

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



Tese

Culturas iniciadoras nativas: Aspectos tecnológicos, de segurança e aplicação em embutidos fermentados de carne ovina

Claudio Eduardo dos Santos Cruxen
Tecnólogo em Agroindústria

Pelotas, 2019

Claudio Eduardo dos Santos Cruxen

Culturas iniciadoras nativas: Aspectos tecnológicos, de segurança e aplicação em embutidos fermentados de carne ovina

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas como requisito final à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação: Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C955c Cruxen, Claudio Eduardo dos Santos

Culturas iniciadoras nativas: Aspectos tecnológicos, de segurança e aplicação em embutidos fermentados de carne ovina / Claudio Eduardo dos Santos Cruxen ; Angela Maria Fiorentini, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, coorientador. — Pelotas, 2019.

104 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Ciências ômicas. 2. Métodos *in vitro*. 3. *Pediococcus pentosaceus*. 4. *Staphylococcus xylosus*. I. Fiorentini, Angela Maria, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Título.

CDD : 636.3

Claudio Eduardo dos Santos Cruxen

Culturas iniciadoras nativas: Aspectos tecnológicos, de segurança e aplicação em embutidos fermentados de carne ovina

Tese aprovada, como requisito final, para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/06/2019

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini (Orientadora)
Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Guilherme da Silva Dannenberg
Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Márcia Arocha Gularte
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Maristela Cortez Sawitzki
Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Doutor em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo

Agradecimentos

A Deus pela vida e saúde.

Aos meus pais Clovis e Aracely, aos meus padrinhos Aníbal e Maria Elizabeth, ao tio Cleider o qual o considero como pai, as minhas avós Haydée (*in memoriam*) e Diva Luiza, as minhas afilhadas Izabela e Valentina e demais familiares.

Aos mestres, em especial, à Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini (orientadora) por toda confiança, incentivo, amizade e compreensão, ao Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (co-orientador), que juntos formaram meu comitê de orientação e me auxiliaram durante toda a minha formação de mestrado e doutorado, ao Prof. Dr. Fabio Chaves pelos auxílios e amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal e do Laboratório de Microbiologia de Alimentos que foram muito importantes para o meu aprendizado, a todos os estagiários pela fundamental colaboração.

As funcionárias responsáveis pela limpeza por proporcionarem sempre um ambiente agradável para o desempenho das nossas atividades.

Aos meus fieis amigos que, sem dúvida, sabem do meu apreço e consideração.

Aos grupos Filipenses e Sagrado Coração de Jesus os quais faço parte e são os responsáveis por me manterem ativo na caminhada da fé e pela busca diária de me tornar um ser humano melhor.

Aos meus colegas de Karatê (academia Shido-Kan) pela parceria sempre maravilhosa e por terem me mostrado que na arte de lutar se encontra o equilíbrio para melhor viver.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

À banca examinadora por aceitarem o convite e contribuírem para minha formação.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência”.

(Augusto Curi)

Resumo

CRUXEN, Claudio Eduardo dos Santos. **Culturas iniciadoras nativas: Aspectos tecnológicos, de segurança e aplicação em embutidos fermentados de carne ovina.** 2019. 104f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Culturas iniciadoras são espécies de microrganismos que iniciam o processo fermentativo em alimentos e bebidas para formação de grande parte das características sensoriais dos produtos finais como textura, cor, sabor e aroma, bem como auxiliam na segurança e conservação do produto. Produtos produzidos de forma artesanal em uma determinada região podem apresentar propriedades sensoriais únicas, as quais estão relacionadas à participação da microbiota nativa. Esse fato pode atribuir alto valor agregado e vantagem competitiva mercadológica ao produto. Por este motivo, muitas pesquisas foram realizadas sobre isolamento e caracterização de microrganismos nativos. Geralmente, a matéria-prima utilizada na produção de embutidos cárneos, refere-se a carne suína e bovina, porém a carne de outros animais também pode ser utilizada. A carne ovina proveniente de animais jovens é bastante apreciada pelos consumidores, contudo, animais adultos não apresentam a mesma aceitação por apresentar textura, cor e sabor mais intensos. Diante disso, objetivou-se realizar uma compilação dos principais métodos *in vitro* utilizados para avaliar características tecnológicas e de segurança de isolados nativos, bem como avaliar a ação desses isolados no desenvolvimento de um embutido fermentado de carne ovina. Inicialmente, realizaram-se buscas nas bases do *National Center for Biotechnology Information* e *Science Direct* para obtenção do acervo bibliográfico o qual foi analisado. Consideraram-se os métodos frequentemente empregados e atuais onde as limitações e potencialidades foram comentadas. Para produção de embutidos fermentados, realizaram-se três tratamentos com diferentes concentrações de carne ovina (T1 = 30%, T2 = 60% e T3 = 90%) provenientes de animais adultos (idade superior a quatro anos). Foi monitorada a viabilidade das culturas iniciadoras nativas, realizada a caracterização físico-química e sensorial das formulações. Os resultados a partir da revisão de literatura demonstram que o pesquisador pode optar por ensaios qualitativos ou quantitativos e que essa escolha deve considerar a capacidade analítica disponível, tempo de análise, sensibilidade do ensaio e custos envolvidos. Além disso, foram apresentadas recentes publicações onde diferentes áreas das ciências ômicas foram aplicadas para melhor explicar as dinâmicas e funções das culturas iniciadoras *in situ*. Já no que se refere à produção dos embutidos cárneos fermentados verificou-se que as culturas iniciadoras conseguiram persistir viáveis durante a fermentação, em todas as formulações. Percebeu-se uma acidificação mais rápida em T2 nas primeiras 24 horas de fermentação. Também foi verificada maior formação de compostos

voláteis desejáveis como os ésteres em T2. A análise sensorial demonstrou que T2 apresentou o menor percentual de rejeição e também o maior índice de aceitação entre os tratamentos. Conclui-se que a revisão dos principais métodos *in vitro* foi capaz de oferecer uma síntese objetiva sobre pesquisas desenvolvidas realizadas no âmbito desse escopo. Os resultados da pesquisa experimental indicaram uma opção para agregar valor à carne ovina, proveniente de animais adultos e ratificar sobre a possibilidade de utilizar microrganismos nativos em alimentos fermentados.

Palavras-chave: Ciências ômicas; métodos *in vitro*; *Pediococcus pentosaceus*; *Staphylococcus xylosus*.

Abstract

CRUXEN, Claudio Eduardo dos Santos. 2019. **Native starter cultures: Technological and safety aspects and application in fermented mutton sausage.** 104f. Thesis (Doctoral degree em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Starter cultures are species of microorganisms that initiate the fermentative process in food and beverages to form many of the sensory characteristics of the end products such as texture, color, taste and aroma, as well as conserving the product. Artisanal products produced in a given region may have unique sensory properties, which are related to the participation of native microbiota. This fact can attribute high added value and market competitive advantage to the product. For this reason, much research has been carried out on isolation and characterization of native microorganisms. Generally, the raw material used in the production of meat sausages refers to pork and beef, but meat from other animals can also be used. Meat from young sheep is much appreciated by consumers; however, meat from adult animals does not have the same acceptance because mutton has more intense texture, color and flavor. Therefore, the objective was to compile the main *in vitro* methods used to evaluate technological and safety characteristics of native isolates, as well as to evaluate the action of these isolates in the development of a fermented mutton sausage. Initially, searches were performed in the National Center for Biotechnology Information and Science Direct databases to obtain the bibliographic collection which was analyzed. Frequently employed and current methods were considered, and their limitations and potentialities were commented on. For the production of fermented sausages, three treatments were carried out with different concentrations of meat (T1 = 30%, T2 = 60% and T3 = 90%) from adult sheep (aged over four years). The viability of native starter cultures was monitored, and the physicochemical and sensory characterization of the formulations was performed. The results from the literature review show that the researcher can choose qualitative or quantitative tests and that this choice should consider the available analytical capacity, analysis time, assay sensitivity and costs involved. In addition, recent publications have been presented where different areas of the omics sciences have been applied to better explain the dynamics and functions of starter cultures *in situ*. Regarding the production of fermented meat sausages, it was found that starter cultures were able to remain viable during fermentation in all formulations. Faster acidification was observed in T2 in the first 24 hours of fermentation. Greater formation of desirable volatile compounds, such as esters, was also found in T2. Sensory analysis showed that T2 had the lowest rejection percentage and also the highest acceptance rate among treatments. It is concluded that the review of the main *in vitro* methods was able to offer an objective synthesis about research carried out within this scope. The results of the experimental research indicated a way of adding value to mutton from adult

animals and to ratify the possibility of using native microorganisms in fermented foods.

Keywords: Omics science; *in vitro* methods; *Pediococcus pentosaceus*; *Staphylococcus xylosus*.

SUMÁRIO

| | | |
|---|---|-----|
| 1 | Introdução..... | 12 |
| 2 | Objetivos: Geral e Específicos..... | 20 |
| 3 | Capítulo I - Seleção de cultura iniciadora bacteriana nativa na produção de embutidos cárneos fermentados: potencial de aplicação, aspectos de segurança e tecnologias emergentes | 21 |
| 4 | Capítulo II - Desenvolvimento de embutido fermentado de carne ovina produzido com culturas iniciadoras nativas | 74 |
| 5 | Considerações Finais | 103 |

1. Introdução

Os microrganismos, desde a Antiguidade, participam dos processos fermentativos, contribuindo para a conservação dos alimentos (CAMPBELL-PLATT; COOK, 1995; ROSS; MORGAN; HILL, 2002). As carnes *in natura* eram picadas e misturadas ao sal e a ervas aromáticas (especiarias), embutidos em tripas para que ocorresse a fermentação e desidratação (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). Esse processo realizado desde os tempos remotos para conservar a matéria-prima, é baseado na fermentação realizada por microrganismos. A fermentação consiste na produção de ácidos orgânicos e outros metabólitos, a partir das fontes de carbono disponíveis, preferencialmente carboidratos (PRICE e SCHWEIGERT, 1994; YAMADA e BERAQUET, 1993). Os microrganismos responsáveis por essa fermentação são aqueles provenientes da própria carne, das tripas e dos utensílios utilizados, definidos pela expressão microbiota autóctone (SANTOS et al., 1998). Assim, no processo fermentativo natural, não há um controle da microbiota, a qual irá variar de acordo com a origem da carne, condições de manipulação e utensílios utilizados. Desta forma, o perfil enzimático também é alterado de acordo com a composição de espécies da microbiota presente, acarretando em variações físicas (textura, cor), químicas (compostos voláteis) e microbiológicas (competição seletiva). Além disso, por essa microbiota ser desconhecida, é possível conter espécies patogênicas que podem causar algum tipo de doença (infecção ou intoxicação alimentar) (LANDETA et al., 2013b).

A indústria objetivando produzir alimentos padronizados, com boas características sensoriais e seguros do ponto de vista microbiológico, opta pela adição de culturas iniciadoras. Culturas iniciadoras são microrganismos previamente identificados e caracterizados, apresentando potencial tecnológico (persistentes às condições intrínsecas e extrínsecas do processamento

tecnológico e com desejável perfil enzimático) e de segurança microbiológica e toxicológica (LÜCKE, 2000).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são responsáveis pela produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico que irá reduzir o pH do embutido cárneo durante a fermentação. Esse processo é importante para inibir o desenvolvimento da microbiota autóctone e também coagular as proteínas miofibrilares, resultando no aumento da firmeza e conferindo fatiabilidade do produto, após o período de maturação (DROSINOS et al., 2007) As espécies de BAL frequentemente utilizadas são *Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus plantarum*. Também é importante a participação de bactérias Estafilococos coagulase negativa (ECN), onde merecem destaque as espécies amplamente utilizadas *Staphylococcus xylosus* e *S. carnosus*. Esse grupo de microrganismos contribui para a formação do *flavor* característico do produto por suas atividades enzimáticas. Além disso, essas bactérias reduzem o nitrato a nitrito e por essa razão são importantes na formação da cor característica dos embutidos fermentados (MAURIELLO et al., 2004; TALON et al., 1999).

As culturas iniciadoras, aplicadas em produtos fermentados no Brasil, são importadas de países como Dinamarca, França, Alemanha, entre outros, pois o Brasil ainda não produz em escala industrial para comercialização. Sabe-se que microrganismos isolados da microbiota de produtos locais, já se encontram bem adaptados às condições climáticas, tecnológicas e a microbiota nativa das matérias-primas utilizadas nos processos fermentativos. Portanto, possuem como vantagens, maior capacidade de se desenvolver, competir e reduzir a microbiota autóctone. Além disso, podem contribuir para um sabor genuíno, que remete a características únicas do produto de uma determinada região (DROSINOS et al., 2005; MAURIELLO et al., 2004).

Desta forma, vários pesquisadores se dedicaram ao isolamento e caracterização de microrganismos nativos para oferecer maiores opções em seus países ou regiões de onde foram isolados (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015; BONOMO et al., 2009; LANDETA et al., 2013a, 2013b; RUARO et al., 2013; SAWITZKI et al., 2008). Destacam-se, dentro do escopo apresentado, as

publicações “*Phenotypic and molecular characterization of Staphylococcus xylosum: technological potential for use in fermented sausage*” (FIORENTINI et al., 2009) e “*Characterization of Staphylococcus xylosum LQ3 and its application in dried cured sausage*” (CRUXEN et al., 2017).

Portanto, se reconhece um notório acervo de informações sobre culturas iniciadoras e suas aplicações em diferentes produtos fermentados. Não obstante, nos últimos anos, houve um avanço em técnicas cromatográficas, maior disponibilidade de equipamentos com identificação baseada na espectrometria de massas, avanços consideráveis também na área de sequenciamento de material genético e maior capacidade de análise de dados com base na bioinformática e bioestatística. Neste contexto, novas pesquisas estão surgindo, exatamente para investigar e explicar melhor as dinâmicas no microbioma, baseado na aplicação das ciências ômicas, da bioinformática e bioestatística. As ciências ômicas englobam análises de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, oferecendo uma capacidade de análise completa dos sistemas biológicos. A bioinformática e a bioestatística ocupam destaque neste cenário, pois são as responsáveis por analisar esse conjunto de dados e cruzar todas essas informações, permitindo novos avanços na ciência e tecnologia dos alimentos fermentados.

Já no que se refere à matéria-prima, em especial a carne ovina, sabe-se que a produção mundial de ovinos está aumentando e estima-se um crescimento de 22% na oferta global de carne ovina nos próximos 10 anos. A Ásia é o continente com maior produção de ovinos no mundo, com 45% do efetivo mundial (BEHRENDT; WEEKS, 2017). O Brasil contava com um número médio de 17.771.841 cabeças no triênio 2013-2015. Entre as unidades da federação, o Rio Grande do Sul é o estado com o maior rebanho do Brasil. Sabe-se que a ovinocultura no Estado do Rio Grande do Sul sempre foi uma atividade de importância econômica e que o rebanho Gaúcho se mantém entre os maiores do Brasil (IBGE, 2016; SILVA et al., 2013). Os principais municípios produtores encontram-se principalmente na porção sul-sudoeste do Rio Grande do Sul onde

se destaca a maior produção em Santana do Livramento, seguido pelo Município de Alegrete (IBGE, 2016).

A carne ovina tem sido muito apreciada e é crescente seu consumo (BEHRENDT; WEEKS, 2017), porém a preferência do mercado consumidor é por categorias mais jovens como cordeiros e borregos. Outras categorias adultas como ovelhas e reprodutores (idade superior a 4 anos) não apresentam a mesma aceitação, por apresentarem uma textura mais firme, sabor, odor mais intensos, refletindo num menor valor agregado (DA SILVEIRA OSÓRIO; OSÓRIO; SAÑUDO, 2009; NASSU; BESERRA; GONÇALVES, 2002). Sendo assim, agroindustrializar a carne ovina no que se refere à carne proveniente de categorias adultas é uma necessidade, pois além de agregar valor a uma categoria economicamente desvalorizada, se estará desenvolvendo novos produtos.

A presente pesquisa faz parte dos projetos Institucionais (UFPEL), (1) **Bactérias ácido lácticas: isolamento, caracterização, metabólitos e aplicação em alimentos** (COCEPE - 4393) e (2) ***Staphylococcus xylosus* e *Lactobacillus plantarum* como culturas iniciadoras na elaboração de embutidos fermentados** (COCEPE- 50000014). As bactérias usadas na pesquisa experimental fazem parte da **Coleção de Bactérias Probióticas e Culturas Iniciadoras** do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (UFPEL). Foram isoladas e identificadas por métodos fenotípicos e moleculares pelo nosso grupo de pesquisa, sendo *Pediococcus pentosaceus* P38 obtida a partir de presunto cozido fatiado e *Staphylococcus xylosus* LQ3 de queijo parmesão.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tese, estruturados em dois capítulos: O Capítulo I aborda o tema: Seleção de cultura iniciadora bacteriana nativa na produção de embutidos cárneos fermentados: potencial de aplicação, aspectos de segurança e tecnologias emergentes. Esse capítulo visa buscar respostas para questionamentos como: quais análises/métodos mais frequentemente empregadas para avaliar isolados nativos e como o emprego, em conjunto, de diferentes áreas das ciências ômicas podem ser úteis na microbiologia de alimentos fermentados. Deste estudo, foi gerado o artigo:

“*Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: application potential, safety aspects, and emerging technologies*” publicado na *Food Research International* (Fator de Impacto 3.520), doi 10.1016/j.foodres.2019.04.018.

No Capítulo II, o estudo foi proposto a partir da problemática da baixa aceitação por parte dos consumidores no que se refere à carne ovina proveniente de animais adultos onde se buscou valorizar essa matéria-prima, através de um processo fermentativo. Esse estudo foi realizado em parceria com a Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Análise de Compostos Voláteis e Precursores (Dr. Roger Wagner) e com Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos/UFPel, Laboratório de Análise Sensorial (Dra. Márcia Arocha Gularte). A divulgação científica deste estudo encontra-se no artigo: *Development of fermented sausage produced with mutton and native starter cultures* publicado na *Food Science and Technology – LWT* (Fator de Impacto 3.129), doi 10.1016/j.lwt.2018.04.060.

Referências

ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G. et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103, 2015.

BEHRENDT, K.; WEEKS, P. **How are global and Australian sheepmeat producers performing? Global agri benchmark network results 2016**, 2017. (Nota técnica).

BONOMO, M. G. et al. Technological and safety characterization of coagulase-negative staphylococci from traditionally fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). **Meat Science**, v. 83, n. 1, p. 15–23, 2009.

CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P. E. **Fermented Meats**. Boston, MA: Springer US, 1995.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 131–149, 15 set. 1999.

CRUXEN, C. E. D. S. et al. Characterization of *Staphylococcus xylosus* LQ3 and its application in dried cured sausage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 538–543, 2017.

DA SILVEIRA OSÓRIO, J. C.; OSÓRIO, M. T. M.; SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 292–300, 2009.

DROSINOS, E. H. et al. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, n. 2, p. 307–317, fev. 2005.

DROSINOS, E. H. et al. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 260–270, 2007.

FIORENTINI, Â. M. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus*: Technological potential for use in fermented sausage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 737–746, 2009.

IBGE. Produção pecuária municipal 2016. **Instituto Brasileiro de geografia e estatística**, v. 44, n. 4, p. 1–51, 2016.

LANDETA, G. et al. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p. 387–396, 2013a.

LANDETA, G. et al. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 272–280, 2013b.

LÜCKE, F.-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, n. 2, p. 105–115, 2000.

MAURIELLO, G. et al. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 149–158, 2004.

NASSU, R. T.; BESERRA, F. J.; GONÇALVES, L. A. G. **Comunicado Técnico 74. Processo Agroindustrial: Obtenção de Embutido Fermentado Tipo Salame de Carne de Caprinos**. Fortaleza, CE: 2002

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos**. 2. ed., Zaragoza: Acribia, 1994. 581 p.

ROSS, P. R.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p. 3–16, nov. 2002.

RUARO, A. et al. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 106–111, 2013.

SANTOS, E. M. et al. Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of “chorizo”. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, n. 1-2, p. 123–128, 1998.

SAWITZKI, M. C. et al. *Lactobacillus plantarum* AJ2 isolated from naturally fermented sausage and its effects on the technological properties of Milano-type salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 709–717, 2008.

SILVA, A. P. S. P. et al. Ovinocultura do Rio Grande do Sul: Descrição do sistema produtivo e dos principais aspectos sanitários e reprodutivos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1453–1458, 2013.

TALON, R. et al. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, n. 1-2, p. 47–56, 1999.

YAMADA, E. A.; BERAQUET, N. J. Embutido fermentado cozido. **Col. Inst. Tecnol. Alim.**, v.23, p.19-27, 1993.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Sistematizar informações sobre os principais métodos *in vitro* empregados para selecionar culturas iniciadoras nativas que serão destinadas a aplicação em alimentos cárneos fermentados, bem como avaliar a ação dessas culturas no desenvolvimento e na caracterização de um produto fermentado de carne ovina.

2.2 Objetivos Específicos

- Compilar estudos sobre métodos *in vitro* utilizados para avaliar aspectos tecnológicos e de segurança de isolados nativos.

- Avaliar recentes pesquisas que utilizaram emergentes tecnologias ômicas para melhor compreender as dinâmicas e funções das culturas iniciadoras em alimentos fermentados.

- Desenvolver embutido fermentado contendo carne ovina proveniente de animais adultos, adicionado de culturas iniciadoras nativas (*Pediococcus pentosaceus* P38 e *Staphylococcus xylosus* LQ3).

- Caracterizar o embutido fermentado quanto às características físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais.

3. Capítulo I

Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: application potential, safety aspects, and emerging technologies

Artigo de revisão publicado na *Food Research International* (Fator de Impacto 3.520), Qualis A1 na Área de Ciência de Alimentos

Abstract

The development of standardized and safe food products with the typical characteristics of each region is highly desirable and can be obtained by using native starter cultures that influence the flavor, texture, and color of fermented foods. Therefore, scientists have been employing various techniques for screening and characterizing native bacteria (lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci) for application in fermented meat sausage. The present review outlines *in vitro* assays that evaluate the potential application and safety aspects of native isolates and introduces emerging omics technologies applied to the microbiology of fermented meat sausage. Results from current research are presented, and the strengths and limitations of each assay are provided, with references indicating where further details can be obtained. In choosing the most appropriate *in vitro* method, it is necessary to consider the available analytical infrastructure, the sensitivity and selectivity of the assay, the time it takes to get the results, the ease of the assay, and the costs involved.

Keywords: Starter culture; Methods; Virulence factors; Enzyme activities; *in vitro* assays; Next Generation Sequencing; Omics.

MATERIAL NÃO DIVULGADO

4. Capítulo II

Development of fermented sausage produced with mutton and native starter cultures

Artigo publicado em *LWT - Food Science and Technology* (Fator de Impacto 3.129), Qualis A1 na Área de Ciência de Alimentos

Abstract

The aims of this study were to develop and characterize a fermented sausage produced with different percentages of mutton (from adult female sheep, over four years old) and additional native starter cultures. Three treatments of fermented sausage were prepared: (T1) 30% of mutton; (T2) 60% of mutton; (T3) 90% of mutton. Starter cultures *Staphylococcus xylosum* LQ3 and *Pediococcus pentosaceus* P38 were used for the fermentation/maturation process. The parameters of a_w , pH, acidity, weight loss, and monitoring of native starter cultures were evaluated during the fermentation and maturation processes. After maturation, the sausages were assessed for texture profile, color, lipid profile, volatile compounds and sensory analysis. Based on principal components analysis (PCA), it was verified that as mutton was added, there was a reduction of unsaturated fatty acids and an increase in red tonality. T2 showed higher ester production, which possibly positively influenced the acceptance of the aroma of the sausage. Sensorial analysis demonstrated that T2 had a greater tendency to be accepted. It can be concluded that up to 60% of meat from adult sheep can be used in the preparation of fermented sausages and that the use of native cultures attributed positive and typical characteristics to fermented sausage.

keywords: lipid profile; texture profile; volatile compounds; sensory analysis;
multivariate analysis

MATERIAL NÃO DIVULGADO

5. Considerações Finais

Os principais métodos *in vitro* utilizados para avaliar isolados nativos bacterianos foram revisados, comentados e sugeridas referências onde maiores informações podem ser obtidas, oferecendo, portanto, uma síntese objetiva para pesquisadores que atuam no âmbito desse escopo. Essa escolha deverá considerar vários aspectos dentre eles: capacidade analítica disponível, tempo necessário para obtenção dos resultados, custos envolvidos e sensibilidade do método. Também foi possível apresentar trabalhos recentes, que empregaram estudos de metagenômica, metatranscriptômica, proteômica e metabolômica visando explicar a dinâmica da microbiota de alimentos fermentados. A realização desse tipo de delineamento que englobe e integre essas diferentes áreas das ciências ômicas ainda não são comuns, devido aos custos envolvidos e a necessidade de conhecimento em diferentes especialidades. Contudo, a maior disponibilidade de centros de sequenciamento e o crescente aumento do número de cientistas com conhecimento em bioinformática e em bioestatística tendem a tornar esse tipo de delineamentos mais acessíveis. Assim, projeta-se que, no futuro, se possa acessar um maior número de informações organizadas em um banco de dados e assim se possam escolher os microrganismos que irão compor as culturas iniciadoras, de acordo com os atributos sensoriais desejados no produto final.

Também foi possível desenvolver embutido de carne ovina proveniente de animais adultos, adicionado de culturas iniciadoras nativas, sendo o produto com 60% de carne ovina, o mais preferido pelos consumidores. Esses resultados são importantes, pois oferecem uma alternativa para uma matéria-prima de baixo valor agregado e de grande oferta, principalmente no que se refere ao Estado do Rio Grande do Sul. Além disso, foi demonstrado que culturas iniciadoras compostas por isolados nativos de uma região, podem ser utilizadas como alternativa as culturas iniciadoras importadas, obtidas comercialmente. O cultivo desses isolados

nativos em escala industrial é possível, oferecendo a indústria mais uma possibilidade de obter as culturas iniciadoras, porém sem a necessidade de importá-las.