

## Influência do NaCl e do NaNO<sub>2</sub> sobre a Fermentação Lática Desenvolvida pelo *Lactobacillus curvatus* em Meio MRS

### Influence of NaCl and NaNO<sub>2</sub> on the Lactic Acid Fermentation of *Lactobacillus curvatus* Grown in MRS Medium

Maria Celia de Oliveira Haully<sup>1</sup>; Rosicler Balduino Nogueira<sup>2</sup>; Antonio Sérgio Oliveira<sup>1</sup>

**Resumo:** As bactérias lácticas são microrganismos de grande importância na indústria alimentícia. Isto pela produção de ácido láctico o qual contribui na preservação de alimentos e nas suas propriedades organolépticas. Em produtos cárneos, essas bactérias são úteis por reduzirem nitratos e nitritos diminuindo a formação de compostos carcinogênicos como as nitrosaminas. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de NaCl e NaNO<sub>2</sub> no meio MRS (Man-Rogosa-Sharpe) para desenvolver a fermentação láctica pelo *Lactobacillus curvatus*. As concentrações ótimas de NaCl e NaNO<sub>2</sub>, obtidas pela metodologia da superfície de resposta, com planejamento fatorial 3<sup>2</sup>, foram 0,87 % (m/v) e 156 ppm, respectivamente. Nessas condições, o *L. curvatus* produziu em média 3,3 % de ácido láctico e manteve uma viabilidade celular de 1x10<sup>12</sup> UFC/mL, demonstrando a possibilidade de ser utilizado como cultura iniciadora em produtos cárneos.

**Palavras-chave:** bactérias ácidas-lácticas, NaCl, NaCO<sub>2</sub>, cultura iniciadora, *Lactobacillus*.

**Abstract:** Lactic acid bacteria are microorganisms of major importance in food industry, mainly for its lactic acid production which contributes for food preservation and organoleptic properties. In the case of meat products, these bacteria are useful because they reduce nitrates and nitrites. The reduction of nitrites decreases formation of carcinogenic compounds as the nitrosamines. The objective of this work was to evaluate the use of NaCl and NaNO<sub>2</sub> as supplementation of the MRS medium (Man-Rogosa-Sharpe), in order to improve the lactic fermentation by *Lactobacillus curvatus*. The optimization of the concentration of these salts in the medium was obtained by the response surface methodology with factorial design 3<sup>2</sup>. The cultures were developed during 48h at 37°C and initial pH of 6.2 in MRS liquid medium. The lactic acid was measured by spectrophotometry at 425 nm. Better acid lactic production, 3.3%, was obtained using 0.87 % (w/v) of NaCl and 156ppm of NaNO<sub>2</sub>. It was observed that levels of NaCl up to 4 % (w/v) and NaNO<sub>2</sub> up to 300ppm, recommended in the meat preservation, did not significantly affected the lactic acid production at the 5% level, which demonstrates the possibility of using *L. curvatus* as starter culture in meat products.

**Key words:** Lactic acid bacteria, NaCl, NaNO<sub>2</sub>, starter culture.

## 1 Introdução

Desde há muito tempo o homem utiliza a fermentação láctica para preservar alimentos. Hoje sabe-se que inúmeros microrganismos desenvolvem processos fermentativos, melhorando a conservação e qualidade de alimentos. Dentre os microrganismos envolvidos nesses processos fermentativos, como alguns fungos e leveduras, destacam-se as bactérias ácido lácticas. Vários tipos de alimentos consumidos atualmente são provenientes da fermentação por bactérias ácido lácticas como iogurtes, queijos, produtos cárneos maturados, além de alimentos destinados aos animais, como silagens. O processo fermentativo dessas bactérias resulta em um produto principal, o ácido láctico, que, além de propriedades conservantes, melhora as características organolépticas dos alimentos (BUCHTA, 1983).

Na indústria de produtos cárneos e derivados, as bactérias lácticas desempenham papel fundamental. Em produtos cárneos maturados, essas bactérias são utilizadas como culturas iniciadoras. As culturas iniciadoras melhoram o sabor, a conservação, reduzem nitratos e nitritos e diminuem o tempo de maturação. É comum a utilização de nitratos ou nitritos em produtos cárneos a fim de inibir o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* e manter a cor vermelha da carne (TONY *et al.*, 1994). Contudo, esses nitratos e nitritos podem levar à formação de nitrosaminas que são potencialmente carcinogênicas (ANJOS e RIBEIRO, 1994). Culturas iniciadoras constituídas de bactérias lácticas podem contribuir na redução destas substâncias diminuindo a formação de nitrosaminas (LIEPE, 1983).

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>2</sup> Bolsistas CNPq/CPG-Uel.

Lee e Park (2000) observaram que as cepas de bactérias lácticas isoladas de pickles diminuíram 70 % do teor de nitrito após 48 h de incubação a 21 °C e 90% após 48 h a 32 °C em caldo MRS, cuja concentração inicial de nitrito era de 200 mg/mL. Em carnes curadas, a depleção de nitrito foi de 87,6 a 92,3 % desenvolvido por bactérias lácticas na temperatura de 32 °C durante 24 horas.

Embora as bactérias lácticas possam reduzir a concentração de nitritos, o teor desses compostos juntamente com o NaCl, ambos utilizados nos sais de cura, podem influenciar no desenvolvimento das culturas iniciadoras. Ballesteros *et al.* (1999) estudaram o efeito do NaCl sobre a fermentação de beringela (*Solanum melongena*) por cultura comercial de *Lactobacillus* e observaram que a fermentação era adequada quando a concentração de NaCl na salmoura não ultrapassava 6 %. Lee e Park (2000) verificaram que o crescimento das cepas isoladas de pickles em caldo MRS contendo 5 % de NaCl foi inibido a 21 %, mas não a 32 %. Arihara e Itoh (2000) observaram que a mutação de *Lactobacillus gasserii* induzida por U.V. gerou resistência ao NaCl e NaNO<sub>2</sub>, possibilitando o seu desenvolvimento em produto cárneo contendo 3,3 % de NaCl e 200 ppm de NaNO<sub>2</sub>.

Outra atuação importante das bactérias ácido lácticas é a produção de bacteriocinas que inibem o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis ao alimento. O *L. curvatus* é um produtor de curvacina A que tem atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*, patógenos que podem ser encontrados nos alimentos (TICHACZEK *et al.*, 1992).

Considerando o exposto, pode-se afirmar que as bactérias lácticas oferecem vantagens significantes para os alimentos, favorecendo a sua conservação e propriedades organolépticas. Contudo, torna-se necessário avaliar como os sais de cura, constituídos principalmente de NaCl e nitritos interferem no desenvolvimento das culturas iniciadoras adicionadas aos produtos cárneos. O presente trabalho tem por finalidade avaliar a influência de NaCl e NaNO<sub>2</sub> na fermentação láctica desenvolvida pelo *L. curvatus* e otimizar, pela metodologia da superfície de resposta, as concentrações de NaCl e NaNO<sub>2</sub>, visando obter uma boa produção de ácido láctico e alta viabilidade celular.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Microrganismos

O microrganismo utilizado foi o *Lactobacillus curvatus*, isolado de silagem de milho por Oliveira (1995).

### 2.2 Meios de cultivo

As culturas foram mantidas em leite em pó desengordurado na concentração de 11% (m/v). O processo fermentativo foi desenvolvido em caldo MRS, suplementado ou não com NaNO<sub>2</sub> e NaCl (QUADROS 1 e 2).

### 2.3 Processo fermentativo

O microrganismo foi ativado por meio de repiques sucessivos realizados a cada 24 horas em leite em pó desengordurado na concentração de 11 % (m/v). O inóculo de 10% (v/v) foi transferido para o caldo MRS, suplementado ou não, e mantido a 37°C por 48 horas, sem agitação. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,2 com NaOH N. Após fermentar, foi determinada a viabilidade celular. Em seguida o caldo foi centrifugado e submetido à determinação de ácido láctico.

### 2.4 Dosagem de ácido láctico

O ácido láctico foi extraído do caldo fermentado utilizando-se BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 9,88 % NaOH 0,66 N e ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, conforme Silva (1981). O padrão utilizado para a curva de referência foi o lactato de lítio 1 % (m/v), extraído nas mesmas condições. A determinação espectrofotométrica do ácido láctico foi realizada em 425 nm.

### 2.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através da técnica de semeadura em profundidade utilizando-se ágar MRS (ZAYED; WINTER, 1995). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas.

### 2.6 Metodologia de superfície de resposta

Para otimizar as concentrações de NaCl e NaNO<sub>2</sub> foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta. Foram investigadas 2 variáveis independentes, NaCl e NaNO<sub>2</sub>, representados por X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> e três níveis de variação, ou seja, um modelo de 3<sup>2</sup>. A resposta avaliada foi a produção de ácido láctico, variável dependente. O Quadro 1 mostra as variáveis independentes e os níveis de variação. O Quadro 2 indica o delineamento estatístico dos experimentos.

## 3 Resultados e Discussão

O *L. curvatus* é um microrganismo que domina o processo fermentativo quando aplicado em produtos cárneos (TICHACZEK *et al.*, 1992). Esta cepa, isolada por Oliveira (1995), apresentou alta produção de ácido láctico quando comparada ao *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *Pediococcus acidilactic*. Os sais, NaCl e NaNO<sub>2</sub>, adicionados em produtos cárneos, podem interferir no processo fermentativo das culturas iniciadoras adicionadas a estes produtos.

O Quadro 3 mostra a produção de ácido láctico e o pH final obtidos no processo fermentativo, desenvolvido pelo *L. curvatus* em diferentes condições de cultivo, conforme indicado pelo delineamento estatístico da metodologia da superfície de resposta. A variação do pH final foi de 3,42 a 3,67. A maior concentração de ácido láctico foi de 2,64 % (tratamento 10) no caldo MRS contendo 2,0 % (m/v) de NaCl e 150 ppm de

**Quadro 1** – Variáveis independentes e níveis de variação no perfil da otimização.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> = NaCl (%)	0	2	4
X <sub>2</sub> = NaNO <sub>2</sub> (ppm)	0	150	300

**Quadro 2** – Delineamento estatístico dos experimentos (valores codificados).

Número de experimentos	Variáveis independentes	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	-1	-1
2	0	-1
3	1	-1
4	-1	0
5	0	0
6	1	0
7	-1	1
8	0	1
9	1	1
10	0	0
11	0	0

NaNO<sub>2</sub>. O controle (tratamento 1) não suplementado com os sais forneceu 2,44 % de ácido láctico. Isto demonstra um efeito positivo do uso simultâneo dos sais, NaCl e NaNO<sub>2</sub>, na fermentação láctica.

Entretanto, quando se utilizou 4 % (m/v) de NaCl e 300 ppm de NaNO<sub>2</sub> (tratamento 9), obteve-se 2,11% de ácido láctico, o que sugere que concentrações muito elevadas desses sais podem diminuir a produção de ácido láctico.

Esses resultados foram avaliados através do mapa de contorno mostrado na Figura 1, pela metodologia da superfície de resposta, visando à obtenção de um ponto ótimo, ou seja, as concentrações mais adequadas de NaCl e NaNO<sub>2</sub>, para uma melhor produção de ácido láctico. A Equação 1 mostra que o ponto ótimo para produção de ácido láctico pode ser obtido utilizando-se 0,87 % (m/v) de NaCl e 156 ppm de NaNO<sub>2</sub> na suplementação do caldo MRS para cultivo do *L. curvatus*.

#### EQUAÇÃO 1

$$Z = 2,617 - 0,083x - 0,066y - 0,0784x^2 - 0,138y^2 - 0,138xy$$

Onde: Z= ácido láctico %

X= NaCl (valor codificado)

Y= NaNO<sub>2</sub> (valor codificado)

O processo fermentativo desenvolvido pelo *L.*

*curvatus* nas condições do ponto ótimo forneceu 3,3% de ácido láctico e uma viabilidade celular de 1x 10<sup>12</sup> UFC/mL. Esse resultado, porém, não apresentou diferença significativa, em termos de ácido láctico, quando comparado ao controle (sem suplementação salina) que produziu 3,34% de ácido láctico, conforme indicado nos Quadros 4 e 5.

Quando o *L. curvatus* foi cultivado no meio contendo altas concentrações de NaCl 4%(m/v) e NaNO<sub>2</sub> 300 ppm, referentes ao tratamento 2, as quais podem ser empregadas em produtos cárneos, produziu 2,23% de ácido láctico. Esse resultado é significativamente diferente dos tratamentos 1 e 3, conforme mostra o Quadro 5. Embora essa diferença seja significativa, a quantidade de ácido láctico é adequada para a conservação de produtos cárneos e mantém uma viabilidade celular de 1x 10<sup>10</sup> UFC/mL, demonstrando a possibilidade de aplicação desse microrganismo em produtos cárneos como cultura iniciadora.

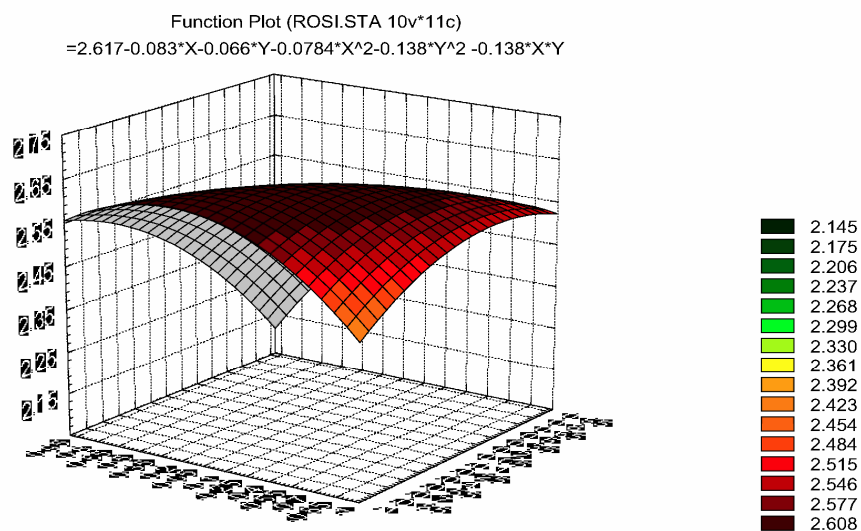
#### 4 Conclusões

- Os sais NaCl e NaNO<sub>2</sub> adicionados ao meio de M.R.S. não acarretam uma queda significativa na produção de ácido láctico quando utilizados em concentrações inferiores a 4% e 300 ppm, respectivamente.

- O *L. curvatus*, nas condições testadas, manteve viabilidade celular recomendável para cultura iniciadora (> 10<sup>8</sup> UFC/mL), mesmo quando cultivado na presença de 4 % (m/v) de NaCl e 300 ppm de NaNO<sub>2</sub>.

**Quadro 3** – Produção de ácido láctico pelo *L. curvatus* em caldo MRS suplementado com NaCl e/ou NaNO<sub>2</sub>.

Tratamentos	pH	Ácido láctico (%)	NaCl	NaNO <sub>2</sub>
	final		%(m/v)	(ppm)
1	3,64	2,44	0	0
2	3,48	2,54	2	0
3	3,42	2,50	4	0
4	3,64	2,55	0	150
5	3,48	2,63	2	150
6	3,46	2,48	4	150
7	3,67	2,60	0	300
8	3,56	2,37	2	300
9	3,58	2,11	4	300
10	3,48	2,64	2	150
11	3,48	2,63	2	150



**Figura 1** – Superfície de resposta obtida pela fermentação láctica desenvolvida pelo *L. curvatus* em caldo MRS suplementado com NaCl e NaNO<sub>2</sub> em diferentes concentrações (valores codificados).

**Quadro 4** – Comparação da produção de ácido láctico pelo *L. curvatus* cultivado em caldo MRS.

Tratamentos	NaCl	NaNO <sub>2</sub>	pH	Ácido	Viabilidade
	%(m/v)	(ppm)	final	lático %	celular UFC/mL
1	0,87	156	3,60	3,30	10 <sup>12</sup>
2	4	300	3,69	2,23	10 <sup>10</sup>
3	0	0	3,65	3,34	10 <sup>10</sup>

1- MRS otimizado

2- MRS contendo a concentração máxima de sais utilizada na M. S. de Resposta.

3- MRS sem suplementação (controle)

**Quadro 5** – Teste de Tukey para as médias de ácido láctico obtidas em caldo MRS otimizado ; em caldo MRS contendo a concentração máxima dos sais e em MRS sem os sais de cura.

Comparação entre os tratamentos	Ácido láctico % (conc. média)	Significância ao nível de 5%
1	3,30	**
2	2,23	
1	3,30	—
3	3,34	
2	2,23	**
3	3,34	

Tratamento 1 : caldo MRS otimizado, contendo 0.87%(m/v) de NaCl e 156 ppm de NaNO<sub>2</sub>

Tratamento 2 : caldo MRS contendo 4%(m/v) de NaCl e 300 ppm de NaNO<sub>2</sub>.

Tratamento 3 : caldo MRS sem suplementação (controle).

\*\* Estes tratamentos apresentaram diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

## Referências

- ANJOS, A. C.; RIBEIRO, P. O Nitrito em Carnes Curadas: Vantagens, Desvantagens e Recursos Tecnológicos para Reduzir os Níveis de Nitrosaminas no Bacon. *Higiene Alimentar*, v. 8, n. 29, p. 8-13, fev. 1994.
- ARIHARA, K.; ITOH, M. U.V.-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 56, n. 2-3, p. 227-230, 2000.
- BALLESTEROS, C.; PALOP, L.; SÁNCHEZ, I. Influence of sodium chloride concentration on the controlled lactic acid fermentation of "almagro" eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 13-20, dez/1999.
- BUCHTA, K. Lactic Acid. In : REHN, H. I. ; REED, G. *Biotechnology*. Flórida: Verlagchemie, 1983. p. 409-417.
- LEE, S.H.; PARK, L.Y. Nitrite depletion and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 1, p. 39-44, 2000.
- LIEPE, Hans-Ulrich. Starter Culture in Meat Production. In : REHM, H. I.; REED, G. *Biotechnology*,. Flórida: Verlagchemie, 1983. v. 5. Cap. 8, p. 399-419.
- OLIVEIRA, A. S. *Desenvolvimento de Inoculante para Fermentação Láctica de Silagens: utilização de resíduos agroindustriais*. 1995. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- SILVA, D. J. *Análise de Alimentos : Métodos Químicos e Biológicos*, p. 110-114. Viçosa: UFV. 1981.
- TICHACZEK, P. S.; VOGEL, R. F.; HAMMES, W. P Characterization of bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 15, n. 3, p. 460-468, 1992.
- TONY, C. H. De; TONI Jr., C. De; SANT'ANNA, E. S.; OGLIARI, P. J. Uso de Bactérias Lácticas e seus Efeitos nas Variações de pH de Nitrito Durante a Maturação do Salame Tipo Italiano. *Bol. SBCTA*, v. 28, n. 1, p. 1-9, jan/ jun 1994.
- ZAYED, G.; WINTER, J. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of Lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.44,p.362-366,1995.