



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**NICHOLAS VINICIUS SILVA**

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO LÁTICA DE PROTEÍNAS DO  
PESCADO VISANDO A OBTENÇÃO DE SURIMI ANCHOVADO**

**DOURADOS - MS  
2013**

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO LÁTICA DE PROTEÍNAS DO PESCADO VISANDO  
A OBTENÇÃO DE SURIMI ANCHOVADO**

**NICHOLAS VINICIUS SILVA**

Trabalho de Conclusão do Curso, apresentado a Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, como parte das exigências do curso de Biotecnologia, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo da Fossa Paz

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano  
Fonseca

**DOURADOS - MS  
2013**

Dedico este trabalho de pesquisa a minha família, que sempre através do carinho e compreensão, me incentivou ao longo dos meus estudos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar e me guiar durante toda a minha vida; por me permitir concretizar mais um sonho e dar mais um passo em minha caminhada. Por me ter concedido saúde, dedicação e perseverança para realizar mais este objetivo.

A meu orientador Dr. Marcelo Fossa da Paz, pela amizade, correções, estímulo, críticas, paciência e confiança. E principalmente pelo apoio necessário para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pelas fundamentais contribuições, críticas, sugestões e por ter disponibilizado os equipamentos, materiais necessários para a realização desta pesquisa e pelas bolsas concedidas. Muito obrigado por todo apoio, confiança e por fazer parte desta etapa da minha vida! Muito obrigado!

A professora Dr<sup>a</sup>. Danielle Marques Vilela, pela contribuição fundamental no início deste trabalho e por estar sempre disposta a me ajudar. Muito obrigado!

A professora Dr<sup>a</sup>. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá e Msc. Janina Zanoni Camargo, por aceitarem participar desta defesa, enriquecendo este trabalho.

A toda minha família, pelo amor, bondade, estímulo, apoio incondicional para minha formação. Obrigado por estarem sempre presente ao meu lado apesar da distancia, por acreditarem e mim e pelo auxílio em todas as decisões e estímulo sempre presentes nos momentos difíceis, elevando minha autoconfiança e certeza da capacidade de realização, Obrigado pelo carinho e amor! Amo vocês incondicionalmente!

Aos grandes amigos do Laboratório de Análises Químicas de alimentos da FAEN: Roberto, Cinthia, Rosemarie, Ana Claudia, Cataline, Aline, Camila, Valkirea, Kauyse, Maria Eugênia, Suéllen e Maria Priscila por todo auxílio, companhia, compreensão, incentivo, pelos inúmeros momentos de alegria e pela amizade especial compartilhada nos mais diferentes momentos,. Especialmente aos amigos Janina e Roberto pelos momentos inesquecíveis durante as madrugadas, finais de semana e principalmente pelo companheirismo, amizade, apoio e ensinamentos. Muito obrigado a todos e desejo que todos realizem seus objetivos e que suas vidas sejam repletas de muito sucesso e realizações.

Aos técnicos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e da Faculdade de Ciências Biológicas e ambientais: Fabiana, Priscila, Andressa. Muito obrigado pelas orientações e auxílio durante todo o período de realização deste experimento, e principalmente pela compreensão, amizade e dedicação.

Aos amigos: Mônica Ansilago, Francielle Antonelli, Danielly Beraldo, Luiz Augusto, Suellen Ramalho, Igor Chiarelli, Edinaldo, Elton Felipe, Lara Endres, Suelen Moreira, Patrícia Gonzales, Thays Nogueira, Jéssica Casagrande, Pierre Louis, Valeska Lopes, Nathália Lopez, Albneir Souza, Gabriela Finoto, Geovana Dantas e Júlio Paiva por todos os momentos compartilhados, confiança, apoio, carinho, companhia, por serem grandes amigos e estarem presentes em momentos emocionantes, especiais e inesquecíveis da minha vida.

As meus amigos, Nayara, Nighel, Nelly, Henrique Zorzi, Eduardo, Vinicius, Rodolfo pela companhia, convivência, brincadeiras, momentos de alegrias e amizade fundamentais durante este período de graduação.

Agradeço também aos grandes amigos Elisangela, Vanessa Calado, Cássia Tigre, Marichel Canazza, Nilda Hoffman, Gisele, Bruna Cárceres e Camila pela grande amizade, companhia, conselhos e conquistas que alcançamos juntos durante este período. Vocês foram fundamentais para que esta pesquisa fosse realizada.

A todas as pessoas e situações que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, as quais participaram da minha formação como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão.

Este trabalho somente foi concretizado com a participação fundamental de cada um de vocês! Muito obrigado!

Nicholas

*“Aprendi que são os pequenos acontecimentos diários  
que tornam a vida espetacular.”*

*(William Shakespeare)*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>2.0 OBJETIVOS</b> .....	8
2.1 Objetivo Geral .....	8
2.2 Objetivos Específicos .....	8
<b>3.0 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	9
3.1 Bactérias lática.....	9
3.2 Via de fermentação das hexoses.....	10
3.2.1 Bactérias láticas homofermentativas .....	11
3.2.2 Bactérias láticas heterofermentativas .....	12
3.3 Gênero <i>Lactobacillus</i> .....	13
3.3.1 <i>Lactobacillus casei</i> .....	17
3.3.2 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	17
3.3.3 <i>Lactobacillus brevis</i> .....	18
3.4 Gênero <i>Leuconostoc</i> .....	19
3.4.1 <i>Leuconostoc lactis</i> .....	21
3.5 Gênero <i>Weissella</i> .....	21
3.5.1 <i>Weissella viridescens</i> .....	24
3.6 Metabólitos .....	25
3.6.1 Produção de dióxido de carbono e Etanol .....	26
3.6.2 Ácidos orgânicos e pH.....	27
3.6.3 Peróxido de hidrogênio.....	28
3.6.4 Diacetil .....	29
3.6.5 Bacteriocinas .....	30
3.7 Fermentação do pescado.....	31
3.8 Anchovas .....	32
3.9 Carne Mecanicamente Separada (CMS).....	32
3.10 Surimi .....	33
<b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
Parâmetros Cinéticos e Perfil de Metabólitos Excretados por Bactérias Lálicas em Caldo MRS.....	35

4.1	Microrganismos .....	35
4.2	Ativação e manutenção dos microrganismos .....	35
4.3	Meio de cultivo .....	37
4.4	Preparação do inóculo para cinética .....	37
4.4.1	Pré-inóculo .....	37
4.4.2	Cultivo principal .....	37
4.5	Determinação do pH .....	37
4.6	Monitoramento do crescimento dos cultivos .....	38
4.7	Amostragem e preparo das amostras .....	38
4.8	Determinação da taxa de crescimento, conversão de substrato a células e consumo de substrato durante a fase exponencial de crescimento. ....	38
4.9	Determinação da concentração de metabólitos .....	39
4.10	Avaliação do número de células viáveis no inóculo.....	39
5.0	Processamento do concentrado proteico.....	40
5.1	Tratamento do concentrado proteico .....	40
5.2	Pasteurização do Concentrado Proteico .....	40
5.3	Preparação do inóculo para fermentação .....	41
5.3.1	Pré-inóculo .....	41
5.3.2	Inóculo .....	41
5.3	Fermentação do Concentrado Protéico .....	42
5.4	Determinação do pH durante a fermentação .....	43
5.5	Monitoramento do processo fermentativo e coleta de amostras.....	43
6.0	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
6.1	Cinéticas de crescimento .....	46
6.2	Metabolismo de carboidratos.....	48
6.3	Produção de ácido lático, ácido acético e redução do pH .....	51
7.0	Análise da textura, cor, odor e acidez.....	56
8.0	<b>CONCLUSÕES</b> .....	61

## RESUMO

As bactérias lácticas são conhecidas pela sua capacidade de produzir diferentes metabólitos considerados antibacterianos, incluindo ácidos orgânicos, bacteriocinas, diacetil, peróxido de hidrogênio e pelas propriedades de alterar as características sensoriais de alimentos, melhorando suas propriedades organolépticas. No presente trabalho, procurou-se avaliar o metabolismo de cinco linhagens de bactérias lácticas em meio MRS (De Man Rugosa e Sharpe) para sua posterior utilização na elaboração de um fermentado láctico de concentrado proteico de pescado. Para o estudo do metabolismo foram realizadas cinéticas de crescimento em meio MRS, acrescido de como fonte de carbono, por períodos de 21 a 27 horas a 30°C. O crescimento bacteriano, consumo de substrato, formação de metabólitos como ácido láctico, ácido acético, etanol foram determinados durante os cultivos. Os resultados mostraram que entre as espécies que mais produziram ácido láctico foram às classificadas como heterofermentativas facultativas, sendo elas, *Lactobacillus rhamnosus* (8,95 g L<sup>-1</sup>) e *Lactobacillus casei subs. casei* com (4,47 g L<sup>-1</sup>). As características obtidas através das fermentações do concentrado proteico foram específicas para cada espécie. Sendo que a produção de gás carbônico foi mais evidente para as espécies *Weissella viridescens* e *Lactobacillus casei subspécie casei*. O pH final se manteve baixo em todos os tratamentos, no entanto, as bactérias *Leuconostoc lactis* e *Weissella viridescens* não apresentaram grande poder de acidificação, quando comparadas as demais espécies utilizadas.

**Palavras chave:** bactérias lácticas, ácido láctico, concentrado proteico de pescado, fermentação láctica.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gêneros de bactérias lácticas e sua morfologia. ....	10
<b>Figura 2.</b> Via Embden-Meyerhoff usada por bactérias do ácido láctico homofermentativas. ...	11
<b>Figura 3.</b> Via da fosfocetolase usada por bactérias lácticas heterofermentativas. ....	13
<b>Figura 4.</b> Classificação do gênero <i>Lactobacillus</i> em grupos de acordo com sua habilidade fermentativa e algumas espécies que os compõem. ....	16
<b>Figura 5.</b> Filogenia de <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> e <i>Weissella</i> . ....	25
<b>Figura 6.</b> Esquema geral da formação de produtos metabólitos importantes à partir do piruvato pelas bactérias lácticas. ....	26
<b>Figura 7.</b> Fluxograma de elaboração do Surimi. ....	34
<b>Figura 8.</b> Características de crescimento das culturas lácticas utilizadas em placa com ágar MRS. Onde: A - <i>Lactobacillus brevis</i> , B - <i>Lactobacillus casei</i> subspécie <i>casei</i> , C - <i>Weissella viridescens</i> e D - <i>Lactobacillus rhamnosus</i> . ....	36
<b>Figura 9.</b> Característica decrescimento em ágar MRS de <i>Leuconostoc lactis</i> . ....	36
<b>Figura 10.</b> A e B: Concentrado proteico de Tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) após processamento. ....	41
<b>Figura 11.</b> Modelo do biorreator utilizado para o processo fermentativo. Em detalhes: A e B - componentes protetores, C e D – sistema completo. ....	44
<b>Figura 12.</b> A - concentrado proteico após pasteurização sem a presença de inóculo, B - biorreator finalizado com a presença de inóculo e substrato. ....	45
<b>Figura 13.</b> Curvas de crescimento e de pH de BAL em caldo MRS. ....	47
<b>Figura 14.</b> Consumo de substrato (glicose) e curvas de crescimentos. ....	48
<b>Figura 15.</b> Perfil de metabólitos excretados (ácido láctico, ácido acético e etanol) pelas BAL durante o crescimento em caldo MRS. ....	49
<b>Figura 16.</b> Curva de produção de ácido láctico pelos microrganismos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> e <i>Weissella viridescens</i> em caldo MRS. ....	52
<b>Figura 17.</b> Curva de produção de ácido acético pelas bactérias <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> e <i>Weissella viridescens</i> em caldo MRS. ....	53

**Figura 18.** Características da textura final do concentrado proteico fermentado. A - tratamento com *Weissella viridescens*, B - Tratamento com *Leuconostoc lactis*, C - tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* e C - tratamento com *Lactobacillus casei* subspécie *casei*.....59

**Figura 19.** Formação de bolhas de gás carbônico por bactérias Lácticas. A - *Weissella viridescens*; C - controle, B - *Lactobacillus casei* subspécie *casei*.....60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nova designação dos microrganismos que compõem o gênero <i>Weissella</i> . ....	22
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de bactérias do ácido láctico em caldo MRS tendo glicose como carboidrato fermentescível.....	46
Tabela 3 - Produção de ácido láctico ( $\text{g.L}^{-1}$ ), ácido acético ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e etanol ( $\text{EtOH g.L}^{-1}$ ) por diferentes linhagens de bactérias lácticas em caldo MRS, sob temperatura de 30°C e agitação de 215 rpm.....	51
Tabela 4 - Representação da produção máxima de metabólitos, e correlação com o tempo de detecção e duração da cinética microbiana, em meio MRS, sob 30°C e agitação de 215 rpm.	55
TDM: tempo de detecção do metabólito, TDC: tempo de duração da cinética.....	55

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. Cromatograma de compostos presentes no caldo MRS analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sendo 1: glicose; 2: Ácido Lático; 3: Ácido acético apresentaram, respectivamente, os seguintes tempos de retenção: 9.96 min; 13,3 min e 15,8 min. Os demais picos na amostra, não foram identificados. .... 84
- Anexo 2. Cromatograma de compostos presentes no caldo MRS durante a cinética de crescimento, após inoculação (tempo 0 horas) de *Lactobacillus rhamnosus*, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sendo 1: glicose; 2: Ácido Lático; 3: Ácido acético e 4: etanol apresentaram, respectivamente, os seguintes tempos de retenção: 9.96 min; 13,3 min; 15,8 min e 21,7 min. Os demais picos na amostra, não foram identificados. .... 85
- Anexo 3. Cromatograma de compostos presentes no caldo MRS durante a cinética de crescimento, após inoculação (tempo 27 horas) de *Lactobacillus rhamnosus*, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sendo 1: glicose; 2: Ácido Lático; 3: Ácido acético e 4: etanol apresentaram, respectivamente, os seguintes tempos de retenção: 9.96 min; 13,3 min; 15,8 min e 21,7 min. Os demais picos na amostra, não foram identificados. .... 86

## 1.0 INTRODUÇÃO

O interesse por subprodutos da indústria pesqueira, está sendo considerado como uma potencial fonte de recursos para exploração racional ao invés destes serem descartados como resíduos (ARVANITOYANNIS; KASSAVETI, 2008).

No Brasil, o aproveitamento de resíduos de pescados é ainda pequeno e o seu descarte inadequado gera graves problemas ambientais (PESSATTI, 2001). Desta forma há a necessidade de desenvolver metodologias e tecnologias para o aproveitamento destes recursos de forma simples e barata. Um das alternativas é a utilização concentrado proteico de pescado, que possui alto valor nutritivo e baixo custo de matéria-prima empregada, e benefícios para a saúde. Por apresentar baixo teor de gordura, evita-se a ingestão de gorduras saturadas causadoras de alto colesterol, obesidade e outras consequências negativas a saúde (CAMILO et al. 2011).

Uma grande vantagem na utilização do concentrado está na comercialização do pescado como um produto de primeira qualidade (CAMILO et al. 2011).

A Carne Mecanicamente Separada (CMS) de pescado é um produto intermediário obtido através do processo de separação mecanizada do material comestível proveniente de uma única espécie de pescado ou de uma mistura de espécies que possuem características sensoriais parecidas, no processo o produto gerado é constituído de partículas de músculo esquelético desprovidas de vísceras, ossos e pele. Este produto é utilizado como matéria-prima na obtenção de concentrado proteico, produtos empanados, hambúrguer (NEIVA, 2006).

A anchovagem, a silagem e fermentação do pescado são técnicas que utilizam microrganismos que causam efeitos bioquímicos e biológicos sobre estes alimentos, resultando em produtos com definições sensoriais, nutricionais e probióticas de elevada importância funcional (DAESCHEL, 1989; SANTO, 2003).

Os microrganismos presentes nos produtos fermentados de pescado são provenientes de quatro fontes: naturais do próprio pescado, da água do mar, do solo e de contaminantes oriundos das manipulações e equipamentos usados para a pesca e processamento (SOUZA et al. 2006).

As bactérias lácticas são amplamente utilizadas na produção de queijos, leites e fermentados, como o vinho e são de grande interesse, pois são capazes de produzir outras substâncias inibidoras além de ácidos orgânicos, antagônicos a outros microrganismos. Essas substâncias são produzidas em pequena quantidade e incluem peróxido de hidrogênio,

diacetil, bacteriocinas e produtos de reações secundárias como hipotiocianatos; obtidos geralmente pela ação da lacto-peroxidase sobre o  $H_2O_2$ , e os tiocianatos (DAESCHEL, 1989).

A utilização da fermentação anaeróbica associada às bactérias lácticas há a interrupção temporária ou definitiva dos processos bioquímicos oxidativos e a deterioração microbiana. Desta forma, tem-se despertado um grande interesse na utilização destes microrganismos para a transformação de alimentos provenientes de pescado para o consumo.

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver um fermentado láctico a partir do concentrado proteico.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Desenvolver e avaliar a atividade de diferentes bactérias lácticas e o seu efeito na fermentação de concentrado proteico de tilápia (*Oreochromis niloticus*);
- Realizar os parâmetros cinéticos de crescimentos das culturas lácticas utilizadas;
- Quantificar e avaliar o perfil de metabólitos (ácido láctico, ácido acético e etanol) produzidos pelas bactérias lácticas;
- Avaliar os produtos obtidos via processo fermentativo.

### 3.0 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Bactérias lática

As bactérias láticas são um grupo heterogêneo de microrganismos com espectro antibacteriano, com modo de ação e propriedades químicas específicas. São caracterizadas como Gram positivas; o que é muito importante para a diferenciação de outros microrganismos, citocromo ausente, não esporogênica, anaeróbia facultativa, catalase; oxidase e gelatinase negativas, com morfologia de cocos ou bastonetes que geralmente não apresentam mobilidade, são tolerantes a pH baixo, não possuem a capacidade de reduzir nitrato a nitrito, mas possuem a capacidade de utilizar o lactato, são muito exigentes quanto a nutrientes e possuem como principal ou único produto do metabolismo de carboidratos a síntese de ácido lático (POFFO e M. DA SILVA, 2011). Quanto à temperatura de crescimento são divididas em mesofílicas, com crescimento a uma temperatura ótima de 30°C e em termofílicas com crescimento a uma temperatura ótima de 42°C (FOX et al., 2000; SILVA JR., 2002).

Este grupo é composto por 12 gêneros, são eles *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY, 2005).

São geralmente encontradas em ambientes rico em nutrientes como produtos lácteos, carnes e vegetais, sendo também associadas ao solo, à pele e mucosa de mamíferos (LÓPEZ-DÍAZ et al. 2000; SAVADOGO et al. 2006).

São conhecidas por apresentarem características de interesse biotecnológico e pela produção de diversos metabólitos antibacterianos, incluindo ácidos orgânicos, bacteriocinas, diacetil, peróxido de hidrogênio, ácido lático e reuterina (SOUZA et al. 2006; COSTA, 2006). As bactérias láticas são capazes de sintetizar outras substâncias que são consideradas antagonicas a microrganismos contaminantes. No entanto, esses metabólitos são produzidos em pequena quantidade. O peróxido de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas, hipotiocianatos e os tiocianatos são alguns exemplos (SOUZA et al. 2006). As bactérias do ácido lático (BAL) são amplamente utilizadas na produção de queijos e leites fermentados e desempenham uma importante função na elaboração de alimentos, pois produzem efeitos bioquímicos e biológicos que favorecerem características sensoriais e tecnológicas. Também são importantes, pois são responsáveis em promover a conservação, devido à competição e inibição de contaminantes (JACOBSEN et al. 1999; MADERA et al. 2003)

Quando são isoladas da carne e de seus produtos derivados são as que provavelmente apresentam as melhores características para melhorar a segurança microbiológica desses alimentos, isto se deve pelo fato de estarem habituadas às condições impostas pelo meio proteico, assim são consideradas mais efetivas do que as bactérias lácticas de outras origens (JEPPESEN; HUSS, 1993).

Algumas BAL isoladas de produtos lácteos e utilizadas na indústria de carnes apresentam poder de inibição a microrganismos patogênicos e deteriorantes como *Staphylococcus* sp., *Listeria* sp., *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e bactérias do grupo coliforme (Figura 1) (ALEXANDRE et al. 2002; CARIDI et al. 2003; GUEDES NETO et al. 2005).

Gêneros	Morfologia
<i>Aerococcus</i>	Cocos, pares/ aglomerados/ tétrades
<i>Atopobium</i>	Bacilos, pares
<i>Bifidobacterium</i>	Pleomorfos
<i>Brochothrix</i>	Cocos, ovóides/ pares
<i>Carnobacterium</i>	Bacilos, pares
<i>Enterococcus</i>	Cocos, isolados/ cadeia
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos, isolados/ pares/ cadeia
<i>Lactococcus</i>	Cocos, pares/ cadeias curtas
<i>Leuconostoc</i>	Cocos, ovóides/ pares/ cadeias curtas
<i>Oenococcus</i>	Cocos, ovóides/ pares
<i>Pediococcus</i>	Cocos, tétrades
<i>Streptococcus</i>	Cocos, isolados/ cadeias de tamanhos variados
<i>Tetragenococcus</i>	Cocos, ovóides/ pares/ tétrades
<i>Vagococcus</i>	Cocos, ovóides/ pares, tétrades
<i>Weissella</i>	Cocos, ovóides/ pares

**Figura 1.** Gêneros de bactérias lácticas e sua morfologia.  
Fonte: FERREIRA, 2003.

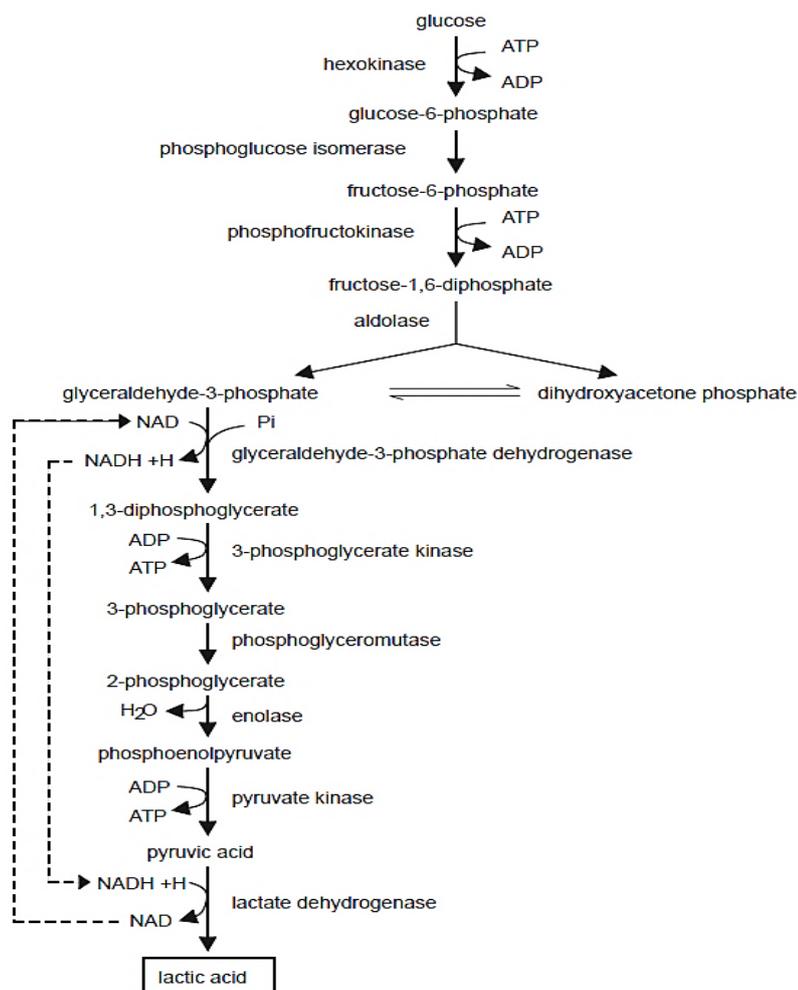
### 3.2 Via de fermentação das hexoses

O grupo das bactérias lácticas é classificado de acordo com o metabolismo fermentativo das hexoses e produtos sintetizados. As homofermentativas; produzem 85% de ácido láctico a partir da glicose as heterofermentativas que produzem 50% de ácido láctico e pequenas quantidades de etanol, ácido acético e dióxido de carbono a partir da glicose. As bactérias do ácido láctico homoláticas produzem ácido láctico como produto final principal da fermentação

de hexoses, enquanto que as bactérias heterofermentativas sintetizam outros metabólitos advindos do consumo da glicose (CARR et al. 2002). As bactérias lácticas podem realizar a fermentação dos açúcares por diferentes rotas, no entanto o que as difere enquanto ao metabolismo, homolático ou heterolático, é a forma em que é efetuada a clivagem do esqueleto de carbono, que resulta em diferentes metabólitos.

### 3.2.1 Bactérias lácticas homofermentativas

O grupo das bactérias homofermentativas obrigatórias compreende aquelas que fermentam a glicose (hexoses) exclusivamente em ácido láctico e não fermentam pentoses e gliconato. São exemplos as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus helveticuse* *Lactobacillus salivarius*.



**Figura 2.** Via Embden-Meyerhoff usada por bactérias do ácido láctico homofermentativas.  
Fonte: HUTKINS, 2006.

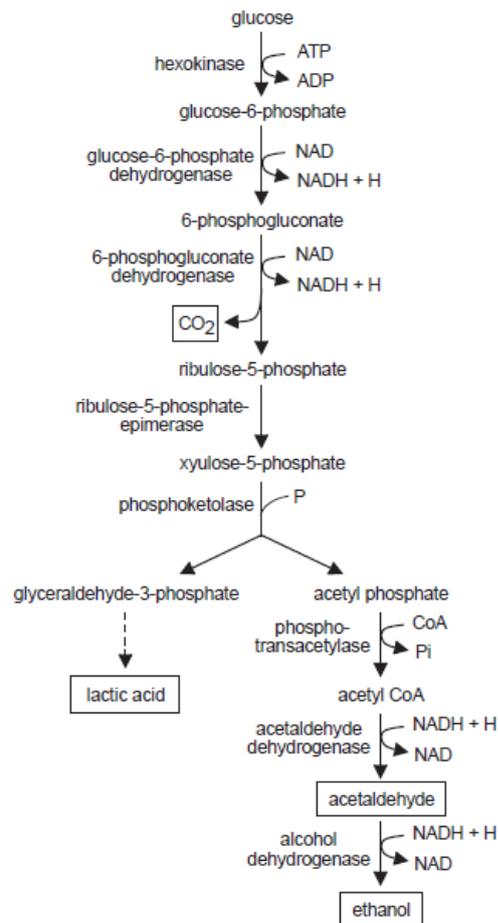
Essas bactérias fermentam a glicose, pela via glicolítica, conhecida como Embden-Meyerhof-Parnas, onde há a formação de frutose 1,6-difosfato (FDP), que é clivada pela enzima aldolase em dihidroxiacetone-fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-Fosfato (GAP) (FONTES, 2009). Nesta via, a enzima lactato desidrogenase reduz o piruvato a ácido láctico (Figura 2). Desvios nessa rota metabólica podem levar à formação de outros compostos como acetato, etanol, acetona, diacetil e 2,3 – butanodiol (Figura 3). Na fermentação homolática, para cada 1 mol de glicose metabolizado, são gerados 2 mol de ácido láctico e 2 mol de ATP (CAPELLARI, 2010).

### 3.2.2 Bactérias lácticas heterofermentativas

Enquanto as bactérias lácticas homofermentativas utilizam a via glicolítica, as bactérias heterofermentativas, utilizam a via oxidativa das pentoses fosfato, conhecida como via fosfatoaldolase para fermentação das hexoses (WISSELINK et al. 2002). Em condições de anaerobiose as hexoses são convertidas em quantidades equimolares de ácido láctico, etanol, ou ácido acético, gás carbônico e ATP. Estas bactérias não apresentam a enzima frutose 1,6-difosfato aldolase, desta forma realizam a oxidação de glicose-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, que posteriormente sofre descarboxilação; perda de uma molécula de gás carbônico, o que resulta na formação de xilulose5-fosfato, que é clivada em gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato (WEYMARN, 2002). Finalmente, o gliceraldeído-3-fosfato será o precursor para a formação de moléculas de lactato e acetil-fosfato o precursor que poderá ser transformado em etanol ou acetato, sendo que quando o acetil-fosfato é convertido para acetato pode ser formado 1 mol de ATP adicional. Nesta rota, 1 mol de glicose é transformado em quantidades equimolares de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono e de 1 mol de ATP (Figura 3) (COGAN; JORDAN 1994).

Bactérias heterofermentativas incluem *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus Reuteri*, *Oenococcus oeni* e *Weissella viridescens*.

As BAL heterofermentativas, são bastante utilizadas em alimentos por possuírem a capacidade de produzir compostos flavorizantes. Isto ocorre porque durante o processo de conversão de hexose em pentose, essas bactérias sintetizam substâncias aromáticas, como aldeído e diacetil (CARR et al. 2002). Entretanto, quando comparadas com as bactérias homofermentativas, a quantidade de ácido produzido é muito menor.



**Figura 3.** Via da fosfoacetolase usada por bactérias lácticas heterofermentativas.  
 Fonte: HUTKINS, 2006

### 3.3 Gênero *Lactobacillus*

As bactérias que compõem o gênero *Lactobacillus* são consideradas de extrema importância para a indústria de alimentos, pois são utilizadas em leites fermentados como culturas iniciadoras em processos fermentativos ou em iogurtes na forma de próbiótico (Kandler, 1983). Este grupo é considerado fisiologicamente, bioquimicamente e geneticamente diverso, pois são encontrados em diversos habitats exceto em ambientes considerados muito extremos para o seu desenvolvimento (HUTKINS, 2006). Estão presentes também em vários tipos de alimentos (cereais, bebidas fermentadas, queijos e produtos lácteos, carnes e derivados (HAMMES; HERTEL, 2002).

O grupo dos lactobacilos podem ser classificados em três grupos de acordo com o produto final de sua fermentação e temperatura de crescimento (FOX et al., 2000). Orla-Jensen, em 1919, dividiu *Lactobacilli* em três grupos; denominou o primeiro grupo de Thermobacterias, o segundo de Streptobacterias e o último de Betabacterias (HAMMES; VOGEL, 1995; CARR et al. 2002).

O primeiro grupo, Thermobacteria é formado por lactobacilos homofermentativos hemofílicos que utilizam as hexoses para produzir ácido láctico, sendo que difere dos demais grupos por crescer a 45°C, não fermentar ribose, não hidrolisar arginina e não crescer á 15°C, são exemplos *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus helveticus* (CARR et al., 2002)

No segundo grupo, Streptobacteria estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos facultativos, que utilizam outras fontes de carbono além de hexoses (HASSAN; FRANK, 2001), sendo capazes de produzir ácido láctico, ácido acético, CO<sub>2</sub>, álcool e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este grupo inclui *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum*.

O terceiro grupo, Beta bactéria contém os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos que utilizam, obrigatoriamente, hexoses e pentoses como fonte de carbono, tendo crescimento ótimo à 15°C e hidrolisam arginina. Esses microrganismos são responsáveis por produzir sabores indesejáveis e gás durante o processo fermentativo (HASSAN e FRANK, 2001). Neste grupo estão incluídos *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*.

Os lactobacilos são caracterizados como Gram-positivos, possuem a forma de bastonetes ou cocobacilos, anaeróbias aerotolerante, incapazes de formar esporos, geralmente imóveis, catalase negativa e crescem na faixa de temperatura que varia entre 2 e 53°C (FERREIRA, 2003). Pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae. Os lactobacilos são nutricionalmente fastidiosos, necessitando de um meio rico em nutrientes que seja constituído de carboidratos, peptídeos, vitaminas, sais, aminoácidos, ácidos graxos e derivados de ácidos nucléicos (CARR et al., 2002). Desta forma, as condições ótimas para o cultivo de representantes deste grupo inclui meios ricos com pH entre 6,4 e 4,5, sendo pH ótimo 5,0; cultivo em microaerofilia ou aerobiose, sendo que o aumento concentração de CO<sub>2</sub>, entre 5 e 10%, pode estimular o crescimento e temperaturas em torno de 15 à 45°C (GARRITY et al., 2005). Alguns são extremamente tolerantes ao sal, baixa atividade de água e pressão osmótica. A tolerância a ambientes ácidos

é uma característica comum deste grupo, sendo que muitas espécies preferem crescer em pHs ácidos e alguns também são tolerantes a etanol e a bile (HUTKINS, 2006).

Segundo Costa (2006) o fator limitante no desenvolvimento de lactobacilos é devido à tensão elevada de gás carbônico do que ao teor de acidez ou abaixamento de tensão de oxigênio. Sendo que a mudança gradativa de população microbiana pode ser condicionada a elevação da tensão de gás carbônico. Desta forma, a seletividade pode estar relacionada à tolerância a CO<sub>2</sub> e resistência à acidez elevada.

De acordo com J. P. Euzéby (2011) o gênero lactobacilos é composto por cerca de 180 espécies, sendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei* as espécies mais utilizadas em processos industriais (GOMES, 1999).

Para o cultivo o meio comumente utilizado para lactobacilos são o de “Man Rogosa Sharpe” (MRS) (De MAN *et al.* 1960), “Rogosa ágar” (ROGOSA *et al.* 1951) e ágar seletivo lactobacilos (LBS). MRS, LBS Rogosa são considerados mais eficazes para o isolamento de lactobacilos a partir de produtos alimentares fermentados, pelo fato de serem predominantes nesses ambientes.

As espécies de *Lactobacillus* podem ser encontradas em diversos ambientes. São considerados representantes naturais de produtos hortícolas, produtos lácteos, carne e derivados, suco e bebidas fermentadas e em cereais. Os *Lactobacillus* são encontrados compondo a microbiota de alimentos fermentados, como o queijo, iogurte, salame, pickles, molhos ácidos entre outros (JAY, 1996).

Os *Lactobacillus* apresentam o metabolismo mais diversificado do que outros gêneros de bactérias lácticas, sendo classificadas de acordo com a via de fermentação do carboidrato. São fermentadores da glicose sendo, a grande maioria, considerada homofermentativos obrigatórios tendo, como produto final do metabolismo de hexoses, o ácido lático se são incapazes de fermentar pentoses. Já os heterofermentativos obrigatórios, utilizam hexoses para sintetizar ácido lático, ácido acético, dióxido de carbono e o etanol em concentrações equimolares e as pentoses para obter ácido lático e acético (VANDAMME *et al.*, 1996; JAY 1996). No entanto, foi observado que algumas espécies deste gênero fermentam os açúcares em ambas as vias homolática e heterolática (Figura 4), estas espécies são denominadas de heterofermentativas facultativas e convertem hexoses em ácido lático e algumas espécies em certas circunstâncias, como a limitação de glicose, algumas espécies podem converter as hexoses em ácido lático, ácido acético, ácido fórmico e etanol, sendo capazes também de sintetizar ácido lático e ácido acético através da fermentação de pentoses (KANDLER *et al.*

1986; HUTKINS 2006; COSTA 2006). As espécies: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* compartilham esta característica.

Grupo I	Grupo II	Grupo III
Homofermentativo	Heterofermentativo	Heterofermentativo
Obrigatório	Facultativo	Obrigatório
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. bavaricus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. celobiosus</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fructivorans</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. hilgardii</i>
<i>L. delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. panis</i>
<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. paracasei ssp. Tolerans</i>	
<i>L. kefirifaciens</i>	<i>L. plantarum</i>	
<i>L. salivarius ssp. salivarius</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. salivarius ssp. salicinus</i>		

**Figura 4.** Classificação do gênero *Lactobacillus* em grupos de acordo com sua habilidade fermentativa e algumas espécies que os compõem.

Fonte: FERREIRA, 2003.

A utilização dos lactobacilos em alimentos é considerada segura (LEE e SALMINEN, 1995). Estudos mostram que representantes do grupo dos *Lactobacillus* são benéficos a saúde, auxiliando no tratamento de inúmeras doenças, como infecções entéricas, síndromes relacionadas ao uso de antibióticos e diarreias (SAZAWAL et al., 2006) e infecções do trato urogenital em mulheres (FALAGAS et al., 2007). Tem-se empregado lactobacilos como vetores vacinais para toxinas tetânicas (GRANGETTE et al. 2001), antígenos protetores e pneumocócicos (OLIVEIRA et al. 2003; 2006; CHOI et al. 2002; KAJIKAWA et al. 2007), receptores para o HIV (CHANG et al. 2003) e outros determinantes virais (LEE et al., 2007). Sendo que os resultados obtidos evidenciaram a eficiência como veículos vacinais.

Pelo fato de muitas espécies de lactobacilos serem encontradas no trato gastrointestinal de animais e humanos conduziu a sugestão de que estas bactérias poderiam possuir atividade probiótica (HUTIKINS, 2006). Muitos microrganismos probióticos foram extensivamente estudados pelos benefícios à saúde, principalmente relacionados ao trato gastrointestinal. *Lactobacillus* passaram a ser selecionados para a utilização como probióticos, principalmente como tratamento alternativo para a prevenção de doenças orais, como cáries dentárias, mau hálito e doenças periodontal (TEUGHELIS et al., 2008).

### 3.3.1 *Lactobacillus casei*

A espécie *Lactobacillus casei* pertence ao grupo Streptobacterium, é usualmente encontrada no leite, queijo, derivados lácteos e em carnes. A espécie é utilizada na fabricação de queijos e tem sido extensamente utilizada como probiótico devido às ações benéficas exercidas ao trato intestinal. Em queijo a produção de metabólitos representa uma característica de extrema importância no desenvolvimento do *flavour* e devido a presença da enzima peptidase, esta bactéria possui a capacidade de degradar peptídeos, inclusive os constituídos de muitos aminoácidos hidrofóbicos e derivados de amino e peptídeos sulfurados, considerados responsáveis pelo sabor amargo em queijos maturados (MARTÍNEZ-CUESTA et al., 2001).

Apresentam-se na forma de bastonetes, com cerca de 0,7 a 1,1 µm de largura e 2,0 a 4,0 µm de comprimento, com tendência em formar cadeias. O crescimento não é verificado acima de 45 °C e são comumente isolados de produtos de origem láctea, silagem, esgoto e no trato intestinal humano. Essa espécie não apresenta atividade carboxipeptidase, sendo característica fisiológica apresentarem uma maior atividade amino e dipeptidase do que tripeptidase (KANDLER et al., 1986). Para o crescimento estes microrganismos requerem riboflavina, ácido fólico, pantotenato de cálcio e niacina.

*Lactobacillus casei* possui metabolismo heterofermentativo facultativo, realizando a fermentação das hexoses para a produção de ácido láctico e em certas circunstâncias para a produção de ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico e etanol, sendo capaz também de metabolizar ácido láctico e ácido acético através da fermentação de pentoses (KANDLER; WEISS, 1986; HUTIKINS, 2006; COSTA, 2006; COSTA et al., 2008).

### 3.3.2 *Lactobacillus rhamnosus*

Esta bactéria do ácido láctico é considerada importante como probiótico e é conhecido o possuem atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli* (SAITO et al., 1980; LING et al., 2006). Cepas de *L. rhamnosus* são usualmente muito utilizadas para a fabricação de iogurtes (SCHILLINGER, 1999).

*Lactobacillus rhamnosus* apresenta-se em forma de bacilos, são gram-positivas, não esporuladas, desprovidas de citocromos, anaeróbias facultativas (HOLZAPFEL et al., 2001). Não apresentam crescimento a 10°C, porém alguns representantes crescem a 15 e 45. São heterofermentativas facultativas, produzindo a forma L (+) do ácido láctico e não hidrolisa

arginina e ureia, mas hidrolisam esculina. Esses microrganismos possuem a capacidade de fermentar glicose, ramnose, manose, manitol, trealose, frutose, arabinose, ribose, celobiose, maltose, amidalina, arbutina, galactose, beta-gentiobiose, gluconato, sorbitol, N-acetilglicosamina, salicina, turanose e melezitose. (CARR et al., 2002).

Essas bactérias lácticas são utilizadas pela indústria na produção do diacetil e da acetoína, substâncias que conferem aos alimentos sabores amanteigados. Quando cultivadas em meio com grande disponibilidade de carboidrato, o açúcar é metabolizado rapidamente a ácido láctico, o entanto quando o açúcar é esgotado, estes microrganismos realizam um desvio no metabolismo e passam a utilizar o lactato como fonte de carbono principal (POOLMAN et al., 2004).

A espécie *L. rhamnosus* possui a capacidade de colonizar vários ambientes, pode ser encontrado nos laticínios, vegetais, alimentos deteriorados, boca, trato intestinal, ensilagem e esgoto (FELIS et al., 2001; STILES; HOLZAPFEL, 1997; HAMMES; HERTEL, 2002).

### **3.3.3 *Lactobacillus brevis***

São microrganismos heterofermentativos, gram-positivos, não esporulantes, raramente com motilidade, anaeróbios facultativos, catalase negativa, com forma de bastonetes com 2,0-4,0 µm de largura e 0,7-1,0 µm de comprimento, isolados ou em pequenas cadeias e com temperatura ótima entre 30°C a 40°C, tendo crescimento positivo a 15°C e crescimento negativo a 45°C, o pH ótimo para crescimento está na faixa de 5,5 - 5,8 (AMORIM, 2003).

*Lactobacillus brevis* é encontrado em materiais de origem vegetal, chucrute, queijo, bebidas, leite, silagem, fezes, boca, esterco, sendo isolados também do trato intestinal humano e de ratos (KANDLER; WEISS, 1986; SALMINEN; WRIGHT, 1993). Esta espécie é frequentemente utilizada como cultura iniciadora em silagens, “sourdough” e na fermentação láctica de cerveja. Estas bactérias são resistentes a substâncias, como a isohumulona, que são presentes em cervejas, essa característica permite o crescimento destes microrganismos neste produtos (RICHARDS; MACRAE, 1964). É conhecido que em vinhos algumas cepas realizam a produção de aminas biogênicas por meio da reação de descarboxilação de aminoácidos precursores, isto é possível através da reação com enzimas específicas presentes no substrato (TEN BRINK et al., 1990; MARINÉ-FONT et al., 1995). Alimentos constituídos de níveis elevados de aminas, tais como histamina e tiramina podem causar perturbações toxicológicas (TEN BRINK et al., 1990; MARINÉ-FONT et al., 1995).

Esta espécie é heterofermentativa obrigatória e emprega a via 6-fosfogluconato/*fosfocetolase* mas também possui enzimas glicolíticas (SAIER et al., 1996). Através desta via, estes microrganismos realizam a síntese de ácido láctico, dióxido de carbono e etanol e/ou ácido acético em quantidades equimolares (KANDLER, 1983).

Estudos de mostram que *Lactobacillus brevis* possui a capacidade de consumir mais de uma fontes de carbono simultaneamente e parece existir a ausência de controle hierárquico na utilização de carboidratos (KIM et al., 2009).

### 3.4 Gênero *Leuconostoc*

*Leuconostoc* pertence a família *Leuconostocaceae* e foi descrito originalmente descrito por Van Tieghem em 1878 (HUCKER, 1957). Os representantes deste gênero são caracterizados como gram-positivos, imóveis, não esporulantes, anaeróbios facultativos, sendo encontrados na forma de cocos em pares ou em cadeias (HUCKER et al., 1957, CAMPBELL et al., 1996). São mesofílicos, com crescimento ótimo entre 18°C e 25°C, no entanto, algumas espécies sobrevivem em temperatura abaixo de 10°C.

*Leuconostoc* possui metabolismo heterofermentativo obrigatório, utilizando a via tendo como produto final do metabolismo da glicose ácido láctico D (-), dióxido de carbono (HUCKER, 1957; SINGLETON, 1987). São incapazes de hidrolisar arginina para formar amoníaco, não possuem citocromo, são catalase negativos, não fermentam nitratos e não produzem quantidades de ácido suficiente para coagular o leite. Fermentam a trealose e são resistentes a vancomicina (SHARP, 1972; SHARPE, 1979; SCHILLINGER, 1987; SINGLETON, 1987).

De acordo com Björkroth (2006) o gênero *Leuconostoc* é composto por 10 espécies com 3 subespécies conhecidas de *Leuconostoc mesenteroides*. Elas são *Leuconostoc argentinum* (DICKS et al., 1993), *Leuconostoc carnosum* (SHAW; HARDING, 1989), *Leuconostoc citreum* (Farrow et al., 1989), *Leuconostoc fallax* (MARTINEZ-MURCIA; COLLINS, 1991), *Leuconostoc gasicomitatum* (BJÖRKROTH et al., 2002), *Leuconostoc gelidum* (SHAW; HARDING, 1989), *Leuconostoc kimchi* (KIM et al., 2000a), *Leuconostoc lactis* (GARVIE, 1960), *Leuconostoc mesenteroides* (GARVIE 1979; GARVIE 1983) e *Leuconostoc pseudomesenteroides* (FARROW et al., 1989). As espécies conhecidas como *Leuconostoc cremoris* e *Leuconostoc dextranicum* passaram a ser consideradas subespécies

de *Leuconostoc mesenteroides* (GARVIE, 1983). Foi descoberto que *Leuconostoc amelibiosum* e *Leuconostoc citreum* são as mesmas espécies, assim a designação para a espécie “amelibiosum” foi abandonada (TAKAHASHI et al., 1992).

*Leuconostocs* desempenham uma colocação importante na fermentação de carnes, produtos lácticos, chucrute e picles (KITCHELL et al., 1975; WHITING, 1975; GARVIE, 1984; SCHILLINGER et al., 1987; SINGLETON et al., 1987; JAY, 1992). Apesar de possuírem pequena capacidade de acidificar o ambiente em que estão inseridos, são utilizados juntamente com espécies de *Lactococcus* em produtos lácteos para produzir “flavour” nos alimentos (HASSAN; FRANK, 2001). Em queijos, a síntese de substâncias como diacetil, acetoína e CO<sub>2</sub> a partir do citrato são responsáveis por adquirir características importantes como textura, consistência, formação de olhaduras e pela qualidade organoléptica (DELLAGLIO et al. 1995). As características que fazem do gênero *Leuconostoc* importante representante para os alimentos são: capacidade de sintetizar substância aromatizantes, possuir a habilidade de iniciar a fermentação em vegetais com velocidade superior a outras bactérias lácticas que necessitam produzir ácidos com efeito antagônico em contaminantes concorrentes, possuírem tolerância ao sal e altas concentrações de açúcar, produção de dextrana (MAVHUNG, 2006).

Os representantes deste grupo são geralmente encontrados na superfície e interior de frutos, leite e derivados, plantas e materiais vegetais, carne e derivados. As espécies *Leuconostoc Lactis*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum* foram isoladas de silagem enquanto que do solo, há registro do isolamento de *Leuc. Mesenteroides*, se tem observado a associação desta espécie com a planta cana-de-açúcar (WOOD, 1992; CAMPBELL et al., 1996). *Leuconostoc mesenteroides*, também foi isolado de frutos, bebidas africanas e chucrute. Esta espécie é extremamente importante na fermentação de vegetais, arroz, feijão e farinha trigo (WOOD, 1992; JAY, 1992). *Leuconostoc lactis* é responsável pela fermentação da lactose. No entanto, apesar de terem sido isoladas de diferentes ambientes esse gênero não é considerado amplamente distribuído, pelo fato, de que a maioria dos isolados foram obtidos de produtos lácteos (SNEATH et al., 1986).

A capacidade do gênero *Leuconostoc* em produzir dextrana tem causado sérios problemas para as indústrias de açúcar, pelo fato de a dextrana prejudicar a cor e a aparência do refinado, qualidade e quantidade de produto produzido (CARR et al., 2002)

### 3.4.1 *Leuconostoc lactis*

São caracterizados por apresentar células esféricas e frequentemente lenticulares, com 0,7-1,2 µm de largura e x 0,5-0,7 µm de comprimento, são caracterizados como gram-positivos, sendo encontrados aos pares ou em cadeias, não apresentam motilidade e não esporulam. Possui a característica de fermentar a lactose, são anaeróbios facultativos, sendo a temperatura de crescimento ótima entre 25 e 30°C, a temperatura mínima 10°C e a máxima 40°C. *Leuconostoc lactis* são catalase negativos, não apresentam complexo citocromo, sendo verificado o crescimento negativo em 10% etanol e em pH 4,8. É característica desta espécie a produção de dextrana e o crescimento em pH ótimo 5,5-6,0 (AMORIM, 2003).

### 3.5 Gênero *Weissella*

O gênero *Weissella* pertence à família Leuconostocaceae, ordem Lactobacillales, classe Bacilli e filo Firmicutes (COLLINS et al., 1993). As bactérias pertencentes a este grupo apresentam formato de cocos ou bastonetes, são gram positivos, não esporulantes, microaerófilos, imóveis (CHELO et al., 2010).

Atualmente, o gênero é composto por treze espécies: *Weissella confusa*, *Weissella cibaria*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella kimchii*, *Weissella minor*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella thailandensis* e *Weissella viridescens* (BJÖRKROTH et al., 2002; NAM et al., 2002; FUSCO et al., 2011).

Collins et al. (1993), trabalhando com bactérias presentes em salsichas gregas, estudaram a relação dessas espécies isoladas com espécies reconhecidas do gênero *Leuconostoc*, segundo estes autores um grupo de bactérias acidoláticas isoladas apresentavam características peculiares que não os enquadravam em nenhuma classificação existente. As bactérias lácticas desconhecidas assemelhavam-se ao gênero *Leuconostoc* por produzir ácido láctico D (-), mas diferiam das espécies que compõem este gênero em várias outras características fisiológicas e em vários testes bioquímicos.

A fim de investigar os resultados obtidos, foi realizado o sequenciamento genético das subunidades ribossomais 16S dos microrganismos isolados da salsicha. Através do sequenciamento, e de análises referentes às distâncias evolucionárias ( $K_{nuc}$ ) entre as bactérias lácticas e os microrganismos desconhecidos revelou uma forte relação filogenética entre as cepas desconhecidas, algumas linhagens de *Lactobacillus* e a espécie *Leuconostoc*

*paramesenteroides*. Desta forma, foi proposto o gênero *Weissella* com o intuito de abranger cinco espécies heterofermentativas de *Lactobacillus* e a espécie *Leuconostoc paramesenteroides*. As espécies isoladas da salsicha grega foram classificadas como uma nova espécie denominada de *Weissella hellenica* (VIEGAS, 2008; ALVIM, 2011).

O gênero *Weissella* passou então a englobar as seguintes espécies de *Leuconostoc*: *Weissella confusa* (anteriormente *Lactobacillus confusus*), *Weissella minor* (anteriormente *Lactobacillus minor*), *Weissella kandleri* (anteriormente *Lactobacillus kandleri*), *Weissella halotolerans* (anteriormente *Lactobacillus halotolerans*), *Weissella viridescens* (anteriormente *Lactobacillus viridescens*), *Weissella paramesenteroides* (anteriormente *Leuconostoc paramesenteroides*) e *Weissella Hellenica* (Tabela 1) (COLLINS et al., 1993).

Os representantes desse gênero foram isoladas de diversas fontes, como alimentos fermentados, carnes, vegetais, peixes, solo, além do trato gastrointestinal e vaginal humano e de animais (RENGPIPAT et al., 2008; VALERIO et al., 2009). Muitos representantes foram isolados de alimentos fermentados: *Weissella hellenica* estirpes foram isolados a partir de salsichas fermentadas (COLLINS et al., 1993), *Weissella kimchii* (ENNAHAR e CAI 2004) e *Weissella koreensis* estirpes foram isoladas a partir de Kimchi (CHOI et al. 2002; LEE et al., 2002), *Weissella thailandensis* foram isolados a partir de peixe fermentado (TANASUPAWAT et al., 2000). As exceções são *Weissella soli*, que foram isolado do solo (MAGNUSSON et al., 2002), *Weissella cibaria* que foram isoladas de alimentos fermentados e amostras clínicas (BJÖRKROTH et al., 2002).

Tabela 1 - Nova designação dos microrganismos que compõem o gênero *Weissella*.

<b>Designação anterior como <i>Leuconostoc</i> ou <i>Lactobacillus</i></b>	<b>Atual designação como <i>Weissella</i>*</b>
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Lactobacillus confuses</i>	<i>Weissella confusa</i>
<i>Lactobacillus halotolerans</i>	<i>Weissella halotolerans</i>
<i>Lactobacillus kandleri</i>	<i>Weissella kandleri</i>
<i>Lactobacillus minor</i>	<i>Weissella minor</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Weissella viridescens</i>
NF	<i>Weissella hellenica sp. nov.</i>
NF	<i>Weissella thailandensis sp. nov.</i>

Os representantes desse gênero foram isoladas de diversas fontes, como alimentos fermentados, carnes, vegetais, peixes, solo, além do trato gastrointestinal e vaginal humano e de animais (RENGPIPAT et al., 2008; VALERIO et al., 2009). Muitos representantes foram isolados de alimentos fermentados: *Weissella hellenica* estirpes foram isolados a partir de salsichas fermentadas (COLLINS et al., 1993), *Weissella kimchii* (ENNAHAR e CAI 2004) e

*Weissella koreensis* estirpes foram isoladas a partir de Kimchi (CHOI et al. 2002; LEE et al., 2002), *Weissella thailandensis* foram isolados a partir de peixe fermentado (TANASUPAWAT et al., 2000). As exceções são *Weissella soli*, que foram isolado do solo (MAGNUSSON et al., 2002), *Weissella cibaria* que foram isoladas de alimentos fermentados e amostras clínicas (BJÖRKROTH et al., 2002).

Geralmente o meio utilizado para o crescimento de espécies pertencentes a gênero é o caldo e o ágar MRS, sendo observado o seu crescimento efetivo.

As bactérias que compõem o gênero *Weissella* são consideradas heterofermentadoras obrigatórias, sendo que as hexoses são fermentadas em ácido láctico, etanol e CO<sub>2</sub> ou ácido acético e as pentoses são fermentadas em ácido láctico e acético (GARVIE, 1986). Também são características deste gênero a ausência de catalase e do sistema citocromo. Exceções podem ser observadas nas espécies *Weissella hellenica*, *Weissella paramesenteroides* e *Weissella thailandensis* que produzem ácido láctico D (-), sendo que todas as demais espécies sintetizam isômeros lactato DL a partir da glicose (COLLINS et al., 1993; TANASUPAWAT et al., 2000).

Espécies do gênero *Weissella* tem sido isoladas de inúmeras fontes. *Weissella confusa* é uma das espécies mais comuns em alimentos (FUSCO et al., 2011). A *Weissella paramesenteroides* é encontrada predominantemente em vegetais frescos e desempenha papel fundamental no início da fermentação (BJÖRKROTH et al., 2002). *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica* e *Weissella videscens* são encontradas em carne e derivados (COLLINS et al., 1993; BJÖRKROTH et al., 2002). A espécie *Weissella kandleri* foi isolada inicialmente de plantas do deserto e foi sugerido que este é seu principal habitat (HOLZAPFEL; VAN WYK, 1982). Linhagens de *Weissella soli* foram isoladas a partir de amostras de solo (MAGNUSSON et al. 2002) e *Weissella cibaria* foram isoladas de alimentos fermentados e amostras clínicas (BJÖRKROTH et al. 2002).

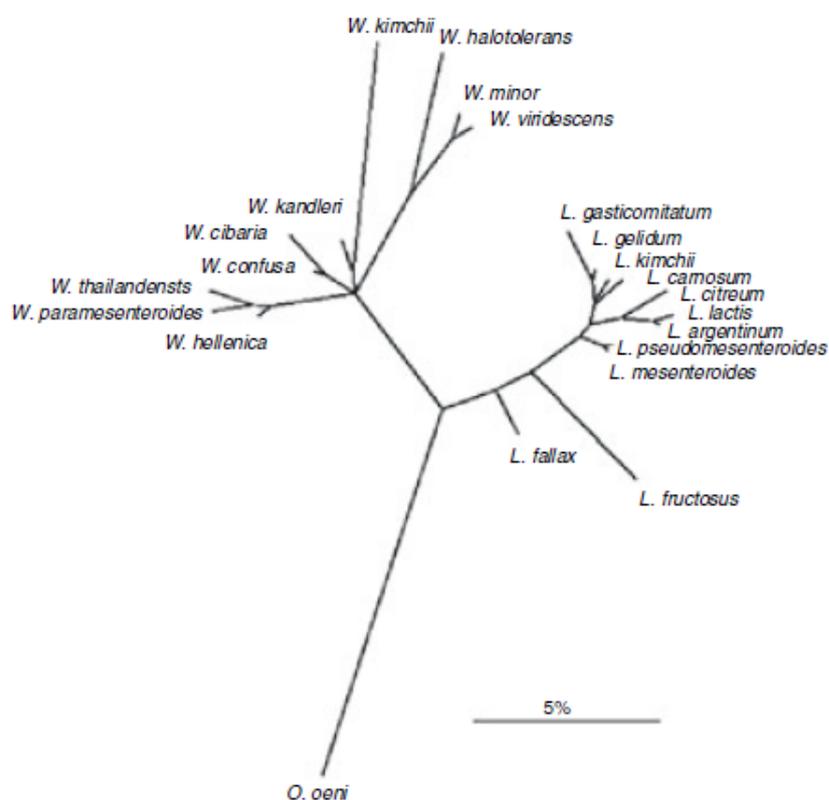
Inúmeros estudos estão sendo realizados para descobrir a possibilidade de utilizar representantes deste grupo de bactérias lácticas para serem utilizados como próbióticos. Estudos utilizando *Weissella kimchii* e *Weissella confusa* mostraram a sua possível utilização como probióticos (NAM et al. 2002; LEE, 2005; AYENI et al. 2011). De acordo com Ayeni et al. (2011) *Weissella confusa* é forte candidata para futuros estudos sobre o seu potencial como próbiótico, no entanto, salienta que novos estudos devem ser realizados para estabelecer a segurança em sua utilização em possíveis aplicações probióticas. A (Figura 5) mostra a correlação filogenética do gênero *Weissella* com outras bactérias lácticas.

### 3.5.1 *Weissella viridescens*

*Weissella viridescens* é um microrganismo caracterizado por apresentar formato de cocos ou bastonetes com 0,8 µm de largura e 2,0 µm de comprimento, ocorrendo aos individualmente ou em pares, é considerada Gram positiva, não possui a capacidade de formar esporos, microaerófila, catalase negativa e isenta de motilidade (NIVEN et al., 1957; CHELO, ZÉ-ZÉ; TENREIRO, 2010).

Quando cultivada em condições de anaerobiose possui a característica de acumular peróxido de hidrogênio. Possui a característica de produzir grande concentração de dióxido de carbono e acumular a o isômero óptico inativo do ácido láctico. O pH final quando cultivado em glicose é aproximadamente 4,5. Está espécie não reduz nitrato, gelatina não é liquefeita, no entanto, fermenta glicose, frutose, maltose, manose e ocasionalmente algumas cepas desta espécie possuem a capacidade de fermentar trealose. Das fermentações dos carboidratos xylose, inulina, sorbitol, rafinose, galactose, arabinose e glicerol não há produção de nenhum ácido (NIVEN e EVANS, 1957).

*Weissella viridescens* tem sido associada à formação de coloração verde em produtos cárneos, isto resulta em graves prejuízos financeiros (NIVEN; EVANS, 1957; MILBOURNE, 1983; COLLINS et al., 1983 ). Este fenômeno é causado pela acumulo de peróxido de hidrogênio oriundo do metabolismo microbiano, onde o baixo potencial de oxidação-redução (O/R) permite o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que reage com o nitrosoemocromo para produzir uma porfirina oxidada e esverdeada. Outro problema é a resistência destas espécies a altas temperaturas, foi demonstrado sua sobrevivência sob temperatura de 68°C por mais de 40 min (NIVEN et al., 1954; BORCH et al., 1988)



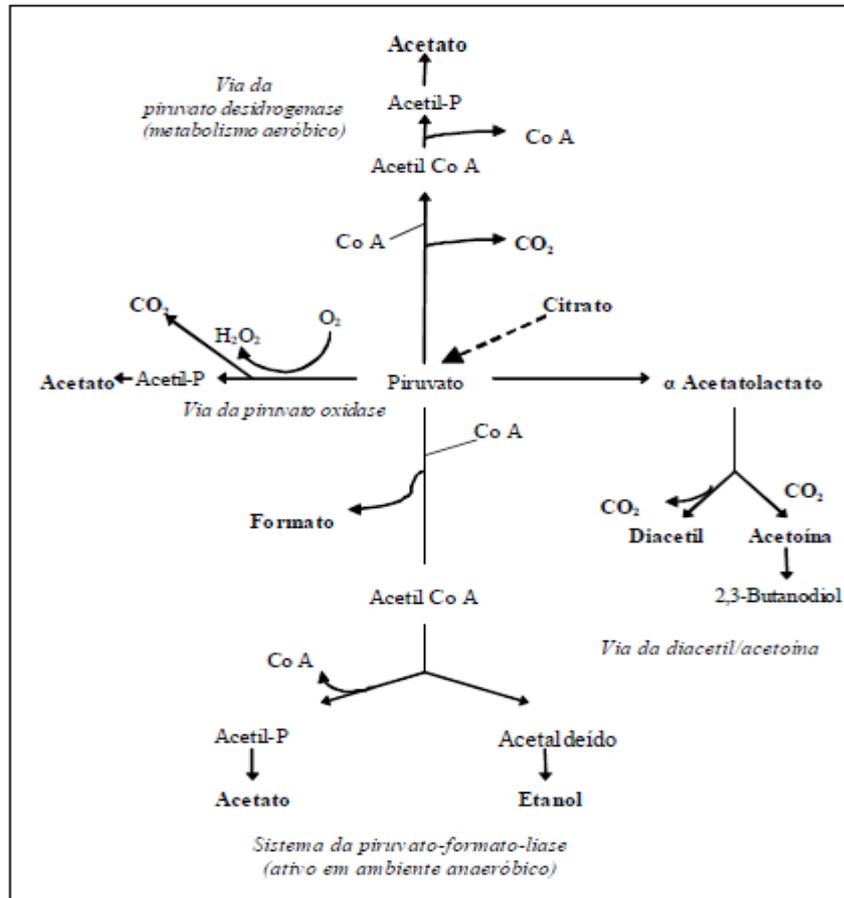
**Figura 5.** Filogenia de *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella*.

Fonte: BJÖRKROTH; HOLZAPFEL, 2006.

### 3.6 Metabólitos

As bactérias lácticas são microrganismos com grande espectro de utilização na elaboração dos processos fermentativos. Estes microrganismos podem conferir características sensoriais desejáveis e a biopreservação destes alimentos, resultando no aumento da segurança sanitária e na qualidade (GOLBERG; WILLIAMS, 1991).

Os mecanismos antimicrobianos específicos das bactérias lácticas e que são explorados na biopreservação e no desenvolvimento características sensoriais de alimentos incluem a produção de metabólitos que são sintetizados através do consumo do carboidrato disponível e do tipo de metabolismo realizado pelas bactérias acidoláticas. Estes metabólitos incluem ácidos orgânicos; como ácido lático e acético e outras moléculas como gás carbônico, peróxido de hidrogênio, diacetil, etanol, compostos antimicrobianos de largo espectro como a reuterina e a produção de bacteriocinas (Figura 6) (DE VUYST; VANDAMME, 1994).



**Figura 6.** Esquema geral da formação de produtos metabólitos importantes a partir do piruvato pelas bactérias lácticas.

Fonte: CAPLICE; FITZGERALD, 1999.

### 3.6.1 Produção de dióxido de carbono e Etanol

As BAL heterofermentativas possuem a capacidade de produzir grandes quantidades de  $\text{CO}_2$  através da fermentação de açúcares. Esta característica é extremamente importante para a conservação de produtos e contribui significativamente para a inibição de patógenos presentes nos produtos fermentados. Geralmente o processo de inibição de microrganismos aeróbios é efetivo, pois a disponibilidade de oxigênio diminui com o aumento da respiração microbiana, desta forma, uma condição de anaerobiose é gerada sendo esta limitante para o desenvolvimento de microrganismos aeróbios obrigatórios, como os fungos filamentosos. Outro fator relevante é o de que a maioria dos microrganismos não possuem sensibilidade ao  $\text{CO}_2$ . Segundo Santo (2003) o mecanismo de inibição é complexo e envolve uma redução do pH intracelular, a inibição de reações enzimáticas e a interação com a membrana celular

impedindo o transporte de solutos. Em alimentos fermentados, o dióxido de carbono contribui na formação das características do produto (HANSEN, 2002).

Assim como o dióxido de carbono, o etanol também é produto do metabolismo heterofermentativo deste grupo de microrganismo, no entanto, a quantidade sintetizada é muito menor que os demais metabólitos. Desta forma, segundo Caplice e Fitzgerald (1999) os níveis produzidos em alimentos e em processos fermentativos são tão baixos que a contribuição deste metabólito é mínima.

### **3.6.2 Ácidos orgânicos e pH**

As bactérias lácticas possuem um papel fundamental na elaboração de produtos fermentados, nos alimentos fermentados possuem a característica de auxiliar o aumento da vida de prateleira (ABEE et al., 1995). Estes microrganismos possuem a habilidade de inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, pois possuem a capacidade de sintetizar fatores antimicrobianos que agem conjuntamente ou isoladamente para proporcionar este efeito (RAY e DAESCHEL, 1992; LERICHE et al., 1999).

Assim que presentes no processo fermentativo as bactérias lácticas realizam suas primeiras ações conservantes, a diminuição do pH e a redução dos carboidratos por fermentação ocasionam no alimento processado por fermentação (BERTOLDI, 2003).

Os microrganismos se desenvolvem na faixa de pH ótimo entre 6 e 7, portanto, o decréscimo desses valores pode influenciar na sua sobrevivência. O pH é responsável pelo efeito inibitório a diversos outros microrganismos, no entanto o efeito antimicrobiano depende também do ácido orgânico que está envolvido. A morte microbiana pelo decréscimo do pH é acentuada pelo aumento da temperatura, sendo considerados três os fatores envolvidos neste mecanismo, são eles; o grau de dissociação do ácido presente, efeito tóxico e o pH. A atividade inibitória do ácido acético e ácido láctico é devido a capacidade que estas moléculas na forma não dissociada possuem em atravessar a membrana plasmática microbiana e reduzir o pH intracelular, interferindo algumas funções metabólicas, como a fosforilação oxidativa e a translocação de substratos (NAIDU et al., 1999). O ácido acético, embora seja produzido em pequenas concentrações, possui um maior efeito inibitório, pelo fato de que sua constante de dissociação é superior a do ácido láctico (PIARD; DESMAZEAUD, 1992).

Estudos realizados por Brackett, (1987); Sorrels et al., (1989), citados por Adams e Nicolaidis (1997), comprovaram a eficácia da acidificação do meio na inibição microbiana

das seguintes espécies de bactérias: *Salmonella* sp., *Listeria* sp. *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*. Segundo estes autores as bactérias ácido lácticas (BAL) heterofermentativas produzem ácido láctico e acético, em determinadas circunstâncias. No entanto, são as homofermentativas, que produzem uma acidificação maior. Para que o processo de síntese de ácido seja suficiente para a inibição das bactérias patogênicas, é necessário um grande número de bactérias lácticas, sendo que em produtos cárneos o número de células viáveis sejam dois ciclos logarítmicos superiores ao número de células da microbiota contaminante (TERRA, 1998; BERTOLDI, 2003)

De acordo com Mensah et al., (1991) o efeito antimicrobiano do decréscimo do pH deve ser utilizado nos processos fermentativos como um complemento e não como um substituto das boas práticas de manipulação (MENSAH et al. 1991).

O ácido láctico sintetizado pelas BAL pode ser de isômeros diferentes, geralmente é produzido L (+), menos frequentemente o D (-) ou ainda uma mistura de ambos. A produção de ambos os isômeros é possível pelo fato destes microrganismos apresentarem enzimas desidrogenases lácticas estereoespecíficas (COSTA, 2006). A forma D (-) do ácido láctico não é metabolizada pelo homem, podendo causar acidose, sendo não recomendado para crianças e jovens, sendo que a ingestão diária máxima indicada é de  $100 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  de peso corpóreo (KANDLER, 1983; CAPLICE E FITZGERALD, 1999; BJÖRKROTH et al. 2002).

### **3.6.3 Peróxido de hidrogênio**

O peróxido de hidrogênio é originado da reação de oxidação do lactato por oxidases em condições de aerobiose.

A grande maioria dos lactobacilos é capaz de produzir peróxido de hidrogênio e em certos alimentos sua síntese auxilia na inibição de microrganismos contaminantes.

A ausência da enzima catalase torna as BAL incapacitadas de metabolizar peróxido de hidrogênio, desta forma, há o acúmulo deste metabólito durante o crescimento bacteriano (ADAMS; NICOLAIDES, 1997). As bactérias do ácido láctico, portanto, apresentam uma elevada resistência aos efeitos do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (REDDY et al., 2008).

A maior produção de peróxido de hidrogênio ocorre em temperaturas baixas quando a solubilidade do oxigênio é alta ou quando a cultura é mantida em agitação constante. Em situação de anaerobiose ou em situações em que a oxigenação é baixa, a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se acumula é muito reduzida (COLLINS; ARAMAKI, 1980).

O peróxido de hidrogênio pode reagir com outros componentes para formando outras substâncias que possuem ação inibitória. No leite, existe a atuação do sistema lactoperoxidase, que é naturalmente ativo no leite e que possui ação antimicrobiana contra bactérias e fungos (RUSSELL, 1991; WIT; HOOYDONK 1996). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente no leite cru e produzido por microrganismos após reagir com a lactoperoxidase promove a oxidação do tiocianato; um componente natural do leite para hipotiocianato que possui ação inibidora contra bactérias e fungos (AUNE; THOMAS, 1978; PRUITT et al., 1982). Este sistema prolonga a vida útil do leite, no entanto, em produtos cárneos os peróxidos causam a descoloração, pois atacam os hemepigmentos presentes no tecido (SANTA, 2008).

### 3.6.4 Diacetil

O diacetil (2,3 - butanodieno) é produzido por bactérias do ácido láctico de todos os gêneros, este composto é sintetizado através da fermentação do citrato. Este metabólito intermediário é conhecido por influenciar propriedades sensoriais de produtos fermentados, sua principal característica é a de conferir aroma amanteigado aos produtos fermentados de leite (JAY, 1982; SANTA, 2008).

O diacetil pode ser encontrado em vinhos tintos e brancos, manteiga e leite, ensilagem, conhaque, café torrado e outros alimentos fermentados. De acordo com Santo (2003), o diacetil possui eficiência limitada devido a necessidade de produção de uma quantidade elevada para gerar o preservativo. Além disso, o forte aroma impede sua utilização na maioria dos produtos alimentícios. Em salames, a síntese de diacetil não é suficiente para melhorar a estabilidade e a segurança destes produtos (LÜCKE, 2000).

O diacetil possui eficiente atividade inibitória para o crescimento de bactérias Gram negativas, pois interfere na utilização da arginina, entretanto este metabólito não possui alta ação antibacteriana eficiente em bactérias Gram positivas que apresentam baixa sensibilidade (SANTA, 2008).

Segundo Santo (2003) o diacetil pode ser degradado por alguns isolados de bactérias lácticas quando presente em concentrações baixas.

A ação inibitória desta molécula foi objeto de estudado em um grande número de microrganismos, como: *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Streptococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila* (JAY, 1982; MOTLAGH et al., 1991 apud ADAMS; NICOLAIDES, 1997).

A via de formação de diacetil se inicia no momento em que os microrganismos sintetizam moléculas ativas de acetaldeído do piruvato e tiamina pirofosfato pela ação da enzima piruvato oxidase (HICKEY et al., 1983). Posteriormente, o acetaldeído ativo reage com outra molécula de piruvato, resultando na formação de  $\alpha$ -acetolactato pela ação da enzima  $\alpha$ -acetolactato síntese (COGAN et al., 1984). Em seguida  $\alpha$ -acetolactato é oxidado a diacetil pela enzima  $\alpha$ -acetolactato oxidase (SEITZ et al., 1963a).

A razão fisiológica para a produção de diacetil não é claramente compreendida, embora se propusesse que sua síntese é um mecanismo para diminuir a toxidade do piruvato intracelular ou para a inibição de organismos concorrentes (ADAMS, 1999).

### 3.6.5 Bacteriocinas

As bacteriocinas formam um grupo heterogêneo que atuam no metabolismo bacteriano e nas propriedades químicas dos produtos alimentícios (SANTO, 2003). Estas moléculas microbianas despertaram grande interesse para a indústria alimentícia pelo potencial de aplicação na preservação de alimentos. As bacteriocinas são polipeptídios antimicrobianos de natureza proteica produzidas por diversas bactérias lácticas (SANTA 2008). Possuem importante atividade bactericida e bacteriostática contras alguns microrganismos, principalmente na inibição da esporulação de bactérias Gram positivas (COVENTRY et al. 1997).

Segundo Ammor et al. (2006) as bactérias que produzem bacteriocinas não são sensíveis a essas substâncias. A presença de enzimas proteolíticas no substrato pode resultar na inativação das bacteriocinas (HOLZAPFEL, 2002). Devido à natureza proteica, estas moléculas não representam risco a saúde humana quando ingeridas, pois são rapidamente degradadas (TYÖPPÖNEN et al. 2003).

A maiorias bacteriocinas produzidas pelas BAL possui capacidade de inibir o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, mas somente uma pequena quantidade são efetivas contra *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Bacillus*.

Uma grande variedades de bacteriocinas são identificadas, e são produzidas por inúmeras espécies de bactérias do ácido láctico, como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (DICKS et al., 2004). No entanto, devido a dificuldade de se realizar a introdução de novas bacteriocinas em produtos alimentícios, a biopreservação está sendo realizada através da utilização de microrganismos

produtores que podem ser utilizados em vez de bacteriocinas purificadas (HANSEN 2002; O'SULLIVAN et al. 2002).

### **3.7 Fermentação do pescado**

A fermentação do pescado pode ser compreendida como uma alternativa de transformar substâncias orgânicas em componentes simples, pela ação de enzimas ou microrganismos.

As fermentações são consideradas métodos importantes para a conservação de um determinado produto, são caracterizados por desempenhar importantes modificações químicas, resultando na formação de agentes conservadores através da ação de microrganismo. Com efeito da fermentação característica como o valor nutricional, textura e aroma dos alimentos são alterados. Em produtos de origem carne e de pescado há a conversão de proteínas insolúveis em formas solúveis, resultando na degradação da actomiosina em aminoácidos e peptídeos solúveis em concentrações iônicas baixas (ROBINSON, 1991; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 1995).

A decomposição que se manifesta no pescado pode ser produzida por enzimas proteolíticas, próprias das espécies, pelo resultado de atividades bacterianas ou, ainda, consistir em uma combinação dos dois processos metabólicos (LINDEN e LORIENT, 1994).

O início da fermentação do pescado se dá pela ação de bactérias intestinais. Posteriormente a utilização dos compostos solúveis essas bactérias passam a degradar as proteínas constituintes do pescado (OETTERER, 1999). A hidrólise da proteína é realizada também por enzimas proteolíticas tissulares presentes no peixe, além das enzimas proteolíticas excretadas por bactérias (DISSARAPHONG et al., 2007).

Pelo fato de as proteínas do pescado apresenta uma difícil contenção das alterações deterioradoras a contenção de alterações degradativas durante o armazenamento e mais difícil. Porém, quando há o controle do processo de deterioração são consideradas benéficas, produzindo *flavour* e odores desejáveis, mascarando o sabor indesejável de algumas espécies e aumentando a aceitabilidade de outras (ROBINSON, 1991).

De acordo com AQUARONE et al. (1983), A ação das enzimas durante o processo fermentativo é essencial para o desenvolvimento de componentes desejáveis, como a textura do produto. No entanto, características como o amolecimento ou a parcial liquefação da

matéria-prima, resulta em uma depreciação do consumo alimento. Os produtos resultantes da fermentação são elaborados nas mais variadas formas e o processamento possui a finalidade de conferir textura, odor e sabor para estes alimentos; o efeito conservador é considerado um benefício secundário (BERTULLO, 1975; MORZEL et al., 1997).

Na Ásia, se realiza a produção de molhos e pastas de pescado. Na França, as anchovas são preparadas exclusivamente com a espécie de anchova (*Engraulis encrasicolus*), esse processo possui um *flavour* especial, devido a características da espécie utilizada. Nas Filipinas a fermentação resulta na total desintegração do pescado. (BERTULLO, 1975).

### **3.8 Anchovas**

As anchovas são consideradas conservas de peixe consideradas tradicionais. São preparadas a partir de pescado, principalmente os pertencentes a família *Engraulidae*. A sardinha (*Sardinella brasiliensis*) é um peixe alternativo utilizado para o preparo deste tipo de produto. Algumas espécies possuem características próprias que podem agregar grande valor ao preparo de conservas fermentadas. Para a obtenção de um produto de elevada qualidade e levado em consideração as suas qualidades sensoriais, tais como, cor, sabor, aroma e textura. Estas características intrínsecas, para algumas espécies, esta relacionada com seus músculos, vísceras, microrganismos e enzimas (OETTERER, 2001). Além disso, os peixes utilizados neste processo são pequenos, que apresentam baixo valor comercial e são de sazonalidade abundante. As sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) possuem características interessantes que fazem deste pescado uma alternativa para a obtenção de anchovas, pois são peixes pequenos, e possuem os componentes biológicos necessários para proporcionar o sabor adequado, cor, sabor e textura específicos das anchovas (Beirão, 1979).

### **3.9 Carne Mecanicamente Separada (CMS)**

A carne mecanicamente separada é considerada uma alternativa para a diversificação de novos produtos a base de pescado, sendo considerado um alimento de fácil digestão e com elevada fonte de proteínas, minerais, destacando o cálcio e fósforo, vitaminas A, D e complexo B. Além disso, é um produto isento espinhos (RANKEN, 1993; SIMOES et al., 2004). A Carne Mecanicamente Separada (CMS) de pescado é definida pela FAO/WHO (2008) como sendo um produto resultante de uma única espécie de peixe ou uma mistura, que

possuem características sensoriais parecidas e que através do processo extração mecânica, gera partículas de músculo isenta de ossos, vísceras, escamas e pele.

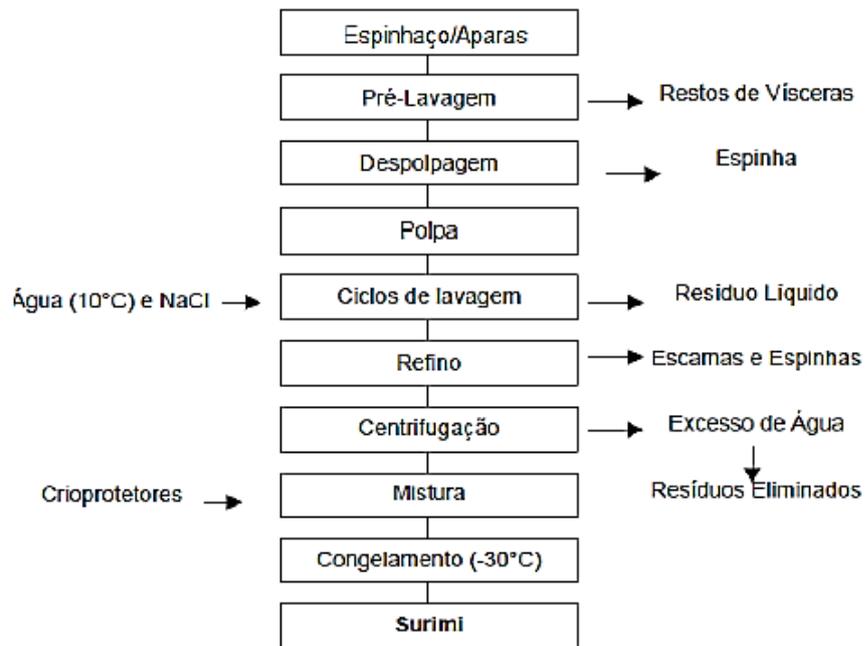
A produção de CMS em escala industrial possibilita a elaboração de produtos com alto valor agregado, que mesmo quando transformados em produtos mais simples atendem à necessidade de demanda social por um alimento proteico de origem animal de boa qualidade (KUHN e SOARES, 2002). Entretanto, a qualidade sanitária destes resíduos deve ser rigorosa para que o direcionamento para a elaboração dos diferentes tipos de resíduos aos subprodutos recomendados seja efetivo.

### **3.10 Surimi**

O surimi consiste em uma base protéica obtida a partir de carne de pescado separada mecanicamente, a qual é submetida a sucessivas formas de tratamento como lavagens, refino, desidratação, adição de crioprotetores e congelamento para preservação (TAHA, 1996). O Surimi é constituído em média de 75% de proteína é considerado a matéria-prima essencial para a elaboração produtos como o kamaboko e na produção de produtos análogos de frutos do mar, como camarão, lagosta, ou já kani-kama, análogo de caranguejo., A funcionalidade do surimi é dependente de sua qualidade de formar gel em temperaturas superiores a 40°C com adições adequadas de sais. Sendo que a qualidade pode ser avaliada pela força de gel. O surimi é considerado também, uma alternativa para a obtenção de produtos com maior concentração de proteínas quando comprado a CMS, e que possua alto teor protéico, que seja quimicamente estável, de baixo custo, baixo teor de umidade e gordura, desodorizado, de fácil estocagem e alta digestibilidade (PESSATTI et al., 2001).

Para elaboração surimi descrito no fluxograma (Figura 7), a CMS é submetida a etapas de lavagem, resultando na remoção das proteínas sarcoplasmáticas, lipídeos, sangue e pigmentos. Após esta etapa se obtém o concentrado proteico, que é constituído de proteínas miofibrilares. A etapa posterior de remoção do excesso de água faz com que haja aumento na concentração do de proteínas, cuja habilidade de formação de gel é a base da elaboração de produtos derivados de surimi (NEIVA, 2006). Por fim, se realiza a adição de crioprotetores, que pode ser glicerol ou sacarose.

O produto final é caracterizado por ser uma pasta de branca de pescado, inodora e com sabor acentuado de pescado, que depois de gelatinizada resulta em um produto intermediário, que pode ser moldado na forma desejada (GOMES et al., 1994).



**Figura 7.** Fluxograma de elaboração do Surimi.  
 Fonte: ALFARO et al. (2004).

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### Parâmetros Cinéticos e Perfil de Metabólitos Excretados por Bactérias Láticas em Caldo MRS.

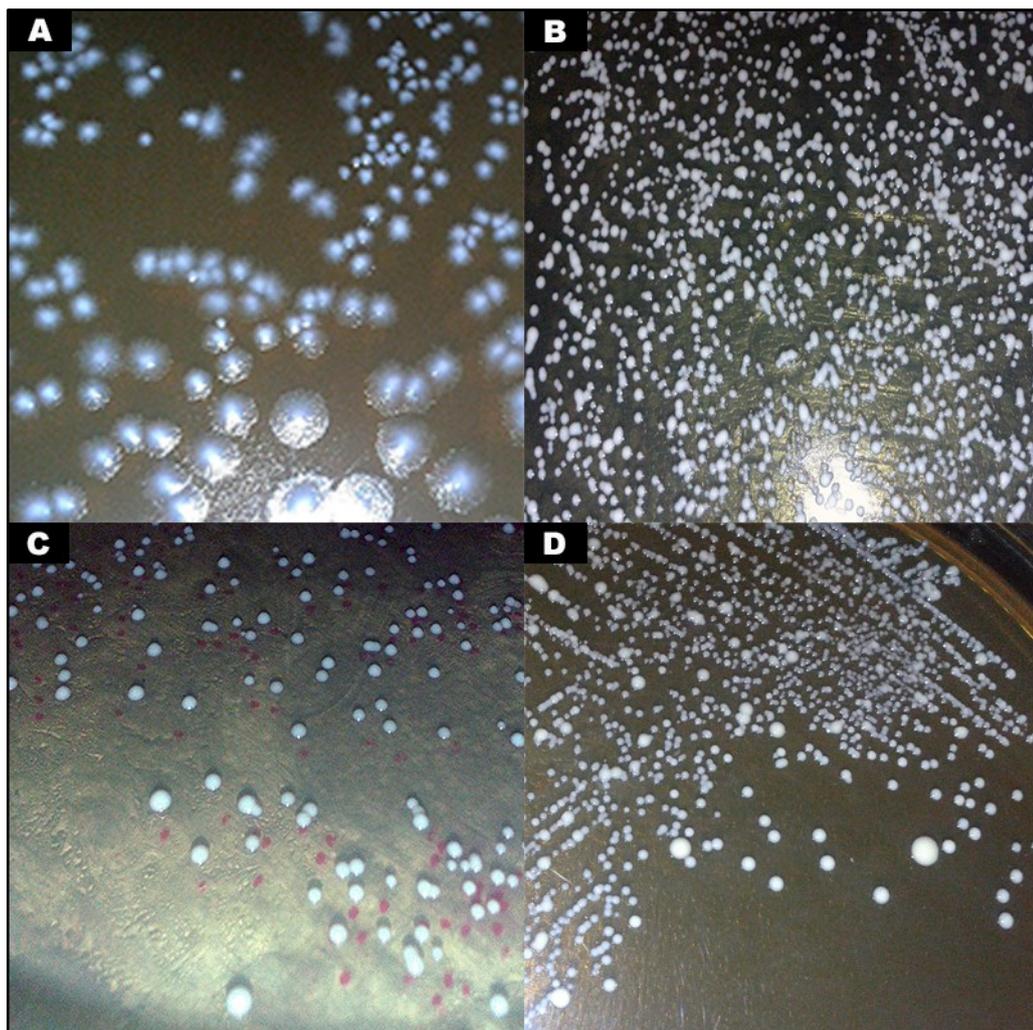
#### 4.1 Microrganismos

Os microrganismos: *Lactobacillus casei subspécies casei* (NRRL B-1922), *Lactobacillus rhamnosus* (NRRL B-442), *Lactobacillus brevis* (NRRL B-1834), *Weissella viridescens* (NRRL B-1951), *Leuconostoc lactis* (NRRL B-41409) foram obtidos junto ao banco de microrganismos ARS Culture Collection (Agricultural Reserch Service Culture Collection, Peoria, Illinois – USA) na forma liofilizada.

#### 4.2 Ativação e manutenção dos microrganismos

As cepas puras foram ativadas em 100 mL de caldo sintético MRS (De Man Rugosa e Sharpe, Oxoid) completo contendo glicose como fonte de carbono. O meio foi dividido em frascos do tipo Erlenmeyers de 100mL e foram esterilizados a 121°C em autoclave por 15 minutos, sendo posteriormente resfriados à temperatura ambiente.

O processo foi conduzido inoculando-se um tubo de cultura liofilizada no meio de crescimento. A ativação foi conduzida em câmara incubadora com shaker rotativo acoplado (Marconi, MA 415) a 215 rpm por 18 h, à temperatura de 30°C. Após a ativação as culturas foram repicadas em tubos e placas de Petri contendo ágar MRS onde foram incubadas durante 48 h a 30°C. A seguir foram mantidas em câmara fria a 10°C para posterior utilização. Este processo foi repetido a cada 4 semanas para a manutenção da viabilidade microbiana. As Figura 8 e Figura 9 demonstram o crescimento em ágar MRS das espécies de bactérias do ácido láctico utilizadas no decorrer dos experimentos.



**Figura 8.** Características de crescimento das culturas lácticas utilizadas em placa com ágar MRS. Onde: A - *Lactobacillus brevis*, B - *Lactobacillus casei* subspécie *casei*, C - *Weissella viridescens* e D - *Lactobacillus rhamnosus*.



**Figura 9.** Característica de crescimento em ágar MRS de *Leuconostoc lactis*.

### **4.3 Meio de cultivo**

As bactérias foram pré-cultivadas em caldo MRS, quimicamente definido, a fim de propagar o inóculo destinado à silagem biológica. Este meio contém (em g L<sup>-1</sup>): peptona, 10 g; extrato de levedura, 4g; extrato de carne, 8g; glicose, 20 g; fosfato dipotássico, 2 g; acetato de sódio trihidratado, 5g; citrato de amônia, 2 g; sulfato de magnésio heptahidratado; 0,2 g, sulfato de manganês tetra hidratado, 0,05g, sorbitano monooleato, 1 g. Para o preparo do ágar MRS adicionou-se 15 g de ágar para cada litro de caldo. Todos os componentes do meio foram misturados, ajustados a pH 6,7 e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.

### **4.4 Preparação do inóculo para cinética**

#### **4.4.1 Pré-inóculo**

Para obtenção do pré-inóculo, colônias isoladas de cada cepa foi inoculada, separadamente, em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL acrescidos 100 mL de caldo MRS. Os frascos foram incubados a 30°C em estufa bacteriológica (Marconi - MA 415) com shaker a 215 rpm, por 12 horas, para obtenção das culturas bacterianas fisiologicamente ativadas.

#### **4.4.2 Cultivo principal**

Após o período de 12 horas de incubação foi realizada inoculação a partir de uma alíquota do pré-inóculo, tendo-se utilizado a densidade óptica (D.O) inicial de 0,1. Cada microrganismo inoculado isoladamente em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL acrescidos de 100 mL de caldo MRS. Posterior a inoculação de cada isolado, foi realizada a retira da primeira alíquota para a determinação dos parâmetros cinéticos, biomassa, pH e possível síntese de metabólitos. Seguiu-se com a incubação dos frascos a 30°C em estufa bacteriológica, a 215 rpm até o fim da cinética. O experimento foi realizado em duplicata.

### **4.5 Determinação do pH**

O pH foi medido potenciométricamente (Hanna, pH 21) (AOAC, 1995). Os valores de pH foram determinados por processo eletrométrico em potenciômetro digital devidamente

calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0, mediante leituras diretas (TERRA; BRUM, 1988).

#### **4.6 Monitoramento do crescimento dos cultivos**

A densidade óptica foi estimada por leitura espectrofotométrica a 600nm em espectrofotômetro (Biospectro – SP 220) (Nova Optical Systems UV-VIS Mod. LGS 53). Sendo realizado a retirada de alíquotas (2 mL) do cultivo principal para as leituras de absorbância.

#### **4.7 Amostragem e preparo das amostras**

Para a amostragem, alíquotas de 4 mL foram retiradas a cada 60 minutos, sendo 2 mL utilizado imediatamente para a quantificação das células em espectrofotômetro (Biospectro – SP 220) e 2mL para a analisar a formação de metabólitos. As alíquotas utilizadas na quantificação de metabólitos foram filtradas por pressão positiva com o auxílio de filtros de seringa de acetato celulose com poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 13 mm (Allcrom). Os sobrenadantes foram armazenados em microtubos tipo Eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização.

#### **4.8 Determinação da taxa de crescimento, conversão de substrato a células e consumo de substrato durante a fase exponencial de crescimento.**

A fase exponencial de crescimento foi obtida através da plotagem de  $\ln(X)$  em função do tempo de cultivo descontínuo. Sendo que a velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\text{max}}$ ) foi identificada através da inclinação desta reta. A taxa de conversão de substrato em célula foi determinado por meio da plotagem da concentração celular em função da concentração de substrato. A velocidade de consumo de substrato foi obtida através da equação abaixo:

$$\mu_S = \frac{\mu_{\text{max}}}{Y_{X/S}} \quad \text{Eq. 1.0}$$

onde  $\mu_{\text{max}}$  = velocidade específica de crescimento máxima ( $\text{h}^{-1}$ ); X = concentração celular no frasco ( $\text{g MCS l}^{-1}$ );  $\mu_S$  = velocidade específica de consumo de substrato durante a EGP ( $\text{g (g$

MCS h)<sup>-1</sup>); S = concentração de substrato no biorreator (g l<sup>-1</sup>); Y<sub>X/S</sub> = fator de conversão de substrato a células durante a EGP (g MCS g<sup>-1</sup>); MCS = massa celular seca (FONSECA, 2007).

#### **4.9 Determinação da concentração de metabólitos**

A determinação do consumo de substrato, produção de ácidos orgânicos e etanol, foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), aparelho da marca Agilent, modelo P-1290 If, equipado com detector de índice de refração diferencial Agilent 1260 (RID), acoplado a um módulo de aquisição de dados e coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm; Bio-Rad, Hercules, EUA). A coluna utilizada foi eluída a 55°C, empregando-se água acidificada com ácido trifluoracético (TFA) a 0,005 M como fase móvel a uma vazão de 0,06 mL min e volume de injeção de 20µL. Estes compostos foram detectados por absorvância UV a 254 nm (FONSECA, 2007).

#### **4.10 Avaliação do número de células viáveis no inóculo**

A enumeração das células viáveis dos microrganismos utilizados foi realizada em ágar MRS através de alíquotas (0,1mL) das correspondentes diluições, por plaqueamento em superfície. O plaqueamento foi realizado no momento em que cada cepa atingiu a densidade óptica estimada (D.O.=4,0) com leitura a 600nm ( $\lambda=600\text{nm}$ ).

Os inóculos foram realizados em triplicatas e foram incubadas a 30°C por 24 horas (MAZO et al., 2002).

## **Processo Fermentativo do Concentrado Proteico por Bactérias do Ácido Lático.**

### **5.0 Processamento do concentrado proteico**

Para o processamento do concentrado proteico utilizou-se amostras de polpa de pescado (CMS de *Oreochromis niloticus*) fornecidas pelo frigorífico Mar & Terra S.A., situado na cidade de Itaporã, MS. As amostras foram mantidas refrigeradas até o momento do preparo do concentrado proteico. As amostras de polpa de pescado foram submetidas a descongelamento em temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente foram submetidas a três ciclos de lavagens (polpa : água de 1:3) em pH alcalino utilizando bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 0,25%; que possui a função de aumentar a força de formação do gel e melhorar a aparência, e cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) a 0,3% para agilizar o processo de remoção das proteínas sarcoplasmáticas remanescentes.

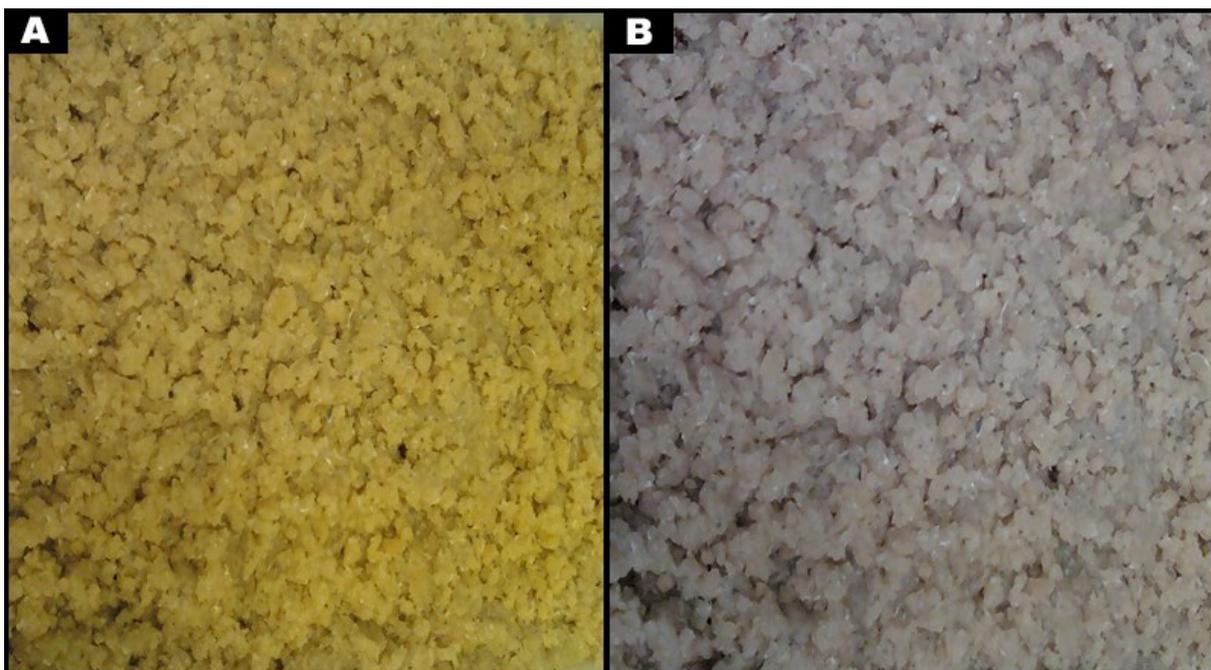
Homogeneizou-se a solução por um período de 5 minutos, à temperatura inferior a  $10^{\circ}\text{C}$ , com drenagem entre as lavagens. Posteriormente ao fim da segunda lavagem foi realizado o processo de refino da polpa, por compressão. A água em excesso foi drenada por compressão em peneira de malha de aço. Por fim, obteve-se a massa de concentrado proteico de pescado (Figura 10).

### **5.1 Tratamento do concentrado proteico**

Após a obtenção do concentrado proteico procedeu-se com a cisalhamento em liquidificador tipo industrial (Poli, Mod. S-10) para a obtenção de um produto homogeneizado. Depois de triturado o concentrado proteico adquiriu uma consistência uniforme e pastosa, foi então, dividido em porções e congelado a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização.

### **5.2 Pasteurização do Concentrado Proteico**

Para evitar contaminação e auxiliar na diminuição dos níveis de contaminantes, anterior a inoculação e adição da glicose, concentrado proteico foi submetido ao processo de pasteurização em autoclave a  $99^{\circ}\text{C}\pm 2$  por aproximadamente 5 minutos.



**Figura 10.** A e B: Concentrado proteico de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) após processamento.

### 5.3 Preparação do inóculo para fermentação

#### 5.3.1 Pré-inóculo

Para obtenção do inóculo, colônias isoladas de cada isolado foi inoculado, separadamente, em 100 mL de caldo MRS. Os frascos foram incubados a 30°C em estufa bacteriológica com shaker a 215 rpm, por 12 horas, para obtenção das culturas bacterianas fisiologicamente ativadas.

#### 5.3.2 Inóculo

Para obtenção do inóculo, colônias isoladas de cada isolado foram inoculadas, separadamente, em 100 mL com posterior incubação em estufa bacteriológica a 30°C, 215 rpm até atingirem densidade óptica (D.O) de 4.0 equivalente a *Lactobacillus rhamnosus*:  $2,86 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, *Lactobacillus casei subspécies casei*:  $1,46 \times 10^{11}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, *Lactobacillus brevis*:  $1,38 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, *Weissella viridescens*:  $1,11 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, *Leuconostoc lactis*:  $1,69 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> de células viáveis. Após esse período, procedeu-se a centrifugação do volume total do caldo contendo as culturas ativadas em centrífuga (ITR 24BT, SIMPLEX II).

O sobrenadante foi descartado e o concentrado de células ressuspendido em água destilada estéril, procedendo-se nova centrifugação a 1.100 rpm/15 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi adicionado à massa proteica após a adição de todos os demais componentes.

A determinação da concentração celular do inóculo foi estimada por espectrofotometria a 600nm e contagem de células viáveis (UFC) por meio de plaqueamento em meio MRS.

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 min.

### 5.3 Fermentação do Concentrado Protéico

No presente trabalho, foram realizados quatro tratamentos que variaram quanto ao tipo da cultura bacteriana adicionada ao concentrado proteico. Sendo estes descritos abaixo:

- **Tratamento 1** : 180 mg de concentrado proteico + 10% de glicose + cultura pura de *Lactobacillus rhamnosus*;
- **Tratamento 2**: 180 mg de concentrado proteico + 10% de glicose + cultura pura de *Lactobacillus casei*;
- **Tratamento 3**: 180 mg de concentrado proteico + 10% de glicose + cultura pura de *Leuconostoc lactis*;
- **Tratamento 4**: 180 mg de concentrado proteico + 10% de glicose + cultura pura de *Weissella viridescens*.

O concentrado proteico, conservado sob congelamento (-18°C) foi descongelado, pesado e dividido em porções de 180 g em Erlenmeyers de 500 mL estéreis. Em seguida o experimento foi conduzido com a esterilização da matéria-prima. Após o resfriamento procedeu-se com a adição de 10% de glicose em cada frasco e por fim, a inoculação dos microrganismos. Os tratamentos foram realizados de forma independente, variando apenas um dos parâmetros operacionais (microrganismos). O concentrado proteico foi fermentado à temperatura de 30°C±2 durante o período de 8 dias.

Os sistema desenvolvido para a realização do processo fermentativo do concentrado proteico de pescado foi constituído de um Erlenmeyers de 500 mL estéril com a quantidade a

crescido do substrato proteico, glicose e microrganismo. Para evitar a contaminação por outro microrganismos contaminantes além ter sido utilizado uma quantidade de inóculo alta e se ter pasteurizado o substrato, utilizou-se duas tampas vedantes estéreis, uma interna e outra externa, necessárias para diminuir a entrada de oxigênio externo e manter a microaerofilia desejável para o crescimento das bactéria lácticas. Para facilitar as coletas de amostras durante o decorrer do experimento e evitar a abertura dos frascos, realizou-se a perfuração de ambas as tampas e inseriu-se uma mangueira de ar de silicone (diâmetro externo 5 mm e interno 4 mm) de 15 cm compatível com uma seringa que foi utilizada para a retirada das amostras, na parte externa da mangueira foi colocado um microfiltro de 23  $\mu\text{m}$  para proporcionar a troca gasosa necessária. A parte superior do bocal dos Erlenmeyers foi vedada com parafilm. A Figura 11 demonstra o biorreator desenvolvido em detalhes.

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 min.

A Figura 12 mostra duas etapas distintas do preparo do processo fermentativo.

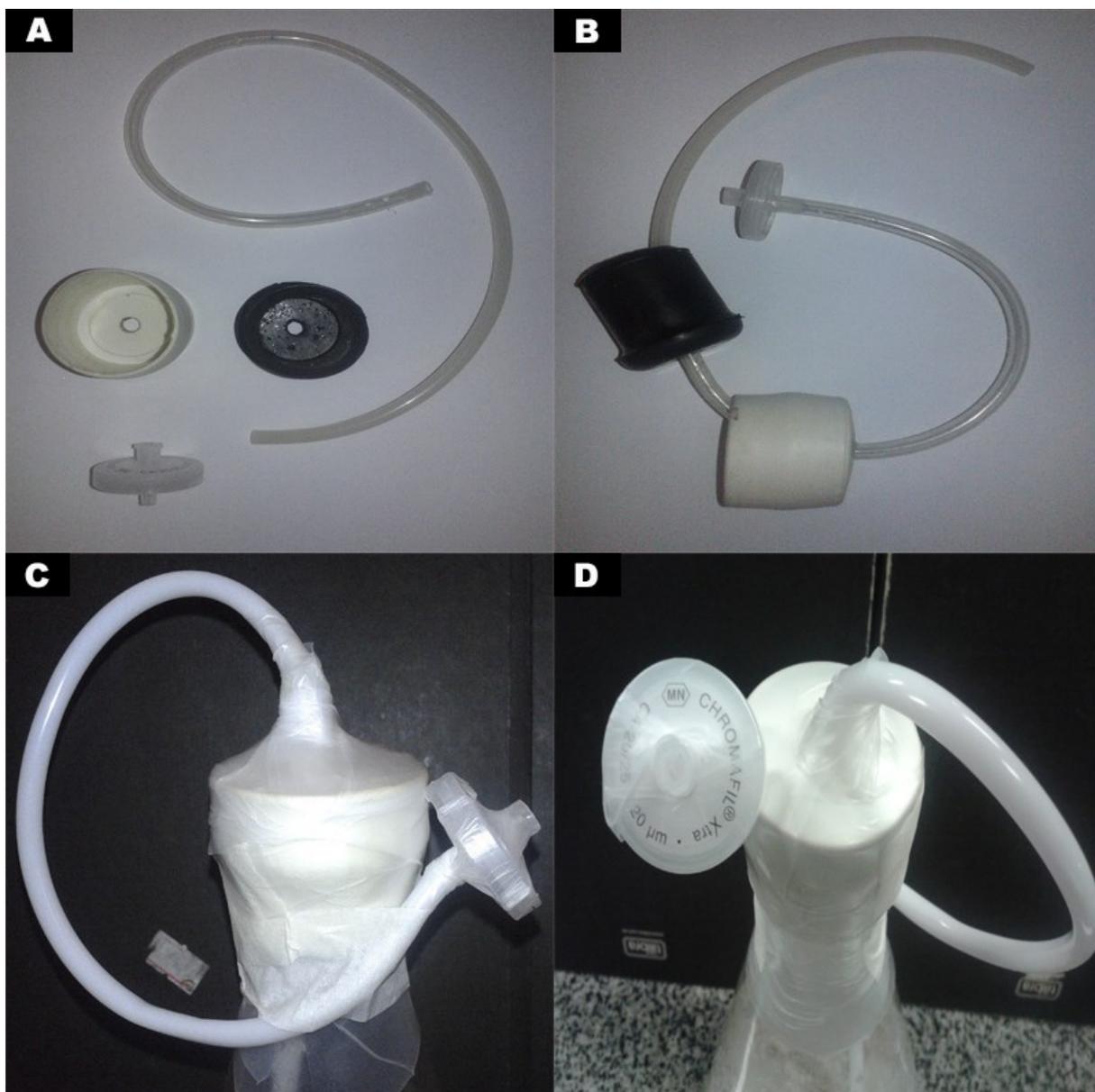
#### **5.4 Determinação do pH durante a fermentação**

Foram removidas amostras com 5g dos fracos de fermentação e homogeneizadas com água destilada (5mL) (adaptado de AOAC, 1995). O pH foi medido potenciométricamente somente ao final da fermentação.

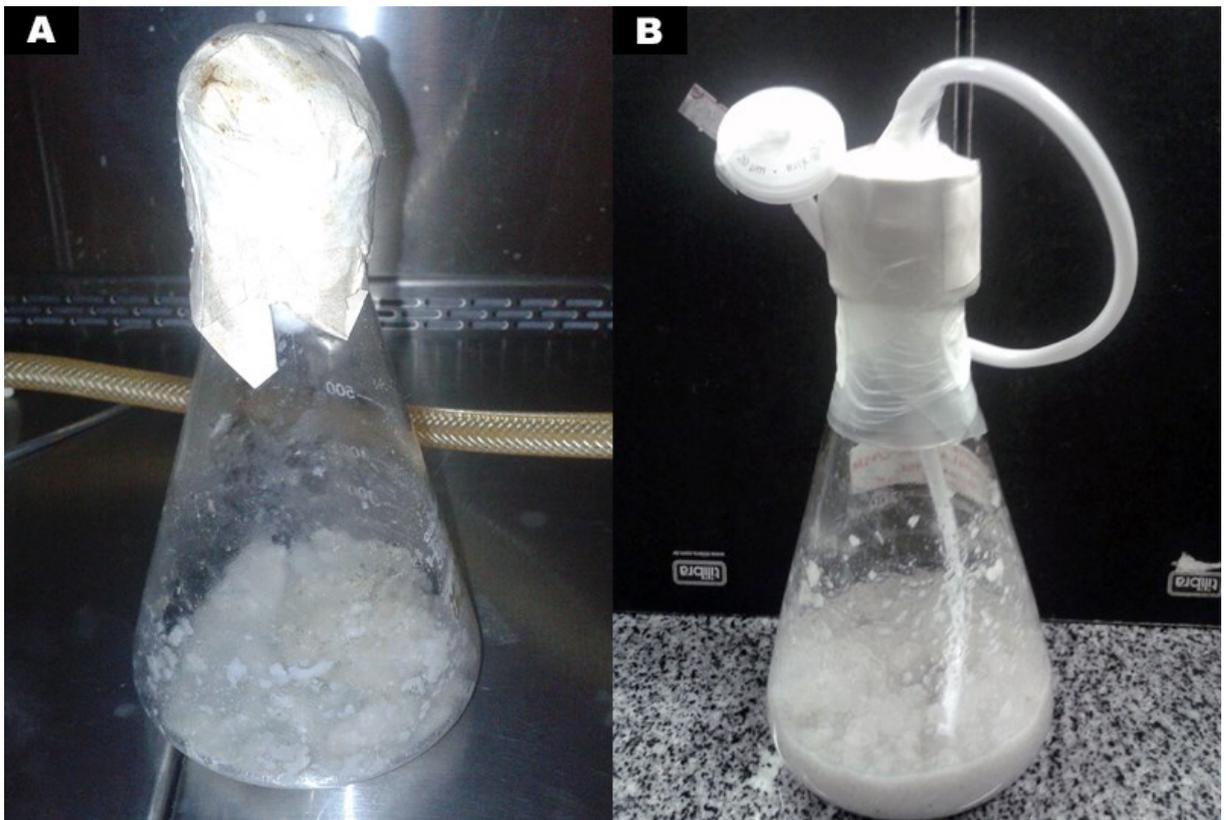
#### **5.5 Monitoramento do processo fermentativo e coleta de amostras**

Foi realizado o monitoramento do processo fermentativo em dias alternados. Durante o monitoramento avaliou-se as características do substrato proteico inoculado com os microrganismos, sendo avaliados possíveis alterações na cor, textura, odor e a presença de formação de gás.

Simultaneamente foi realizada a retirada de amostras por meio de seringas autoclavadas, as amostras foram colocadas em tubo (Falcon, 15mL) de plástico estéreis. Cada amostra foi submetida à análise de textura e odor e em seguida congelada a - 18°C.



**Figura 11.** Modelo do biorreator utilizado para o processo fermentativo. Em detalhes: A e B - componentes protetores, C e D – sistema completo.



**Figura 12.** A - concentrado proteico após pasteurização sem a presença de inóculo, B - biorreator finalizado com a presença de inóculo e substrato.

## 6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parâmetros Cinéticos e Perfil De Metabólitos Excretados Por Bactérias Láticas

#### 6.1 Cinéticas de crescimento

Os resultados encontrados foram obtidos através da realização de cinéticas de crescimento de cada microrganismo em caldo MRS tendo glicose como fonte carbono. Em conjunto foi realizado a curva de decréscimo do pH do meio para cada bactéria láctica, sendo os respectivos valores apresentados (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de bactérias do ácido láctico em caldo MRS tendo glicose como carboidrato fermentescível.

Linagem	DO max	TD (h)	$\mu_{\max}$ (1h)	$\mu_s$ g(g/h)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	Ac. Láctico (g.L <sup>-1</sup> )	Ac. Acético (g.L <sup>-1</sup> )
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4,375	2,276 ± 0,042	0,350 ± 0,058	0,3116	0,0872	8,95	3,00
<i>Lactobacillus casei subspécies casei</i>	4,310	5,495 ± 0,065	0,135 ± 0,046	1,6138	0,0711	4,47	3,19
<i>Lactobacillus brevis</i>	4,215	1,663 ± 0,076	0,417 ± 0,019	0,9385	0,0977	3,11	3,79
<i>Weissella viridescens</i>	4,298	3,502 ± 0,051	0,197 ± 0,002	0,3998	0,1319	1,98	3,59
<i>Leuconostoc lactis</i>	4,290	4,07 ± 0,001	0,164 ± 0,009	0,4168	0,5111	1,35	3,60

Onde: D.O. max = Densidade Óptica máxima atingida durante o cultivo, TD = tempo de duplicação em horas,  $\mu_{\max}$  = velocidade máxima de crescimento,  $\mu_s$  = velocidade específica de consumo de substrato Y<sub>x/s</sub> = fator de conversão de substrato a célula.

Os melhores resultados de  $\mu_{\max}$  coincidiram com os maiores valores de D.O de crescimento. Sendo, *Lactobacillus rhamnosus* (4,3) e *Lactobacillus casei subspécie casei* (4,3) os que apresentaram os melhores valores. Foi verificado que *Lactobacillus rhamnosus*, apesar de ter alcançado uma elevada D.O seu consumo de substrato foi abaixo (0,31) do valor observado por *Lactobacillus casei* (1,61).

Os resultados obtidos Y<sub>x/s</sub> mostram que os valores altos são encontrados para os microrganismos *Weissella viridescens* e *Leuconostoc lactis*, ao contrário do que é observado para as três espécies de *Lactobacillus*. Valores altos evidenciam que estes microrganismos conduziram seu metabolismo para a produção de biomassa e não de produto. Fato esse confirmado pela baixa concentração de metabólitos que foram excretados por estas cepas, ao contrário dos demais que apresentaram baixos valores de Y<sub>x/s</sub> e alta produção de metabólitos.

A Figura 13, mostra as cinéticas de crescimento e curvas de pH dos respectivos microrganismos em meio MRS.

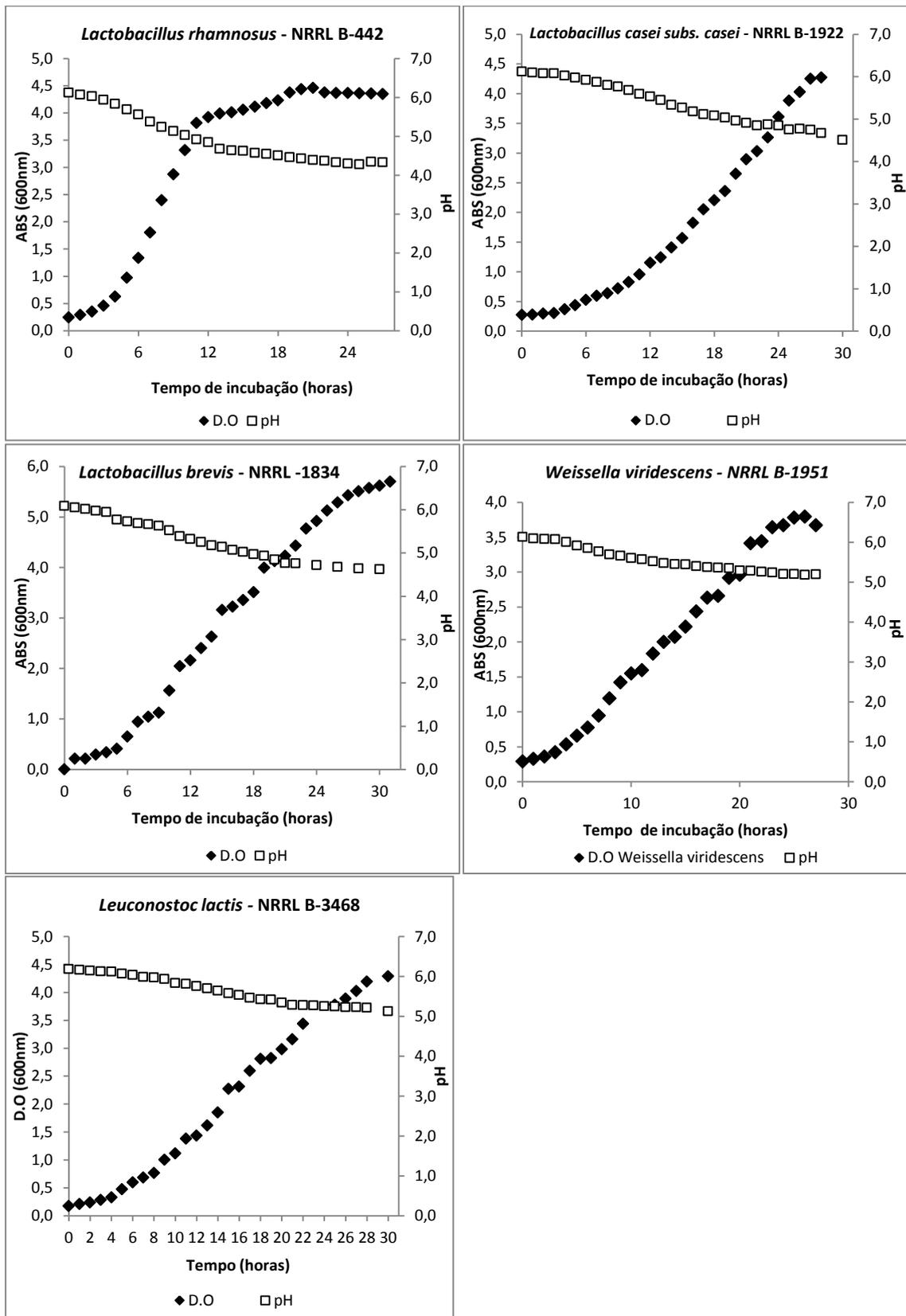


Figura 13. Curvas de crescimento e de pH de BAL em caldo MRS.

## 6.2 Metabolismo de carboidratos

A Figura 14 mostra a curvas de crescimento microbiano e o consumo de substrato (glicose) durante as cinéticas de crescimentos das bactérias.

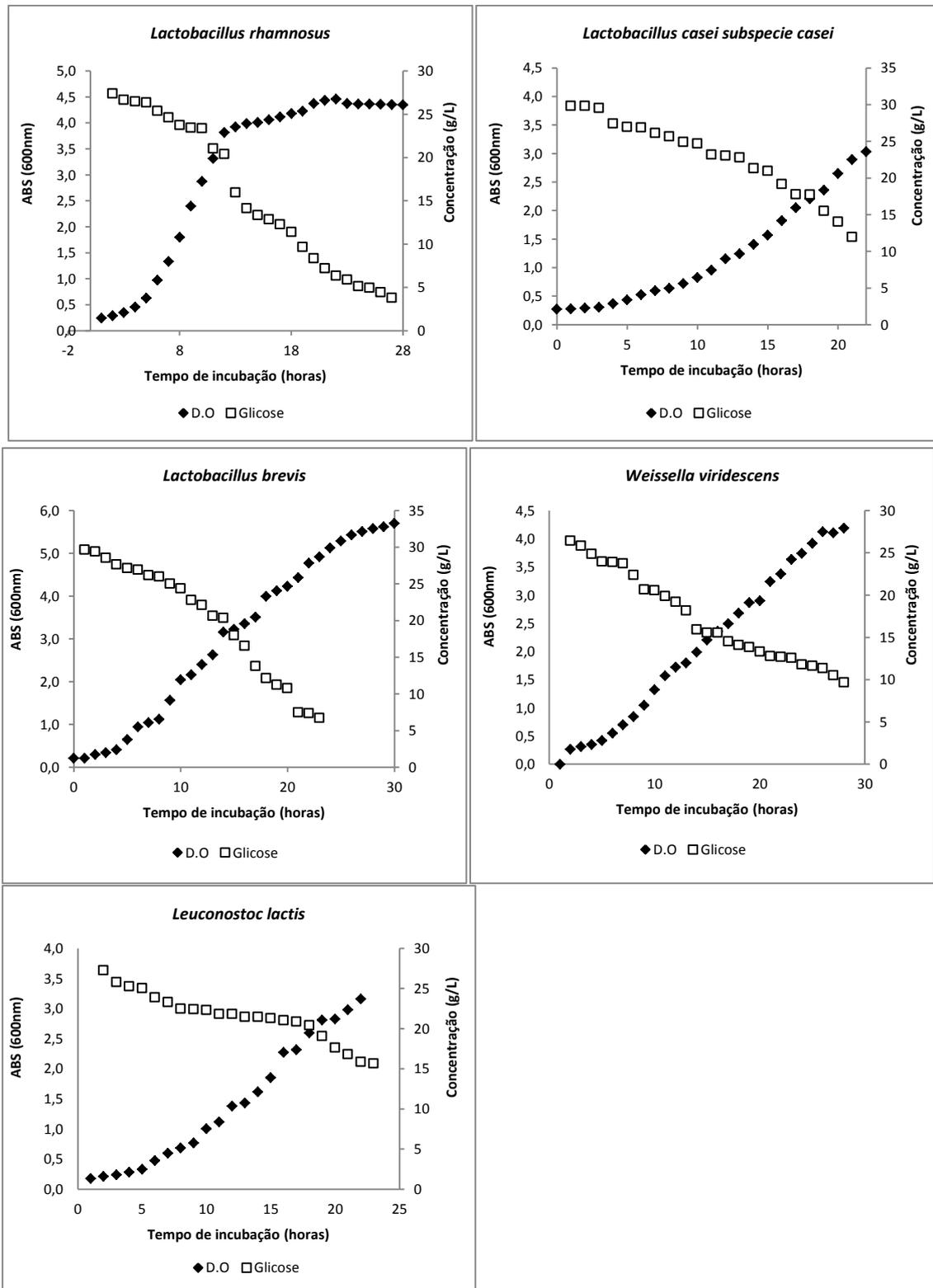
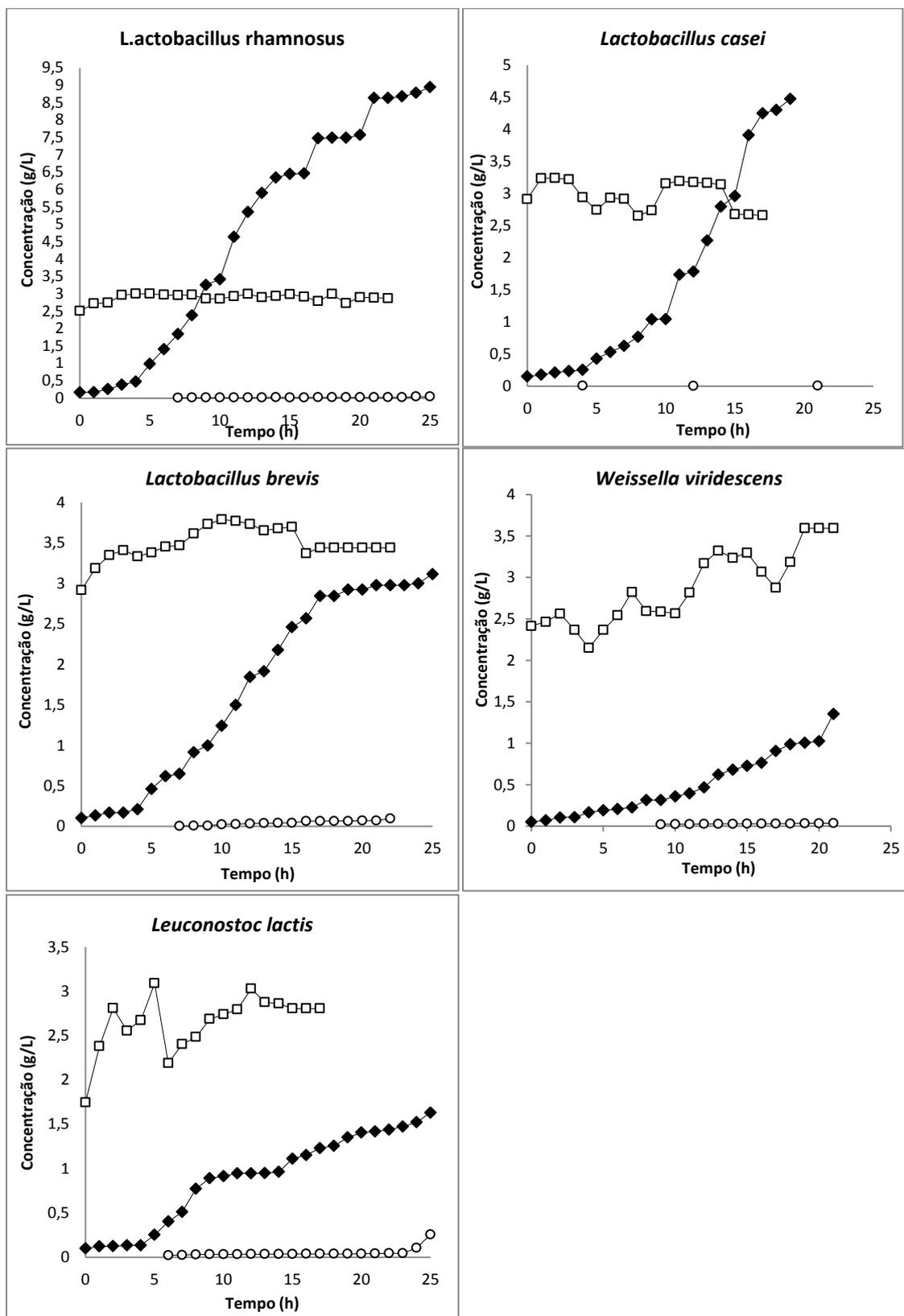


Figura 14. Consumo de substrato (glicose) e curvas de crescimentos.

A Figura 15 mostra a curvas de crescimento microbiano e o consumo de substrato (glicose) durante as cinéticas de crescimentos das bactérias.



**Figura 15.** Perfil de metabólitos excretados (ácido láctico, ácido acético e etanol) pelas BAL durante o crescimento em caldo MRS.

A partir dos resultados obtidos pode-se deduzir que entre as bactérias estudadas se encontrou somente um dos biótipos metabólitos. As linhagens *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei subespécie casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Weissella viridescens* e *Leuconostoc lactis* podem ser consideradas do tipo metabólico heterofermentativo, pois, além do ácido láctico, se mostraram produtoras de ácido acético e etanol. Segundo Kandler (1983) neste tipo de metabolismo as bactérias lácticas utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase para a fermentação de hexoses, que em condições de anaerobiose são convertidas em quantidade equimoleculares de ácido láctico e etanol + acetato.

Segundo Carr et al. (2002), o grupo das bactérias lácticas são classificadas de acordo com a sua via metabólica em homofermentativas e heterofermentativas. As bactérias que utilizam a via homofermentativas metabolizam as hexoses, sendo o produto principal sintetizado de ácido láctico (85%). As heterofermentativas ao contrário realizam a síntese de 50% de ácido láctico e pequenas quantidades de etanol, ácido acético e dióxido de carbono. No gênero *Lactobacillus* foi constatado que algumas espécies fermentam os açúcares em ambas as vias metabólicas, sendo denominadas de heterofermentativas facultativas. Estas espécies possuem a capacidade de converter as hexoses em ácido láctico e em certas circunstâncias, ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico e etanol, sendo capazes também de sintetizar ácido láctico e ácido acético através da fermentação de pentoses (KANDLER e WEISS, 1986; HUTIKINS, 2006; COSTA, 2006; COSTA et al., 2008).

De acordo com Gandhi (2006) as linhagens *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* são classificadas como heterofermentativas facultativas. Dentre as três espécies de *Lactobacillus* estudadas, estas duas apresentaram este perfil, pois produziram quantidades pequenas, mas mensuráveis de ácido acético e etanol. *Lactobacillus rhamnosus* foi considerado dentre os microrganismos o que mais produziu ácido láctico durante todo o processo cinético (8,90 g.L<sup>-1</sup>), em contrapartida foi o que menos produziu ácido acético (3,0 g.L<sup>-1</sup>) e o segundo a sintetizar menor quantidade de etanol (0,04 g.L<sup>-1</sup>). *Lactobacillus casei subespécie casei* foi dentre as cepas a segunda a sintetizar maior concentração de ácido láctico (4,47 g.L<sup>-1</sup>), entretanto, sendo observado que esta foi a que menos produziu etanol (0,005 g.L<sup>-1</sup>) e ácido acético (3,19 g.L<sup>-1</sup>) dentre os *Lactobacillus*. Desta forma, pode-se sugerir que as cepas avaliadas realmente apresentam o metabolismo descrito, sendo caracterizadas por produzirem grande quantidade de ácido láctico e baixa produção de metabólitos secundários, como ácido acético e etanol. Segundo Kandler e Weiss (1986), as bactérias pertencentes a este grupo apresentam a característica de se comportar como heterofermentativas, sintetizando

acetato e etanol quando em condições de limitação de glicose. Dessa forma, durante a fase de crescimento em que houve limitação de glicose, as linhagens podem ter dirigido seu metabolismo para a produção destes metabólitos, juntamente com o ácido láctico.

De acordo com Pot et al., (1993) a identificação de espécies de BAL, geralmente é realizada baseando-se em teste testes bioquímicos, como o perfil de fermentação de açúcares, no entanto, pesquisas recentes têm mostrado que algumas espécies não se enquadram nesta forma de avaliação. Desta forma, a identificação exata das espécies é dificultada devido à pequena variação destas (Quere et al., 1997).

### 6.3 Produção de ácido láctico, ácido acético e redução do pH

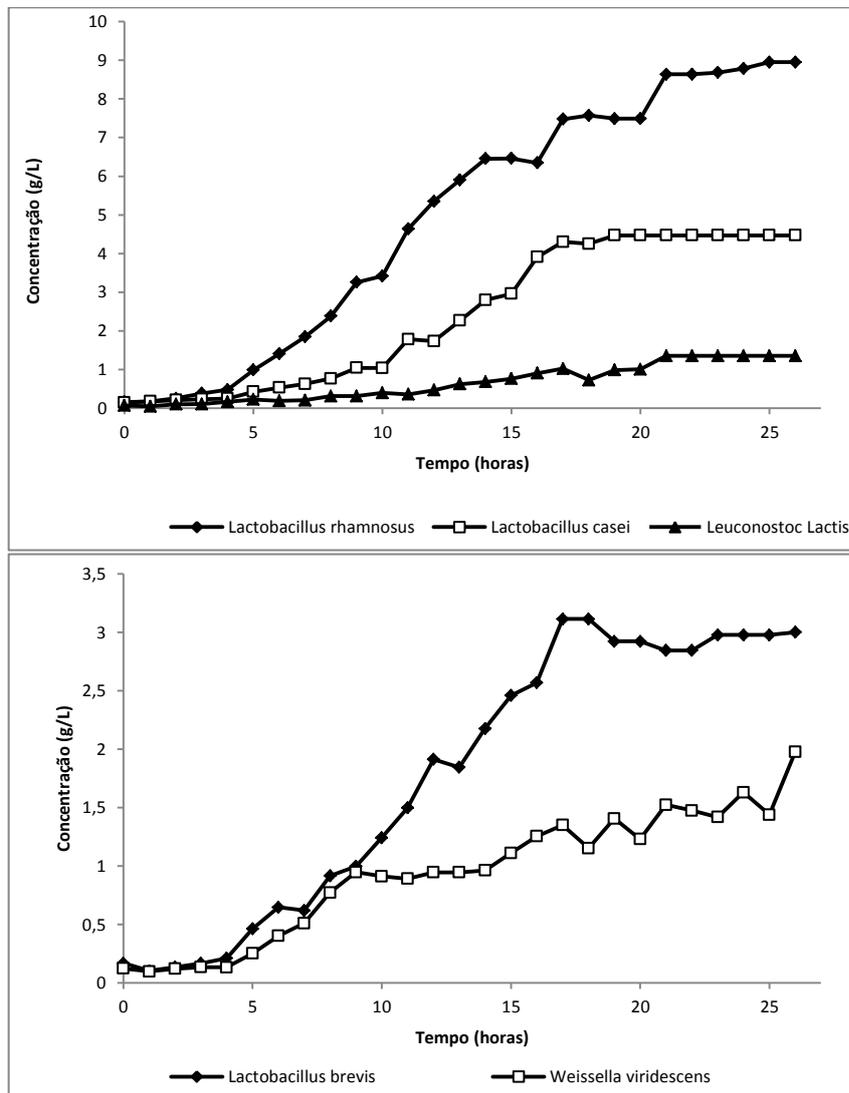
Quando comparadas em relação a produção de ácidos orgânicos, todas as bactérias estudadas mostraram capazes de realizar a síntese de ácido láctico e ácido acético. No entanto, cada microrganismo apresentou níveis diferentes em relação a produção destes metabólitos através da fermentação da glicose.

A tabela 3. traz os valores encontrados para os respectivos ácidos orgânicos sintetizados pelas bactérias láctica estudadas.

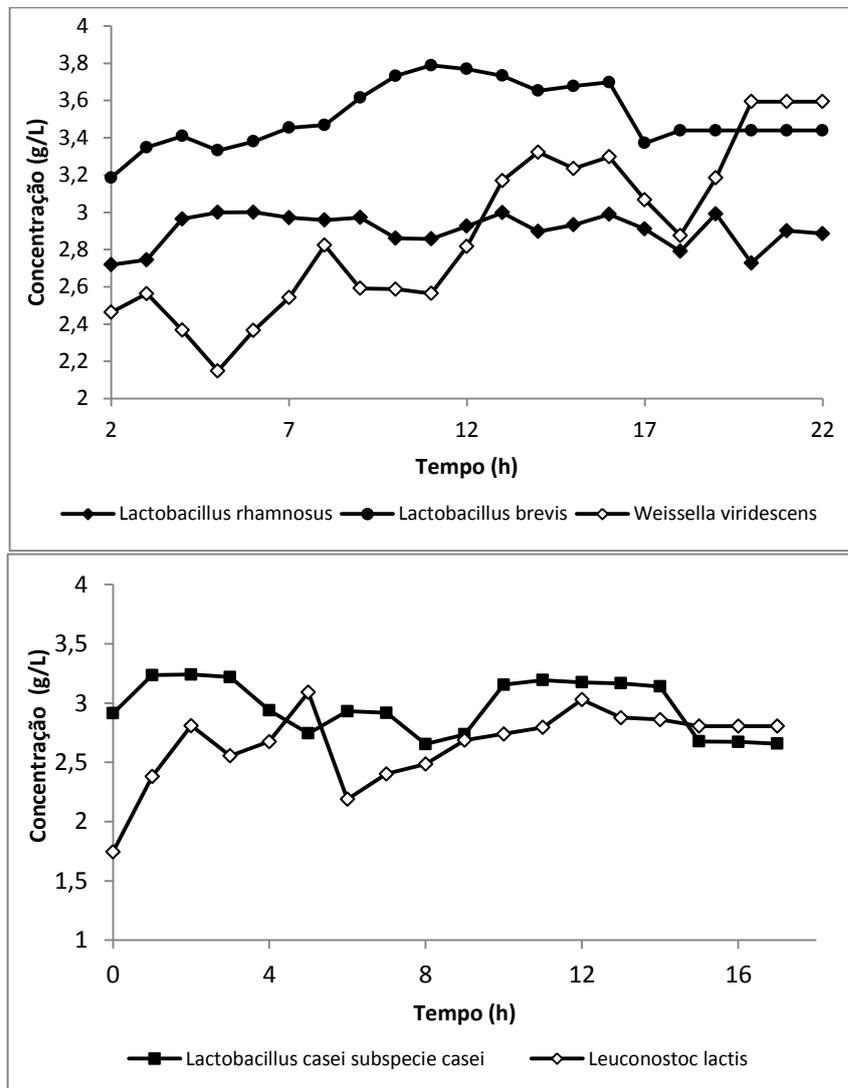
Tabela 3 - Produção de ácido láctico ( $\text{g.L}^{-1}$ ), ácido acético ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e etanol ( $\text{EtOH g.L}^{-1}$ ) por diferentes linhagens de bactérias lácticas em caldo MRS, sob temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  e agitação de 215 rpm.

	Ac. Láctico ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Ac. Acético ( $\text{g.L}^{-1}$ )	EtOHol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	pH final
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	8,95	3,00	0,045	4,33
<i>Lactobacillus casei subs. Casei</i>	4,47	3,19	0,005	4,51
<i>Lactobacillus brevis</i>	3,11	3,79	0,071	4,63
<i>Leuconostoc Lactis</i>	1,35	3,60	0,036	5,19
<i>Weissella viridescens</i>	1,98	3,59	0,395	5,13

A Figura 16 e 17 mostram as curvas de formação de ácido láctico e acético durante o crescimento microbiano.



**Figura 16.** Curva de produção de ácido láctico pelos microrganismos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus brevis* e *Weissella viridescens* em caldo MRS.



**Figura 17.** Curva de produção de ácido acético pelas bactérias *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus brevis* e *Weissella viridescens* em caldo MRS.

A partir do resultado, observou-se que o microrganismo que apresentou maior desempenho na produção de ácido láctico, com concentração de  $8,95 \text{ g.L}^{-1}$ , foi *Lactobacillus rhamnosus*, seguido de *Lactobacillus casei subspécies casei* com produção de  $4,47 \text{ g.L}^{-1}$ . Valores maiores foram relatados por Nawel et al., (2012), sendo alcançados o valor de  $10,96 \text{ g.L}^{-1}$  de lactato no controle e  $13,78 \text{ g.L}^{-1}$  em fermentação em meio MRS acrescido de óleos essenciais de plantas. Os microrganismos representantes do gênero *Weissella* e *Leuconostoc* não apresentaram teores elevados de ácido láctico, sendo que o valor máximo para *Weissella*  $1,4 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  para *Leuconostoc*. Mussatto et al., (2008), utilizando MRS suplementado com cevada hidrolisado e pH controlado, obteve um rendimento máximo de  $35,54 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido láctico, enquanto que o mesmo meio sem pH controle resultou  $13,02 \text{ g.L}^{-1}$ .

De acordo com Hassan e Frank (2001) espécies pertencentes ao gênero *Leuconostoc* possuem a característica de não produzir grandes quantidades de ácidos, no entanto, são utilizadas em processos fermentativos juntamente com outros microrganismos para produzir *flavour*. A baixa capacidade de acidificação do meio em que estão incluídos fazem do gênero *Leuconostoc* um microrganismo importante na fermentação de vegetais, pois possuem a habilidade de iniciar a fermentação com velocidade superior a outras bactérias lácticas, que necessitam produzir grandes quantidades de ácidos para inibir o crescimento de contaminantes concorrentes (Mavhung, 2006).

Baixa produção de ácidos orgânicos por *Weissella* e *Leuconostoc* foram encontrados quando se avaliou a capacidade destes microrganismos em diminuir a acidez do meio. Dentre as bactérias estudadas, somente estas, apresentaram pH final de fermentação superior a 5. Valores semelhantes para *Weissella confusa* foram encontrados por Viegas et al. (2010), onde os valores mais altos de pH (4,48 e 4,53) em leite fermentado foram obtidos por essa linhagem. Segundo o autor, isso poderia estar relacionado com os menores percentuais de acidez e pelo metabolismo heterofermentativos obrigatório deste microrganismo. O pH do meio pode afetar o padrão de fermentação exibido pelas bactérias lácticas, dependendo da espécie considerada. *Lactobacillus bulgaricus* possui metabolismo homofermentativo em pH ácido, porém desvia seu metabolismo para rotas heterofermentativas quando em pH alcalino (Liu 2003).

De acordo com Idris e Suzana (2006) a produção de ácido láctico depende do crescimento microbiano, sendo que, o aumento na biomassa microbiana conduz a um aumento na produção de ácido láctico. Quando comparados com os resultados obtidos das bactérias *Weissella* e *Leuconostoc*, podemos perceber que estes microrganismos não se

enquadram nesta característica, pois produziram baixa concentração de ácido láctico. No entanto, as três espécies de *Lactobacillus* avaliadas quanto a produção de ácidos orgânicos, demonstraram elevada síntese de ambos metabólitos.

Como o ácido acético possui maior toxicidade do que o láctico (GUTIERREZ et al., 1991; MAIORELLA et al., 1983; NODA et al., 1980; PAMPULHA e LOUREIRO, 1989), pode-se dizer que o crescimento de *Leuconostoc* foi inibido no início do crescimento alcançou níveis baixos e pelo fato de a concentração de ácido acético ter sido constante e alta. Em um estudo realizado por Monteagudo et al., (1997) produtos inibidores do metabolismo celular durante o acumulado crescimento do microrganismo adicionado ao baixo pH do meio durante fermentação, obriga a célula a consumir mais energia para sobreviver sob estas condições adversas, levando a um mau desempenho e consequente morte.

Quanto à produção de metabólitos verificou-se que a produção de etanol, produto característico de bactérias heterofermentativas, passou a ser sintetizado por todos os microrganismos a partir de 6 horas, sendo *Weissella viridescens* o microrganismo que o sintetizou primeiro (6 horas), seguido de *Lactobacillus rhamnosus* e *brevis* (7 horas) e *Leuconostoc* (9 horas). *Lactobacillus casei subsp. casei* apresentou poucos picos durante o seu crescimento. A produção de ácidos orgânicos foi detectada desde o início dos cultivos, isto foi possível, pois a análise do meio de cultivo sem inóculo em CLAE, evidenciou a presença de ácido acético (2,11g.L<sup>-1</sup>) e ácido láctico (0,084g.L<sup>-1</sup>). A concentração inicial de glicose no meio de cultivo foi de 25,50 g.L<sup>-1</sup>.

A Tabela 4 traz a representação da produção máxima de metabólitos, correlação com o tempo de detecção e duração da cinética microbiana.

Tabela 5 - Representação da produção máxima de metabólitos, correlação com o tempo de detecção e duração da cinética microbiana, em meio MRS, sob 30°C e agitação de 215 rpm.

Linhagem	Ac. Láctico		Ac. Acético		Etanol	
	Concentração máxima (g/L)	TDM/TDC (horas)	Concentração máxima (g/L)	TDM/TDC (horas)	Concentração máxima (g/L)	TDM/TDC (horas)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	8,95	27h/27h	3,00	7h/27h	0,04	21h/27h
<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i>	4,47	21h/21h	3,19	12h/21h	0,01	21h/21h
<i>Lactobacillus brevis</i>	3,11	18h/22h	3,79	13h/22h	0,07	22h/22h
<i>Leuconostoc lactis</i>	1,35	23h/23h	3,60	23h/23h	0,04	23h/23h
<i>Weissella viridescens</i>	1,98	28h/28h	3,59	28h/28h	0,39	28h/28h

TDM: tempo de detecção do metabólito, TDC: tempo de duração da cinética

A partir destes podemos verificar que a produção de etanol máxima pelas bactérias consideradas heterofermentativas se deu no final das cinéticas de crescimento, exceto *L. rhamnosus* em que verificou-se a maior produção em 21 horas de cultivo. O valor máximo de produção de ácido acético foi verificado em *Lactobacillus* durante o período de 7 a 13 horas após o início do crescimento, em *Leuconostoc* e *Weissela*, ao contrário, esses valores foram obtidos durante a fase final do crescimento.

## **Processo Fermentativo do Concentrado Proteico por Bactérias do Ácido Lático.**

### **7.0 Análise da textura, cor, odor e acidez**

Para promover o crescimento adequado dos microrganismos no substrato proteico foi imprescindível a utilização da glicose, pois a carne de pescado apresenta baixo teor de carboidratos livres, sendo considerada sem efeito no processo fermentativo.

O pescado fermentado é definido como a transformação de substâncias orgânicas em compostos simples, através da ação de enzimas, que pode ser proveniente de microrganismos, que atuam incrementando sabor e odor desejados que resultam em uma maior aceitabilidade (ANDRADE, 1983). Geralmente, com o fim do processo fermentativo é alcançado as características desenvolvidas por meio de uma avaliação sensorial (aparência, cor, aroma e textura) (BEIRÃO, 1979; SANCHES, 1983).

Areche e Berenz (1989), demonstraram a eficiência de bactérias lácticas associadas com as mudanças nas características físico-químicas e microbiológicas do pescado fermentado. Foi observado que as bactérias lácticas realizaram o aumento das bases voláteis nitrogenadas e em especial da histamina, durante as primeiras 24 horas de fermentação, em seguida a concentração destes compostos diminuiu contribuindo para a redução do nitrogênio solúvel total.

Foi verificado no término do processo fermentativo que todas as bactérias lácticas utilizadas na obtenção de um fermentado láctico a base de concentrado proteico mostraram a característica de realizar alterações neste substrato, produzindo odores característicos, sendo que nenhuma linhagem apresentou odores desagradáveis. No entanto, esta característica

observada variou em cada espécie de bactéria estudada. Esta característica está intimamente relacionada com a fermentação da hexose presente no substrato fermentativo, sendo que o tipo de metabolismo e conseqüentemente os metabólitos excretados são considerados importantes para a implementação do *flavour*. De acordo com Ferreira (1987) no iogurte observa-se que a rápida formação de acidez e o aparecimento do *flavor* característico neste produto. Segundo o autor os principais componentes envolvidos neste processo são o ácido láctico, o acetaldeído e o diacetil em baixas concentrações. O acetaldeído é considerado o metabólito de maior importância para a geração do *flavor* característico deste fermentado, sendo os microrganismos *Lactobacillus delbrueckii subspécie bulgaricus* o principal produtor.

Os resultados finais do pH das fermentações, foram considerados satisfatórios, pois obteve-se valores muito baixos. Dentre os microrganismos os que apresentaram uma maior capacidade de acidificar o meio proteico foram as bactérias *Lactobacillus casei subspécies casei* ( $pH_f=3,98$ ) e *Lactobacillus rhamnosus* ( $pH_f=4,0$ ). Estes microrganismos são classificados com heterofermentativos facultativo, desta forma, pode-se supor que a alta concentração de glicose no substrato proporcionou a utilização da rota homofermentativa por estes microrganismos. No entanto, *Weissella viridescens* ( $pH_f=4,27$ ) e *Leuconostoc lactis* ( $pH_f=4,38$ ) apresentaram uma capacidade menor de acidificar, porém os valores obtidos por estes microrganismos já são considerados satisfatórios pois são abaixo do perfil ótimo para bactéria lácticas.

Adams et al., (1987), avaliando a ação preservativa do ácido láctico em truta (*Salmo truta*), monitoraram a eficiência da fermentação com a utilização das culturas *starters* comerciais de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*. Os autores evidenciaram o decréscimo do pH com a adição de 5% de sacarose.

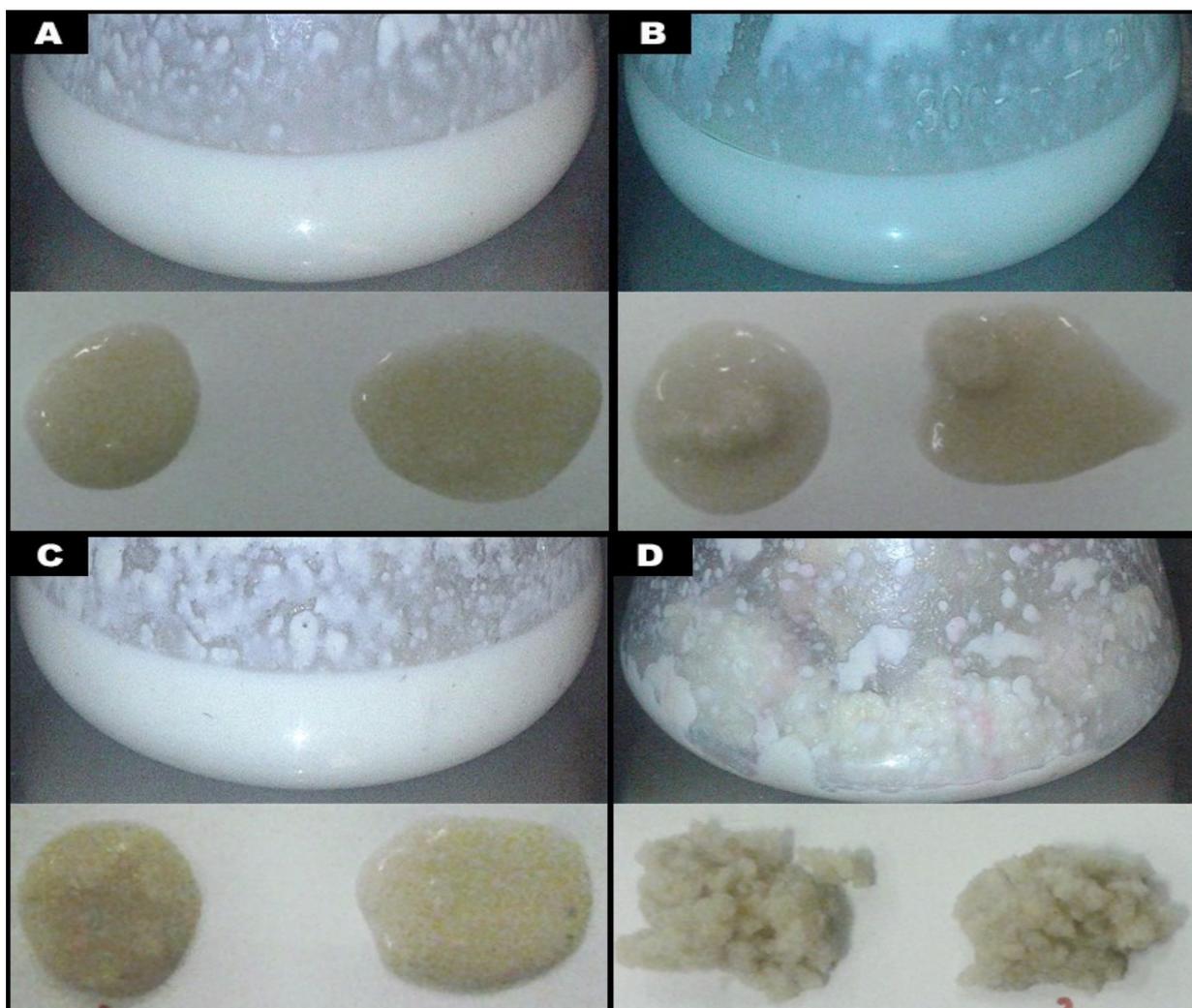
A acidificação do produto a um pH em torno de 4,0 inibe o crescimento patógenos, conseqüentemente permitindo uma maior conservação do produto fermentado (PIARD et al., 1999).

Um fator importante resultante da acidificação, é o desenvolvimento das propriedades sensoriais dos alimentos fermentados (CARR et al., 2002). Isto é ocasionado pela ação de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas que são produzidas por estes microrganismo e atuam transformando os nutrientes presentes no meio em compostos com propriedades sensoriais complexas alterando as características estruturais e aromáticas dos alimentos fermentados (PIARD et al., 1999).

Em relação a possíveis alterações na cor do fermentado proteico, esta se mostrou inalterada durante todo o processo para todos os microrganismos, exceto *Lactobacillus casei subspécies casei* em que o produto final apresentou uma leve coloração amarela.

A textura inicial do fermentado proteico também sofreu influência das cepas de microrganismos utilizadas, sendo modificada a cada dia da fermentação (Figura 18). Através do exame visual das fermentações, verificou-se durante os primeiros dias que o substrato apresentou consistência líquida, fato este justificado pela adição da solução de 10% de glicose no substrato. Porém a partir do decorrer do processo a consistência foi variando de acordo com o tratamento utilizado. Sendo que os microrganismos que apresentaram um fermentado proteico liquefeito foram *Weissella viridescens* e *Leuconostoc lactis*, sendo que o primeiro apresentou um caráter mais liquefeito, no entanto mais homogêneo do que no início do processo fermentativo.

O fermentado em que se adicionou a cultura de *Lactobacillus rhamnosus* apresentou uma consistência líquido-pastosa após o terceiro dia de fermentação, sendo esta permanecida até o fim do processo. Dados semelhantes foram descritos por Hardy et al. (1983). Este aspecto é resultado da contínua hidrólise proteica que acontece na silagem devido à ação das enzimas proteolíticas naturalmente presentes no pescado, principalmente nas vísceras e/ou adicionadas (HAARD et al., 1985; KOMPIANG, 1981).

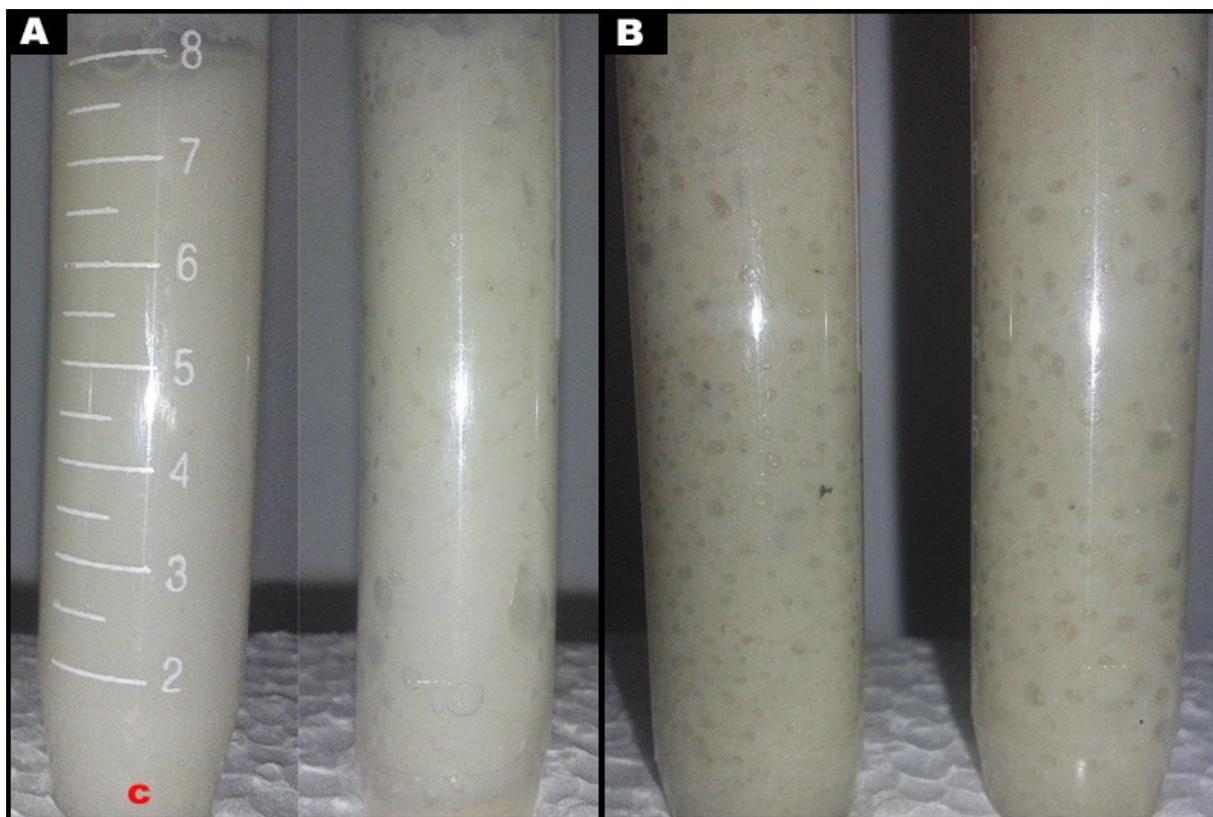


**Figura 18.** Características da textura final do concentrado proteico fermentado. A - tratamento com *Weissella viridescens*, B - Tratamento com *Leuconostoc lactis*, C - tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* e C - tratamento com *Lactobacillus casei* subspécie *casei*.

Ao contrário dos demais microrganismos, *Lactobacillus casei subspécies casei* foi a cultura em que a textura proteica do substrato foi menos alterada desde o início até o término do processo. O fermentado obtido foi caracterizado por possuir uma maior consistência. Desta forma, este microrganismo atuou sobre o substrato proteico realizando sua preservação, ao contrário de *Weissella* e *Leuconostoc*, em que pode-se especular que houve alteração de alguns componentes do substrato proteico, por isso, os tratamentos em que houve a inoculação destes microrganismos apresentaram a textura final mais liquefeita.

Foi constatada a produção de dióxido de carbono nas fermentações realizadas por todas cepas de bactérias lácticas, no entanto, observou-se que a produção deste gás variou durante o período fermentativo (Figura 19). Sendo que *Lactobacillus casei subspécies casei* e *Weissella viridescens* foram os que mais apresentaram esta atividade e *Leuconostoc lactis* a

que menos se verificou. A bactéria *Lactobacillus rhamnosus*, permaneceu neste perfil durante os primeiros dias de fermentação, estando ausente no fim da fermentação.



**Figura 19.** Formação de bolhas de gás carbônico por bactérias Lácticas. A - *Weissella viridescens*: C - controle, B - *Lactobacillus casei* subspécie *casei*.

## 8.0 CONCLUSÕES

Com os resultados constatou-se que as espécies de bactérias lácticas congregam os tipos metabólicos heterofermentativos facultativo e obrigatório. Estas bactérias são de interesse na indústria de alimentos, pois produzem alterações sensoriais benéficas nos alimentos e mantêm sua conservação.

Por meio da análise de produção de metabólitos verificou-se a capacidade que cada bactéria possui em acidificar e incrementar características sensoriais ao fermentado proteico, sendo viável a utilização destas cepas para o desenvolvimento de outros produtos fermentados.

Cada fermentado apresentou características próprias, sendo que a produção de *flavour* ácido foi observada em todas as fermentações.

Os fermentados mostraram eficiente redução do pH durante o processamento fermentativo, devido à atividade fermentativa desses microrganismos.

Os resultados encontrados demonstram que a utilização destas bactérias lácticas para a elaboração de produtos fermentados pode variar de acordo com as características que se deseja encontrar no produto final. Caso o interesse seja o de inibir o crescimento de microrganismos contaminantes e de obter um produto mais ácido, os microrganismos indicados são *Lactobacillus casei subspécie casei* e *Lactobacillus rhamnosus*, pois foram estes os maiores produtores de ácidos orgânicos. No entanto caso o intuito seja a produção de gás carbônico e pouca acidificação do produto, características essenciais na fabricação de queijos, os microrganismos indicados são *Leuconostoc lactis* e *Weissella viridescens*.

A fermentação do concentrado proteico por bactérias lácticas é viável, pois foi constatada a conservação do produto e a produção de características de sensoriais benéficas e de interesse.

## 9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, COLIN. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 169-185, 1995.

ADAMS, M R. Safety of industrial lactic acid bacteria. **Journal of biotechnology**, v. 68, n. 2-3, p. 171-8, 1999. n

ADAMS, MARTIN R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, v. 8, n. 5-6, p. 227-239, 1997.

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.

ALFARO, A.T. Otimização do processo e determinação das propriedades funcionais da gelatina de ossos de pescado. Rio Grande, 2004, 105p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Química, Universidade Federal de Rio Grande, FURG, 2004.

ALVIM, L. B. Luige biciati alvim. **Dissertação** (Mestrado em Genética) – Departamento de Biologia geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte., 2011.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v. 17, n. 6, p. 454-461, 2006.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v. 2, n. 5, p. 12- 18, 1982.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C. R.; GARCIA, C.E.; GODOY, A.; DALLAQUA, M.; CHERUBIN, R.A. Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica - **Microscopia**. Piracicaba: FERMENTEC, 74p, 2003.

ANDRADE, M. O. Pescado fermentado. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A; BORZANI, W. Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: **Edgard Blücher**, v. 5, 1983

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC international. 16th ed. Arlington, 1995.

AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgar Blücher, 1983. 227p.

ARECHE, T. N.; BERENZ, Z. Ensilado de residuos de pescado por bacterias del yogur. **Boletín de Investigación** - Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, Callao, v.3, p. 26-36, 1989.

ARVANITTOYANNIS, I. S. & KASSAVETI, A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. **Int J Food Sci Technol**, v. 43, n. 4, p. 726-745, 2007.

AUNE, T.M.; THOMAS, E.L.. Accumulation of hypothiocyanate ion during peroxidase catalysed oxidation of thiocyanate ion. **Eur. J. Biochemistry**, 17:1005-10, 1978.

AYENI, F. A; SÁNCHEZ, B.; ADENIYI, B. A; et al. Evaluation of the functional potential of Weissella and Lactobacillus isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. **International journal of food microbiology**, v. 147, n. 2, p. 97-104, 2011.

BEIRÃO, L. H. Parâmetros de maturação de sardinha (*Sardinella brasilienses* S.) no processo de anchovagem. São Paulo, 120 p. **Dissertação** (Mestrado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1979.

BERTOLDI, F. C. EFEITO DO *Lactobacillus casei* subsp . *casei* ATCC 393 NA REDUÇÃO DO SABOR AMARGO DA CARNE ESCURA DE ATUM ( *Euthynnus pelamis* ).

**Dissertação** (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis., p. 48, 2003.

BERTULLO, V.H. **Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1975. 538p.

BJÖRKROTH, K. J.; SCHILINGER, U.; GEISEN, R.; WEISS, N.; HOSTE, B.; HOLZAPFEL, W. H.; KORKEALA, H. J.; VANDAME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 52, p. 141-148, 2002.

BORCH, E.; NERBRINK, E.; SVENSSON, P. Identification of major contamination sources during processing of emulsion sausage. **International journal of food microbiology**, v. 7, n. 4, p. 317-30, 1988.

BRUNO, M.; MONTVILLE, T. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and environmental ...**, v. 59, n. 9, p. 3003-10, 1993.

CAMILO, A. I. G.; FONSECA, G. G.; CAVENAGHI, A. D.; HELD AZAMBUJA, S. P. Obtenção de concentrado proteico a partir de carne mecanicamente separada de pescado pintado. **Anais Do Encontro De Iniciação Científica-Enic**, v. 1, n. 1, 2011.

CAMPBELL, I. & PRIEST, F.G. *Brewing Microbiology*. Second edition, **International center for brewing and distilling**, Chapman & Hall, U.K, pp. 134-15, 1996.

CAPELLARI, J. B. Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville, p. 67, 2010.

CAPLICE, ELIZABETH; FITZGERALD, GERALD F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International journal of food microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 131-49, 1999.

CARIDI, A.; MICARI, P.; CAPARRA, P.; CUFARI, A.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 191-200, 2003.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical reviews in microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CHANG, T. L.-Y.; CHANG, C.-H.; SIMPSON, D. A. et al. Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11672-7, 2003.

CHELO, I. M.; ZÉ-ZÉ, L.; TENREIRO, R. Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping. **Microbiology (Reading, England)**, v. 156, n. Pt 2, p. 420-30, 2010.

CHOI, H. J., CHEIGH, C. I., KIM, S. B., LEE, J. C., LEE, D. W., CHOI, S. W., PARK, J. M. & PYUN, Y. R. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. **Int J Syst Evol Microbiol** 52, 507–511, 2002.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International journal of food microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

COGAN, T. M.; FITZGERALD, R. J.; DOONAN, S. Acetolactate synthase of *Leuconostoc lactis* and its regulation of acetoin production. **Journal of Dairy Research**, v. 51, n. 04, p. 597-604, 1984. Cambridge Journals Online.

COGAN, T. M.; JORDAN, K. N. Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2704-2717, 1994.

COLLINS, E. B.; ARAMAKI, K. Production of Hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of dairy science**, v. 63, n. 3, p. 353-7, 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6768778>>. Acesso em: 14/4/2013.

COLLINS, M D; SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; WALLBANKS, S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **The Journal of applied bacteriology**, v. 75, n. 6, p. 595-603, 1993.

COSTA, V. M. Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D (-) e L (+) do ácido láctico. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, p. 65, 2006. Piracicaba.

COVENTRY, M. J.; GORDON, J. B.; WILCOCK, A. et al. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. **Journal of applied microbiology**, v. 83, n. 2, p. 248-58, 1997.

COVENTRY, M.J.; GORDON, J.B.; WILCOCK, A.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B.E.; HICKEY, M.W.; HILLIER, A.J.; WAN, J. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.83, n.2, p.248-258, 1997.

DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, n.43, p.164-167, 1989.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Nisin, A Lantibiotic Produced by *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis*: Properties, Biosynthesis, Fermentation and Applications. In: L. Vuyst; E. J. Vandamme (Eds.); **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications**. E.J. Edito ed., p.151-221, 1994. London: Springer US.

DELLAGLIO, F; DICKS, L. M. T.; TORRIANI, S. The Genus *Leuconostoc*. In: B. J. B. Wood; W H Holzapfel (Eds.); **The Genera of Lactic Acid Bacteria SE - 7**. v. 2, p.235-278, 1995. Springer US.

DICKS, L. M. T.; MELLETT, F. D.; HOFFMAN, L. C. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. **Meat science**, v. 66, n. 3, p. 703-8, 2004.

DICKS, L.M.T., L. FANTUZZI, F. GONZALEZ, M. DU TOIT, AND F. DELLAGLIO. *Leuconostoc argentinum* sp. nov., isolated from argentine raw milk. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 43, 347-351, 1993.

DISSARAPHONG, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. The Influence Of Storage Conditions Of Tuna Viscera Before Fermentation On The Chemical, Physical And Microbiological Changes In Fish Sauce During Fermentation. **Bioresource Technology**.

ENNAHAR, S.; CAI, Y. Genetic evidence that *Weissella kimchii* Choi et al. 2002 is a later heterotypic synonym of *Weissella cibaria* Björkroth et al. 2002. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. Pt 2, p. 463-5, 2004.

EUZEBY, J.P.: List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 47, 590-592, 1997.

FALAGAS, M. E.; BETSI, G. I.; ATHANASIOU, S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 657-64, 2007.

FAO/WHO. Code practice for fish and fishery products (CAC/ RCP 52-2003). **Codex alimentarius: food standards**, Roma, p.1-146, 2003.

FARROW, J. A. E.; FACKLAM, R. R.; COLLINS, MATTHEW D. Nucleic Acid Homologies of Some Vancomycin-Resistant *Leuconostocs* and Description of *Leuconostoc citreum* sp . nov . and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp . nov . , , n. July, p. 279-283, 1989.

FELIS, G. E., DELLAGLIO, F., MIZZI, L. AND TORRIANI, S. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 2113-2117, 2001

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 206 p, 2003

FERREIRA, S. O. Aplicação de tecnologia à espécie de pescado de água doce visando atender a agroindústria rural. 1987. 121 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

FONSECA, G.G. Análise de Fluxos Metabólicos em *Kluyveromyces marxianus* utilizando substratos marcados com <sup>13</sup>C. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia), São Paulo, 2007.

FONTES, C. P. M. L. PRODUÇÃO DE MANITOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO SUCO DE CAJU UTILIZANDO BACTÉRIAS LÁTICAS HETEROFERMENTATIVAS. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Quality and quality changes in fresh fish**. Roma, 1995. 195p.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Fundamentals of Cheese Science**. Springer; 1 edition, 2000.

FUSCO, V.; QUERO, G. M.; STEA, G.; MOREA, M.; VISCONTI, A. Novel PCR-based identification of *Weissella confusa* using an AFLP-derived marker. **Int J Food Microbiol**, v. 145, n. 2-3, p. 437-443, 2011. Elsevier B.V.

GANDHI, D. **Dairy Microbiology Division**. 2006.

GARRITY, G.M., BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. **The Proteobacteria**, Springer-Verlag, 2005

GARVIE, E. I. Genus *Leuconostoc* In: SENAETH, P.H.A; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT J.G. (editors). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. **Baltimore: Williams and Wilkins**. 1234 p, 1986

GARVIE, E. I. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Knudsen and Sorensen) comb. nov. and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Beijerinck) comb. nov.

**International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, n. 1, p. 118-119, 1983.

GARVIE, E. I. Proposal of Neotype Strains for *Leuconostoc mesenteroides* (Tsenkovskii) van Tieghem, *Leuconostoc dextranicum* (Beijerinck) Hucker and Pederson, and *Leuconostoc cremoris* (Knudsen and Sorensen) Garvie. **International Journal of Systematic**

**Bacteriology**, v. 29, n. 2, p. 149-151, 1979.

GARVIE, E. I. The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. **J. Gen. Microbiol.**, v.48, p.439-447, 1967.

GARVIE, E.I. Separation of Species of the Genus *Leuconostoc* and Differentiation of the *Leuconostoc*'s from Other Lactic Acid Bacteria, In: **Methods in Microbiology** vol 16. Ed. Bergen, T., Academic Presss, London, pp. 147-177, 1984.

GARVIE, E.I. The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. **Journal of Dairy Sciences**. 27: 283-292, 1960.

GOLBERG, I.; WILLIAMS, R. *Biotechnology and food ingredients*. New York: **Van Nostrand Reinhold**, 577p, 1991.

GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Bol. Biotecnol. Al.**, São Paulo, n. 64, p. 12-22, 1999.

GOMES, J. C. et al. Processamento e caracterização do surimi de água doce. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.14, p.226-237, jul/dez, 1994.

GRANGETTE, C.; MÜLLER-ALOUF, H.; GOUDERCOURT, D. et al. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. **Infection and immunity**, v. 69, n. 3, p. 1547-53, 2001.

GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 245-250, 2005.

GUTIERREZ, L. E.; ANNICHINO, A. V. K. O.; LUCATTI, L.; STIPP, J. M. S. Efeitos do ácido acético sobre a fermentação alcoólica. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 34, n. 2, p. 235-242, 1991.

HAARD, M.F.; KARIEL, N.; HERZBERG, G.; FELTHAM, L.A.W.; WINTER, K. Stabilization of protein and oil fish in silage for use as a ruminant feed supplements. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.36, n.4, p.229-241, 1985.

HAMMES, W. P. & HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: **The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria**, 3rd edn, vol. 4, pp. 320–403. Edited by M. DWORKIN, S. FALKOW, E. ROSENBERG, K. H. SCHLEIFER & E. STACKEBRANDT. New York: Springer, 2006.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: B. J. B. Wood; W H Holzapfel (Eds.); **The Genera of Lactic Acid Bacteria SE - 3**. v. 2, p.19-54. Springer US, 1995.

HAMMES, W.P.; HERTEL, C. Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. **Food Research International**, v. 35, n. 2/3, p. 165-170, 2002.

HANSEN, E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 119-131, 2002.

HARDY, R.W.; SHEARER, K.P.; STONE, F.E. WIEG, D.H. Fish silage in aquaculture diets. **Journal of World Mariculture Society**, v.14, p.695-703, 1983.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HOLZAPFEL, W H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 197-212, 2002.

HOLZAPFEL, WILHELM H; VAN WYK, E. P. *Lactobacillus kandleri* sp. nov., a new species of the subgenus betabacterium, with glycine in the peptidoglycan. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie**, v. 3, n. 4, p. 495-502, 1982.

HUCKER, G.J. AND PEDERSON, C.S., Eds., Genus IV. *Leuconostoc*, in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, **Breed, R.S., Murray, E.G.D., and Smith, N.R., 7th ed.**, Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland, 531-533, 1957.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and technology of fermented foods**. 2006.

IDRIS, A.; SUZANA, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1117-1123, 2006.

JACOBSEN, C. N.; ROSENFELDT NIELSEN, V.; HAYFORD, A. E. et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4949-56, 1999.

JAY, J. Antimicrobial properties of diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 525-532, 1982.

JAY, J. M. Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. **Meat Science**, v. 43, Supple, n. 0, p. 59-66, 1996.

JAY, M. J. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 711p, 2005

JEPPESEN, V. F.; HUSS, H. H. Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5 degrees C. **International journal of food microbiology**, v. 19, n. 3, p. 179-86, 1993.

JYOTI, B. D.; SURESH, A K.; VENKATESH, K. V. Effect of preculturing conditions on growth of *Lactobacillus rhamnosus* on medium containing glucose and citrate.

**Microbiological research**, v. 159, n. 1, p. 35-42, 2004.

KAJIKAWA, A.; SATOH, E.; LEER, R. J.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Intragastic immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.

**Vaccine**, v. 25, n. 18, p. 3599-605, 2007.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 49, n. 3, p. 209-24, 1983.

KANDLER, O; WEISS, N; GARRITY, G.; WILLIAMS, J.; WILKINS, C. **In Bergey's Manual of Systematic Bacteriol.**, 2. 1986.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria The term “ lactic acid bacteria ” gradually emerged in the years around the. **Antoine van Leeuwenhoek**, v. 49, p. 209-224, 1983.

KIM, J., J. CHUN, AND H.-U. HAN. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from Kimchi. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50, 1915-1919, 2000a.

KIM, J.-H.; SHOEMAKER, S. P.; MILLS, D. A. Relaxed control of sugar utilization in *Lactobacillus brevis*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 155, n. Pt 4, p. 1351-9, 2009.

KITCHELL, A.G. AND SHAW, B.G. Lactic acid bacteria in fresh and cured meat. In: **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food** ed. CARR, J.G., CUTTING, C.V. AND WHITING, G.C. pp. 209-220. London: Academic Press, 1975.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, n. 3, p. 337-49, 1988.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 12, n. 1-3, p. 39-85, 1993.

- KOMPIANG, I. P. Fish silage - Its prospect and future in Indonésia. **Indonésia Agricultural Research & Develop Journal**. v. 3, p. 1-12, 1981.
- KUHN, C. R.; SOARES, G. J. D. Proteases e inibidores no processamento de surimi. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.1, p.5-11, 2002.
- LEE, J.-S.; LEE, K. C.; AHN, J.-S. et al. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. Pt 4, p. 1257-61, 2002.
- LEE, S. H.; LILLEHOJ, H. S.; DALLOUL, R. A. et al. Influence of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. **Poultry science**, v. 86, n. 1, p. 63-6, 2007.
- LEE, Y. Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. **FEMS microbiology letters**, v. 250, n. 1, p. 157-62, 2005.
- LEE, Y.-K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 7, p. 241-245, 1995.
- LINDEN, G.; LORIENT, D. Bioquímica agroindustrial - **Revalorización alimentaria de la producción agrícola**. Zaragoza: Acribia, 1994. 428p.
- LING LS, MOHAMAD R, RAHIM RA, WAN HY, ARIFF AB. Improved production of live cells of *Lactobacillus rhamnosus* by continuous cultivation using glucose-yeast extract medium. **J. Microbiol.** Aug;44(4):439-46, 2006.
- LING, L. S.; MOHAMAD, R.; RAHIM, R. A.; WAN, H. Y.; ARIFF, A. BIN. Improved production of live cells of *Lactobacillus rhamnosus* by continuous cultivation using glucose-yeast extract medium. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 44, n. 4, p. 439-46, 2006.
- LIU, S. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 115-131, 2003.

LÓPEZ-DÍAZ, T. .; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. .; MORENO, B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-115, 2000.

MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANZEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 3, p. 213-22, 2003.

MAGNUSSON, J.; JONSSON, H.; SCHNÜRER, J.; ROOS, S. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. Pt 3, p. 831-4, 2002.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 25, p. 103-121, 1983.

MARINÉ-FONT, A., M. C. VIDAL-CAROU, M. IZQUIERDO-PULIDO, M. T VENCIANA-NOGUÉS, AND T. HERNÁNDEZ-JOVER. Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann. Fals. Exp. Chim*, vol 88, pp. 11-140, 1995.

MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; FERNÁNDEZ DE PALENCIA, P.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavour development in cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 8, p. 577-585, 2001.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; COLLINS, M. D. A phylogenetic analyses of an atypical *Leuconostoc*: description of *Leuconostoc fallax* sp. nov. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.82, p. 55-60, 1991

MAVHUNG, J. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from “ Ting ” in the Northern Province of South Africa. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia) – Departamneto de Microbiologia e patologia de Plantas, Universidade de Pretoria, Pretoria, Africa do Sul., 2006.

MAZO, J., S.; E., F.; B., P.; A., F. Detecção De Bacteriocinas Produzidas Por *Lactobacillus Plantarum* Bn Em Melaço De Cana-De-Açúcar Sob Fermentação Submersa. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimento**, v. 20, p. 157-172, 2002.

MENSAH, P.; TOMKINS, A. M.; DRASAR, B. S.; HARRISON, T. J. Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. **Journal of Applied Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 203-210, 1991. Blackwell Publishing Ltd.

MILBOURNE, K. Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. **Meat Sci** **9**, 113–119, 1983.

MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, n. 1-4, p. 185-98, 1999.

MONTEAGUDO, J. M.; RODRÍGUEZ, L.; RINCÓN, J.; FUERTES, J. Kinetics of Lactic Acid Fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* Grown on Beet Molasses. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 68, n. 3, p. 271-276, 1997.

MORZEL, M.; FRANSEN, N.G.; ELKE, K.A. Defined starter cultures used for fermentation of salmon fillets. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.6, p.1214- 1218, 1997.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 39, n. 1, p. 13-126, 1999.  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028126>>. Acesso em: 14/4/2013.

NAM, H.; HA, M.; BAE, O.; LEE, Y. Effect of *Weissella confusa* Strain PL9001 on the Adherence and Growth of *Helicobacter pylori* Effect of *Weissella confusa* Strain PL9001 on the Adherence and Growth of *Helicobacter pylori*. , v. 68, n. 9, 2002.

NAWEL, O.; AHMED, H.; DONIA, Z. E. A. Effect of the Essential Oils from Parsley and Fennel Seeds on the Growth of *Lactobacillus Casei* Subsp *Rhamnosus*. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 02, n. 03, p. 3-7, 2012.

NEIVA, C. R. P. Aplicação da tecnologia de carne mecanicamente separada – CMS na indústria de pescado. In: **Simpósio de Controle do Pescado**, 2. São Vicente. Anais... São Vicente: Instituto de Pesca, p. 1-7, 2006.

NIVEN, C. F., JR&EVANS, J. B. Lactobacillus viridescens nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discolouration of cured meat pigments. **J Bacteriol** **73**, 758–759, 1957.

NIVEN, C. F.; BUETTNER, L. G.; EVANS, J. B. Thermal tolerance studies on the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. **Applied microbiology**, v. 2, n. 1, p. 26-9, 1954.

NODA, F.; HAYASHI, K.; MIZUNUMA, T. Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeast in brine fermentation of soy sauce. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 40, p. 452-457, 1980.

O’SULLIVAN, L.; ROSS, R. .; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.

OETTERER, M. Produtos Obtidos por Interferência na Fração Protéica do Pescado. Piracicaba: ESALQ, 2001. RAA, J. & GILDBERG, A. Fish silage: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, 16: 383, 1982.

OETTERER, M. Química do pescado. In: OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. p. 353-359.

OLIVEIRA, MARIA LEONOR S; MONEDERO, V.; MIYAJI, ELIANE N; et al. Expression of Streptococcus pneumoniae antigens, PsaA (pneumococcal surface antigen A) and PspA (pneumococcal surface protein A) by Lactobacillus casei. **FEMS microbiology letters**, v. 227, n. 1, p. 25-31, 2003.

OLIVEIRA, MARIA LEONOR SARNO; ARÊAS, A. P. M.; CAMPOS, I. B. et al. Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in Streptococcus pneumoniae colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing

pneumococcal surface antigen A. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 8, n. 4, p. 1016-24, 2006.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO, V. Interaction of the effects of acetic-acid and ethanol on inhibition of fermentation in *saccharomyces-cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, London, v. 11, n. 4, p. 269-274, 1989.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 6, p. 465-499, 2003.

PESSATTI, M. L. Aproveitamento dos subprodutos do pescado. **Meta 11. Relatório Final de Ações Prioritárias ao Desenvolvimento da Pesca e Aqüicultura no Sul do Brasil, Convênio Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**, Universidade do Vale do Itajaí, MA/SARC, n.003/2000, 2001

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. **Le Lait**, v. 72, n. 2, p. 113-142, 1992.

PIARD, J-C. et al. Bactérias lácticas. **Biociência & Desenvolvimento**. Brasília. v. II, n. 8, p. 80-84, mai/jun. 1999.

POFFO, F.; SILVA, M. DA. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2011.

POOLMAN, M. G.; VENKATESH, K. V; PIDCOCK, M. K.; FELL, D. A. A method for the determination of flux in elementary modes, and its application to *Lactobacillus rhamnosus*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 601-12, 2004.

POT, B.; HERTEL, C.; LUDWIG, W. et al. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. **Journal of general microbiology**, v. 139, n. 3, p. 513-7, 1993.

PRUITT, K.M.; TENOVUO, J.; ANDREWS, R.W.; MCKANE, T.. Lactoperoxidase-catalyzed oxidation products. **Biochemistry**, 21:562-7, 1982.

QUERE, F.; DESCHAMPS, A.; URDACI, M. C. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of applied microbiology**, v. 82, n. 6, p. 783-90, 1997.

RANKEN, M. D. **Manual de Industrias de los Alimentos**. Editorial Acribia, S.A. 2a ed. España, 1993.

RAY, B., & DAESCHEL, M.. Food biopreservatives of microbiological origin. **CRC Press, Inc.**, Boca Raton, Fla ,1992.

REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 1, p. 22-34, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17884326>>. Acesso em: 14/4/2013.

RENGPIPAT, S.; RUEANGRUKLIKHIT, T.; PIYATIRATITIVORAKUL, S. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 2, p. 134-143, 2008.

RICHARDS, M.; R. M. MACRAE. The significance of the use of hops in regard to the biological stability of beer. II. The development of resistance to hop resins by strains of lactobacilli. **J. Inst. Brewing**, vol. 70, pp. 484-488, 1964.

ROBINSON, D.S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1991. 516p.

ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. **Journal of dental research**, v. 30, n. 5, p. 682-9, 1951.

RUSSELL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. **The Journal of applied bacteriology**, v. 71, n. 3, p. 191-201, 1991.

SAITO, H., T. WATANABE, O. TADO. 1980. Protective effects of lactobacilli on experimental Escherichia coli infection. **Med. Biol.** 101, 61-64, 1980.

SALMINEM, S. Probiotics: how should they be defined? **Trends Food Sci. Tech.**, v.10, p. 107-110, 1999.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. Lactic acid bacteria. New York: **Marcel Dekker**, 1993. 442p

SANCHES, L. Estudos sobre a conservação de peixes de água doce por fermentação com quatro espécies brasileiras. São Paulo: **Faculdade do Sagrado Coração**, 93 p. (Caderno de Divulgação Cultural, n. 10), 1983

SANTA, O. R. D. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SALAMES ARTESANAIS E SELEÇÃO DE CULTURAS STARTER PARA A PRODUÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO. **Dissertação** (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 133, 2008.

SANTO, M. Efeito da bacteriocinogenicidade do Lactobacillus sakei 2a na qualidade microbiológica da sardinha verdadeira (Sardinella brasiliensis) fermentada. **Dissertação** (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis., p. 198, 2003.

SAVADOGO, A., C.A.T. OUATTARA, A.S. OUATTARA AND A.S. TRAORÉ. Isolement et Caractérisation de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides à partir de laits du Burkina Faso. **Revue Sci. et Tech.**, Séries Sci. Nat. et Agro., 25: 75-85, 2001.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, A.; BASSOLE, I. H. N.; TRAORE, S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 678-683, 2006.

SAZAWAL, S.; HIREMATH, G.; DHINGRA, U. et al. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. **The Lancet infectious diseases**, v. 6, n. 6, p. 374-82, 2006.

SCHILLINGER, U. & LUKE, F.K. Identification of *Lactobacilli* from meat products, **Journal of Food Microbiology**, pp. 4, 199-208, 1987.

SCHILLINGER, U. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 79-87, 1999.

SCHILLINGER, U., AND LÜCKE, F.K., Identification of Lactobacilli from meat and meat products, **J. Food Microbiol.**, 4, 199-208, 1987.

SEITZ, E.W., SANDINE, W., ELLIKER, P.R. & DAY, R. Studies on diacetyl synthesis by *Streptococcus diacetylactis*. Canadian **Journal of Microbiology** 9, 431-441, 1963<sup>a</sup>

SHARP, M.E., GARVIE, E.I. AND TILBURY, R.H., *Some Slime-Forming Heterofermentative Species of the Genus Lactobacillus*, **Appl. Microbiol.**, 23, 389-397, 1972.

SHARPE, M.E., *Lactic Acid Bacteria in the dairy industry*, **J. Soc. of Dairy Technology**, 32, 9-17, 1979.

SHAW, B.G. and C.D. Harding. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 39, 217-223, 1989.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 623 p, 2002

SILVA, B. C. Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico para uso como veículos vacinais orais contra a leptospirose canina. **Dissertação** (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

SIMÕES, D. R. S., QUEIROZ, M. I. VOLPATO, G., ZEPKA, L. Q. Desodorización de la base protéica de pescado (BPP) con ácido fosfórico. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 24(1): 023-026, jan-mar. 2004.

SINGLETON, P. AND SAINSBURY, D., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2<sup>nd</sup> ed., **John Wiley & Sons**, New York, 1987.

SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematics Bacteriology**. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1075-1079, 1986.

SOUZA, J. L. L.; RODRIGUES, L. G. G. GONZALES, P. M.; TORTATO, R. et al. Atividade Antimicrobiana do *Lactobacillus Sakei* Na Fermentação Do Bonito- De-Barriga-Listrada (*Euthynnus Pelamis*). **Vetor (FURG)**, v. 16, p. 25-36, 2006.

STILES, M. E.; HASTINGS, J. W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 2, p. 247-251, 1991.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

TAHA, P. Estudo de viabilidade técnico-econômica da produção de su- rimi. **Dissertação Mestrado**, UFSC: Florianópolis, 104p, 1996.

TAKAHASHI, M., OKADA, S., UCHIMURA, T. AND KOZAKI, M., 1992. *Leuconostoc amelibiosum* Schillinger, Holzapfel, and Kandler Is a Subjective Synonym of *Leuconostoc citreum* Farrow, Facklam, and Collins, **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 42, 649-651, 1989.

TAKAHASHI, M.; OKADA, S.; UCHIMURA, T.; KOZAKI, M. *Leuconostoc amelibiosum* Schillinger, Holzapfel, and Kandler 1989 Is a Later Subjective Synonym of *Leuconostoc citreum* Farrow, Facklam, and Collins 1989. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 4, p. 649-651, 1992.

TANASUPAWAT, S.; SHIDA, O.; OKADA, SANAE; KOMAGATA, K. *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1479-1485, 2000.

TEN BRINK, B., C. DAMINK, H. M. L. J. JOOSTEN, AND J. H. J. HUIS IN'T VELD. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **Int. J. Food Microbiol**, vol 11, pp. 73-84, 1990.

TERRA, N. N. **Apontamentos sobre tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Editora Unisinos, 1998.

TEUGHEL, W.; VAN ESSCHE, M.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Probiotics and oral healthcare. **Periodontology** 2000, v. 48, p. 111-47, 2008.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International journal of food microbiology**, v. 83, n. 3, p. 233-44, 2003.

VALERIO, F.; FAVILLA, M.; DE BELLIS, P. et al. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. **Systematic and applied microbiology**, v. 32, n. 6, p. 438-48, 2009.

VANCANNEYT, M.; ZAMFIR, M.; DE WACHTER, M. et al. Reclassification of *Leuconostoc argentinum* as a later synonym of *Leuconostoc lactis*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. Pt 1, p. 213-6, 2006.

VANDAMME, P; POT, B.; GILLIS, M. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-38, 1996.

VIEGAS, R. P. Leites Fermentados Probióticos Produzidos A Partir De Bactérias Ácido-Lácticas E Adicionados De Concentrado Protéico De Soro Lácteo: Características Físico-Químicas, Microbiológicas E Sensoriais. **Dissertação (Mestrado em Ciência de Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, e Belo Horizont e.**, p. 70, 2008.

VIEGAS, R. P.; SOUZA, M R; FIGUEIREDO, T. C. Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho. , p. 460-467, 2010.

W., HICKEY, M.; HILLIER, A. J.; JAGO, G. R. Metabolism of Pyruvate and Citrate in *Lactobacilli*. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 36, n. 6, p. 487-496, 1983.

WHITING, G.C. Some biochemical and flavour aspects of lactic acid bacteria in ciders and other alcoholic beverages. In: CARR, J.G., CUTTING, C.V., WHITING, G.C. (Eds.), **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food**. Academic Press, London, pp. 69–85, 1975.

WISSELINK, H. .; WEUSTHUIS, R. .; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J.; GROBBEN, G. .  
Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n.  
2-3, p. 151-161, 2002.

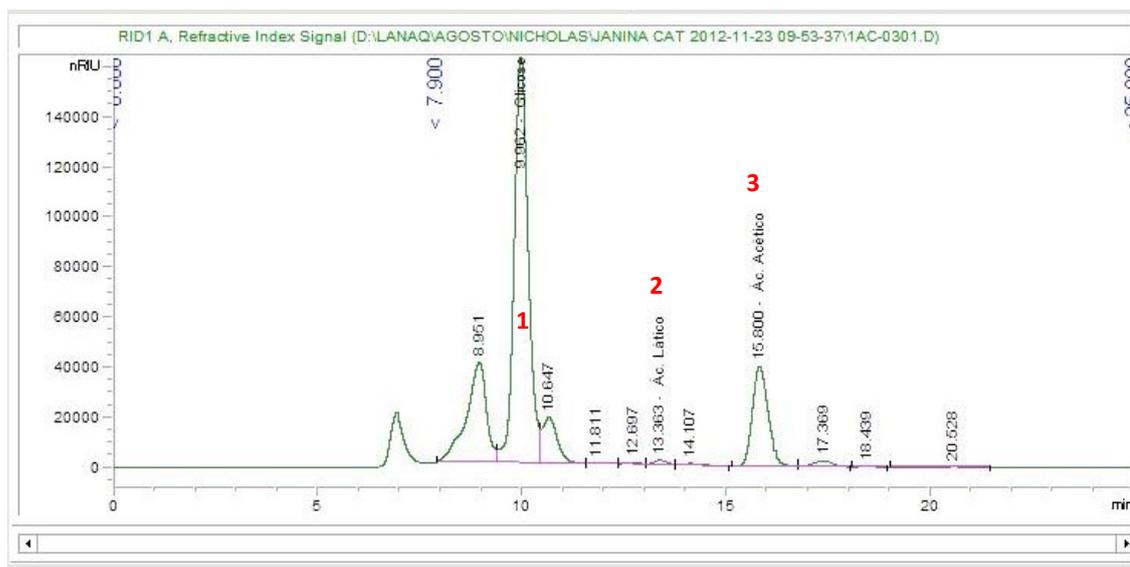
WIT, J. N. DE; HOOYDONK, A. C. M. VAN. Structure, functions and applications of  
lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. , v. 50, p. 227-244, 1996. P051,  
Levensmiddelenchemie en -microbiologie, Food Chemistry and Microbiology.

WOOD, J.B. BRIAN. **Microbiology of Fermented Foods**. Second edition. Blackie  
Academic& Professional. Chapman &Hall. UK, pp. 713-797, 1998.

WOOD, J.B. BRIAN. The lactic acid bacteria in health & diseases. **Elsevier Applied  
Science1**: 23-27, 1992.

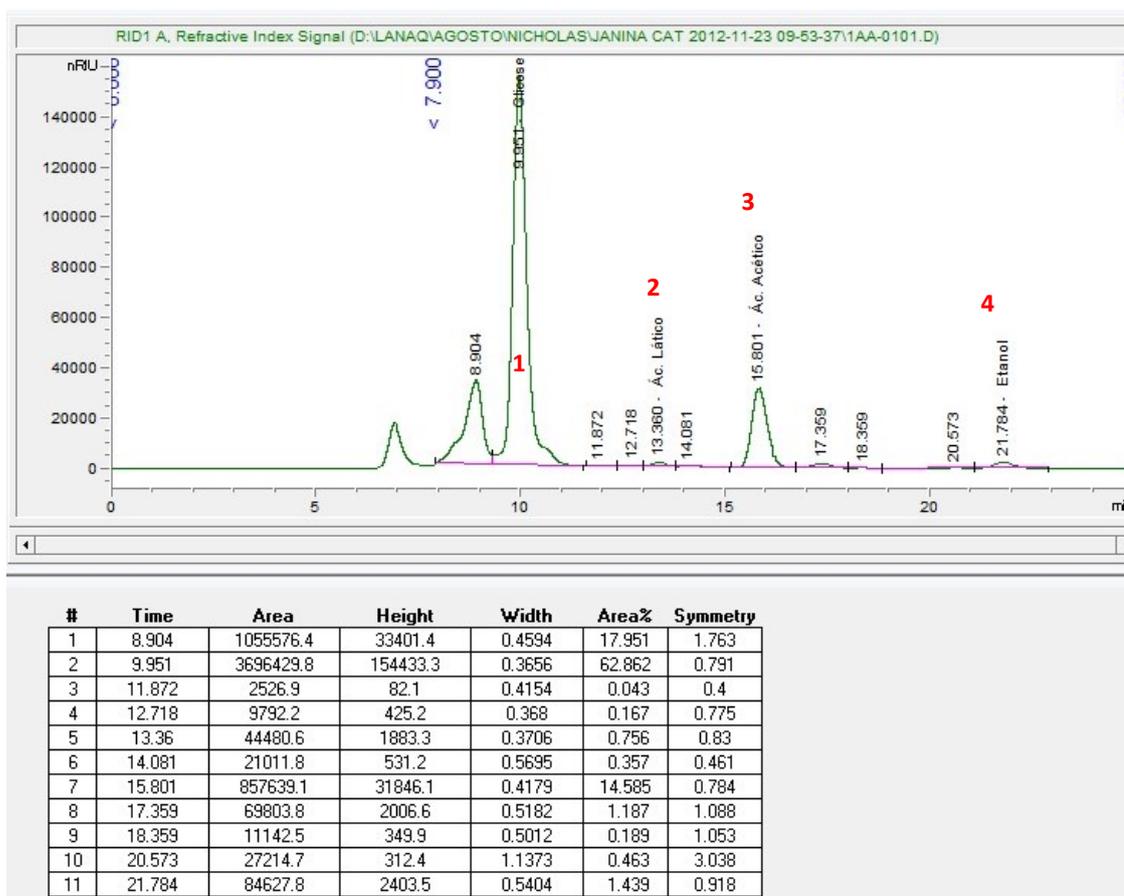
## 10.0 ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma de compostos presentes no caldo MRS analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sendo 1: glicose; 2: Ácido Lático; 3: Ácido acético apresentaram, respectivamente, os seguintes tempos de retenção: 9.96 min; 13,3 min e 15,8 min. Os demais picos na amostra, não foram identificados.

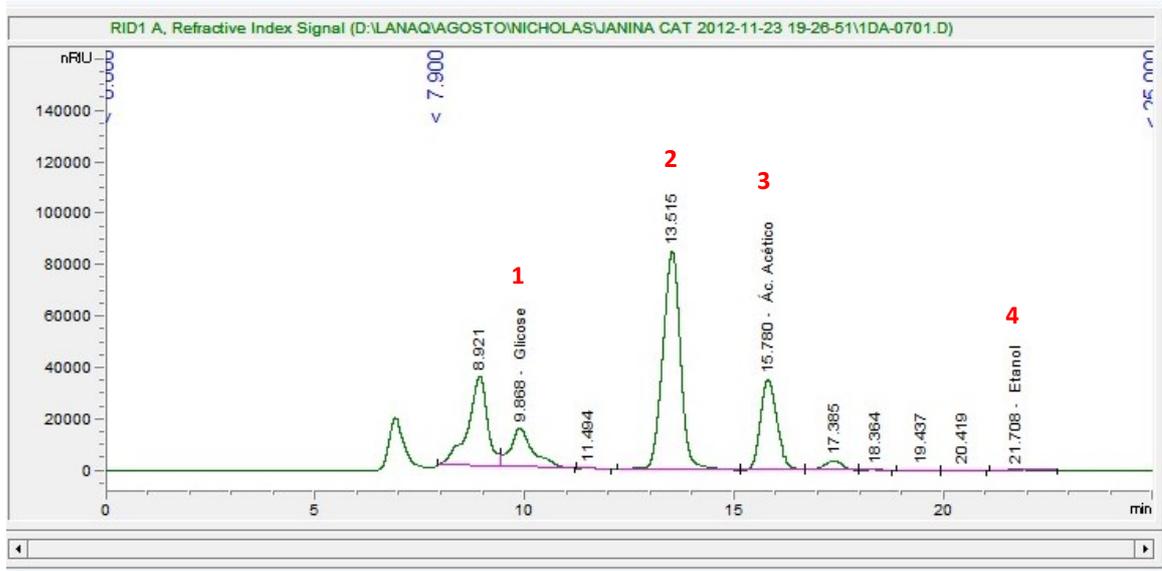


#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	8.951	1355452.9	40156.1	0.4932	19.509	1.767
2	9.962	3875219.5	163096.6	0.3679	55.776	0.876
3	10.647	439371.3	18226.5	0.3547	6.324	0.678
4	11.811	7379.6	152.5	0.6251	0.106	0.163
5	12.697	18120.1	747.1	0.3693	0.261	0.843
6	13.363	43595.1	1882.7	0.3609	0.627	0.816
7	14.107	31777.2	787.8	0.6348	0.457	0.54
8	15.8	1077031.4	39900.7	0.4186	15.502	0.783
9	17.369	76446.3	2416.7	0.477	1.100	1.156
10	18.439	5395.2	203.8	0.4169	0.078	0.681
11	20.528	18018.6	282.4	0.8652	0.259	1.903

Anexo 2. Cromatograma de compostos presentes no caldo MRS durante a cinética de crescimento, após inoculação (tempo 0 horas) de *Lactobacillus rhamnosus*, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sendo 1: glicose; 2: Ácido Lático; 3: Ácido acético e 4: etanol apresentaram, respectivamente, os seguintes tempos de retenção: 9.96 min; 13,3 min; 15,8 min e 21,7 min. Os demais picos na amostra, não foram identificados.



Anexo 3. Cromatograma de compostos presentes no caldo MRS durante a cinética de crescimento, após inoculação (tempo 27 horas) de *Lactobacillus rhamnosus*, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sendo 1: glicose; 2: Ácido Lático; 3: Ácido acético e 4: etanol apresentaram, respectivamente, os seguintes tempos de retenção: 9.96 min; 13,3 min; 15,8 min e 21,7 min. Os demais picos na amostra, não foram identificados.



#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	8.921	1144865.1	35160.9	0.4706	21.411	1.552
2	9.868	569810.5	15410.2	0.5135	10.657	0.676
3	11.494	8592.8	390.4	0.3432	0.161	0.554
4	13.515	2477649.3	85069.8	0.4478	46.337	1.092
5	15.78	981807	35345.8	0.4277	18.362	0.762
6	17.385	118335.2	3699.2	0.4942	2.213	1.333
7	18.364	12152.8	502.5	0.3902	0.227	0.866
8	19.437	6205.3	163.7	0.6063	0.116	1.406
9	20.419	5461.2	178.2	0.4699	0.102	0.745
10	21.708	22181.8	598.1	0.5752	0.415	0.781