

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FERNANDA CRISTINA KANDALSKI BORTOLOTTO

**USE OF NATURAL ANTIMICROBIALS TO CONTROL LACTIC SPOILAGE AND
INCREASE THE STABILITY OF REDUCED SODIUM *CALABRESA* SAUSAGE**

CURITIBA

2019

FERNANDA CRISTINA KANDALSKI BORTOLOTTTO

**USE OF NATURAL ANTIMICROBIALS TO CONTROL LACTIC SPOILAGE AND
INCREASE THE STABILITY OF REDUCED SODIUM CALABRESA SAUSAGE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientadora: Dra. Renata Ernlund
Freitas de Macedo

CURITIBA

2019

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA.....	vii
AGRADECIMENTOS.....	Viii
FORMATO DA TESE.....	lx
RESUMO GERAL.....	X
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1.....	1
1.INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
1.1 Produtos cárneos e a redução de sódio.....	2
1.2 Predições de vida útil e identificação de microbiota deteriorante.....	4
1.3 Antimicrobianos naturais – Nisina.....	7
1.4 Antimicrobianos naturais - ϵ-Poli-L-lisina.....	9
1.5 Interação entre Nisina e ϵ-Poli-L-lisina.....	10
CAPÍTULO 2.....	12
ELABORAÇÃO DE LINGUIÇA CALABRESA COM REDUZIDO TEOR DE SÓDIO.....	12
Resumo.....	12
1.Introdução.....	13
2.Materiais e métodos.....	15
2.1 Análise físico-química.....	16
2.2 Análise microbiológica.....	16
2.3 Estabilidade sensorial comercial.....	16
2.4 Análises estatística.....	17
3.Resultados.....	17
4.Discussão.....	20
5.Conclusão.....	23
Referências.....	24
CAPÍTULO 3.....	27
USE OF MICROBIALS PEPTIDES (NISIN AND ϵ-POLY-L-LYSINE) AS NATURAL ANTIMICROBIALS OF SPOILAGE LACTIC ACID BACTERIA IN CALABRESA COOKED SAUSAGE.....	27

Abstract.....	27
1. Introduction.....	28
2. Materials and methods.....	29
2.1 Materials.....	29
2.2 Isolation of LAB and phenotypic characterization.....	29
2.3 Mass spectrometry identification of LAB.....	30
2.4 DNA extraction of LAB.....	30
2.5 RAPD-PCR.....	31
2.6 Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC).....	31
2.7 Determination of Fractional Inhibitory Concentration Index (ICIF) of NI and ϵ-PL.....	32
2.8 Statistical Analysis.....	32
3. Results and Discussion.....	33
3.1 Identification of LAB isolates.....	33
3.2 MIC and MBC of NI and ϵ-PL.....	34
3.3 ICIF of NI and ϵ-PL combination.....	35
4. Conclusion.....	37
Acknowledgments.....	37
References.....	37
CAPÍTULO 4.....	40
COMBINATION OF ϵ-POLY-L-LYSINE AND NISIN Z AS BIOPRESERVATIVES IN REDUCED SODIUM CALABRESA SAUSAGE...	40
Abstract.....	40
1.Introduction.....	41
2.Materials and methods.....	43
2.1 Materials.....	43
2.2 Preparation of reduced sodium Calabresa sausage.....	43
2.3 Microbiological analysis.....	44
2.4 Physicalchemical characterization.....	44
2.5 Sensory analysis.....	45
2.6 Statistical analysis.....	46
3.Results and Discussion.....	46

3.1 Sodium, protein and moisture content.....	46
3.2 Effects on sausage stability.....	47
3.3 Sensory analysis.....	50
4. Conclusions.....	51
Acknowledgments.....	52
References.....	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A Ficha de Avaliação Sensorial.....	62
ANEXO B Parecer Consubstancial do CEP.....	63

“Se vi mais longe foi por estar de pé em ombro de gigantes”
Isaac Newton.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me ajudarem na conclusão desta importante etapa de minha carreira profissional, sempre me incentivando a buscar excelência na minha formação e por todos os momentos em que estive ausente e cuidaram dos meus filhos.

À meu marido, Daniel, companheiro de todas as horas que entendeu meu distanciamento e em nenhum momento deixou de me apoiar e incentivar.

À minha orientadora professora Dra. Renata E. F. de Macedo, por acreditar em meu potencial, transmitir sabiamente seus ensinamentos, e principalmente por toda a paciência que teve comigo ao longo desse período.

A todos os funcionários da PUCPR, em especial às técnicas de laboratório que muito me ajudaram e as graduandas, bolsistas de iniciação científica: Maria Helena, Taciane e Natália, por toda ajuda na realização de meu experimento.

Ao professor Marcelo Pilonetto e sua equipe do LACEN-PR pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

Aos diretores do Frigorífico Bizinelli, Ana e Ângelo Bizinelli, por todo apoio, compreensão e também pelos materiais disponibilizados. Aos colegas de frigorífico Itacir, Edmar e Israel, pela ajuda no desenvolvimento do experimento.

E, por último, aos meus filhos, anjos que guiam meu caminho. João e Maria, vocês são a razão do meu constante crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada e desculpem-me pela ausência em determinados momentos, tenho certeza que um dia entenderão.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO/ TESE

A presente tese é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, justificativa e os objetivos do estudo.

Os capítulos 2, 3 e 4 tratam-se de artigos científicos completos, contendo referências, e formatados nas normas das revistas para as quais os mesmos serão submetidos.

O capítulo 5 finaliza a tese com conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da tese.

RESUMO GERAL

O consumo excessivo de sódio está associado ao aumento da pressão arterial, principal fator de risco de mortes evitáveis no mundo segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Dessa forma, autoridades da área de saúde pública vem desenvolvendo, em parceria com as indústrias de alimentos, alternativas para a redução do consumo de sódio pela população. Considerando que produtos cárneos representam entre 20 a 30% da ingestão diária de sódio, estratégias para redução de sal pela indústria da carne tornou-se necessária. Em produtos cárneos o sal não afeta apenas as propriedades sensoriais, mas também atua como um importante conservador, prolongando a vida útil dos produtos por evitar deterioração microbiana. Em produtos tradicionalmente armazenados em temperatura ambiente, como linguiça Calabresa, a redução do sódio acaba por reduzir o prazo de validade do produto, o que não é interessante para a indústria. Os objetivos do presente trabalho foram (1) desenvolver formulações de linguiça Calabresa cozida com reduzido teor de sódio (R1 e R2) e avaliar a estabilidade físico-química (Aw, pH, cor instrumental e teor de sódio), microbiológica (contagem de bactérias lácticas) e comercial (odor, presença de vácuo na embalagem, aparência geral) do produto; (2) isolar e identificar cepas de bactérias lácticas (BAL) de linguiça Calabresa comercial com sinais de deterioração e usá-las como modelo para avaliação *in vitro* dos antimicrobianos naturais nisina (NI) e ϵ -polilisina (ϵ -PL); (3) testar o efeito da combinação de NI e ϵ -PL adicionada em diferentes concentrações sobre as características físico-químicas, sensoriais e estabilidade microbiológica de linguiça Calabresa com reduzido teor de sódio, armazenada a temperatura ambiente. A redução dos teores de sódio nas linguiças em 21% (R1) e 34% (R2) não afetou a maioria das características físico-químicas de identidade e qualidade da linguiça Calabresa, sendo possível sua redução nesses níveis, com a manutenção da qualidade do produto. Com relação à deterioração microbiana, a redução de sódio também não afetou o desenvolvimento de bactérias lácticas nas linguiças. Contudo, verificou-se que para a manutenção da estabilidade deste tipo de produto a temperatura ambiente, seja com teor usual ou com teor reduzido de sódio, é necessária a aplicação de método de controle microbiano complementar ao cozimento. BAL foram identificadas fenotipicamente, molecularmente (RAPD-PCR) e por espectrometria de massa (MALDITOF) como sendo *L. plantarum* e *L. curvatus*. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos antimicrobianos isoladamente e em combinação, contra um pool de BAL *in vitro* foram determinadas pela técnica de diluição em tubos. Após a definição das combinações com menor CIM *in vitro*, procederam-se os testes em uma formulação de linguiça Calabresa comercial com 30% de redução de sal e adicionada de diferentes concentrações dos antimicrobianos NI e ϵ -PL. Foram produzidas quatro formulações de linguiça Calabresa (T1=sem adição antimicrobianos, T2= 95mg ϵ -PL + 0,5mg NI, T3= 142,5mg ϵ -PL + 0,25 mg NI, T4= 47,5mg ϵ -PL + 0,75mg NI),

embaladas a vácuo e mantidas em temperatura ambiente durante 28 dias. No tempo 0 foram avaliados os teores de sódio, umidade e proteína, e iniciaram-se as demais análises microbiológicas (contagem de BAL) e físico-químicas (pH, cor instrumental, Aw) em intervalos de sete dias. Foi realizada análise sensorial, com teste afetivo usando escala hedônica de nove pontos, com 105 provadores não treinados. Os resultados foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A adição dos antimicrobianos não afetou os valores de sódio, umidade e proteína, nem a Aw das linguiças. O pH de todos os tratamentos reduziu com o tempo de estocagem, sendo que T2 obteve a menor queda de pH. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) na cor instrumental entre os tratamentos e ao longo do tempo, mas as variações estão relacionadas às diferenças intrínsecas das amostras e não à influência dos tratamentos. As linguiças tratadas com ϵ -PL e NI (T2, T3 e T4) apresentaram menor contagem de LAB em comparação ao controle ($P < 0,05$) no final do armazenamento. T3 apresentou a menor contagem de LAB, com diferença significativa para T2 e T4. A contagem de LAB nas linguiças contendo NI e ϵ -PL aos 28 dias de estocagem à temperatura ambiente variou de 4,43 log UFC/g (T3) a 5,74 log CFU/g (T4), apresentando diferença para o controle (7,35 UFC/g) e estando abaixo do limite de 7 log UFC/g para a contagem de LAB e a deterioração láctica do produto. Na análise sensorial, as linguiças adicionadas de antimicrobianos apresentaram índice de aceitabilidade acima de 75% nos quesitos odor, cor, textura, sabor e avaliação global, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. A adição combinada de ϵ -PL e NI mostrou-se eficiente como agente conservante natural em linguiça Calabresa reduzida de sódio, prolongando a vida útil do produto, mesmo em condições de estocagem a temperatura ambiente.

Palavras-chave: peptídeos, antimicrobianos, BAL, produto cárneo, linguiça, vida útil

ABSTRACT

Excessive sodium intake is associated with increased blood pressure, which is, according to the World Health Organization (WHO), the leading risk factor for preventable deaths in the world. Thus, public health authorities have been developing, in partnership with the food industries, alternatives for reducing the consumption of sodium by the population. Considering that meat products account for between 20 to 30% of daily sodium intake, strategies for salt reduction by the meat industry have become necessary. In meat products salt not only affects the sensory properties but also acts as an important conservative, extending the shelf life of the products by preventing microbial spoilage. In products traditionally stored at room temperature, such as *Calabresa* sausage, sodium reduction ultimately reduces the shelf life of the product, which is not of interest to the industry. The objectives of the present work were (1) to develop formulations of low sodium cooked *Calabresa* sausage (R1 and R2) and to evaluate the physicochemical (A_w , pH, instrumental color, weight loss and sodium content), microbiological (lactic bacteria count) and commercial stability (odor, presence of vacuum in packaging, overall appearance) of the product; (2) isolate and identify lactic acid bacteria (LAB) from commercial *Calabresa* sausage with signs of spoilage and use them as a model for *in vitro* evaluation of the natural antimicrobials nisin (NI) and ϵ -polylysine (ϵ -PL); (3) test the effect of the combination of NI and ϵ -PL added at different concentrations on the physicochemical, sensory and microbiological stability characteristics of low-sodium *Calabresa* sausage stored at room temperature. The reduction of sodium content in sausages by 21% (R1) and 34% (R2) did not affect most of the physicochemical characteristics of the *Calabresa* sausage, showing the feasibility in reducing salt at these levels and still maintaining the quality of the sausage. Regarding microbial spoilage, sodium reduction did not affect the development of LAB in sausages. However, it has been found that in order to maintain the stability of this type of product at room temperature, either with normal or low sodium content, it is necessary to apply a complementary microbial control method to cooking. LAB were phenotypically, molecularly (RAPD) and spectrometry mass technique (MALDITOF) identified as *L. plantarum* and *L. curvatus*. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (CBM) of antimicrobials alone and in combination against a LAB pool were determined by the tube dilution technique. After defining the combinations with lower MIC *in vitro*, the tests were carried out on a commercial *Calabresa* sausage formulation with 30% salt reduction and added with different concentrations of NI and ϵ -PL antimicrobials. Four *Calabresa* sausage formulations were produced (T1 = no antimicrobial addition, T2 = 95mg ϵ -PL + 0.5mg NI, T3 = 142.5mg ϵ -PL + 0.25 mg NI, T4 = 47.5mg ϵ -PL + 0.75mg NI), vacuum packed and kept at room temperature for 28 days. At time 0, sodium, moisture and protein contents were evaluated. Microbiological (LAB count) and physicochemical (pH, instrumental color, A_w) analyzes were carried out at seven-day intervals.

Sensory analysis was performed using a nine-point hedonic scale, with 105 untrained panelists. Results were statistically analyzed and means compared by Tukey test ($P < 0.05$). The addition of antimicrobials did not affect sodium, moisture and protein values, nor A_w of the sausages. pH of all treatments decreased with storage time, and T2 obtained the lowest pH drop. There was a significant difference ($P < 0.05$) in the instrumental color between treatments and over time, but the variations are related to the intrinsic differences of the samples and not to the influence of the treatments. Sausages treated with ϵ -PL and NI (T2, T3 and T4) presented lower LAB count compared to control ($P < 0.05$) at the end of storage. T3 presented the lowest LAB count, with significant difference for T2 and T4. The LAB count in NI and ϵ -PL sausages at 28 days of storage at room temperature ranged from 4.43 log CFU/ g (T3) to 5.74 log CFU/ g (T4), showing difference to the control (7.35 CFU/ g) and below the 7 log CFU/ g limit for LAB count and lactic spoilage. In the sensory analysis, the sausages added with antimicrobials presented acceptability index above 75% for odor, color, texture, taste and overall rating, with no significant difference between treatments. The combined addition of ϵ -PL and NI proved to be effective as a natural preservative in reduced sodium *Calabresa* sausage, extending product shelf life even under room temperature storage conditions

Keywords: peptides, antimicrobials, LAB, meat product, sausage, shelf life

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

A hipertensão arterial, enfermidade não transmissível que mais leva a óbitos no mundo, é considerada ao mesmo tempo uma doença e um fator de risco, representando um dos maiores desafios em saúde pública devido à complexidade de recursos necessários para seu controle. No Brasil, 30% da população adulta, com mais de 40 anos tem pressão arterial elevada. O Ministério da Saúde alerta que 34 pessoas morrem por hora de doenças cardiovasculares em nosso país, sendo a pressão arterial elevada o principal fator de risco. (Portal da Saúde, 2019).

Dados da OMS (2016) revelam que mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo sofrem de hipertensão arterial, o que predispõe a ataques cardíacos e acidente vascular cerebral. Por ano, cerca de 1,6 milhões de mortes, são causadas por doenças cardiovasculares apenas no continente Americano das quais, cerca de meio milhão correspondem a pessoas com menos de 70 anos de idade. O número de pessoas com hipertensão arterial cresceu 3,2% em 10 anos, passando de 22,5% em 2006 para 25,7% em 2016 (Castro, 2017).

Este preocupante quadro revelou a necessidade de que medidas fossem tomadas pelo governo brasileiro. Essas medidas visam principalmente à redução do consumo de sódio pela população, visto que o consumo excessivo de sal está associado a uma série de doenças, sobretudo à hipertensão arterial (Brasil, 2013).

A diminuição gradual do consumo de sal na dieta deve alcançar recomendações internacionais, que determinam um consumo de sal inferior a 5 g/ dia/ pessoa e de sódio inferior a 2g/ dia até o ano de 2020. Atualmente, o brasileiro consome em média 12 g/ dia de sal (Brasil, 2013).

Produtos cárneos são tradicionalmente considerados como vilões das dietas por conterem alto teor de gordura, colesterol e sal (ou sódio), além dos aditivos químicos adicionados. Devido às implicações à saúde, a redução do sódio tornou-se uma necessidade para a sobrevivência da indústria da carne no mundo inteiro (Campagnol et al., 2011). Para criar produtos mais saudáveis, esforços devem ser direcionados em formulações que reduzam esse

1 componente. Estudos mostram que os produtos cárneos são responsáveis por
2 cerca de 20 a 30% do consumo diário de sódio. Nesses produtos, o sal
3 desempenha funções importantes, sendo responsável por conferir sabor,
4 propriedades de textura, conservação e estabilidade (Petracci et al., 2013).

5 Sendo o sal um importante conservante dos produtos cárneos, com ação
6 contra microrganismos deteriorantes e patogênicos, a redução dos níveis de
7 sódio pode comprometer a estabilidade microbiológica desses alimentos,
8 reduzindo sua vida de prateleira. O sal reduz a água disponível para reações
9 físicas, químicas e microbiológicas, que é chamada de atividade de água de
10 um alimento e principal responsável pela deterioração do produto (Ordóñez,
11 2005).

12 Nesse contexto, o Ministério da Saúde juntamente com a Associação
13 das Indústrias de Alimentos Brasileiras (ABIA) assinou um acordo tendo como
14 objetivo a redução do sódio nos próximos cinco anos (2017 – 2022). O primeiro
15 acordo de redução está em vigor desde 2011 e tornou possível a retirada de 17
16 mil toneladas de sódio que seriam consumidas pela população. A meta é
17 retirar, 28,5 mil toneladas de sódio da alimentação dos brasileiros, e a partir de
18 2011, os produtos cárneos entraram neste acordo. Dentre os produtos com
19 metas para redução no teor de sódio estão: empanados, hambúrguer, linguiça
20 cozida mantida em temperatura ambiente, linguiça cozida mantida sob
21 refrigeração, linguiça frescal, salsichas, mortadela mantida em temperatura
22 ambiente e mantida sob refrigeração, além dos produtos de presuntaria (Portal
23 da Saúde, 2017).

24 **1.1 Produtos cárneos e a redução de sódio**

25 No Brasil, os embutidos cárneos são bastante populares, representando
26 um importante segmento do mercado das carnes industrializadas, visto que
27 70% do consumo interno brasileiro de carne suína se dá sob a forma de
28 produtos industrializados, dentre eles, destacam-se as linguiças, que
29 representam mais de 80% deste consumo (Abipecs, 2010). Por definição,
30 linguiça é o produto cárneo industrializado, obtido de carne de animais de
31 açougue adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutidos em
32 envoltórios naturais ou artificiais, e submetido a processo tecnológico
33 específico (Brasil, 2000).

1 A linguiça Calabresa é um produto genuinamente brasileiro, que nasceu
2 por influência da imigração italiana, e tem seu nome devido à pimenta usada
3 em sua composição e por ser inspirada em uma linguiça encontrada na região
4 da Calábria, sul da Itália (salsiccia di Calabria). Essa é a linguiça
5 tradicionalmente usada como cobertura em pizzas e um dos principais
6 ingredientes da feijoada brasileira. Por isso, é um embutido cárneo
7 amplamente incorporado na dieta do brasileiro (Insumos, 2012).

8 De acordo com a legislação nacional, a linguiça Calabresa deve ser
9 obtida exclusivamente de carne suína, curada, e adicionada de ingredientes,
10 devendo ter o sabor picante da pimenta Calabresa, submetida ou não ao
11 processo de estufagem, ou similar para desidratação e ou cozimento, sendo o
12 processo de defumação opcional. Nas linguiças denominadas tipo Calabresa,
13 que são submetidas ao cozimento, é permitida a adição de até 20% de carne
14 mecanicamente separada de aves (Brasil, 2000).

15 As linguiças também entraram no acordo realizado entre o Ministério da
16 Saúde e a ABIA, e nas linguiças cozidas conservadas em temperatura
17 ambiente foram registradas reduções de 15,6% no teor de sódio entre 2013 e
18 2016 (Portal da Saúde, 2017).

19 Entre as estratégias propostas para promover a redução de sódio nos
20 produtos cárneos estão a simples redução do teor de NaCl; a utilização de sais
21 substitutos como cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2) e cloreto
22 de magnésio (MgCl_2); o uso de realçadores de sabor e produtos de
23 fermentação; e a modificação da forma física do sal, entre outros (Galvão,
24 2014).

25 Entre os sais substitutos, o KCl é o mais amplamente testado e com
26 melhores resultados por ser muito similar ao NaCl, no que diz respeito a força
27 iônica, propriedades químicas e eficiência antimicrobiana. Porém substituições
28 acima de 30 ou 40% afetam consideravelmente o sabor, que tende ao metálico
29 e amargo (Campagnol et al., 2012). O KCl é reconhecidamente seguro e de
30 eficiência antimicrobiana equivalente ao NaCl (Bidlas e Lambert, 2008).

31 A substituição parcial de NaCl por CaCl_2 pode ser uma alternativa
32 saudável por providenciar cálcio adicional à dieta. Entretanto, estudos mostram
33 que sais divalentes como o CaCl_2 e o MgCl_2 não apresentam força iônica

1 similar aos monovalentes, o que resulta em instabilidade no caso de emulsões
2 cárneas (Ma et al., 2013).

3 A adição de realçadores de sabor, como umami (sais de glutamato,
4 inosinato e guanilato), extratos de leveduras, lactato e aromas é bastante
5 eficiente para melhorar a aceitação dos produtos com reduzido teor de sódio.
6 Além de enriquecer e realçar o sabor do próprio alimento, reduz a percepção
7 de sabor residual indesejável dos substitutos do sal (Santos et al., 2014).

8 A adição de sal em produtos cárneos, geralmente na proporção de 1,5 a
9 2,5%, promove melhorias na textura, na capacidade de retenção de água e
10 menor perda de peso durante processos de cozimento (Grossi et al., 2012),
11 sem falar nos aspectos de conservação microbiana. A atividade antimicrobiana
12 do sal está relacionada a sua capacidade de redução da atividade de água.
13 Com menos água disponível, o cloreto de sódio retarda a atividade osmótica e,
14 consequentemente cria um ambiente prejudicial à sobrevivência e ao
15 crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (Desmond, 2006).

16 A redução no teor de sódio dos produtos cárneos processados é um
17 grande desafio do ponto de vista tecnológico e sensorial, uma vez que resulta
18 não apenas em redução do gosto salgado e da aceitabilidade, mas também
19 impacta em importantes funções que este ingrediente desempenha na
20 produção e na conservação destes alimentos.

21 Desta forma, cada produto cárneo exige um tipo de abordagem diferente
22 para se conseguir uma efetiva redução no teor de sódio, levando-se em conta
23 ingredientes utilizados, processos tecnológicos e sistemas de embalagens
24 empregados. Mas o importante mesmo é que as condições de segurança
25 alimentar prevaleçam, mantendo este produto com suas propriedades físico-
26 químicas e sensoriais estáveis durante sua vida de prateleira.

27 **1.2 Predições de vida útil e identificação de microbiota deteriorante**

28 A identificação de microrganismos em embutidos cárneos é de
29 fundamental importância para caracterização da qualidade higiênico-sanitária
30 dos produtos e garantia de vida de prateleira (Abipecs, 2008).

31 Por sua composição (alto teor de nutrientes, pH próximo a neutralidade,
32 alta atividade de água), a linguiça apresenta alto risco microbiológico. Como
33 passa por grande manuseio durante processamento, pode apresentar
34 condições propícias para a manutenção e multiplicação de grande número de

1 microrganismos. É importante a preocupação com vários aspectos
2 relacionados à segurança do produto, tais como hábitos higiênicos dos
3 manipuladores, qualidade de ingredientes e matérias-primas utilizados, bem
4 como correta sanitização de equipamentos empregados na elaboração do
5 embutido (Ritter, 2003).

6 Em ambiente de conservação a vácuo, a microbiota dos produtos
7 cárneos é composta principalmente por bactérias ácido lácticas (BAL) não
8 putrefativas (*Lactobacillus*, *Carnobacterium* e *Leuconostoc*) (Holley e Gill,
9 2005). Esse grupo é considerado o maior grupo de bactérias associadas à
10 deterioração de produtos cárneos cozidos embalados a vácuo. A multiplicação
11 das bactérias lácticas nesses produtos resulta em limosidade superficial,
12 formação de exsudado leitoso, odores estranhos e consequentemente,
13 redução de vida de prateleira (Borch et al., 1996). Hoje esse tipo de
14 contaminação, causado pelas bactérias lácticas, é o principal problema de
15 deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo mantidos em
16 temperatura ambiente, como é o caso da linguiça Calabresa.

17 BAL são bactérias Gram positivas, anaeróbias aerotolerantes, cocos,
18 cocobacilos ou bacilos geralmente imóveis, não esporogênicas e
19 fermentadoras, produtoras de ácido láctico como resultado da fermentação de
20 carboidratos. Existem espécies heterofermentativas, que produzem além de
21 ácido láctico, grandes quantidades de dióxido de carbono e ácido acético ou
22 etanol, e espécies homofermentativas, em que seu produto final de
23 fermentação é quase que exclusivamente o ácido láctico. Muitas espécies de
24 BAL (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*)
25 são utilizadas na produção de alimentos fermentados apresentando
26 antagonismo a outras bactérias, inclusive patogênicas (Hu et al., 2009).

27 As linguiças são produtos altamente perecíveis e servem como substrato
28 para vários microrganismos deteriorantes e patogênicos. O conhecimento
29 sobre os metabólitos microbianos ou microrganismos deteriorantes específicos,
30 podem ser aplicados para prever a vida útil de um produto. Mas, para uma
31 eficiente caracterização da diversidade bacteriana do embutido, o método
32 utilizado para detecção de microrganismos deve ser considerado. Muitas vezes
33 o isolamento tradicional não detecta microrganismos presentes na amostra,
34 seja pelo estado de injúria deste, pela falha do meio de cultivo em proporcionar

1 condições para que os microrganismos cresçam ou, ainda, microrganismos de
2 diferentes espécies que compartilham características fenotípicas em comum
3 sendo difícil sua identificação. Para evitar as falhas do isolamento tradicional, a
4 técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo empregada
5 como alternativa para estudo da diversidade microbiana (Hansen e Huss,
6 1998).

7 O desenvolvimento da biologia molecular, permitiu que vários métodos
8 se tornassem disponíveis, os quais são utilizados para entender o dinamismo e
9 a diversidade de microrganismos envolvidos nos processos de produção e
10 também de deterioração dos alimentos (Fontana et al, 2016).

11 A identificação da microflora proveniente de linguças utilizando-se
12 somente métodos fenotípicos é insuficiente para a caracterização de um
13 microrganismo, pois não é precisa, devida a uma interpretação ambígua do
14 perfil colorimétrico resultante dos testes bioquímicos. Por esta razão, métodos
15 moleculares, como PCR tem sido cada vez mais utilizado nos procedimentos
16 de caracterização molecular (Blaiotta et al., 2003; Morot-Bizot et al., 2003). A
17 identificação das bactérias lácticas usando apenas métodos fenotípicos
18 apresenta limitações, principalmente devido à pequena variação de
19 características entre espécies (Quere et al., 1997). Visando obter uma
20 identificação mais específica para essas bactérias, diversos métodos
21 moleculares têm sido desenvolvidos, muitos deles se baseando no uso da
22 técnica de PCR para a identificação genotípica de microrganismos,
23 diferenciando cepas entre si (Bruno, 2011).

24 A PCR (reação em cadeia da polimerase) é um método considerado
25 sensível e específico que vem sendo utilizado na detecção de DNA ou RNA de
26 bactérias. A sensibilidade da técnica da PCR está relacionada principalmente
27 ao número de cópias da sequência alvo presente no genoma do patógeno, o
28 tipo de iniciadores, bem como inibidores presentes na amostra (Poroca et al.,
29 2009).

30 A análise RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA = Amplificação
31 Aleatória de DNA polimórfico) é uma derivação do processo de PCR e consiste
32 na amplificação simultânea de vários *loci* anônimos do genoma através da
33 utilização de um único primer decâmico de sequência arbitrária (Williams *et al.*,
34 1993). Obtendo assim um *fingerprint* genômico, permitindo identificar a

diversidade genética de indivíduos de uma mesma população (Fontana et al., 2016).

Já a técnica de espectrometria de massa com fonte de ionização e desorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-vôo (MALDI-TOF) incrementa métodos tradicionais de identificação microbiana, detecta e caracteriza microrganismos de forma rápida utilizando uma simples extração da amostra a ser analisada (Assis et al., 2011). Esta técnica é um incremento aos métodos tradicionais microbiológicos na detecção de microrganismos, visto que permite a comparação do espectro de massas de um microrganismo isolado com os espectros de referência de cepas conhecidas, possibilitando a classificação e identificação do patógeno com mais rapidez do que métodos convencionais (Bier et al., 2017).

Para a indústria cárnea torna-se de suma importância o conhecimento sobre a microbiota do produto e organismos específicos de deterioração (“specific spoilage organisms” ou SSO), assim podem auxiliar nas inspeções microbiológicas, nas predições de vida útil e em novas concepções de preservação ou métodos de produção (Hansen e Huss, 1998).

1.3 Antimicrobianos naturais - Nisina

Tendo em vista as demandas atuais dos consumidores, onde estes têm dado preferência aos alimentos mais naturais com menos aditivos químicos, os conservantes naturais, vêm ganhando espaço na preservação dos alimentos. Alguns antimicrobianos de origem microbiana, como nisina e ϵ -polilisina, têm sido utilizados para a conservação de alimentos.

A nisina é uma bacteriocina produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, muito utilizada na composição de fermentos lácticos para o processamento de queijos. Das 40 cepas conhecidas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 35 são capazes de sintetizar esse peptídeo, sendo que a capacidade de produzir nisina está geneticamente vinculada à capacidade de fermentar a sacarose. A molécula da nisina é um peptídeo com 34 aminoácidos, tendo como aminoácidos terminais a isoleucina e a lisina, respectivamente (Tong et al., 2010).

Ela apresenta atividade bactericida contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas, como as bactérias lácticas, e também sobre bactérias esporogênicas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (Lerayer et al.,

2015). Possui habilidade de inibir o crescimento microbiano de importantes bactérias Gram-positivas patogênicas vinculadas pelos alimentos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* (Turgis et al., 2012).

É uma bacteriocina pertencente à classe dos lantibióticos – classe I (Cotter et al., 2005) havendo relatos de que desde os anos 1960, a nisina tem sido utilizada como antimicrobiano em alimentos, sendo reconhecida pelo FDA como segura (GRAS) (Delves-Broughton et al., 1996).

A nisina liga-se à membrana-alvo microbiana através de algum grau de interação eletrostática, mediante dois mecanismos distintos. No primeiro, a nisina liga-se ao lipídio II, que é o principal transportador de subunidades de peptideoglicanos do citoplasma para a parede celular, impedindo dessa forma a correta síntese da parede celular. Além disso, a nisina utiliza a molécula do lipídio II como uma molécula de ancoragem, para iniciar um processo de inserção na membrana celular, levando à formação de poros, efluxo de íons potássio, fosfato inorgânico, aminoácidos e ATP intracelular, e consequente morte celular (Cotter et al., 2005).

Estudos mostram que a ação antimicrobiana da nisina é potencializada quando utilizada em sinergismo com outros tratamentos, entre eles cita-se a adição de ácidos orgânicos ou outros conservantes naturais (Riley e Wertz, 2002). Turgis et al. (2012), comprovaram efeito aditivo e sinérgico da nisina quando usada juntamente com óleos essenciais testada contra alguns microrganismos específicos (Nisina + *Cinnamomum cassia*: efeito aditivo contra *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas putida*; Nisina + *Brassica hirta*: efeito aditivo contra *Staphylococcus aureus*; Nisina + *Origanum vulgare*: efeito sinérgico contra *L. monocytogenes*; Nisina + *Thymus vulgaris*: efeito aditivo contra *Bacillus cereus* e *L. monocytogenes*; Nisina + *Satureja montana*: efeito aditivo contra *E. coli* O157:H7 e *Pseudomonas putida*). Silva et al. (2014), comprovou efeito positivo da associação de nisina com lactato de sódio para o controle de BAL de linguiça frescal embalada à vácuo e mantida sob refrigeração a 4 °C.

Para o *Codex Alimentarius* a nisina é classificada como conservante alimentar, sendo reconhecida pelo INS 234, tendo indicação para uso em carnes termicamente processadas no limite de 25mg/Kg, indicação esta

1 atualizada pelo comitê científico em 2015. Antes disso era reconhecida para
2 uso em queijos, derivados lácteos e alguns cereais (General Standard for Food
3 Additives, Codex Stan review 2015). No Brasil a nisina é amplamente utilizada
4 em derivados lácteos, como queijos e requeijão, e recentemente foi aprovada
5 para ser usada em produtos cárneos industrializados cozidos na concentração
6 máxima de 0,0025g/100g de produto, através da Resolução da Diretoria
7 Colegiada, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em 14/03/2019.

8 **1.4 Antimicrobianos naturais - ϵ -polilisina**

9 A ϵ -polilisina (ϵ -PL) é um poliaminoácido catiônico composto por 25-35
10 moléculas de L-lisina, obtido a partir de um processo de fermentação natural
11 da bactéria *Streptomyces albulus* (Najjar et al., 2007). Desde o final dos anos
12 1980, a ϵ -polilisina é aprovada para uso como conservante em alimentos no
13 Japão. Em janeiro de 2004, a ϵ -polilisina foi reconhecida com o *status* GRAS
14 (*Generally Recognized as Safe*) nos Estados Unidos como agente
15 antimicrobiano e de prevenção de deterioração, para uso em arroz cozido e
16 arroz de sushi, em dosagens de 5-50 ppm (Gras Notice - FDA, 2004; Benli et
17 al., 2011). Em 2010 a mesma agência reguladora (FDA) atualizou seu status
18 GRAS, ampliando sua aplicação para outros produtos, Gras Notice – FDA,
19 2010). Atualmente esta substância está disponível comercialmente como
20 aditivo conservante de alimentos no Japão, Coreia do Sul e Estados Unidos,
21 principalmente para o uso em arroz cozido, legumes cozidos, sopas, macarrão,
22 pescado (sushi) (Hiraki et al., 2003) e em leite e derivados (Honghua e Hui,
23 2000).

24 A atividade antimicrobiana da ϵ -PL está intimamente relacionada com a
25 quantidade de resíduos de L-lisina, inclusive já foi demonstrado que são
26 necessários mais de 10 resíduos para que a ϵ -PL exerça atividade
27 antibacteriana adequada (Hyltdgaard et al., 2014). A ϵ -polilisina interage com
28 as cabeças dos fosfolipídeos da membrana celular devido à sua carga
29 eletrostática, causando alterações conformacionais na membrana plasmática.
30 Os fosfolípidos removidos da membrana podem formar vesículas ou micelas
31 livres, deixando uma lacuna na membrana através da qual, a ϵ -polilisina pode
32 ganhar acesso ao citoplasma e causar ainda mais danos à célula (Hyltdgaard et
33 al., 2014; Najjar et al., 2007). Por ser uma molécula catiônica, a ϵ -PL é capaz
34 de interagir com a membrana externa de bactérias Gram-negativas, que

1 contém LPS hidrofóbico e carregado negativamente. ϵ -PL compete com
2 cátions divalentes pela ligação aos grupos fosfatados da LPS, causando a
3 remoção da membrana externa nas bactérias Gram negativas (Hyltdgaard et
4 al., 2014).

5 Embora a membrana possa ser o alvo primário, Hyltdgaard et al. (2014)
6 demonstraram através de estudo que a ϵ -PL interage com outros alvos que
7 levam a morte celular, mesmo quando a integridade da membrana celular está
8 mantida. Neste mesmo estudo, os autores citados concluíram que para
9 bactérias Gram negativas são necessárias doses menores de ϵ -PL, se
10 comparadas com bactérias Gram positivas.

11 Estudos conduzidos com o uso de microscopia eletrônica confirmaram
12 que doses elevadas de ϵ -PL levam à completa desintegração das células
13 bacterianas, enquanto que concentrações mais baixas apenas removem partes
14 da membrana externa (Ye et al., 2013, Hyltdgaard et al., 2014). O efeito
15 bactericida da ϵ -PL também foi associado ao estresse oxidativo induzido nas
16 células bacterianas de microrganismos aeróbicos (Ye et al., 2013). A ϵ -PL
17 rompe a membrana celular, entra no citoplasma e induz ao estresse oxidativo
18 na célula, o que acaba levando à morte celular, além de reduzir a expressão de
19 genes de virulência da *E. coli*, por exemplo, levando a morte celular. Liu et al.
20 (2015), em seu estudo comprovaram que a ϵ -PL é capaz de impedir a
21 replicação do DNA após invadir o citoplasma da célula.

22 Vários estudos já relataram o efeito antimicrobiano de ϵ -polilisina sobre
23 bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*
24 O157:H7, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* (Geornaras e
25 Sofos, 2005). O seu potencial não tóxico às células eucarióticas, estabilidade
26 em ampla faixa de pH e em altas temperaturas tornam esse peptídeo um
27 potencial candidato para uso como antimicrobiano natural em embutidos
28 cárneos cozidos.

29 **1.5 Interação nisina e ϵ -polilisina**

30 Já existem estudos mostrando a atividade antimicrobiana da nisina
31 associada a ϵ -polilisina *in vitro* (Najjar et al., 2007; Liu et al., 2015) com bons
32 resultados, porém, poucos estudos demonstram essa interação, quando
33 aplicada em uma matriz alimentar. Takahashi et al. (2012), comprovaram que a
34 interação entre nisina e ϵ -polilisina foi eficaz na inibição do patógeno *L.*

1 *monocytogenes* em frutos do mar prontos para consumo. Liu et al. (2015),
2 testaram o sinergismo NI + ϵ -PL contra *Bacillus subtilis*; Takahashi et al. (2012)
3 testaram contra *L. monocytogenes*; Najjar et al. (2007) contra *Bacillus cereus* e
4 *L. monocytogenes*.

5 O sinergismo entre ϵ -polilisina e nisina foi comprovado em estudo que
6 usou microscopia eletrônica fluorescente, evidenciando que essa combinação
7 de antimicrobianos danifica a morfologia da célula bacteriana testada. A
8 combinação dos antimicrobianos aumenta a permeabilidade celular bacteriana
9 por inibição de importantes enzimas (sódio-potássio ATPase e cálcio-magnésio
10 ATPase). O mesmo estudo ainda comprovou que a absorção da ϵ -polilisina
11 pela célula bacteriana, mediada pela nisina, faz com que a ϵ -polilisina interaja
12 com o DNA da célula bacteriana, inibindo o processo de replicação (Liu et
13 al., 2015).

14 Para aplicação em matrizes alimentares é fundamental que os efeitos
15 antimicrobianos sinérgicos sejam alcançados com as menores doses dos
16 antimicrobianos possíveis. Poucos estudos até o momento demonstraram os
17 efeitos desse sinergismo em matrizes alimentares, e muito pouco se sabe
18 sobre os efeitos de interação dos antimicrobianos com os componentes dos
19 alimentos. A maioria dos estudos ainda é restrita a condições *in vitro* e não
20 comprovados em uma matriz alimentar como os embutidos cárneos (Ye et al.,
21 2013; Najjar et al., 2007; Geornaras e Sofos, 2005).

22 Desta forma, o presente estudo teve por objetivo identificar o principal
23 microrganismo deteriorador da linguiça Calabresa cozida mantida em
24 temperatura ambiente, testar neste microrganismo os antimicrobianos naturais
25 nisina e ϵ -polilisina isolados e em combinação, e desenvolver uma formulação
26 desta linguiça com redução de sódio e adicionada dos antimicrobianos naturais
27 previamente testados *in vitro*, visando obter uma alternativa viável para
28 aplicação na formulação de embutidos.

CAPITULO 2

(Artigo científico a ser submetido em periódico ainda a definir)

ELABORAÇÃO DE LINGUIÇA CALABRESA COM REDUZIDO TEOR DE SÓDIO

RESUMO

O consumo excessivo de sal está associado a uma série de doenças, sobretudo à hipertensão arterial, que atingiu 25,7% da população adulta brasileira em 2016. Cerca de 20 a 30% do aporte de sódio na dieta da população provém do consumo de produtos cárneos. Como o sal é responsável por diversas funções tecnológicas nos produtos cárneos, além da ação conservadora, sua redução nesses produtos é um desafio, principalmente naqueles estocados a temperatura ambiente. O objetivo deste estudo foi desenvolver linguiça Calabresa cozida, estocada em temperatura ambiente, com teor reduzido de sódio e avaliar suas características físico-químicas, microbiológicas e de estabilidade comercial. Foram testadas 03 formulações de linguiça Calabresa, sendo uma formulação controle (C), e duas formulações com redução da adição de sódio, 30% (R1) e 50% (R2). Os ingredientes foram carne suína, toucinho, CMS de aves, proteína de soja, condimentos, sais de cura e estabilizante comercial. As linguiças foram embutidas em envoltório suíno e cozidas em estufa a vapor até temperatura interna de 76 °C. Após, as linguiças foram embaladas a vácuo e mantidas em local seco e em temperatura ambiente por 28 dias. O teor de sódio foi determinado e a cada 7 dias, amostras foram submetidas à análise físico-química (pH, Aw, cor instrumental), microbiológica (bactérias lácticas) e de estabilidade sensorial. Os resultados foram analisados por ANOVA e Tukey (P<0,05). As coordenadas de cor instrumental das linguiças do controle, apresentaram menor brilho superficial (L*) e maior intensidade de cor vermelha (a*) e saturação (C*) em relação às reduções R1 e R2. Contudo, essas diferenças instrumentais não foram percebidas na avaliação visual de estabilidade durante a estocagem. Houve queda de pH em todos os tratamentos ao longo da estocagem, que apresentaram valores inferiores a 5,6, com menor valor para R1. Entretanto, a contagem de bactérias lácticas não foi afetada em ambos os níveis de redução de sal, com valores inferiores (R1) ou semelhantes (R2) aos do controle. Obteve-se redução do teor de sódio nos produtos finais de 21% (R1) e 34% (R2) e a estabilidade das linguiças em todos os tratamentos foi mantida por até 14 dias, havendo sinais de deterioração láctica a partir desse período. A redução de sódio nas linguiças Calabresa nos níveis testados não afetou a maioria das características físico-químicas de identidade e qualidade do produto. Contudo, faz-se necessário o estudo de um método de conservação complementar ao cozimento para a manutenção da estabilidade microbiana das linguiças seja com teor usual ou reduzido de sódio, para manutenção em temperatura ambiente.

Palavras chave: Linguiça Calabresa, conservador, deteriorantes, estabilidade físico-química, redução de sódio.

1. INTRODUÇÃO

O quadro preocupante de crescimento de doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas consequências ao SUS (Sistema Único de Saúde) revelou a necessidade de que medidas fossem tomadas pelo governo brasileiro. Medidas essas que visam principalmente a redução do consumo de sódio pela população. O consumo excessivo de sal está associado a uma série de doenças, sobretudo à hipertensão arterial, doença que atingiu 24,3% da população adulta brasileira em 2012 (Agência Saúde, 2013).

A diminuição gradual do consumo de sal na dieta deve alcançar recomendações internacionais, que determinam um consumo de sal inferior a 5 g/ dia/ pessoa e de sódio inferior a 2 g/ dia, até o ano de 2020. Atualmente, o brasileiro consome em média 12 g/ dia de sal (Brasil, 2013).

Estudos recentes apontam que os produtos cárneos são responsáveis por cerca de 20 a 30% do consumo diário de sódio. Nesses produtos, o sal desempenha funções importantes, sendo responsável por conferir sabor, propriedades de textura, conservação e estabilidade (Campagnol et al., 2011; Petracci et al., 2013; Horita et al., 2014).

No Brasil, os embutidos cárneos são bastante populares, representando um importante segmento do mercado das carnes industrializadas. Entre os embutidos cárneos destacam-se as linguiças. A linguiça Calabresa é um produto genuinamente brasileiro e tradicionalmente usado em cobertura de pizzas e um dos principais ingredientes da feijoada brasileira (Insumos, 2012).

A linguiça Calabresa deve ser obtida exclusivamente de carne suína, curada, e adicionada de ingredientes, devendo ter o sabor picante da pimenta Calabresa, submetida ou não ao processo de estufagem, ou similar para desidratação e ou cozimento, sendo o processo de defumação opcional (BRASIL, 2000). Atualmente, no mercado brasileiro, as indústrias de embutidos têm produzido a linguiça Calabresa cozida, que é embalada a vácuo e armazenada em temperatura ambiente, para facilitar as condições de transporte e comercialização do produto.

Com vistas à redução de sódio nos alimentos industrializados, o Ministério da Saúde e a ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de

1 Alimentos) assinaram um acordo para os próximos cinco anos (2017 – 2022). A
2 meta é retirar 28,5 mil toneladas de sódio da alimentação dos brasileiros. Um
3 primeiro acordo de redução, assinado em 2011, tornou possível a retirada de
4 17 mil toneladas de sódio de 30 diferentes tipos de alimentos industrializados
5 entre 2011 e 2017. A quarta etapa do acordo, assinada em novembro 2013 e
6 que contemplou os produtos cárneos, tornou possível a redução de 2.361
7 toneladas das seguintes categorias de produtos cárneos: empanados,
8 hambúrguer, linguiça cozida, linguiça cozida resfriada, linguiça frescal,
9 mortadela refrigerada, mortadela, presuntaria e salsicha. Na linguiça cozida e
10 armazenada a temperatura ambiente foram registradas reduções de 15,6% no
11 teor de sódio entre 2013 e 2016 (Portal da Saúde, 2017). Mesmo com a meta
12 das reduções, o produto ainda é classificado como de alto teor de sódio
13 considerando os valores estabelecidos pela FSA (Food Standards Agency) de
14 Londres, que classifica os produtos com teor de sódio superior a 600mg/ 100g
15 como de alto teor de sódio.

16 Em pesquisa realizada pela Anvisa em 2012, verificou-se variações
17 significativas nos teores de sódio empregados pelas diferentes indústrias nas
18 mesmas categorias de produtos cárneos. Isso indica a possibilidade de reduzir
19 o teor de sódio desses produtos, sem afetar os padrões de identidade e
20 qualidade. Por isso, a meta do acordo entre o Ministério da Saúde e a ABIA
21 para os valores de sódio em linguiças cozidas mantidas em temperatura
22 ambiente é de no máximo de 1500 mg/ 100g até o ano de 2017 (Agência
23 Saúde/ MS, 2013).

24 Devido à importância do sal como conservador em produtos cárneos e
25 mais fortemente, em produtos armazenados a temperatura ambiente, a
26 redução de sal em produtos como a linguiça Calabresa, conservada em
27 temperatura ambiente, torna-se um desafio tecnológico para as indústrias de
28 embutidos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma
29 formulação de linguiça Calabresa cozida com reduzido teor de sódio, testando
30 dois níveis de redução, avaliando a estabilidade físico-química (Aw, pH, cor
31 instrumental, perda de peso e teor de sódio), microbiológica (contagem de
32 bactérias lácticas) e a estabilidade comercial (odor, presença de vácuo na
33 embalagem, aparência geral) do produto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram testadas três formulações de linguiça Calabresa, sendo uma formulação controle (C), seguindo processo industrial tradicional, e duas formulações com redução da adição de sódio em 30% (R1) e 50% (R2) em relação ao controle.

As formulações e o processamento da linguiça tipo Calabresa foram realizados no Frigorífico Bizinelli Ltda (Curitiba, Paraná), conforme a Tabela 1. O preparo das massas iniciou pela moagem das matérias-primas (carne suína, toucinho e CMS de aves) em disco de aço inoxidável de 7 mm (moedor TR 200, Risco, Vicenza, Itália), seguida pela mistura (misturadeira RS 750, Risco, Vicenza, Itália) dos ingredientes secos e da água, até a obtenção de massa de aspecto homogêneo. O embutimento das linguiças, com cerca de 15 cm de comprimento em cada gomo, foi realizado em embutideira automática (RS 405, Risco, Vicenza, Itália), utilizando envoltório natural suíno (40 mm), previamente sanitizado em solução de ácido láctico a 1% por 15 minutos. Após o embutimento, o produto seguiu para cozimento em estufa a vapor (M10, Incomaf, Itaquaquecetuba, SP, Brasil) onde permaneceu até atingir temperatura interna de 76 °C, aferida com o auxílio de termômetro de penetração. Após o cozimento, as linguiças sofreram resfriamento, através de banho em água potável (chuveiro) por 10 minutos. Posteriormente, foram embaladas a vácuo (Selovac 200, São Paulo, SP, Brasil) em sacos plásticos (UNIPAC B320) e mantidas em local seco e fresco, com temperatura inferior a 25 °C.

Tabela 1. Formulação da linguiça tipo Calabresa.

Matéria - Primas	Controle (kg)	R 1 (kg)	R 2 (kg)
Carne suína (retalhos)	6,785	6,845	6,885
Toucinho	1,5	1,5	1,5
CMS de frango	1,0	1,0	1,0
Água	0,2	0,2	0,2
Proteína soja	0,2	0,2	0,2
Sal	0,2	0,140	0,1
Alho	0,025	0,025	0,025
Pimenta Calabresa	0,015	0,015	0,015
Estabilizante (tripolifosfato de sódio 451i)	0,025	0,025	0,025
Antioxidante*	0,025	0,025	0,025
Sal de cura**	0,025	0,025	0,025

* (55% sacarose, 30% isoascorbato de sódio, 15% NaCl); ** (90% de NaCl, 6% NaNO₂, 4% NaNO₃). R1 (30% redução), R2 (50% redução).

1 Após processamento, as linguças foram analisadas para o teor de sódio
2 em um laboratório externo (Laboran Análises Laboratoriais), seguindo a
3 metodologia oficial do MAPA (espectrometria de chama) (Brasil, 2014).

4 As amostras de linguça tipo Calabresa produzidas e devidamente
5 identificadas como C, R1 e R2 foram levadas à Usina Piloto de Alimentos da
6 PUCPR para realização das análises físico-química (atividade de água, cor
7 instrumental, pH), microbiológica (contagem bactérias lácticas) e de
8 estabilidade comercial. As análises foram realizadas em intervalos de 7 dias,
9 iniciando no dia zero e totalizando 4 semanas de ensaios laboratoriais.

11 **2.1 Análise físico-química**

12 A atividade de água foi medida com auxílio de equipamento analisador
13 de atividade de água (Aqua Lab CX-2, Washington, USA).

14 A cor foi avaliada utilizando o método da ASTM International (2001) com o
15 auxílio de colorímetro portátil (Konica Minolta CR 410, Tokyo, Japan) e
16 coordenadas de cor L*, a*, b*, C* e h. A medição foi realizada pela média de 4
17 disparos diretamente sobre a superfície de cada amostra utilizando fonte de luz
18 D₆₅, diâmetro de abertura de 50 a 53 mm e ângulo de observação de 2°.

19 O pH foi medido em pHmetro digital com eletrodo de inserção (HI253
20 Hanna Instruments, Dallas, Texas, USA), em 3 pontos aleatórios dos 02 gomos
21 de linguça de cada tratamento, de acordo com metodologia descrita no Manual
22 de Análises do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008).

23 O teor de sódio das linguças foi determinado por espectrometria de
24 emissão atômica por chama, de acordo com a metodologia recomendada pelo
25 MAPA/SDA/CGAL para produtos de origem animal (Brasil, 2014).

27 **2.2 Análise microbiológica**

28 Para contagem microbiana de bactérias lácticas seguiu-se metodologia
29 descrita por Silva et al. (2010), com plaqueamento em profundidade em ágar
30 MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) (Oxoid). As placas foram incubadas a
31 37°C por 48h e a contagem das colônias foi expressa em log UFC/g.

32 **2.3 Estabilidade comercial**

33 Para avaliação da estabilidade comercial das linguças, dois gomos de
34 cada tratamento foram avaliados em cada tempo de análise, sendo observados

os seguintes critérios: antes da abertura da embalagem - preservação do vácuo da embalagem e formação de limosidade, após a abertura da embalagem - odor e exsudação.

2.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando programa estatístico Statgraphics Centurion XVI.

3. RESULTADOS

Os valores de atividade de água (A_w) e de sódio das diferentes formulações de linguiça Calabresa estão apresentados na Tabela 2. Os valores de atividade de água apresentaram diferença significativa entre os tratamentos nos tempos 0, 7, 14 e 28 dias. Para o teor de sódio, houve diferença significativa entre os três tratamentos ($P < 0,05$).

Tabela 2. Atividade de água (A_w) e teor de sódio (média $\pm$ erro padrão) em linguiças tipo Calabresa.

Parâmetro	Tempo (d)	C	R1	R2
A_w	0	0,970 (0,000) ^a	0,970 (0,975) ^b	0,980 (0,981) ^c
	7	0,971 (0,001) ^a	0,972 (0,00) ^{ab}	0,974 (0,00) ^b
	14	0,972 (0,000) ^a	0,970 (0,00) ^b	0,978 (0,000) ^c
	21	0,985 (0,001) ^a	0,981 (0,001) ^a	0,983 (0,002) ^a
	28	0,965 (0,003) ^a	0,981 (0,00) ^b	0,984 (0,003) ^b
Sódio (mg/100g)	0	974,33 (1,01) ^a	767,51 (9,64) ^b	640,89 (1,05) ^c

Médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($P < 0,05$). Tratamentos testados C (controle), R1 (30% de redução), R2 (50% de redução).

Os valores de pH das linguiças logo após o processamento (Figura 1) variaram de 6,6 a 6,75, sendo compatíveis com o esperado para este tipo de produto recém-fabricado, que deve variar entre 6,6 a 6,8. Durante a estocagem, houve queda gradativa do pH em todos os tratamentos, sendo linguiças R1 as que apresentaram os menores valores de pH.

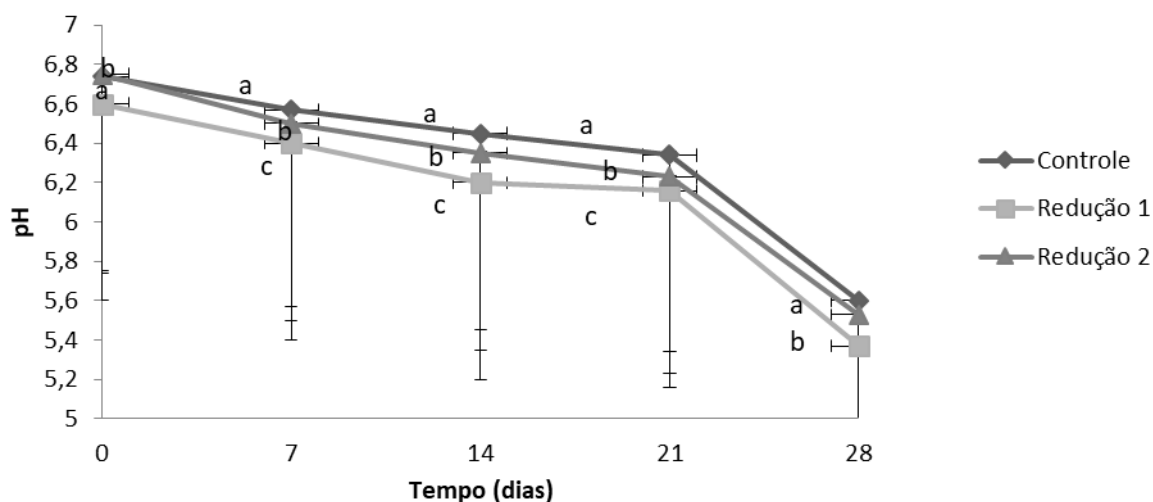


Figura 1. Evolução do pH das linguças tipo Calabresa ao longo de 28 dias de estocagem. Valores representam média com barra de erro padrão. Tratamentos testados foram C (controle), R1 (30% de redução), R2 (50% de redução). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das coordenadas de cor L^* , a^* , b^* , C^* e h , ao longo dos dias de estudo. Para a coordenada L^* (luminosidade) houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos 7, 14 e 28 dias. Para a coordenada a^* (vermelho) houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos 0, 14, 21 e 28 dias. Para a coordenada b^* (amarelo) houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos 0, 14 e 21 dias. Para a coordenada C^* (saturação de cor) houve diferença significativa entre os tratamentos nos dias 0, 14, 21 e 28 dias. Para a coordenada h (matiz) houve diferença significativa entre os tratamentos nos dias 0, 7, 14 e 21 dias.

Tabela 3. Valores para as coordenadas de cor das linguças tipo Calabresa.

Trat	cor	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
C	L^*	55,45(0,869) ^a	55,35(0,166) ^a	54,38(0,545) ^a	56,15(0,725) ^a	54,47(0,581) ^b
	a^*	19,11(0,186) ^a	18,20(0,104) ^a	20,65(0,222) ^a	19,18(0,308) ^a	19,31(0,310) ^a
	b^*	11,37(0,091) ^a	10,07(0,178) ^a	11,54(0,033) ^a	10,85(0,180) ^a	14,52(0,207) ^a
	h	30,76(0,145) ^a	28,95(0,557) ^a	29,28(0,206) ^a	29,48(0,045) ^a	30,38(0,273) ^a
	C^*	22,74(0,423) ^a	20,81(0,034) ^a	23,63(0,226) ^a	22,05(0,350) ^a	21,66(0,395) ^a
R1	L^*	56,88(0,389) ^a	57,20(0,584) ^b	61,60(0,570) ^b	58,65(0,060) ^a	58,45(0,813) ^a
	a^*	17,47(0,118) ^b	18,50(0,097) ^a	17,58(0,104) ^b	17,14(0,406) ^b	16,86(0,364) ^c
	b^*	10,44(0,037) ^b	12,65(0,303) ^a	12,29(0,098) ^b	11,58(0,128) ^b	11,81(0,190) ^a
	h	30,88(0,262) ^b	34,33(0,503) ^b	34,97(0,306) ^b	34,06(0,340) ^b	35,04(0,936) ^a
	C^*	20,36(0,083) ^b	22,41(0,251) ^a	21,46(0,086) ^b	20,69(0,408) ^b	20,61(0,236) ^c
R2	L^*	58,93(0,631) ^a	57,41(0,080) ^b	57,42(0,098) ^c	57,25(0,172) ^a	57,43(0,790) ^a
	a^*	17,54(0,242) ^b	18,18(0,089) ^a	17,40(0,049) ^b	17,19(0,062) ^b	18,19(0,064) ^b
	b^*	10,00(0,194) ^b	10,81(0,012) ^a	10,59(0,019) ^c	09,97(0,040) ^c	10,88(0,346) ^a
	h	29,84(0,039) ^b	30,73(0,145) ^c	31,33(0,106) ^c	30,10(0,012) ^a	30,83(0,924) ^a
	C^*	20,22(0,286) ^b	22,41(0,072) ^a	20,37(0,038) ^c	19,87(0,073) ^b	21,21(0,181) ^b

Valores representam média (erro padrão). Médias com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$), de acordo com teste de Tukey. Tratamentos testados C (controle), R1 (30% de redução), R2 (50% de redução).

Na Figura 2 verifica-se a evolução da contagem de bactérias lácticas nas linguiças ao longo da estocagem. Houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos 0, 7 e 14 dias.

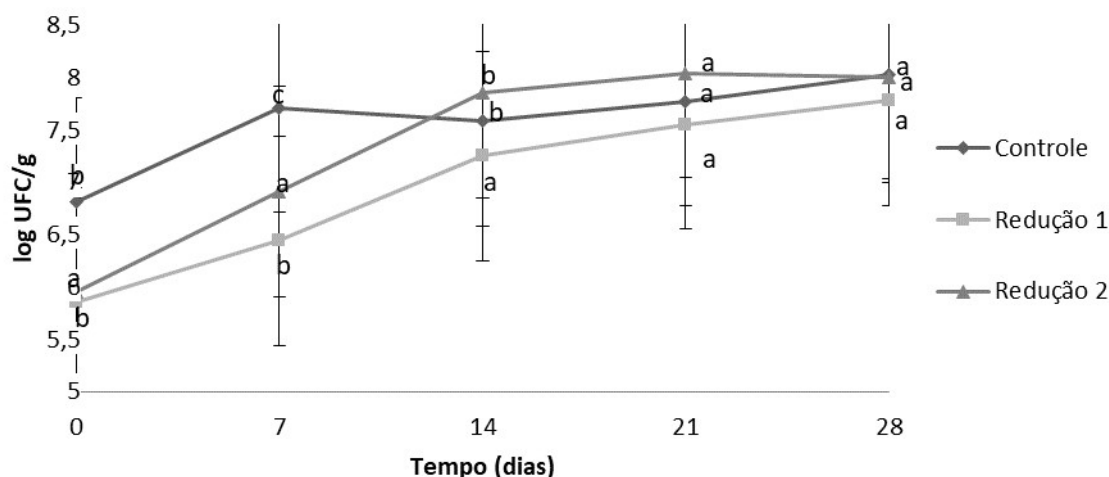


Figura 2. Evolução da contagem de bactérias lácticas das linguiças tipo Calabresa ao longo de 28 dias de estocagem. Valores representam média com barra de erro padrão. Tratamentos testados foram C (controle), R1 (30% de redução), R2 (50% de redução). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Na Tabela 4 observa-se o resultado da análise de estabilidade comercial. O vácuo das embalagens se manteve em todos os tratamentos ao longo da estocagem. Para o odor, as linguiças dos tratamentos R1 e R2 iniciaram a emissão de odor levemente ácido a partir do tempo 14 dias. A limosidade esteve ausente até o dia 7 em todos os tratamentos, e partir do dia 14, foi possível visualizá-la em todos os tratamentos, tornando-se mais evidente após 21 dias em R1 e R2.

Tabela 4. Atributos de estabilidade comercial das linguças tipo Calabresa

Tratamento	Dia	Vácuo	Odor	Limosidade
C	0	+	Característico	-
	7	+	Característico	-
	14	+	Característico	+
	21	+	Ácido	+
	28	+	Ácido	+
R 1	0	+	Característico	-
	7	+	Característico	-
	14	+	Levemente ácido	+
	21	+	Ácido	++
	28	+	Muito ácido	++
R 2	0	+	Característico	-
	7	+	Característico	-
	14	+	Levemente ácido	+
	21	+	Muito ácida	++
	28	+	Muito ácida	++

C (controle), R1 (redução 30%), R2 (redução 50%). Escala de atributos: vácuo - presente (+) ou ausente (-), odor - característico a muito ácido, limosidade - ausente (-), pouco evidente (+) ou bem evidente (++)

4. DISCUSSÃO

O valor do pH da carne tem grande importância, uma vez que influencia na microbiota do produto, auxilia na conservação e é um fator determinante da cor (Almeida, 2005). Os valores de pH iniciaram com médias entre 6,6 a 6,75, havendo diferença significativa no dia de fabricação entre os valores do C e R2 em relação à R1. Entre os dias 7 e 21, as médias de pH caíram, atingindo de 6,57 (C) para 6,16 (R1), revelando diferenças significativas entre os tratamentos. Com 28 dias, os menores valores de pH foram para R1 (5,37), porém inferiores a 5,6 nos demais tratamentos. Valores de pH abaixo de 6,0 são considerados inadequados para a linguça Calabresa e geralmente estão associados ao desenvolvimento de bactérias lácticas, com consequente desenvolvimento de limosidade no produto. A produção de ácido láctico produzido por bactérias lácticas poderia justificar a queda nos valores de pH, observados ao longo do período de estocagem (Borch et al., 1996). Apesar do menor valor de pH, R1 foi o tratamento que apresentou a menor contagem de bactérias lácticas ao longo da estocagem.

A redução de sal nos níveis testados no estudo reduziu a atividade de água dos produtos, porém este parâmetro se manteve alto durante os 28 dias de estocagem. Para a *Aw*, houve diferença significativa entre os tratamentos em todos os tempos, exceto o tempo 21 dias. A atividade de água, por ser definida como a água disponível para o crescimento de microrganismos e para

1 que ocorram reações químicas e bioquímicas de deterioração no alimento,
2 quando seus valores se aproximam de 1,0, faz com que condições de
3 deterioração fiquem favoráveis (Ordóñez, 2005). O tratamento controle foi o
4 que apresentou o menor valor de Aw ao final do experimento (0,96), enquanto
5 que as linguiças R1 e R2 finalizaram o experimento com valores de Aw
6 próximos a 0,98.

7 O teor de sódio revelou que em ambas as formulações de redução (R1 e
8 R2), os valores estiveram acima de 600 mg/ 100 g, considerado limite para
9 alimentos com teor médio de sódio (FSA, 2007). Contudo, esse resultado era
10 esperado em virtude das características de identidade e qualidade da linguiça
11 Calabresa que a caracterizam como um alimento salgado. Entretanto, ao se
12 considerar a meta nacional para o teor máximo de sódio, estabelecida em
13 acordo entre o Ministério da Saúde e a ABIA (Associação Brasileira de
14 Indústrias de Alimentos), para a categoria de linguiças cozidas, mantidas a
15 temperatura ambiente, que é de 1.500 mg/ 100 g (Agência Saúde, 2013),
16 verifica-se que nas formulações R1 e R2, o teor de sódio nos produtos foi
17 51,16% e 42,72% inferior ao estabelecido pela meta.

18 De acordo com o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional
19 Complementar da Anvisa (BRASIL, 2012), para a alegação de redução de
20 sódio em um alimento é necessária a redução mínima de 25% no teor de sódio,
21 em relação ao produto convencional, obedecendo redução equivalente a no
22 mínimo 120 mg de sódio por 100 g do alimento. Apesar da obtenção de
23 redução de 206 mg de sódio/ 100 g nas linguiças R1, verificou-se redução
24 percentual inferior a 25% (21,22%) do teor de sódio no produto final em relação
25 ao controle neste tratamento. Para a formulação R2, obteve-se redução
26 percentual de 34,22% do teor de sódio em relação ao controle. Dessa forma,
27 em ambos os tratamentos, a porcentagem de redução de sódio obtida no
28 produto final foi inferior à porcentagem de redução de sódio utilizada nas
29 formulações. Esses resultados corroboram com os obtidos por outros autores
30 em produtos cárneos formulados para a redução de sódio (Safa et al., 2015).
31 Essas variações podem ser influenciadas pelo teor de sódio naturalmente
32 presente na carne e pela presença deste mineral em outros ingredientes
33 utilizados para a fabricação dos embutidos. Desmond (2006) afirma que os
34 teores de sódio nas carnes *in natura* podem variar de 50 a 70 mg por 100 g.

1 Como a cor é um parâmetro que influencia diretamente na decisão de
2 compra por parte do consumidor, é muito importante o estudo de suas
3 variações nos alimentos (Felisberto et al., 2015). Os valores da coordenada L*
4 revelaram que as reduções (R1 e R2) mostraram luminosidade semelhante,
5 porém maior que a do controle (C), ao final do experimento. Maiores valores de
6 L* indicam maior brilho superficial dos produtos e pode estar associado aos
7 maiores valores de Aw nesses tratamentos (R1 e R2). Para a intensidade da
8 cor vermelha (a*), as linguças dos diferentes tratamentos finalizaram com
9 diferenças significativas, revelando maior valor de a* para o tratamento
10 controle. Da mesma forma, a saturação de cor (C*), também foi maior para o
11 tratamento controle, indicando coloração mais intensa nas linguças com maior
12 teor de sal, revelando que o sal pode ajudar na manutenção da cor vermelha
13 das linguças. Contudo, o teor de sal não influenciou a matiz (h) ou a
14 intensidade da cor amarela (b*) das linguças. As características de maior
15 intensidade de cor nas linguças do controle são justificadas pelo menor teor de
16 água nesse tratamento, gerado pela maior perda de peso durante o cozimento,
17 que proporcionou a concentração dos pigmentos da carne nesses produtos.
18 Contudo, essas diferenças de cor instrumental não foram percebidas na
19 avaliação visual de estabilidade durante a estocagem.

20 À medida que a concentração de sal diminui, a possibilidade de
21 deterioração do produto aumenta, pela maior possibilidade de proliferação
22 bacteriana, pela maior disponibilidade de água livre (Ordóñez, 2005). Conforme
23 a Figura 2, logo no início da estocagem, a contagem de bactérias lácticas em
24 todos os tratamentos apresentava-se alta, com valores próximos de 6 log
25 UFC/g. A alta contagem inicial de bactérias lácticas nas linguças reflete a alta
26 carga microbiana das matérias-primas cárneas com este grupo bacteriano, que
27 apesar de passar por processo de cozimento, pode permanecer viável em altas
28 contagens no produto final.

29 Forsythe et al. (2013), afirmam que a validade comercial de um produto
30 depende da microbiota inicial, ou seja, quanto maior a carga microbiana inicial,
31 menor será a validade do mesmo. Os valores iniciais deveriam estar próximos
32 de 3 a 4 log UFC/g (Sarmiento, 2006) para permitir maior tempo de vida de
33 prateleira ao produto, visto que em contagens acima de 6 log UFC/g, é possível
34 observar a formação de limosidade no produto e odor alterado, o que dificulta a

1 aceitação pelo consumidor. De acordo com Jay (2005), alterações de
2 deterioração são consequentes da atividade metabólica dos microrganismos
3 presentes. Com a deterioração, ocorre formação de limo superficial devido à
4 formação de substâncias viscosas que são polissacarídeos sintetizados pelas
5 bactérias (Ordóñez, 2005).

6 Os sais de cura, que são os conservantes tradicionalmente adicionados
7 nas linguiças, são capazes de inibir microrganismos anaeróbicos, como é o
8 caso do *Clostridium botulinum*, mas enterobactérias psicrotróficas e BAL
9 tornam-se dominantes, devido sua relativa insensibilidade aos nitritos (Jay,
10 2005).

11 Houve diferença significativa para a contagem de bactéria lácticas nos
12 tempos 0, 7 e 14 dias, e nos demais tempos, não houve diferença entre os
13 tratamentos, verificando-se que a redução do teor de sódio não influenciou o
14 desenvolvimento desse grupo de bactérias no produto após estocagem. As
15 diferenças na contagem de bactérias lácticas nos tempos iniciais parecem estar
16 mais associadas à carga microbiana inicial das matérias-primas do que à
17 redução de sal nas linguiças. O único tratamento que manteve contagem de
18 bactérias lácticas inferior a 7 log UFC/g até 14 dias de estocagem foi o R1.

19 Segundo Franco (2005), as bactérias lácticas heterofermentativas, que
20 podem estar presentes nas linguiças, são capazes de produzir gás carbônico
21 que leva à perda de vácuo das embalagens dos produtos. Isso não foi
22 observado nos produtos até o término da estocagem, apesar da presença de
23 limosidade e de odor ácido em todos os tratamentos.

24 Considerando que em todos os tratamentos, incluindo o tratamento
25 controle, as linguiças apresentaram características de deterioração láctica a
26 partir de 14 dias de estocagem, uma estratégia para aumentar a vida de
27 prateleira da linguiça Calabresa, estocada em temperatura ambiente, pode ser
28 a adição de compostos antimicrobianos naturais.

30 5. CONCLUSÃO

31 A redução dos teores de sódio nos produtos finais em 21% (R1) e 34%
32 (R2) não afetou a maioria das características físico-químicas de identidade e
33 qualidade da linguiça Calabresa, sendo possível sua redução nesses níveis,
34 com a manutenção da qualidade do produto. Com relação à deterioração

1 microbiana, a redução de sódio também não afetou o desenvolvimento de
2 bactérias lácticas nas linguças. A estabilidade das linguças Calabresas
3 armazenadas em temperatura ambiente foi mantida por até 14 dias. Mesmo a
4 linguça convencional, formulada com teor usual de sal (controle), não manteve
5 sua estabilidade por todo o período de estocagem, havendo sinais de
6 deterioração láctica a partir da metade desse período.

7 Desta forma, conclui-se que as linguças Calabresa mantidas a
8 temperatura ambiente, seja com teor usual ou com teor reduzido de sódio,
9 necessitam de um método de conservação complementar ao cozimento para
10 manterem-se estáveis por maior tempo nessas condições de estocagem. Neste
11 sentido, indica-se o estudo de alternativas complementares para o controle
12 microbiano deteriorante, tendo-se nos antimicrobianos naturais uma alternativa
13 promissora a ser estudada para esta categoria de embutidos cárneos.

14 15 **REFERÊNCIAS**

16 Agência Saúde (2013). Ministério da Saúde. Ministério da Saúde e ABIA
17 fecham acordo para reduzir teor de sódio em carnes e laticínios. Disponível em
18 [http://www.blog.saude.gov.br/servicos/33243-ministerio-da-saude-e-abia-](http://www.blog.saude.gov.br/servicos/33243-ministerio-da-saude-e-abia-fecham-acordo-para-reduzir-teor-de-sodio-em-carnes-e-laticinios.htm)
19 [fecham-acordo-para-reduzir-teor-de-sodio-em-carnes-e-laticinios.htm](http://www.blog.saude.gov.br/servicos/33243-ministerio-da-saude-e-abia-fecham-acordo-para-reduzir-teor-de-sodio-em-carnes-e-laticinios.htm)

20 Almeida, O.C. (2005). Avaliação físico-química e microbiológica de linguça
21 toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições
22 de estocagem similares às praticadas em supermercados. Dissertação
23 (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de
24 Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

25 ASTM International (2011). American Society for Testing and Material.
26 Standard practice for computing the colors of objects by using the CIE system.
27 Pennsylvania: ASTM International.

28 Borch, E.; Kant M. M. L.; Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured
29 meat products. International Journal of Food Microbiology, 33, 103-120.

30 Brasil (2014). Ministério da Agricultura, Secretaria de Defesa Agropecuária,
31 CGAL, Lanagro, RS. Laboratório de Produto de Origem Animal/ SLAV. Método
32 de ensaio – MET: Determinação de sódio e potássio em produtos de origem
33 animal por espectrometria de emissão atômica por chama, 18 de julho de 2014.

1 Brasil (2000), Ministério da Agricultura, Secretaria da Defesa Agropecuária.
2 Instrução Normativa nº 04, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de
3 Identidade e Qualidade de Linguiça. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 de
4 abril de 2000.

5 Brasil (2012). Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da
6 Diretoria Colegiada - RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o
7 Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Diário
8 Oficial da União, 13 de novembro de 2012.

9 Desmond, E. (2006). Reducing Salt: A challenge for the meat industry. Meat
10 Science 74. 188-196.

11 Felisberto, M. H. F.; Galvão, M.T.E.L.; Picone, C.S.F.; Cunha, R.L.; Pollonio,
12 M.A.R. (2015). Effect of prebiotic ingredients on the rheological properties and
13 microstructure of reduced-sodium and low-fat meat emulsions. LWT- Food
14 Science and Technology, 60, 148-155.

15 Forsythe, Stephen J. (2013) Microbiologia da Segurança dos alimentos, 2ª
16 edição. Porto Alegre, RS. Editora Artmed.

17 Franco, B.D.G.M. (2005). Microbiologia dos Alimentos. São Paulo. Editora
18 Atheneu.

19 FSA - Food Standard Agency (2007). FSA. Food Labels: traffic light labeling.
20 London.

21 IAL, Instituto Adolf Lutz (2008). Métodos físico-químicos para análises de
22 alimentos – Carnes e produtos cárneos. 4ª ed. São Paulo, SP.

23 Insumos (2012). Pizzas e massas – A linguiça Calabresa.

24 Jay, J. (2005). Microbiologia de Alimentos. 6ª edição. Editora Artmed. Porto
25 Alegre, RS.

26 Ordóñez, J.A. (2005). Tecnologia de Alimentos - Volume 1 Componentes dos
27 Alimentos e Processos. 1ª edição. Porto Alegre, RS.

28 Petracci, M.; Bianchi, M.; Mudalal, S.; Cavani, C. (2013). Functional ingredients
29 for poultry meat products. Trends in Food Science and Technology, 33, 27-39.

30 Portal Brasil (2017). Ministério da Saúde, Brasil. Indústria reduziu 17 mil
31 toneladas de sódio nos alimentos. Disponível em:
32 [http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/28730-acordo-com-a-industria-](http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/28730-acordo-com-a-industria-reduziu-17-mil-toneladas-de-sodio-dos-alimentos)
33 [reduziu-17-mil-toneladas-de-sodio-dos-alimentos](http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/28730-acordo-com-a-industria-reduziu-17-mil-toneladas-de-sodio-dos-alimentos)

1 Safa, H.; Gatellier, P.; Lebert, A.; Piggiard, L.; Mirade, P.S. (2015). Effect of
2 combined salt and animal fat reductions on physicochemical and biochemical
3 changes during the manufacture of dry-fermented sausages. Food Bioprocess
4 Technology, 8, 2109-2122.

5 Sarmiento, C. M. P. (2006). Modelagem do Crescimento Microbiano e Avaliação
6 Sensorial no Estudo da Vida de Prateleira da Mortadela e da Linguiça
7 Defumada em Armazenamento Isotérmico e não Isotérmico. Dissertação de
8 mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico,
9 Florianópolis-SC.

10 Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A. (2010). Manual de métodos de
11 análise microbiológica de alimentos. 4ª edição, São Paulo: Livraria Varela,
12 2010, p. 624.

CAPITULO 3

(Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico LWT -
Food Science and Technology)

Use of microbial peptides (Nisin and ϵ -Poly-L-lysine) as natural antimicrobials of spoilage lactic acid bacteria in *Calabresa* cooked sausage

ABSTRACT

Calabresa is a cooked sausage widely incorporated in the Brazilian diet and very susceptible to microbial spoilage when stored at room temperature. Due to the high demand for replacement of artificial preservatives, natural antimicrobials such as nisin and ϵ -poly-L-lysine have been used for food preservation. The objective of the present study was to isolate and identify strains of lactic acid bacteria (LAB) from commercial *Calabresa* sausage with signs of lactic spoilage and use a pool of LAB as a model to the *in vitro* challenge with natural antimicrobials (nisin - NI and ϵ -poly-L-lysine - ϵ -PL). Strains isolated from *Calabresa* cooked sausage, characterized phenotypically, by molecular methods (RAPD) and by mass spectrometry (MALDI-TOF technique), were identified as *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus curvatus*. Different strains were select to form a pool, in order to obtain a representative sample of *Calabresa* sausage microbiota. Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal bactericidal concentration (MBC) of NI and ϵ -PL, alone and in combination, against LAB pool were determined. MIC values were 0.468 ppm and 75 ppm for NI and ϵ -PL, respectively, and MBC values were 12.48 ppm and 150 ppm for NI and ϵ -PL, respectively. MIC concentrations of NI and ϵ -PL were reduced by 1/2, 1/4, 1/8 and tested in combination. Reduced and combined concentration at 1/4 and 1/8 MIC showed synergistic interaction between antimicrobials against LAB pool. The project allowed obtaining data for the further addition of NI and ϵ -PL as natural antimicrobials to cooked sausages to prevent lactic spoilage and extend the shelf life.

Key words: 1.Sausage, 2. Lactic acid bacteria, 3.nisin, 4. ϵ -polylysine, 5. MALDI-TOF, 6.RAPD-PCR

1. Introduction

Sausages represent an important segment in the processed meat market. *Calabresa* sausage is a cooked sausage widely incorporated in the Brazilian diet. It is one of the main ingredients of the Brazilian traditional dish *Feijoada* and the *Calabresa* pizza. However, due to its pH (6,6-6,8), high water content and nutritional characteristics, it is very susceptible to microbial deterioration (Forsythe, 2013).

Among the most important groups of spoilage microorganisms in *Calabresa* cooked sausages are the non-putrefactive lactic acid bacteria (LAB) (*Lactobacillus*, *Carnobacterium* and *Leuconostoc*) (Holley and Gill, 2005). This group is considered the largest group of bacteria associated with deterioration of vacuum-packed cooked meat products (Nychas et al., 2008).

Currently, one of the major challenges for manufacturers of this type of sausage is the difficulty of maintaining the stability of the product under storage at room temperature. This is a common practice in many retailers and leads to the reduction of shelf life and the onset of signs of spoilage in the product even before the expiration date.

Within the trend of using natural antimicrobials to control microbial growth in food, bacteriocins have been applied for controlling pathogenic and spoilage bacteria (Riley and Wertz, 2002; Cleveland et al., 2001). Nisin (NI) is a bacteriocin produced by certain strains of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, which exhibits bactericidal activity against a broad spectrum of Gram-positive bacteria, such as lactic acid bacteria and also on sporogenic bacteria of genus *Bacillus* and *Clostridium* (Lerayer et al., 2015). It acts preventing the synthesis of peptideoglycan in bacterium cell wall, besides forming pores in cell membrane allowing the efflux of intracellular material, causing cell death (Cotter, et al., 2005).

Some studies have shown that the antimicrobial action of nisin is potentiated when it is used in combination with other treatments, such as organic acids or other natural preservatives (Arauz et al., 2009; Riley and Wertz, 2002).

ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) is a polyaminoacid obtained first from *Streptomyces albulus lysinopolymerus*. Since the late 1980s, ϵ -PL has been used as a food preservative in Japan and is recognized as GRAS (Generally Recognized as

1 Safe) in United States since 2004 (Benli, 2011). ϵ -PL interacts with cell
2 membrane phospholipid heads due to their electrostatic charge, causing
3 conformational changes in membrane. Phospholipids removed from the
4 membrane can form free vesicles or micelles, leaving a membrane gap through
5 which ϵ -PL can access cytoplasm and cause even more damage to the cell
6 (Hyldgaard et al., 2014; Najjar et al., 2007).

7 The synergistic effect of NI associated with ϵ -PL against *Bacillus cereus*
8 and *Listeria monocytogenes*, and *Bacillus subtilis*, *E. coli* and *S. aureus* was
9 reported by Najjar et al. (2007) and Liu et al. (2015), respectively. The latter
10 study evidenced the combined action of these compounds by the absorption of
11 ϵ -PL by the NI-mediated bacterial cell and its interaction with bacterial cell DNA,
12 causing cell death. However, these antimicrobials were not assessed against
13 LAB isolated from meat products.

14 In this context, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial
15 effect of NI and ϵ -PL, individually and in combination, against LAB strains
16 isolated from commercial *Calabresa* sausage stored at room temperature and
17 presenting signs of lactic spoilage.

18 **2. Materials and methods**

19 **2.1 Materials**

20 Nisin Z (NI 2.5%; 1,045 IU/ mg) and ϵ -poly-L-lysine (99.5%) were
21 purchased from Handary Ltd (Brussels, Belgium).
22

23 **2.2 Isolation of LAB and phenotypic characterization**

24 LAB strains used in this study were isolated from *Calabresa* sausages
25 from nine different batches produced by a Brazilian meat processing facility and
26 collected in three different supermarket chains. *Calabresa* samples were
27 packaged under vacuum and stored at retail at room temperature. Samples
28 were collected within 20 to 60 days of shelf life and presented visual signs of
29 spoilage such as slime, presence of exudate in the package and loss of
30 vacuum. Lactic spoilage was confirmed in laboratory by measuring the pH of
31 samples, using a digital pHmeter, and counting LAB population on MRS agar.
32 pH of samples ranged from 5.23 to 6.0, below the normal pH of *Calabresa*
33 sausage of 6.6, whereas LAB count varied from 5.86 to 8.30 log CFU/g.
34

1 To isolate the dominant microbiota of LAB from sausages, samples (25 g)
2 were aseptically transferred to sterile plastic bags containing 225 mL of 0.1%
3 peptone water (HIMEDIA, Mumbai, India) and homogenized in a stomacher
4 (IUL Instruments, Barcelona, Spain). From the first dilution (1:10), subsequent
5 dilutions were performed and plated in MRS agar (ACUMEDIA, Lansing, USA)
6 plates incubated at 37 ° C for 48 h. Colonies were counted and 10% of the
7 colonies were picked up from the highest dilution of agar medium and subjected
8 to cell morphology, Gram staining and catalase activity. Nine presumptive LAB
9 strains (Gram-positive, catalase-negative, non-motile rods) were selected for
10 molecular identification.

11 **2.3 Mass spectrometry identification of LAB**

12 **MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization–time of** 13 **flight) mass spectrometry**

14 Identification by MALDI-TOF were performed in duplicate by using a
15 VITEK® MS Spectrometer (*bioMérieux*, Marcy l'Etoile, France). Strains of LAB
16 were grown in trypticase soy agar with 5 % sheep blood (*bioMérieux*) at 37 °C
17 for 48 hours. A thin layer of colony growth was applied directly to the target slide
18 using a 1 µL loop. Two spots on the target plate were inoculated for each isolate
19 tested with VITEK® MS. The spots were overlaid with 1 µL matrix solution (α -
20 cyano-4-hydroxycinnamic acid; *bioMérieux*) and allowed to dry before mass
21 spectrometry analysis. The double spotting for the VITEK® MS was required for
22 the algorithm used by the Durham research laboratory to interpret the output of
23 the SARAMIS database (version 3.62). The result was considered acceptable
24 when the confidence score was greater than 90% for the first spot and the
25 second spot result agreed with the first. *Escherichia coli* ATCC 8739 was used
26 for every acquisition group on the target slide to calibrate the mass
27 spectrometer. Matrix solution without micro-organisms was used as the
28 negative control.

29 **2.4 DNA extraction of LAB**

30 DNA extraction was performed according to Neumann and Pospiech
31 (1995) with some modifications. Briefly, 2 mL of MRS broth containing cultures
32 grown overnight at 37 °C were centrifuged for 10 min at 3,000 g. Cell pellets
33
34

1 were resuspended in 500 μ L of extraction buffer (SET) (75 mM NaCl, 25 mM
2 EDTA, 20 mM Tris pH 7.5) and lysozyme (1 mg/ mL) and incubated at 37 °C for
3 1h. Then 75 μ L of 10% SDS and 0.5 mg/ mL proteinase K were added and
4 incubated at 55 °C for 2h. 285 μ L of NaCl (5M) and 1 mL of chloroform were
5 added and incubated at room temperature for 30 min with frequent inversion.
6 After incubation, solution was centrifuged at 4,500 g for 15 min, the pellet was
7 discarded and the aqueous phase was transferred to a new tube. An equal
8 volume of ice-cold isopropanol was added to aqueous phase and stored at -20
9 °C overnight. After centrifugation at 4,500 g for 5 min, pellets were dried at room
10 temperature and resuspended in 100 μ L of Tris-EDTA buffer + RNase and
11 stored at -20 °C until use. DNA was measured using a NanoDrop 2000 (Thermo
12 Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA).
13

14 2.5 RAPD-PCR

15 Primer OPA-3 (5'-AGTCAGCCAC-3') was used for RAPD-PCR of *L.*
16 *plantarum* strains (Quere et al., 1997). RAPD was performed in a volume of 25
17 μ L containing 3 mM MgCl₂, 1X Buffer, 0.25 mM Dntp (Invitrogen), 1U Taq
18 (Invitrogen) and 3 μ M primer. Colonies were picked with a sterile toothpick and
19 transferred to PCR tubes. RAPD-PCR amplification was performed in a DNA
20 Engine Systems (PTC 200, Bio Rad, Foster City, USA) with initial denaturation
21 at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles at 94 °C of 1 min, 36 °C for 1 min, 72
22 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 7 min. Amplification products
23 were separated on a 1.5% agarose gel by 70V electrophoresis and stained with
24 ethidium bromide solution. A strain of *E. coli* ATCC 25922 was used in each
25 reaction as positive control.

26 To avoid overrepresentation of clones in the preparation of the inoculum,
27 four strains of *Lactobacillus* spp. were selected among those showing different
28 genetic profiles after submitted to RAPD-PCR.

29 2.6 Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and 30 Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

31 A pool of four *Lactobacillus* spp. strains (one *L. curvatus* and three *L.*
32 *plantarum* strains) with different genetic profiles was prepared by inoculating
33

100 μ L of each strain at a concentration of 6 log CFU/mL, grown in MRS broth for 24 h at 37 °C, into 7.5 mL of MRS broth.

The MIC of NI and ϵ -PL was determined by the tube dilution technique (CLSI, 2018). Treatments were performed in screw-capped tubes containing MRS broth, 80 μ L of the pool of *Lactobacillus spp.* and 13 different concentrations of NI, from 0.156 mg/L (163.02 IU/ L= 0.16302 IU/ mL) to 24.96 mg/L (26,083 IU/ L= 26.083 IU/ mL) and of ϵ -PL, from 9.3 mg/L to 150 mg/L. Tubes incubated at 37 °C for 24h. Positive control contained 7.2 mL MRS broth, and 80 μ L bacterial inoculum. ϵ -PL negative control contained 6.8 mL MRS broth and 1.2 mL ϵ -PL stock solution (150 mg/L) and NI negative control contained 7.2 mL MRS broth and 800 μ mL NI stock solution (26.083 IU/ mL).

MIC was defined as the lowest antimicrobial concentration where no increase in turbidity (visible growth) and optical density (600 nm) were observed.

Aliquots (1.0 mL) from the tubes with no visible growth were pour plated on MRS agar and incubated at 37 °C for 48 h. MBC was considered as the lowest antimicrobial concentration where no colony growth was observed after subculture on MRS agar.

2.7 Determination of Fractional Inhibitory Concentration Index (ICIF) of NI and ϵ -PL

MIC of NI and ϵ -PL were reduced by 1/2, 1/4 and 1/8 and tested in combination, following same procedure previously described. MIC of combined antimicrobials was defined as the lowest antimicrobial concentration where no increase in turbidity (visible growth) and optical density (600 nm) were observed. The type of interaction between NI and ϵ -PL was evaluated by calculating the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) Index (Gutierrez et al., 2008). FIC index (FICI) = FIC NI + FIC ϵ -PL, where FIC NI = MIC NI in combination/ MIC NI and FIC ϵ -PL = MIC ϵ -PL in combination/ MIC ϵ -PL.

The interactions between antimicrobials were interpreted as follows: synergistic effect: FICI < 0.5; additive effect: 0.5 $\leq$ FICI $\leq$ 1; no interactive effect: 1 < FICI $\leq$ 4; antagonistic effect: FICI > 4.

2.8 Statistical Analysis

Antimicrobial activity assay was conducted in triplicate and results were analyzed by one-way ANOVA and means were compared by Tukey test ($P<0.05$) using Statgraphics Centurion XVI v. 16.1.11 (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, USA).

3. Results and discussion

3.1 Identification of LAB isolates

Molecular identification of LAB strains using MALDI-TOF revealed eight strains belonging to the species *Lactobacillus plantarum* and one strain to the species *L. curvatus*.

RAPD-PCR of *Lactobacillus* spp. strains revealed four different patterns or types corresponding to different strains (Figure 1). *Lactobacillus plantarum* strains showed three different genetic profiles (band patterns B, C and D).

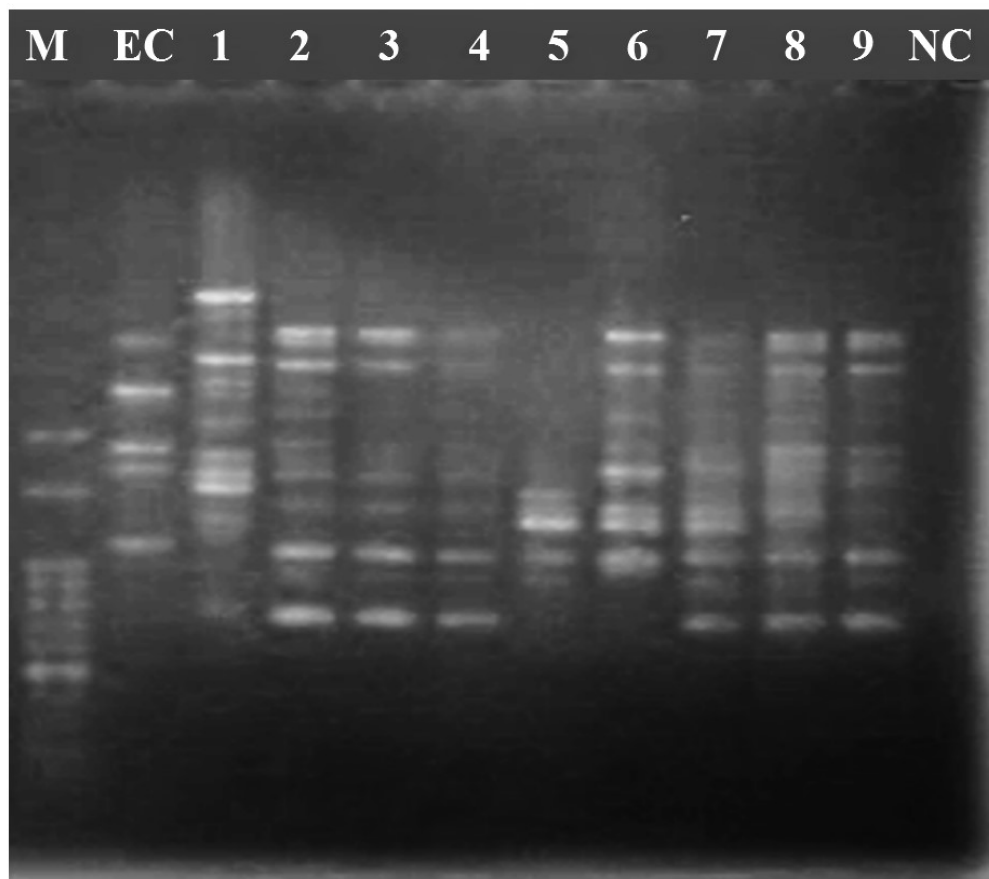


Figure 1. RAPD using OPA-3 primer of *Lactobacillus* spp. strains isolated from Calabresa sausages. M = molecular marker (50pb), EC = *E. coli* ATCC 25922, lane 1 = *L. curvatus* (band pattern A), lanes 2-4 = *L. plantarum* (band pattern B), lane 5 = *L. plantarum* (band pattern C), lane 6 = *L. plantarum* (band pattern D), lanes 7-9 = *L. plantarum* (band pattern B), NC = negative control.

Lactobacillus plantarum is a highly heterogeneous species of versatile lactic acid bacteria (LAB), which are found in many different ecological niches such as vegetables, meat, fish, and dairy products (Siezen et al, 2010).

Among *Lactobacillus* spp., *L. plantarum* usually predominates causing fermentation and spoilage in many types of food, specially at temperatures above 10 °C (Choi and Park, 2000). High proliferation of LAB results in a large number of metabolic products present in samples such as lactic acid, which lowers pH of the product and in some species, carbon dioxide, which causes vacuum lost in package. According to Holley and Gill (2005), this LAB is the main group of bacteria associated with deterioration of cooked meat products packaged under vacuum and kept at room temperature.

3.2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of NI and ϵ -PL

Table 1 shows the values of MIC, MBC and absorption spectrophotometry of NI and ϵ -PL doses.

Table 1 – Results of different concentrations of NI and ϵ -PL against the pool of *Lactobacillus* spp.

Nisin Z				ϵ -poly-L-lysine			
Treatment (mg/L)	Visible growth	Colony Growth	DO _{600nm} (n=3)	Treatment (mg/L)	Visible growth	Colony Growth	DO _{600nm} (n=3)
C+	Yes	ND	1.46 $\pm$ 0.00 ^a	C+	Yes	ND	1.32 $\pm$ 0.01 ^a
C-	No	ND	0.18 $\pm$ 0.03 ^e	C-	No	ND	0.07 $\pm$ 0.00 ^c
0.156	Yes	ND	ND	9.3	Yes	Yes	ND
0.234	Yes	ND	ND	12.5	Yes	Yes	ND
0.312	Yes	ND	0.68 $\pm$ 0.02 ^b	15	Yes	Yes	ND
0.468	No	Yes	0.25 $\pm$ 0.00 ^{cd}	20	Yes	Yes	ND
0.624	No	Yes	0.24 $\pm$ 0.01 ^{cd}	25	Yes	Yes	ND
0.780	No	Yes	0.32 $\pm$ 0.03 ^c	35	Yes	Yes	ND
0.936	No	Yes	0.32 $\pm$ 0.03 ^c	50	Yes	Yes	1.34 $\pm$ 0.00 ^a
1.56	No	Yes	ND	65	Yes	Yes	1.06 $\pm$ 0.01 ^b
2.34	No	Yes	ND	75	No	Yes	0.07 $\pm$ 0.00 ^c
3.12	No	Yes	ND	85	No	Yes	0.08 $\pm$ 0.00 ^c
6.24	No	Yes	ND	100	No	Yes	0.09 $\pm$ 0.00 ^c
12.48	No	No	ND	125	No	Yes	0.09 $\pm$ 0.00 ^c
24.96	No	No	ND	150	No	No	0.07 $\pm$ 0.00 ^c

DO_{600nm} mean $\pm$ standard error. C+ = positive control. C- = negative control. Means with different letters in the same column indicate significant differences between treatments (P <0.05). ND = not determined

MIC of NI and ϵ -PL were 0.468 mg/ L (0.48906 IU/ mL) and 75 mg/ L (75 μ g/ mL), respectively. MBC of NI and ϵ -PL were 12.48 mg/L (13.04 IU/ mL) and 150 mg/L (150 μ g/ mL), respectively.

3.3 Fractional inhibitory concentration index (ICIF) of NI and ϵ -PL combination

Table 2 shows the ICIF results of NI and ϵ -PL.

Table 2. Effect of the combination of different concentrations of NI and ϵ -PL against *Lactobacillus spp.* pool growth

Treatments	Concentration (mg/L)		Visible growth	ICIF	Effect
	NI	ϵ -PL			
$\frac{1}{2}$ MIC NI + $\frac{1}{2}$ MIC ϵ -PL	0.234	37.5	No	1	Additive
$\frac{1}{4}$ MIC NI + $\frac{1}{4}$ MIC ϵ -PL	0.117	18.75	No	0.5	Synergistic
$\frac{1}{8}$ MIC NI + $\frac{1}{8}$ MIC ϵ -PL	0.050	9.375	No	0.2	Synergistic

Tests were incubated at 37 °C for 24h. FICindex < 0.5 indicated a synergic effect; $0.5 \leq$ FIC index ≤ 1 represented an additive effect; $1 < \text{FICindex} \leq 4$ had no interactive effect; and FIC index > 4 indicated an antagonistic effect.

Synergistic inhibitory effect of NI and ϵ -PL against *Lactobacillus spp.* was observed using combinations of 1/4 and 1/8 of MIC concentration of both compounds, showing FIC indices of 0.5 and 0.2, respectively. FIC is a widely method for analysis of multiple compound interactions (Najjar et al, 2007).

Najjar et al. (2007) studied the combination of NI (A) and ϵ -PL against Gram-positive food-borne pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. They found MICs of NI and ϵ -PL for *L. monocytogenes* 300 IU/ml and 15 μ g/ mL, respectively, and a FIC index of 0.83, indicating a strong additive effect according to the FIC calculations. For *Bacillus cereus* vegetative cells, they found MICs of 100 IU/mL and 5 μ g/ mL, NI and ϵ -PL, respectively, and a FIC index 0.56, indicating a synergistic activity. In the present study, the MIC of NI for *Lactobacillus spp* strains was 0.489 IU/ml (0.468 mg/L), showing values quite lower that found by those authors, which may be due to the variant of NI used and the initial bacterial load. On the other hand, the MIC of ϵ -PL was higher (75 mg/L) than that reported by the authors. Even though the bacteria tested are Gram-positive (*Listeria sp.*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*), the resistance to antimicrobials may vary among different species.

1 Choi and Park (2000) studied the selective control of lactobacilli in kimchi
2 (traditional Korean fermented vegetables) using NI. Of 40 isolates of lactobacilli
3 isolated from kimchi, 34 isolates, a significant majority, were either sensitive or
4 very sensitive to NI at a concentration of 100 IU/ mL, which is the level
5 recommended for use in food in many countries. Of 28 *L. plantarum* strains, 26
6 strains were sensitive to 100 IU mL of NI at 20 °C.

7 Tong et al. (2010) evaluated different concentrations of NI against species
8 of *Lactobacillus* associated with caries in oral cavity and observed MIC ranges
9 <1250 IU/mL and >625 IU/mL for *L. acidophilus* ATCC 4356, <625 IU/mL and
10 >312.5 IU/mL for *L. casei* ATCC 393, and <78.125 IU/mL and >39.0625 IU/mL
11 for *L. fermenti* ATCC 9338. MBC ranges against those strains were <2500
12 IU/mL and >1250 IU/mL for *L. acidophilus* ATCC 4356, <1250 IU/mL and >625
13 IU/mL for *L. casei* ATCC 393 and <156.25 IU/mL and >78.125 IU/mL for *L.*
14 *fermenti* ATCC 9338.

15 Liu et al. (2015) studied ϵ -PL and NI combination effects against *E. coli*
16 (source ACCC 10141), *Bacillus subtilis* (source ACCC 10242) and
17 *Staphylococcus aureus* (source ATCC 25923). Towards these bacteria, they
18 found MIC of ϵ -PL ranging from 15.63 mg/L to 62,5 mg/L and MIC of NI from
19 125 to 250 mg/L. FIC index ranged from 0.266 to 0.5, which was similar to the
20 present study. Still studying the effects of interaction of NI and ϵ -PL in *Bacillus*
21 *subtilis*, Liu et al. (2015), using scanning electron microscopy, proved that this
22 combination damaged the bacterial cell membrane, through the activity of NI,
23 facilitating the absorption of ϵ -PL into cells, thereby, increasing the permeability
24 of the cell membrane.

25 Takahashi et al (2012) demonstrated same synergistic effect of NI and ϵ -
26 PL against *L. monocytogenes* in a ready-to-eat seafood matrix (minced tuna
27 and salmon roe). In the study, inhibition of pathogenic bacteria was confirmed
28 using 500 ppm NI and 2,000 ppm ϵ -PL in a solution sprayed on the surface of
29 the food matrix, previously inoculated with *L. monocytogenes*. The higher
30 concentration of the antimicrobials reported by the authors compared to the
31 present study may be due to the application form used.

4. Conclusion

This study showed the synergistic effect of NI and ϵ -PL to control LAB, even in small concentrations (0.05 mg/L NI and 9.375 mg/L ϵ -PL). Therefore, the combination of these natural antimicrobials has potential to be further used in food matrices to control lactic acid spoilage bacteria, increasing the shelf life of the products and helping the food industry to offer safer and more sustainable foods to the consumer.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

References

Arauz, L.J.; Jozala, A.F.; Mazzola, P.G.; Penna, T.C.V. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. Trends in Food Science and Technology, 120, 146-154.

Benli, H.; Sanches-Plata, M.X.; Keeton, J.T. (2011). Efficacy of ϵ -polylysine, lauric arginate, or acidic calcium sulfate applied sequentially for *Salmonella* reduction on membrane filters and chicken carcasses. Journal of Food Protection, 74, 743-750.

Choi, M.H.; Park, Y.H. (2000). Selective control of lactobacilli in kimchi with nisin. Letters in Applied Microbiology, 30, 173-177.

Cleveland. J.; Montville. T.J.; Nes. I.F.; Chikindas. M.L. (2001). Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71, 1-20.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th. Ed. CLSI standard M07. Wayne, PA.

Cotter. P.D.; Hill. C.; Ross. R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews/ Microbiology, 3, 773-788.

Forsythe, Stephen, J. (2013). Microbiologia da Segurança dos Alimentos. 2ª edição, Editora Artmed, Porto Alegre, RS.

1 Gutierrez, J.; Bourke, P.; Ryan, C.B. (2008). The antimicrobial efficacy of
2 plant essential oil combinations and interactions with food ingredients.
3 International Journal of Food Microbiology, 124, 91-97.

4 Holley. R.; Gill. C. O. (2005) Use of modified atmosphere to meat and
5 meat products. Speech. III Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de
6 Carnes. 27 – 29, september, 2005.

7 Hyldgaard. M.; Mygind. T.; Vad. B. S.; Stevang. M.; Otzen. D. E.; Meyer.
8 R. L. (2014). The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-L-lysine.
9 Applied and Environmental Microbiology, 80, (24) 7758-7770.

10 Lerayer, A.L.S.; Viatta. A.; Moreno. I. (2015). Action of nisin on sporogenic
11 bacteria of *Bacillus* gener. Tecnolal/ ITAL. ITAL Artigos Técnicos.

12 Liu. H.; Pei. H.; Han. Z.; Feng. G.; Li. D. (2015) The antimicrobial effect
13 and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Polylysine and
14 Nisin against *Bacillus subtilis*. Food Control, 47, 444-450.

15 Najjar. M. B.; Kashtanov. D.; Chikindas. M. L. (2007). ϵ -Poly-L-lysine and
16 nisin A act synergistically against Gram-positive food borne pathogens *Bacillus*
17 *cereus* and *Listeria monocytogenes*. Letters Applied in Microbiology, 45, 8-13.

18 Neumann. B.; Pospiech A. (2015). A versatile quick-prep of genomic DNA
19 from Gram-positive bacteria. Trends in Genetics, 11, 217-218.

20 Nychas, G.J.E.; Tassou, C.C.; Skandamis, P.N.; Koutsoumanis, K. (2008).
21 Meat spoilage during distribution. Meat Science, 78, 77-89.

22 Quere. F; Deschamps. A.; Urdaci. M.C. (1997). DNA probe and PCR-
23 specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology,
24 82, 783-790.

25 Riley. M.A.; Wertz. J. E. (2002) Bacteriocin diversity ecological and
26 evolutionary perspectives. Biochemie 84, 57-364.

27 Siezen, R.J.; Tzeneva, A.V.; castioni, A.; Wels, M.; Phan, H.T.K.;
28 Rademaker, J.L.W.; Starrenburg, M.J.C. (2010). Phenotypic and genomic
29 diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental
30 niches. Environmental Microbiology, 12 (3), 758-773.

31 Takahashi. H.; Kashimura. M.; Miya. S.; Kuramoto. S.; Koiso. H.; Kuda. T.;
32 Kimura. B. (2012). Effect of paired antimicrobial combinations on *L.*
33 *monocytogenes* growth inhibition in ready-to-eat seafood products. Food
34 Control, 26, 397-400.

- 1 Tong, Z.; Dong, L.; Zhou, L.; Tao, R.; Ni, L. (2010). Nisin inhibits dental
- 2 caries-associated microorganism in vitro. *Peptides*, 31, 2003-2008.
- 3

CAPITULO 4

(Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico LWT –
Food Science and Technology)

Combination of ϵ -Poly-L-Lysine and Nisin Z as biopreservatives in reduced sodium *Calabresa* sausage

Abstract

Meat products are responsible for approximately 20-30% of daily sodium consumption, which justifies the reduction of sodium in these products. However, the reduction of salt could decrease the shelf life due to its effect on the control of bacterial growth. Vacuum packed cooked sausages are very susceptible to the growth of spoilage bacteria, mainly lactic acid bacteria. *Calabresa* sausage is a cooked sausage widely incorporated in the Brazilian diet. The challenge of maintaining the shelf life of reduced salt cooked sausage is even harder when it is stored at room temperature. Then, effects of natural antimicrobials (Nisin and ϵ -Poly-L-Lysine) on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of reduced sodium *Calabresa* cooked sausage were assessed. Reduced sodium *Calabresa* cooked sausages were treated with different combinations of antimicrobial agents and assessed for microbiological (LAB count) and physicochemical parameters (Na, protein, moisture, pH, Aw, instrumental color) during storage at room temperature, for 28 days. Treatments that presented the greatest antimicrobial effects were subjected to sensory evaluation. Combination of 47.5 mg/L Nisin (NI) + 0.75 mg/L ϵ -Poly-L-Lysine (ϵ -PL) (10 fold higher than the MIC obtained *in vitro* against LAB isolated from spoiled commercial *Calabresa* sausage) was effective to control LAB spoilage, and to maintain the physicochemical characteristic of reduced sodium *Calabresa* sausage. Combination of NI and ϵ -PL was effective to increase stability of reduced sodium *Calabresa* sausage with no impact on its sensory acceptance.

Keywords: Nisin, ϵ -Poly-L-Lysine, LAB spoilage, reduced sodium, sausage

1. Introduction

Meat products are important components of the current population diet. However, these products are also associated with high sodium level diets (Felisberto et al., 2015). Excessive sodium intake is considered a critical public health issue, and it has been correlated to an increase in hypertension, that is the major risk factor for the development of various cardiovascular diseases (WHO, 2007).

Studies have reported that meat products are responsible for approximately 20-30% of daily sodium consumption, which justifies the reduction of sodium chloride, an ingredient used in processed meats that provides microbiological stability, reduces the water activity, contributes to the solubilization of myofibrillar proteins and develops flavor and texture characteristics (Horita et al., 2014; Santos et al., 2014; Alves et al., 2017).

Sausages represent an important segment in the processed meat market. *Calabresa* sausage is a cooked sausage widely incorporated in the Brazilian diet. It is made with *Calabresa* pepper and particularly used in pizzas as a spicy sausage and as an ingredient of *feijoada*, a traditional Portuguese and Brazilian dish. Its popularity compares with pepperoni in the United States. Due to its intrinsic characteristics, such as pH > 6.0 and high-water activity, *Calabresa* sausage is very susceptible to the growth of spoilage bacteria (Turgis et al., 2012).

Among the most important groups of spoilage bacteria in vacuum-packed cooked sausages are the non-putrefactive lactic acid bacteria (LAB) (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*) (Holley and Gill, 2005). Currently, one of the major challenges for manufacturers of this type of sausage is the difficulty of maintaining the stability of the product under storage at room temperature. This is a common storage practice in many retailers and leads to the reduction of shelf life and the onset of signs of spoilage in the product even before the expiration date. The challenge of maintaining the shelf life of the *Calabresa* sausage is even harder in reduced salt sausages.

Food preservatives are used to prolong shelf life by reducing the ability of pathogens to survive in the food or extending the time for spoilage microorganisms to reach unacceptable levels manifesting as bad sensory

characteristics (slime formation, odor and flavor) (Hyltdgaard et al., 2014). Natural antimicrobial substances have been widely explored and investigated for their potential use as food preservatives due to the demand of consumers (Geornaras and Sofos, 2005; Najjar et al., 2007; Chang et al., 2010; Takahashi et al., 2012; Hyltdgaard et al., 2015).

Nisin (NI) is a peptide produced by certain strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Since the 1960s, nisin has been used as an antimicrobial in food, recognized by the FDA as safe (GRAS = Generally Recognized as Safe), presenting bactericidal activity against several Gram-positive bacteria, such as lactic bacteria, and also on vegetative cells and spores of *Bacillus* sp. and *Clostridium* sp. (Lerayer et al., 2015).

Several studies have reported the effect of NI as a potent inhibitor of microbial growth in cheeses, fruit juices, ground beef, sausages, canned products, dairy products and beer (Araujo et al., 2018; Silva et al., 2014; Turgis et al., 2012; Hartmann et al., 2011; Geornaras et al., 2007). Its mechanism of action is double, NI acts by preventing the synthesis of peptidoglycan in the bacteria cell wall, besides forming pores in the cell membrane, allowing flow of intracellular material, causing cell death (Cotter et al., 2005).

Studies show that the antimicrobial effect of NI is potentiated when used in synergism with other compounds, such as organic acids, essential oils or other natural preservatives (Riley and Wertz, 2002; Turgis et al., 2012; Liu et al., 2015; Araujo et al., 2018).

ϵ -Poly-L-Lysine (ϵ -PL) is a polyaminoacid obtained from the natural fermentation process of the bacteria *Streptomyces albulus* and has inhibition effect on Gram-negative and Gram-positive bacteria, including some pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* (Geornaras and Sofos, 2005), besides yeasts and molds (Ye et al., 2013).

Since the late 1980s, ϵ -PL has been approved for use as a food preservative in Japan and in January 2004 was recognized as GRAS in the United States (Benli et al., 2011). ϵ -PL interacts with the cell membrane phospholipid heads due to their electrostatic charge, causing conformational changes in the cell membrane. Phospholipids removed from the membrane can form vesicles or free micelles, leaving a membrane gap through which ϵ -PL can

access cytoplasm and cause further damage to the cell (Hyldgaard et al., 2014). The antibacterial activity of ϵ -PL has been also reported in literature, including its interaction with bacterial cell DNA (Liu et al., 2015).

The antimicrobial effect and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -PL and NI was demonstrated *in vitro* against *B. subtilis* (Liu et al., 2015), *L. monocytogenes* (Takahashi et al., 2012; Najjar et al., 2007), *B. cereus* (Najjar et al., 2007). However, the effect of the combination of ϵ -PL and NI against spoilage bacteria in meat products has not been assessed.

The aim of the present study was to evaluate the effect of the combination of ϵ -PL and NI to control the growth of spoilage LAB and extend the shelf life of reduced sodium *Calabresa* sausage.

2. Material and Methods

2.1 Materials

Nisin Z (2.5%) and ϵ -PL (99.5%) were purchased from Handary (Bussels, Belgium).

2.2 Preparation of reduced sodium *Calabresa* sausage

The sausages were prepared with 30% reduction of sodium chloride from a basic commercial formulation presented in Table 1.

Pork leg boneless chuck, pork fat and mechanically deboned poultry meat were ground in an electric meat-grinder (PC-10, Eccel Metalúrgica, Brusque, SC, Brazil) with an 8mm disc. The dry ingredients were added and manually mixed with the batter for 2 min. Subsequently, the antimicrobial compounds were dissolved in water and added at the end of the batter preparation, with subsequent stuffing using a mechanical stuffer (Jamar model EFI, Tupã, SP, Brazil) into natural pork casing (Brascase Alimentos, Fazenda Rio Grande, PR, Brazil), previously sanitized with 10% lactic acid solution for 30 min. Sausages were cooked at 90 °C until a final internal temperature of 76 °C in a steam stove (M10, Incomaf, Itaquaquecetuba, SP, Brazil), cooled immediately in an ice-water bath and vacuum-packed in a low density barrier pouches (permeability of < 30 cc/m²/day at 1ATM and 23°C) (Unipac B320) using a vacuum sealer (200 Selovac, São Paulo, SP, Brazil) and then stored at room temperature for 28 days.

The concentration of ϵ -PL + NI used as antimicrobials in sausages was 10-fold higher than the MIC obtained *in vitro* against BAL isolated from spoiled commercial *Calabresa* sausage in a previous study.

Table 1. Formulations of *Calabresa* sausage with salt reduction

Ingredients	Formulations			
	T1	T2	T3	T4
Lean pork (Kg)	6.845	6.845	6.845	6.885
Pork back fat (kg)	1.500	1.500	1.500	1.500
Mechanically deboned poultry meat (kg)	1.000	1.000	1.000	1.000
Water (kg)	0.200	0.200	0.200	0.200
Soy proyein (kg)	0.200	0.200	0.200	0.200
Salt (kg)	0.140	0.140	0.140	0.140
Garlic (kg)	0.025	0.025	0.025	0.025
Calabresa pepper (kg)	0.015	0.015	0.015	0.015
Sodium tripolyphosphate (kg)	0.025	0.025	0.025	0.025
Antioxidant mix* (kg)	0.025	0.025	0.025	0.025
Curing salt** (kg)	0.025	0.025	0.025	0.025
ϵ -polylysine (99.5%) (mg/L)	-	95.0	142.5	47.5
Nisin Z (2.5%) (mg/L)	-	0.50	0.25	0.75

* (55% sucrose, 30% sodium eritorbate, 15% NaCl); ** (90% de NaCl, 6% NaNO₂, 4% NaNO₃)
T1= no antimicrobials, T2 = 50% ϵ -polylysine + 50% Nisin, T3 = 75% ϵ -polylysine + 25% Nisin, T4 = 25% ϵ -polylysine + 75% Nisin.

At 7-day intervals, samples were withdrawn and subjected to microbiological and physical-chemical analyses. Sodium, protein and moisture content were determined after manufacture of sausages at day 0.

2.3 Microbiological analysis

Sausage samples (25 g) were aseptically transferred to sterile plastic bags containing 225 mL of 0.1% peptone water (HIMEDIA, Mumbai, India) and homogenized in a stomacher (IUL Instruments, Barcelona, Spain) in duplicate. From the first dilution (1:10), subsequent dilutions were performed and plated on MRS agar plates (KASVI, Paraná, Brazil) incubated at 37°C for 48h. Results were expressed in log CFU/g.

2.4 Physicalchemical characterization

pH levels were measured in duplicate using a digital pHmeter (HI253 Hanna Instruments, Dallas, Texas, USA) and the electrode inserted at three

random sites in the sausage, in accordance with Adolfo Lutz Institute Analysis Manual (IAL, 2008). Water activity (A_w) were determined in duplicate using an Aqualab CX2 instrument (Decagon Devices, Inc., Canada). Instrumental color was evaluated in duplicate by the ASTM International (2011) method using a portable colorimeter (Konica Minolta CR 410, Tokyo, Japan) and L^* , a^* , and b^* color coordinates. Color was measure on three different points of surface of sausages using light source D65, opening diameter of 50 to 53mm, and angle of observation of 2° . The hue values [$h = \text{ARCTAN}(b/a)$], which indicate intensity of discoloration, and C^* (chroma; $c = \sqrt{a^2 + b^2}$), the latter indicates color saturation, were calculated.

Protein and moisture contents were analyzed in triplicate using two sausages per treatment according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005). The content of sodium was determined using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP OES, Vista MPX, Varian, Mulgrave, Australia) according to the methodology described by the AOAC (2005).

2.5 Sensory analysis

Three formulations of *Calabresa* sausage were prepared: T1 a control, formulated without the addition of the natural antimicrobials and two other formulations, T2 and T3, formulated with the same ingredients, but with addition of ϵ -PL + NI at different concentrations, according Table 4. Sausages were sliced (~1 cm thickness) at room temperature and samples (2 slices for each panelist) were coded with its own 3-digit random number for the evaluation. An affective test was used to analyze the sensory acceptance of sausages, using a nine-point structured hedonic scale ranging from 1 (disliked extremely) to 9 (liked extremely). The test was performed by a panel of 105 untrained volunteers (50 men and 55 women, aged 18–55 years). The panelists were asked to evaluate the odor, color, taste, tenderness and overall liking of the samples (Dutcosky, 2014). The Acceptability Index (AI) was calculated according with Teixeira, Meinert and Barbeta (1987), following the expression:

$$AI = \frac{\text{Average grade of the product}}{\text{higher grade of the product}} \times 100$$

1 Approval for human use (for the sensory panel evaluation) was granted by
2 the Ethics Research Committee (CEP) of PUCPR (protocol number 2.401.970).

3 4 **2.6 Statistical analysis**

5 Statgraphics® Centurion XVI version 16.1.11 (Statpoint Technologies,
6 Warrenton, Virginia, USA) was used for statistical analysis of the data. The
7 microbiological and physicochemical data were analyzed using a random block
8 design, considering a mixed linear model including formulation and storage time
9 as fixed effects and replication as a random effect. Means were compared by
10 Tukey test ($P < 0.05$). The microbiological and physicochemical assays were
11 performed two times independently and differences between replicates were not
12 significant ($P < 0.05$). The microbiological assays were conducted in duplicate
13 ($n=4$) and physicochemical analysis in triplicate ($n=6$). Sensory assay was
14 conducted in one section and data were analyzed using a random block design,
15 considering a mixed linear model including the fixed effect of formulation and
16 random block effect (panelist). Means were compared by Tukey test ($P < 0.05$).

17 **3. Results and discussion**

18 19 **3.1 Sodium, Protein and moisture content**

20 Reduced sodium *Calabresa* sausages formulated with combinations of E-
21 PL and NI were characterized to their physicochemical properties. No significant
22 differences were found in protein and moisture content between different
23 treatments ($P>0,05$) (Table 2).

24 Average protein content was 24.89 ± 0.03 g, that is higher than the
25 minimum of 12 g/100 g, required in Brazilian legislation for cooked sausages
26 (Brasil, 2000). Average moisture content of sausages was also within the
27 required by Brazilian legislation (maximum of 60 g/100 g).

28 Sausages showed different sodium content, which varied from 793.61 mg/
29 100g (T1) to 910.15 mg/ 100g (T2), however, this difference did not affect the
30 physical-chemical and sensory characteristics of the sausages.
31
32
33

Table 2. Effects of treatment on sodium, moisture and protein content of *Calabresa* sausage added with NI and ε -PL (mean $\pm$ standard error)

Treatment	Sodium (mg/ 100g)	Moisture (g/100g)	Protein (g/100g)
T1	793.61 $\pm$ 44.51 ^b	59.13 $\pm$ 0.12 ^a	24.86 $\pm$ 0.03 ^a
T2	910.15 $\pm$ 17.66 ^a	58.86 $\pm$ 0.07 ^a	24.87 $\pm$ 0.10 ^a
T3	909.59 $\pm$ 6.49 ^a	59.10 $\pm$ 0.06 ^a	24.82 $\pm$ 0.06 ^a
T4	848.17 $\pm$ 12.05 ^{ab}	58.89 $\pm$ 0.11 ^a	25.03 $\pm$ 0.05 ^a
Mean	865.38 $\pm$ 18.07	59.00 $\pm$ 0.05	24.89 $\pm$ 0.03

T1= control, without antimicrobials, T2 = 95 mg ε -PL + 0.50 mg NI, T3 = 142.5 mg ε -PL + 0.25 mg NI, T4 = 47.5 mg ε -PL + 0.75 mg NI. Means with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

3.2 Effects on sausage stability

Table 3 shows pH, Aw and BAL count values of *Calabresa* sausage stored at 28 days at room temperature.

Table 3. Effects of treatment and time on pH, Aw and LAB count in *Calabresa* sausage with and without natural antimicrobials (mean $\pm$ standard error)

		Time					
P	T	0	7	14	21	28	Mean
pH	T1	6.33 $\pm$ 0.00 ^{aA}	6.20 $\pm$ 0.00 ^{aB}	6.06 $\pm$ 0.01 ^{bcC}	5.98 $\pm$ 0.03 ^{abC}	5.80 $\pm$ 0.03 ^{bD}	6.07 $\pm$ 0.03
	T2	6.32 $\pm$ 0.00 ^{aA}	6.19 $\pm$ 0.00 ^{abB}	6.10 $\pm$ 0.01 ^{bBC}	6.08 $\pm$ 0.03 ^{aC}	5.91 $\pm$ 0.02 ^{aD}	6.12 $\pm$ 0.02
	T3	6.31 $\pm$ 0.01 ^{aA}	6.15 $\pm$ 0.00 ^{bB}	6.03 $\pm$ 0.01 ^{cC}	5.93 $\pm$ 0.02 ^{bD}	5.80 $\pm$ 0.01 ^{bE}	6.04 $\pm$ 0.03
	T4	6.29 $\pm$ 0.01 ^{aA}	6.18 $\pm$ 0.00 ^{abB}	6.16 $\pm$ 0.00 ^{aB}	5.94 $\pm$ 0.01 ^{bC}	5.76 $\pm$ 0.01 ^{bD}	6.07 $\pm$ 0.03
	Mean	6.31 $\pm$ 0.00	6.18 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 0.01	5.98 $\pm$ 0.01	5.82 $\pm$ 0.01	
Aw	T1	0.97 $\pm$ 0.00 ^{aA}	0.97 $\pm$ 0.00 ^{aBC}	0.96 $\pm$ 0.00 ^{aC}	0.97 $\pm$ 0.08 ^{aB}	0.97 $\pm$ 0.00 ^{abBC}	0.97 $\pm$ 0.00
	T2	0.97 $\pm$ 0.00 ^{aA}	0.97 $\pm$ 0.00 ^{aAB}	0.96 $\pm$ 0.00 ^{aB}	0.96 $\pm$ 0.08 ^{bB}	0.96 $\pm$ 0.00 ^{abB}	0.97 $\pm$ 0.00
	T3	0.97 $\pm$ 0.00 ^{aA}	0.96 $\pm$ 0.00 ^{aB}	0.96 $\pm$ 0.00 ^{aB}	0.96 $\pm$ 0.26 ^{bB}	0.96 $\pm$ 0.00 ^{bB}	0.96 $\pm$ 0.00
	T4	0.97 $\pm$ 0.00 ^{aA}	0.96 $\pm$ 0.00 ^{aB}	0.97 $\pm$ 0.00 ^{aAB}	0.97 $\pm$ 0.14 ^{abAB}	0.97 $\pm$ 0.00 ^{aAB}	0.97 $\pm$ 0.00
	Mean	0.97 $\pm$ 0.00	0.97 $\pm$ 0.00	0.96 $\pm$ 0.00	0.96 $\pm$ 0.21	0.97 $\pm$ 0.00	
BAL (log CFU/ g)	T1	2.79 $\pm$ 0.15 ^{aD}	4.09 $\pm$ 0.02 ^{aC}	4.52 $\pm$ 0.17 ^{aBC}	4.97 $\pm$ 0.04 ^{aB}	7.35 $\pm$ 0.06 ^{aA}	4.74 $\pm$ 0.34
	T2	2.17 $\pm$ 0.17 ^{abC}	3.98 $\pm$ 0.02 ^{abB}	3.58 $\pm$ 0.20 ^{bB}	4.71 $\pm$ 0.16 ^{aA}	5.25 $\pm$ 0.13 ^{bA}	3.94 $\pm$ 0.24
	T3	2.00 $\pm$ 0.00 ^{bD}	3.83 $\pm$ 0.08 ^{bBC}	3.41 $\pm$ 0.24 ^{bC}	4.74 $\pm$ 0.18 ^{aA}	4.43 $\pm$ 0.25 ^{cAB}	3.68 $\pm$ 0.23
	T4	2.31 $\pm$ 0.19 ^{abD}	3.98 $\pm$ 0.04 ^{abC}	3.83 $\pm$ 0.21 ^{abC}	4.75 $\pm$ 0.20 ^{aB}	5.74 $\pm$ 0.13 ^{bA}	4.12 $\pm$ 0.26
	Mean	2.32 $\pm$ 0.10	3.97 $\pm$ 0.03	3.83 $\pm$ 0.14	4.79 $\pm$ 0.07	5.69 $\pm$ 0.28	

P = Parameter, T = Treatment. T1= control, without antimicrobials, T2 = 95 mg ε -PL + 0.50 mg NI, T3 = 142.5 mg ε -PL + 0.25 mg NI, T4 = 47.5 mg ε -PL + 0.75 mg NI. Values with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). Lowercase letters in columns indicate differences between treatments, uppercase letters in rows indicate differences between storage time ($P < 0.05$).

There was significant interaction between treatment and storage time for pH, Aw and LAB count ($P < 0.05$). There was a decrease in pH in all treatments during storage. Time also influenced Aw and LAB count of sausages, which

showed a slight reduction in Aw and an increase in LAB growth in all treatments over storage.

Treatments had little influence in pH and Aw of sausages. Sausages treated with 95 mg ϵ -PL + 0.50 mg NI (T2) showed the highest pH value (5.91) at the end of storage, whereas control, T3 and T4 showed no difference. However, despite the significant difference, pH values of sausages ranged lower than 0.15 between all treatments at 28 days. Similarly, Aw values showed little variation between treatments during storage, ranging from 0.96 to 0.97.

According to Sun and Holley (2010), the isoelectric point of the myofibrillar protein (pH 5.3) is the minimum pH expected for cooked meat products due to its interference in the water retention of the product. Therefore, despite the decrease in pH of *Calabresa* sausages, it did not interfere in the Aw of the product. The decreasing in pH values of sausages is attributed to the growth of LAB and production of lactic acid during storage (Borch et al., 1996).

Sausages treated with antimicrobials ϵ -PL and NI (T2, T3 and T4) showed lower count of LAB compared to control ($P < 0.05$) at the end of storage. T3 had the lowest count of LAB, which showed difference to T2 and T4. During 28 days of storage, the count of LAB in control increased 4.56 log CFU/g. Treatments with antimicrobials showed increase in LAB count ranging from 2.43 log CFU/g (T3) to 3.43 log CFU/g (T4). Moreover, the count of LAB in NI and ϵ -PL added sausages at 28 days of storage at room temperature varied from 4.43 log CFU/g (T3) to 5.74 log CFU/g (T4), showing lower count than the control (7.35 CFU/g) and the practical threshold of 7 log CFU/g for LAB count and spoilage of the product (Kreyenschmidt et al., 2010).

Geornaras et al. (2007) studied the effect of 0.02% of ϵ -PL in fresh beef and Bologna extracts against *L. monocytogenes*. They found, in both extracts, a 4 log CFU/g reduction after 6 days of storage and concluded that ϵ -PL has a high resistance to heat, showing no degradation during cooked process and a potential antimicrobial for use in food that are subjected to heat treatment, such as cooked sausages. In the present study, T3 (0.000025% NI + 0.1425% ϵ -PL) showed the lowest increase of LAB count during storage. T2 and T4 also obtained lower count compared to control (T1) at the end of storage.

Li et al (2014) studied chilled pork meat treated with different concentrations of ϵ -PL during 8 days at 4 °C. Pieces of chilled pork were dipped

1 into 0.5%, 0.75%, 1%, 1.25% and 1.5% ϵ -PL solutions for 30 seconds before
2 chilling. Total bacterial count (TBC) were determined and all treated samples
3 showed lower TBC than the control. Similarly, bacterial population in *Calabresa*
4 sausages decreased with the increase of ϵ -PL concentration during the same
5 storage time.

6 Chang et al. (2010) observed the effect of ϵ -PL concentrations (0.1%, 1%
7 and 2%) against *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *L. monocytogenes* in
8 ready to eat roast beef slurry. Significant reduction of *E. coli* was observed after
9 48h for all ϵ -PL concentrations. Significant reduction of *S. typhimurium* and *L.*
10 *monocytogenes* were also observed after 10h for 2% ϵ -PL concentration. The
11 authors concluded that the antibacterial effect of ϵ -PL dependent on the
12 concentration, different type of bacteria, inoculum level and experimental
13 temperature.

14 Choi and Park (2000) reported the effectiveness of NI (100 UI) against
15 BAL in vegetables such as kimchi to control over-ripening. The concentration of
16 NI was quite higher than those used in the present study (from 0.26 UI/ 0.25 mg
17 to 0.78 UI/ 0.75 mg) probably due to the synergistic effect of the combination
18 with ϵ -PL, different food matrix and different initial bacterial count.

19 The antibacterial effect of the combination of ϵ -PL + NI was demonstrated
20 by Takahashi et al. (2012) towards *L. monocytogenes* in ready-to-eat seafood.
21 However, the concentration of antimicrobials used (2% ϵ -PL + 0.5 NI) was also
22 higher than those found in the present study.

23 At first sight, color is one of the main meat product attributes that influence
24 consumer's acceptance. In sausages, the color is affected by the fat content,
25 water content and the homogeneity of the cutting surface of the product (Grossi
26 et al., 2012).

27 With regard to the instrumental color of *Calabresa* sausage during
28 storage, there was interaction between treatment and storage time for all color
29 coordinates ($P < 0.05$) (Figure 1). However, despite the significant differences
30 ($P < 0.05$), the effect of antimicrobials addition was not evident, most likely due
31 the heterogeneous coloration of this meat product, due to intrinsic
32 characteristics.

33 Over time, all treatments had increased luminosity (L^*), justified by the pH
34 reduction. Coordinate a^* had little decreased values in all treatments, and

coordinate b^* had little increased values, what is expected to meat products during storage time. Results obtained from color coordinates showed that antimicrobials didn't affect the color of the product.

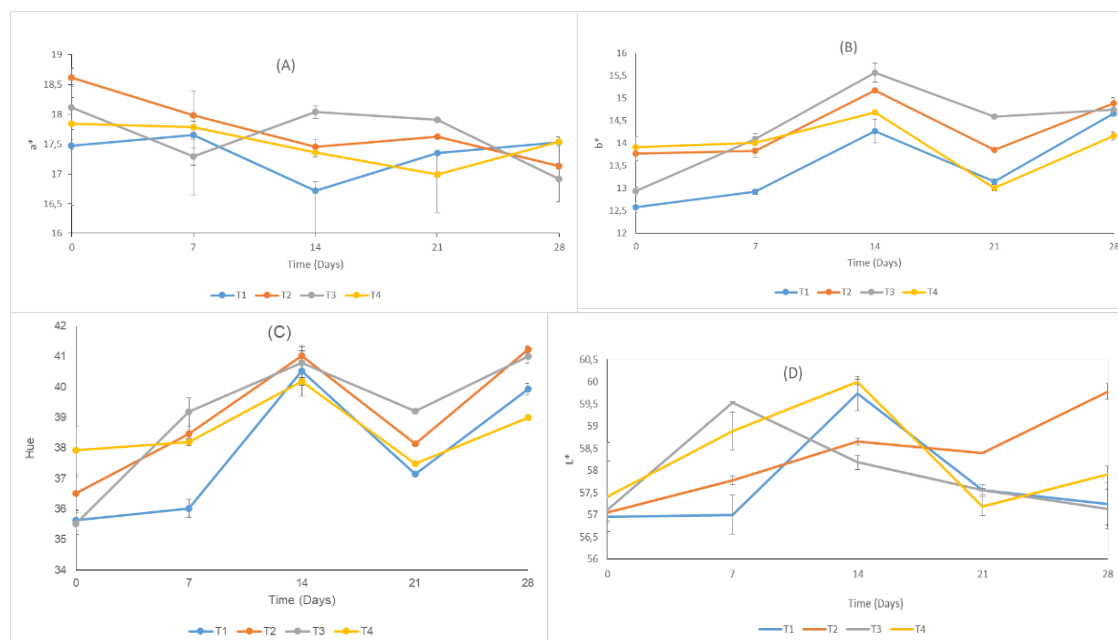


Fig. 1. Color coordinates (A) a^* ; (B) b^* ; (C) hue, and L^* (D) evaluated in reduced sodium *Calabresa* sausage added with antimicrobials. Samples were stored at room temperature and evaluated for 28 days. T1= control, without antimicrobials, T2 = 95 mg ϵ -PL + 0.50 mg NI, T3 = 142.5 mg ϵ -PL + 0.25 mg NI, T4 = 47.5 mg ϵ -PL + 0.75 mg NI.

3.3 Sensory analysis

Based on the results of microbiological and physical-chemical analyses, three formulations were chosen for the sensory evaluation: T1 = control, T2 = 95mg ϵ -PL + 0.50mg NI and T3 = 142.5mg ϵ -PL + 0.25 mg NI. No significant differences were observed between the control and the sausages added with the antimicrobials for odor, color, texture, taste and overall liking (Table 4).

The effect of the combined addition of NI and ϵ -PL on the sensory properties of meat products has not been reported. However, studies report that the addition of NI or ϵ -PL in different food matrices did not negatively affect the sensory characteristics of the products (Ghabraie et al., 2016; Rajapaksha et al., 2013).

Moreover, the addition of ϵ -PL could increase the sensory characteristics of food products as reported by Rajapaksha et al. (2013). Those authors added ϵ -PL (0.005%) to yogurt to inhibit post-acidification caused by LAB

(*Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) and observed that ϵ -PL added samples received higher scores for color, odor, taste, appearance, mouth feel and overall acceptability than samples added with chemical preservative (K-sorbate) and not added any preservatives.

Ghabraie et al. (2016), studied the addition effect of nitrite (100 ppm) + nisin (12.5 ppm) + organic acid salts (1.55% potassium lactate plus sodium acetate) + high and low concentration of essential oil (0.025 to 0.05% Chinese cinnamon and cinnamon bark) in cooked sausages to prevent *Listeria sp.* growth and on sensory properties. They concluded that treatments containing antimicrobials were sensory accepted (texture, odor and taste).

The acceptability index of all treatments was above 80% for odor, texture, flavor and overall liking. Only for color, the acceptability index was lower than 80% (77,6%, 75,6% and 77,8% for T1-control, T2 and T3, respectively).

According to Teixeira, Meinert and Barbeta (1987) an acceptability index $\leq$ 70% indicates the commercial acceptance of the product. Both treatments containing ϵ -PL and NI (T2 and T3) showed acceptance by the consumers and therefore, could have potential to be commercialized.

Table 4. Sensory analysis of *Calabresa* sausage added with nisin and ϵ -polylysine (mean $\pm$ standard error)

Characteristics	T1	T2	T3
Odor	7.38 $\pm$ 0.13 ^a	7.25 $\pm$ 0.14 ^a	7.42 $\pm$ 0.14 ^a
Color	6.99 $\pm$ 0.14 ^a	6.80 $\pm$ 0.15 ^a	7.01 $\pm$ 0.12 ^a
Tenderness	7.58 $\pm$ 0.11 ^a	7.30 $\pm$ 0.14 ^a	7.47 $\pm$ 0.14 ^a
Taste	7.90 $\pm$ 0.10 ^a	7.76 $\pm$ 0.13 ^a	7.69 $\pm$ 0.13 ^a
Overall rating	7.651 $\pm$ 0.09 ^a	7.62 $\pm$ 0.10 ^a	7.52 $\pm$ 0.11 ^a

T1 = control, without antimicrobials, T2 = 95 mg ϵ -PL + 0.50 mg NI, T3 = 142.5 mg ϵ -PL + 0.25 mg NI. Different lower case letters show significant differences ($P < 0.05$) in the same row.

4. Conclusions

The tested combinations of ϵ -PL and NI caused a significant control of the BAL population in reduced sodium *Calabresa* sausage as compared to the control. The combination of the antimicrobials was also effective in maintaining the color and the pH of the sausage. Sausages containing the antimicrobials showed high acceptability, thus indicating a commercial potential of the use of

1 ϵ -PL and NI to extend the shelf life of reduced sodium sausage stored at room
2 temperature.

3 4 **Acknowledgements**

5 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento
6 de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

7 8 **References**

9 Alves, L.A.A.S.; Lorenzo, J.M.; Gonçalves, C.A.A.; Santos, B.A; Heck,
10 R.T.; Cichoski, A.J.; Campagnol, P.C.B. (2017) Impact of lysine and liquid
11 smoke as flavor enhancers on the quality of low-fat Bologna-type sausages with
12 50% replacement of NaCl by KCl. Meat Science, 123, 50-56.

13 AOAC (2005). Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.)
14 Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemistry.

15 Araujo, M.K.; Gumiel, A. M.; Bordin, K.; Luciano, F.B.; Macedo, R.E.F.
16 (2018). Combinations of garlic essential oil, allylisothiocyanate and Nisin Z as
17 biopreservative in fresh sausage. Meat Science, 143, 177-183.

18 ASTM International (2011). American Society for Testing and Material.
19 Standard practice for computing the colors of objects by using the CIE system.
20 Pennsylvania: ASTM International.

21 Benli, H.; Sanches-Plata, M.X.; Keeton, J.T. (2011). Efficacy of ϵ -
22 polylysine, lauric arginate, or acidic calcium sulfate applied sequentially for
23 *Salmonella* reduction on membrane filters and chicken carcasses. Journal of
24 Food Protection, 74,743-750.

25 Borch, E.; Kant, M. M. L.; Blixt, Y.(1996). Bacterial spoilage of meat and
26 cured meat products. International Journal of Food Microbiology, 33,103-120.

27 Brasil (2000). Ministry of Agriculture, livestock and food supply. Normative
28 Instruction nº 4, mar 31th, 2000.Technical regulation of sausage identity and
29 quality. DF, Official Journal of the Union.

30 Chang, S.S.; Lu, W.Y.W.; Park,S.H.; Kang, D.H. (2010). Control of
31 foodborne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by ϵ -Polylysine.
32 International Journal of Food Microbiology, 141,236-241.

1 Choi, M.H.; Park, Y.H. (2000). Selective control of lactobacilli in kimchi
2 with nisin. Letters in Applied Microbiology, 30, 173-177.

3 Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate
4 immunity for food. Nature Reviews/ Microbiology, 3, 773-788.

5 Dutcosky, S.D. (2014). Sensory analysis of food (4 ed.) Champagnat:
6 Curitiba (536 pp).

7 Felisberto, M. H. F.; Galvão, M. T. E. L.; Picone, C. S. F.; Cunha, R. L.;
8 Pollonio M.A.R. (2015). Effect of prebiotic ingredients on the rheological
9 properties and microstructure of reduced-sodium and low-fat meat emulsions.
10 LWT- Food Science and Technology, 60, 148-155.

11 Ghabraie, M.; Vu, K.D.; Hug, T.; Khan A.; Lacroix, M. (2016). Antilisterial
12 effects of antibacterial formulations containing essential oils, nisin, nitrite and
13 organic salts in a sausage model. Journal of Food Science Technology, 53,
14 2625-2633.

15 Geornaras, I.; Sofos, J. N. (2005). Activity of ϵ -Polylysine against *E. coli*
16 O157:H7, *S. typhimurium* and *L. monocytogenes*. Journal of Food Science, 70,
17 404-408.

18 Geornaras, I.; Yoon, Y.; Belk, K.E.; Smith, G.C.; Sofos, J. N. (2007).
19 Antimicrobial activity of ϵ -Polylysine against *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*
20 and *L. Monocytogenes* in various food extracts. Journal of Food Science, 72,
21 330-334.

22 Grossi, A.; Jensen, J.S.; Knudsen, J.C.; Christensen, M.; Orlie, V. (2012).
23 Reduction salt in pork sausages by the addition of carrot fibre or potato starch
24 and high pressure treatment. Meat Science, 92, 481-489.

25 Hartmann, H.A.; Wilke, T.; Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-
26 containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control
27 *Listeria monocytogenes* in food. International Journal of Food Microbiology,
28 146, 192-199.

29 Holley, R.; Gill, C. O. (2005). Use of modified atmosphere to meat and
30 meat products. III Brazilian Congress of Meat Science and Technology,
31 September 27-29, 2005.

32 Horita, C. N.; Messias, V. C.; Morgano, M. A.; Hayakawa, F.M.;
33 Pollonio, M.A.R. (2014). Textural, microstructural and sensory properties of

reduced sodium frankfurter sausages containing mechanically deboned poultry meat and blends of chloride salts. Food Research International, 66, 29-35.

Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Vad, B. S.; Stenvang, M.; Otzen, D. E.; Meyer, R. L. (2014). The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-L-lysine. Applied and Environmental Microbiology, 80, 7758-7770.

Hyldgaard, M.; Meyer, R.L.; Peng, M.; Hibberd, A.A.; Fischer, J.; Sigmundsson, A.; Mygind, T. (2015). Binary combination of epsilon-poly-L-lysine and isoeugenol affect progression of spoilage microbiota in fresh turkey meat, and delay onset of spoilage in *Pseudomonas putida* challenged meat. International Journal of Food Microbiology, 215, 131-142.

IAL, Instituto Adolf Lutz. (2008). Métodos físico-químicos para análises de alimentos – Carnes e produtos cárneos. 4ª ed. São Paulo, 2008.

Lerayer, A. L. S.; Viatta, A.; Moreno, I. (2015). Ação da nisina sobre bactérias esporogênicas do gênero *Bacillus*. Tecnolatl/ ITAL, ITAL Artigos Técnicos.

Kreyenschmidt, J.; Hübner, A.; Beierle, E.; Chonsch, L.; Scherer, A.; Petersen, B. (2010). Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. Journal of Applied Microbiology, 108, 510–520.

Li, Y.Q.; Feng, J.L.; Han, Q.; Dai, Z.Y.; Liu, W.; Mo, H.Z. (2014). Effects of ϵ -Poly-L-lysine on physicochemical characteristics of chilled pork. Food Bioprocess Technology, 7, 2507-2515.

Liu, H.; Pei, H.; Han, Z.; Feng, G.; Li, D. (2015). The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Poly-L-lysine and Nisin against *Bacillus subtilis*. Food Control, 47, 444-450.

Najjar, M. B.; Kashtanov, D.; Chikindas, M. L. (2007). ϵ -Poly-L-lysine and nisin A act synergistically against Gram positive foodborne pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Letters Applied in Microbiology, 45, 8-13.

Rajapaksha, D.S.W.; Kodithuwakku, K.H.T.; Silva, K.S.T.; Rupasinghe, R. J. L. (2013). Evaluation of potassium sorbate and ϵ -Polylysine for their inhibitory activity on post-acidification of set yoghurt under cold storage for 20 days. International Journal of Scientific and Research Publications, 3, 1-7.

Riley, M.A.; Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity ecological and evolutionary perspectives. Biochemie, 84, 357-364.

1 Santos, B.A.; Campagnol, P.C.B.; Morgano, M.A.; Pollonio, M.A.R. (2014)
2 Monosodium glutamate, disodium inosinate, disodium guanylate, lysine and
3 taurine improve the sensory quality of fermented cooked sausages with 50%
4 and 75% replacement of Na Cl with KCl. Meat Science, 96, 509-513.

5 Silva, R. X. A.; José, K. F. C.; Franco, R.M.; Silva T.J.P. (2014). Lactato
6 de sódio, nisina e sua combinação na validade comercial da linguiça Toscana
7 embalada à vácuo e estocada a 4° C. Revista Ciência Rural, 44, 746-751.

8 Sun, X.D.; Holley, R.A. (2010). High hydrostatic pressure effects on the
9 texture of meat and meat products. Journal of Food Science, 75, 17-23.

10 Takahashi, H.; Kashimura, M.; Miya, S.; Kuramoto, S.; Koiso, H.; Kuda, T.;
11 Kimura, B. (2012). Effect of paired antimicrobial combinations on *Listeria*
12 *monocytogenes* growth inhibition in ready-to-eat seafood products. Food
13 Control, 26, 397-400.

14 Teixeira, E.; Meinert, E.; Barbeta, P.A. (1987). Análise Sensorial dos
15 Alimentos. Florianópolis, SC, Editora da UFSC, 180p.

16 Turgis, M.; Vu, K. D.; Dupont, C.; Lacroix, M. (2012). Combined
17 antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against food borne
18 pathogens and food spoilage bacteria. Food Research International, 48, 696-
19 702.

20 WHO, World Health Organization (2007). Reducing salt intake in
21 populations. Report of a WHO Forum and Technical Meeting (pp.185-194).

22 Ye, R.; Xu, H.; Wan, C.; Peng, S.; Wang, S.; Xu, h.; Aguilar, Z.P.; Xiong,
23 Y.; Zeng, Z.; Wei, H. (2013). Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -
24 Polylysine. Biochemical and Biophysical Research Communications, 439, 148-
25 153.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo excessivo de sódio é considerado um problema de saúde pública por ser o principal fator de risco para a hipertensão arterial, doença que mais acomete e leva a óbitos no mundo. Produtos cárneos, como embutidos, representam cerca de 20-30% do consumo diário de sódio, o que justifica a redução do cloreto de sódio, um importante ingrediente que atua na conservação destes produtos.

Indústrias de alimentos brasileiras vêm trabalhando nas metas propostas pelo Ministério da Saúde para redução de sódio nos produtos industrializados. Para a indústria cárnea a redução de sódio é um desafio, principalmente do ponto de vista de segurança alimentar e de estabilidade dos produtos, visto que o sódio desempenha importante função no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes.

Nesse sentido, este estudo mostrou a possibilidade do emprego da combinação de Nisina e ϵ -Poly-L-Lysina, dois antimicrobianos naturais, na formulação de linguiça Calabresa cozida reduzida de sódio, visto que conseguiu controlar o crescimento do principal grupo de bactérias deteriorantes, as bactérias ácido lácticas. A combinação dos antimicrobianos, nas doses testadas, não alterou as principais características físico-químicas das linguiças, permitindo o armazenamento em temperatura ambiente, sem sinais de deterioração. A análise sensorial demonstrou boa aceitação do produto pelos provadores.

Como etapas futuras do estudo sugere-se testar doses maiores dos antimicrobianos em linguiça Calabresa, visando o aumento do efeito antimicrobiano, testar a eficácia da combinação de antimicrobianos em outros microrganismos de importância em produtos cárneos e também em outras categorias de alimentos.

REFERÊNCIAS

- Abipecs (2010). Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Relatório Abipecs 2010, São Paulo. Disponível em www.abipecs.org.br. Acesso em 10 de fevereiro de 2016.
- Abipecs (2008). Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Relatório Abipecs 2008, São Paulo. Disponível em www.abipecs.org.br. Acesso em 10 de fevereiro de 2016.
- Assis, D. M.; Juliano, L.; Juliano, M. A. (2011). A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, 9, 344-355.
- Benli, H., Sanches-Plata, M.X., Keeton, J.T. (2011). Efficacy of ϵ -polylysine, lauric arginate, or acidic calcium sulfate applied sequentially for *Salmonella* reduction on membrane filters and chicken carcasses. Journal of Food Protection 74,743-750.
- Bidlas, E.; Lambert, R. J. W. (2008). Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. International Journal of Food Microbiology, 124, 98-102.
- Bier, D.; Tutija, J.; Pasquatti, T.N.; Oliveira, T.; Araújo, F.R.; Verbisck, N. (2017). Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *E. coli* isolados de carcaças bovinas. Pesquisa Veterinária Brasileira, 37 (12), 1373-1379.
- Blaiotta, G.; Pennacchia, C.; Ercolini, D.; Moschetti, G.; Villani, F. (2003). Combinig denaturing gradient gel eletrophoresis of 16S rDNAV3 region and 16S-235 rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of *Staphilococci* from Italian fermented sausages. Systematic Applied Microbiology, 26, 423-433.
- Borch, E.; Kant M. M. L.; Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. International Journal of Food Microbiology, 33, 103-120.
- Brasil, Ministério da Saúde. Acordo para reduzir teor de sódio em carnes e laticínios (2013). Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/servicos/33243-ministerio-da-saude-e-abia-fecham-acordo-para-reduzir-teor-de-sodio-em-carnes-e-laticinios.htm>. Acesso em 22 de fevereiro de 2016.

1 Brasil (2000). Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Normative
2 Instruction nº 4, March 31th, 2000. Technical regulation of sausage identity and
3 quality. DF, Official Journal of the Union.

4 Bruno, L. M. (2011). Manual de Curadores de Germoplasma –
5 Microrganismos: Bactérias Ácido-Láticas. Brasília, DF: Embrapa Recursos
6 Genéticos e Biotecnologia, jul. 2011.

7 Castro, A. P. (2017). Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas,
8 psicrotróficas, bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas
9 submetidas a tratamento com nisina. 91 f. Dissertação para obtenção do grau
10 de Mestre (Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos) –
11 Universidade de São Paulo.

12 Codex Alimentarius. General Standard for Food Additives - Codex Stan
13 192-1995. Adopted in 1995. Revision: 2015.

14 Compagnol, P. C. B.; Santos, B. A.; Terra, N. N.; Pollonio, M. A. R. (2012).
15 Lysine, disodium guanylate and disodium inosinate as flavor enhancers in low-
16 sodium fermented sausages. Meat Science, 91, 334-338.

17 Compagnol, P. C. B.; Santos, B. A.; Wagner, R.; Terra, N. N.; Pollonio, M.
18 A. R. (2011). The effect of yeast addition on quality of fermented sausages at
19 low NaCl content. Meat Science, 87, 290-298.

20 Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate
21 immunity for food. Nature Reviews/ Microbiology, 3, 773-788.

22 Delves-Broughton, J.; Blackburn, P.; Evans, R.J.; Hugenholtz, J. (1996).
23 Applications of the bacteriocin Nisin. Antonie van Leeuwenhork, 69, 193-202.

24 Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry.
25 Meat Science, 74, 188-196.

26 Fontana, C.; Bassi, D.; López, C.; Pisacane, V.; Otero, M.C.; Puglisi, E.;
27 Rebecchi, A.; Cocconcelli, P.S.; Vignolo, G. (2016). Microbial ecology involved
28 in the ripening of naturally fermented Ithama meat sausages. A focus on
29 lactobacilli diversity. International Journal of Food Microbiology, 236, 17-25.

30 Insumos, Pizzas e massas (2012). A linguiça Calabresa, 4, 31-34.
31 Disponível em: <www.insumos.com.br/pizzas_e_massas/materiais/127>.
32 Acesso em 18 de janeiro de 2016.

33 Galvão, M. T. (2014). Desafios da redução de sódio em produtos cárneos.
34 Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

1 Geornaras, I.; Sofos, J. N. (2005). Activity of ϵ -Polylysine against *E. coli*
2 O157:H7, *S. typhimurium* and *L. monocytogenes*. Journal of Food Science, 70,
3 404-408.

4 GRAS, GRAS notice for ϵ -Polylysine (2004). Division of Biotechnology
5 and GRAS notice Review. Center for food safety and applied nutrition. FDA.

6 GRAS, GRAS notice for ϵ -Polylysine (2010). Division of Biotechnology
7 and GRAS notice Review. Center for food safety and applied nutrition. FDA.

8 Grossi, A.; Jensen, J. S.; Knudsen, J. C.; Christensen, M.; Orlie, V.
9 (2012). Reduction of salt in pork sausages by the addition of carrot fibre ou
10 potato starch and high pressure treatment. Meat Science, 92, 481-489.

11 Hansen, L.T.; Huss, H. H. (1998). Comparison of the microflora isolated
12 from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. Food Research
13 International, 31, 703-711.

14 Hiraki, J.; Ichikawa, T.; Ninomiya, S.; Seki, H.; Uohama, K.; Kimura, S.;
15 Yanagimoto, Y.; Barnett, J.W. (2003). Use of ADME studies to confirm the safety
16 of ϵ -polylysine as a preservative in food. Toxicological Pharmacology, 37, 328-
17 340.

18 Holley, R.; Gill, C. O. (2005). Usos da atmosfera modificada para carnes e
19 produtos cárneos. Palestra. III Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de
20 Carnes, 27 a 29 de setembro de 2005.

21 Honghua, X.; Hui, L. (2000). Food and fermentation Industries:
22 Applications of Polylysine in milk preservation. Applied Chemical Industry, 2008-
23 2015.

24 Hu, P.; Zhou, G.; Xu, X.; Li, C.; Han, Y. (2009). Characterization of the
25 predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on
26 16S rDNA-DGGE. Food Control, 20, 99-104.

27 Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Vad, B. S.; Stenvang, M.; Otzen, D. E.; Meyer,
28 R. L. (2014). The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-L-lysine.
29 Applied and Environmental Microbiology, 80, 7758-7770.

30 Lerayer, A. L. S.; Viatta, A.; Moreno, I. (2015). Ação da nisina sobre
31 bactérias esporogênicas do gênero *Bacillus*. Tecnol. ITAL, ITAL Artigos
32 Técnicos.

1 Liu, H.; Pei, H.; Han, Z.; Feng, G.; Li, D. (2015). The antimicrobial effects
2 and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Poly-L-lysine
3 and Nisin against *Bacillus subtilis*. Food Control, 47, 444-450.

4 Ma, F.; Chen, C.; Zheng, L.; Zhou, C. (2013). Effect of high pressure
5 processing on the gel properties of salt-soluble meat protein containing CaCl_2
6 and K-carrageenan. Meat Science, 95, 22-26.

7 Morot-Bizot, S.; Talon, R.; Leroy-Setrini, S. (2003). Development of specific
8 PCR primers for a rapid and accurate identification of *S. xylosus*, a species
9 used in food fermentation. Journal of Microbiological Methods, 55, 279-286.

10 Najjar, M. B.; Kashtanov, D.; Chikindas, M. L. (2007). ϵ -Poly-L-lysine and
11 nisin A act synergistically against Gram positive food borne pathogens *Bacillus*
12 *cereus* and *Listeria monocytogenes*. Letters Applied in Microbiology, 45, 8-13.

13 Petracci, M.; Bianchi, M.; Mudalal, S.; Cavani, C (2013). Functional
14 ingredients for poultry meat products. Trends in Food Science and Technology,
15 33, 27-39.

16 Poroca, D.R.; Lima, A.S.; Lima, J.F.A.; Cruz, H.L.A.; Montenegro, R.A.
17 (2009). Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. Revista da
18 Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42, 716-722.

19 Portal da Saúde Brasil (2017). Excesso de sal pode causar doenças
20 cardiovasculares. Brasil, Governo Federal, 29 set. 2017.

21 Portal da Saúde Brasil (2019). Hipertensão afeta um a cada quatro
22 adultos no Brasil. Brasil, Governo Federal, 26 abril, 2019.
23 [http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45394-hipertensao-afeta-um-a-](http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45394-hipertensao-afeta-um-a-cada-quatro-adultos-no-brasil)
24 [cada-quatro-adultos-no-brasil](http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45394-hipertensao-afeta-um-a-cada-quatro-adultos-no-brasil)

25 Quere, F; Deschamps, A.; Urdaci, M.C. (1997). DNA probe and PCR-
26 specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology,
27 82, 783-790.

28 Riley, M.A.; Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity ecological and
29 evolutionary perspectives. Biochemie, 84, 357-364.

30 Ritter, R. (2003). Microbiologia contaminante e patogênica de linguiça
31 colonial analisada em quatro períodos distintos. Revista Higiene Alimentar, 17,
32 60-66.

33 Santos, B. A.; Campagnol, P. C. B.; Morgano, M. A.; Pollonio, M. A. R.
34 (2014). Monosodium glutamate, disodium inosinate, disodium guanylate, lysine

1 and taurine improve the sensory quality of fermented cooked sausages with
2 50% and 75% replacement of NaCl with KCl. Meat Science, 96, 509-513.

3 Silva, R. X. A.; José, K. F. C.; Franco, R.M.; Silva T.J.P. (2014). Lactato
4 de sódio, nisina e sua combinação na validade comercial da linguiça Toscana
5 embalada à vácuo e estocada a 4° C. Revista Ciência Rural, 44, 746-751.

6 Takahashi, H.; Kashimura, M.; Miya, S.; Kuramoto, S.; Koiso, H.; Kuda, T.;
7 Kimura, B. (2012). Effect of paired antimicrobial combinations on *Listeria*
8 *monocytogenes* growth inhibition in ready-to-eat seafood products. Food
9 control, 26, 397-400.

10 Tong Z.; Dong, L.; Zhou, J.; Hao, G.; Le, G.W. (2010). Nisin inhibits dental
11 caries- associated microorganism in vitro. Peptides, 31 (11), 2003-2008.

12 Turgis, M.; Vu,K,D.; Dupont, C.; Lacroix, M. (2012). Combined
13 antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against food borne
14 pathogens and food spoilage bacteria. Food Research International, 48, 696-
15 702.

16 Williams, J. G. K.; Hanafey, M.K.; Rafalski J. A.; Tingey S. V. (1993).
17 Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods in
18 Enzimology, 218, 704 - 40.

19 Ye, R.; Xu, H.; Wan, C.; Peng,S.; Wang, S.; Xu, h.; Aguilar, Z.P.; Xiong,
20 Y.; Zeng, Z.; Wei,H. (2013). Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -
21 Polylysine. Biochemical and Biophysical Research Communications, 439, 148-
22 153.

ANEXO A

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Data: ____/____/____

Você está recebendo amostras de linguiça Calabresa cozida. Faça sua avaliação para cada amostra usando a escala abaixo (com valores de 1 a 9) para descrever o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra em relação aos atributos: odor, cor, maciez, sabor e avaliação global.

9 Gostei muitíssimo

8 Gostei muito

7 Gostei regularmente

6 Gostei ligeiramente

5 Indiferente

4 Desgostei ligeiramente

3 Desgostei regularmente

2 Desgostei muito

1 Desgostei muitíssimo

Atenção: prove as amostras da esquerda para direita (em sentido horário) e siga esta ordem ao anotar o código de cada uma.

Código da amostra	Nota para odor	Nota para cor	Nota para maciez	Nota para sabor	Nota para avaliação global

Comentários (favor escrever qualquer observação em relação aos atributos observados na avaliação **sensorial da linguiça Calabresa**).

Ficamos gratos pela sua participação!

1
2 **ANEXO B**

3 **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

4
5 Pesquisador: Renata Ernlund Freitas de Macedo

6 Título da Pesquisa: ACEITABILIDADE DE LINGUIÇA CALABRESA COZIDA
7 COM REDUZIDO TEOR DE SÓDIO ADICIONADA DE ANTIMICROBIANOS
8 NATURAIS

9 Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

10 Versão: 3

11 CAAE: 80950617.9.0000.0020

12 Número do Parecer: 2.595.627

13 Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Os objetivos e a metodologia
14 apresentados estão adequados e de acordo com a Resolução 466/2012.

15 Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

16 Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão adequados e
17 em acordo com a Resolução
18 466/2012.

19 Recomendações: Sem recomendações.

20 Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Projeto aprovado.

21 Situação do Parecer: Aprovado

22 Necessita apreciação da CONEP: Não