

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

Renata Gomes Caetano

**DINÂMICA DA MICROBIOTA PRESENTE NO PROCESSO FERMENTATIVO DA
MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI**

Belo Horizonte
2024

Renata Gomes Caetano

**DINÂMICA DA MICROBIOTA PRESENTE NO PROCESSO FERMENTATIVO DA
MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda

Coorientadora: Profa. Dra. Verônica Ortiz Alvarenga

Belo Horizonte
2024

Ficha catalográfica

C128d Caetano, Renata Gomes.
Dinâmica da microbiota presente no processo fermentativo da mandioca para produção de tucupi [recurso eletrônico] / Renata Gomes Caetano. – 2024.
1 recurso eletrônico (129 f. : il.) : pdf

Orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.
Coorientadora: Verônica Ortiz Alvarenga.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Mandioca – Teses. 2. Fermentação – Teses. 3. Ácido láctico – Teses. 4. Levedura – Teses. 5. *Bacillus* (Bactéria) – Teses. I. Lacerda, Inayara Cristina Alves. II. Alvarenga, Verônica Ortiz. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:664.23

Folha de aprovação

10/10/2024, 15:40

SEI/UFMG - 3365182 - Folha de Aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DINÂMICA DA MICROBIOTA PRESENTE NO PROCESSO FERMENTATIVO DA MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI

RENATA GOMES CAETANO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 24 de abril de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda (Orientadora e Presidente da Comissão) - UFMG

Profa. Dra. Verônica Ortiz Alvarenga (Coorientadora) - UFMG

Profa. Dra. Denise Sande Santos Oliveira - UFMG

Profa. Dra. Fernanda Palladino Pedroso - UFSJ

Profa. Dra. Beatriz Martins Borelli - FAMINAS - BH

Dra. Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga - UFMG

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por Fernanda Palladino Pedroso, Usuário Externo, em 10/07/2024, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Beatriz Martins Borelli, Usuário Externo, em 10/07/2024, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga, Usuário Externo, em 12/07/2024, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Inayara Cristina Alves Lacerda, Membro de comissão, em 08/08/2024, às 14:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Verônica Ortiz Alvarenga, Professora do Magistério Superior, em 14/08/2024, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Denise Sande Santos Oliveira, Membro, em 10/10/2024, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

10/10/2024, 15:40

SEI/UFMG - 3365182 - Folha de Aprovação



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3365182 e o código CRC 913CCD85.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela força e oportunidade que me foi dada.

Aos meus pais e familiares, pela paciência e confiança, sei que não foi fácil conviver comigo nessa jornada.

À Professora Doutora Inayara Cristina Alves Lacerda, expresso minha profunda gratidão pela sua orientação, pelos conhecimentos compartilhados, pela dedicação e paciência, pela confiança depositada na realização deste trabalho, e pelo carinho e amizade. Receba o meu mais sincero obrigado!

À Professora Doutra Verônica Ortiz Alvarenga, minha gratidão pela orientação, paciência, carinho e amizade. Agradeço por ter suas portas abertas para mim quando eu mais precisava, e essas portas foram abertas inúmeras vezes, muito obrigada!

Ao Professor Doutor Carlos Augusto Rosa por todas as contribuições que foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Henrique Figueiredo, Professor Doutor Bruno Botelho e o doutorando Henrique Costa pelas contribuições para a realização deste trabalho.

A Larissa, pela coleta das amostras em Belém durante o período de pandemia. Muito obrigada.

A minha IC incrível e maravilhosa Marina Camargos, minha profunda gratidão por estar sempre ao meu lado, tanto nos momentos de alegria quanto nos de desafio. Agradeço imensamente pelo seu afeto, pelas risadas compartilhadas no laboratório, pelas lágrimas derramadas e pelos chocolates que adoçaram nossos dias. Enlouquecemos juntas nessa jornada intensa e, mesmo quando parecia impossível, conseguimos sobreviver. Não consigo encontrar palavras suficientes para expressar o quanto sou grata por você ter entrado na minha vida. Muito, muito obrigada!

A Marcela, Isabella e Priscyla, vocês são verdadeiramente incríveis. Agradeço profundamente pela amizade e carinho. Com vocês, o trabalho no laboratório se torna mais leve e prazeroso. Vocês irradiam uma energia positiva que é absolutamente contagiante. É um privilégio tê-las por perto. Vivemos juntas muitos momentos de risos e alegrias, e também de lágrimas (afinal, ninguém é de ferro). Minha gratidão a vocês é imensa!

A Ludmila e Elaine, as técnicas da época do mestrado que hoje tenho a alegria de chamar de amigas. Agradeço imensamente pelas conversas, pelo apoio, pelos materiais e por terem paciência comigo nos dias em que eu chegava no laboratório querendo colocar fogo no mundo. Muito obrigada!

A Bianca, que nos conhecemos quando todos estavam vivenciando o maior pesadelo já vivido, a pandemia. Sou extremamente grata pela amizade que construímos, pelos momentos de desabafo, pelas palavras de conforto, pelo afeto e pela assistência nos experimentos. Mantenha a força, tá acabando!

As meninas, Alice, Thais e Maisa, obrigada pela ajuda e por sempre terem um tempinho para me escutar.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pelas disciplinas lecionadas contribuindo meu aprendizado.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da UFMG pela oportunidade de realizar este doutorado.

Para todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste projeto, meu sincero agradecimento.

Antes, a questão era descobrir se a vida precisava de ter algum significado para ser vivida. Agora, ao contrário, ficou evidente que ela será vivida melhor se não tiver significado.

Albert Camus

RESUMO

A mandioca é o substrato utilizado em diversos alimentos fermentados e é a base da dieta alimentar das populações nos países sul-americanos, asiáticos e africanos. No Brasil, ela é um dos principais cultivos tradicionais no setor agrícola, pois serve como uma fonte de alimento para as famílias nas regiões norte e nordeste do país, onde muitos habitantes rurais dependem da produção e processamento da farinha de mandioca para seu sustento. O tucupi, um molho fermentado, é produzido a partir da fermentação espontânea da manipueira, um subproduto líquido resultante da prensagem da massa ralada da mandioca. Este ingrediente é muito valorizado na culinária paraense e do norte do Brasil, destacando-se por sua cor amarela, o baixo pH, alta acidez total, baixo teor proteico e de cianeto total e livre. O objetivo deste estudo foi a caracterização molecular da microbiota envolvida no processo de fermentação da mandioca para produção de tucupi, utilizando culturas iniciadoras selecionadas com o intuito de aprimorar a qualidade do produto final. Além disso, as amostras coletadas durante a fermentação e do produto final foram avaliadas quanto ao perfil de compostos voláteis através de cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa (CG-MS). Para isso, as amostras coletadas da produção de tucupi e do produto final foram submetidas ao isolamento de bactérias do ácido láctico (BAL) em ágar *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS), de leveduras em meio ágar extrato de malte e levedura (YM), e de *Bacillus cereus* em ágar Manitol Egg Yolk Polymyxin (MYP). A identificação molecular foi realizada pela técnica de Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) para as BAL, a técnica de reação em Cadeia de Polimerase (PCR) *fingerprinting* GTG₅ para leveduras, e MALDI-TOF para *Bacillus* sp. A extração dos compostos voláteis foi realizada utilizando álcool etílico absoluto e tripolifosfato de sódio (1:1:1), sendo os compostos detectados por CG-MS. Das 119 amostras obtidas, foram isolados BAL (n = 67), levedura (n = 57) e *Bacillus* sp. (n = 100). A técnica de RFLP identificou duas espécies de BAL: *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* e *Limosilactobacillus fermentum*, sendo *L. plantarum* a espécie mais prevalente. A técnica de PCR permitiu a identificação das espécies de *Pichia scutulata* e *Yarrowia lipolitica*, sendo *P. scutulata* a mais predominante. A técnica de MALDI-TOF identificou as espécies de *Bacillus cereus* sensu stricto (69%), *Bacillus subtilis* (8%), *B. atrophaeus*, *B. mojavensis* e *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* representando 1% dos isolados. A cultura iniciadora P1, que continha *L. plantarum*, *L. fermentum* e *P. scutulata*, apresentou um melhor desempenho para *L. plantarum*, sendo a espécie mais presente durante a fermentação. A *P. scutulata* atingiu sua maior contagem nas primeiras 5 horas de fermentação quando combinada com *L. plantarum* (P5). A espécie *B.*

cereus s.s. foi encontrada em todas as amostras do produto final, e todas excederam o limite de 10^2 UFC/mL estabelecido pela Instrução Normativa Adepára nº 1 de 2008, sugerindo que as condições higiênico-sanitárias são inadequadas no que diz respeito à presença deste patógeno. Entre os ácidos carboxílicos identificados, o ácido acético se destacou como o composto predominante durante o processo de fermentação da mandioca para a produção de tucupi em escala piloto.

Palavras-chave: mandioca; fermentação; tucupi; bactéria do ácido láctico; leveduras; *Bacillus* sp.; cultura iniciadora.

ABSTRACT

In South American, Asian, and African countries, cassava serves as the substrate for various fermented foods and forms the foundation of their diets. In Brazil, it is one of the main traditional crops in the agricultural sector, as it serves as a source of food for families in the northern and northeastern region of the country, where many rural inhabitants lack the production and processing of cassava flour for their livelihood. Tucupi, a fermented sauce, is produced from the spontaneous fermentation of manipueira, a liquid byproduct resulting from the pressing of grated cassava dough. This ingredient is highly valued in the cuisine of Pará and northern Brazil, standing out for its yellow color, low pH, high total acidity, low protein, and total and free cyanide content. The objective of this study was the molecular characterization of the microbiota involved in the cassava fermentation process to produce tucupi, using selected starter cultures to improve the quality of the final product. Furthermore, samples collected during the fermentation and the final product were evaluated for volatile compound profiles by a gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS). For this purpose, samples collected from tucupi production, and the final product were subjected to the isolation of lactic acid bacteria (LAB) on Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar, yeasts on malt extract and yeast (YM) agar, and *Bacillus cereus* on Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar. Molecular identification was performed by the Restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique for LAB, the Polymerase Chain Reaction (PCR) fingerprinting GTG₅ technique for yeast, and MALDI-TOF for *Bacillus* sp. The extraction of volatile compounds was performed using absolute ethyl alcohol and sodium tripolyphosphate (1:1:1), and the compounds were detected by GC-MS. From 119 samples obtained, LAB (n = 67), yeast (m = 57), and *Bacillus* sp. (n = 100) were isolated. The RFLP technique included two LAB species: *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* and *Limosilactobacillus fermentum*, with *L. plantarum* being the most prevalent species. The PCR technique identified *Pichia scutulata* and *Yarrowia lipolytica* species, with *P. scutulata* being the most predominant. The MALDI-TOF technique included *Bacillus cereus* sensu stricto (69%), *Bacillus subtilis* (8%), *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojavensis*, and *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, representing 1% of the isolates. The starter culture P1, which contained *L. plantarum*, *L. fermentum*, and *P. scutulata*, showed better performance for *L. plantarum*, the most present species during the fermentation. *P. scutulata* reached its highest count in the first 5 hours of fermentation when combined with *L. plantarum* (P5). The species *B. cereus* s.s. was found in all samples of the final product, and all exceeded the limit of 10² CFU/ml established by Adepará Normative Instruction No. 1 of 2008,

demonstrating that hygienic-sanitary conditions are flexible about the presence of this pathogen. Among the carboxylic acids identified, acetic acid stands out as the predominant compound during the cassava fermentation process to produce tucupi on a pilot scale.

Keywords: cassava; fermentation; tucupi; lactic acid bacteria; yeast; *Bacillus* sp; initiating culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de tucupi..	28
Figura 2 – Fluxograma de obtenção da manipueira.....	65
Figura 3 – Manipueira em fermentação.....	65
Figura 4 – Contagens populacionais de BAL, leveduras e <i>Bacillus</i> sp. (log UFC.mL ⁻¹) – amostras em fermentação e produto final.....	74
Figura 5 – Perfil de digestão de espécies de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados do tucupi. Canaleta 1: 1 KB DNA padrão de peso molecular; 2-13 e 20-22: <i>L. plantarum</i> (<i>MspI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i>); 14-16: <i>L. fermentum</i> (<i>MspI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i>).....	76
Figura 6 – Contagens populacionais de BAL e leveduras (log UFC.mL ⁻¹) – no tucupi produzido em escala piloto.....	79
Figura 7 – Contagens populacionais (log UFC.mL ⁻¹) de BAL e levedura durante a fermentação de mandioca para produção de tucupi em escala piloto (teste de bancada).....	79
Figura 8 – Contagens populacionais (log UFC.mL ⁻¹) de BAL e levedura durante a fermentação de mandioca para produção de tucupi em escala piloto.....	81
Figura 9 – Testes bioquímicos convencionais para identificação das espécies do grupo <i>B. cereus</i> sensu lato (%).....	83
Figura 10 – Árvore filogenética de <i>Bacillus</i>	86
Figura 11 – Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi em fermentação com inóculo <i>L. fermentum</i>	99
Figura 12 – Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi em fermentação com inóculo <i>L. fermentum</i> e <i>P. scutulata</i>	100

Figura 13 – Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi em fermentação com inoculo <i>L. plantarum</i>	100
Figura 14 – Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi em fermentação com inoculo <i>L. plantarum</i> e <i>P. scutulata</i>	101
Figura 15 – Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi produto final....	101
Figura 16 – Concentração de ácido acético, ácido lático, glicerol e L-valina em amostras de tucupi em fermentação e no produto final.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras de tucupi envolvidas na produção de tucupi.....	60
Tabela 2 – Culturas iniciadoras testadas para produção de tucupi em escala piloto.....	66
Tabela 3 – Identificação e concentração (%) de compostos voláteis identificados em amostras de tucupi em escala piloto e produto final após análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	102

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO 1: SUCESSÃO MICROBIANA ENVOLVIDA NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA: Revisão bibliográfica.....	22
1 MANDIOCA	23
2 TUCUPI.....	26
3 MICROBIOTA ENVOLVIDA NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA.....	29
3.1 Bactérias do ácido láctico.....	29
3.2 Leveduras	30
3.3 Bacillus sensu lato.....	31
3.4 Bacillus cereus sensu stricto	31
3.5 Presença de Bacillus spp. mandioca.....	32
3.6 Bactéria acética	33
3.7 Produtos fermentados obtidos da fermentação da mandioca	34
3.7.1 Tucupi.....	34
3.7.2 Polvilho doce e azedo.....	35
3.7.3 Cauim	36
3.7.4 Caxiri.....	37
3.7.5 Puba.....	37
3.7.6 Chicha.....	38
3.7.7 Lafun / Kokonte	39
3.7.8 Gari.....	40
3.7.9 Fufu.....	41
3.7.10 Agbelima.....	42
4 CULTURAS INICIADORAS.....	44
REFERÊNCIAS	46

CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA PRESENTE NO PROCESSO FERMENTATIVO DE MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Coleta de amostras	60
2.2 Isolamento, quantificação e identificação dos micro-organismos.....	60
2.2.1 <i>Bactérias do ácido láctico</i>	60
2.2.2 <i>Leveduras</i>	61
2.3 Identificação molecular das bactérias do ácido láctico em amostras de tucupi comercial.....	61
2.3.1 <i>Extração de DNA.....</i>	61
2.3.2 <i>Amplificação por PCR da região 16S do gene rRNA.....</i>	62
2.3.3 <i>Agrupamento pela análise dos perfis moleculares obtidos por RFLP</i>	62
2.4 Identificação molecular das leveduras.....	63
2.4.1 <i>Extração de DNA.....</i>	63
2.4.2 <i>Agrupamento por PCR fingerprinting.....</i>	63
2.5 Produção de tucupi em escala piloto e micro-organismos utilizados no estudo	64
2.5.1 <i>Produção de tucupi em escala piloto</i>	64
2.6 Monitoramento molecular das culturas iniciadoras durante a fermentação da mandioca para produção de tucupi	67
2.6.1 <i>Isolamento das bactérias do ácido láctico</i>	67
2.6.2 <i>Monitoramento molecular</i>	68
2.7 Isolamento das leveduras	68
2.7.1 <i>Extração de DNA das leveduras.....</i>	68
2.7.2 <i>Análise dos perfis moleculares obtidos por PCR fingerprinting.....</i>	68
2.8 Isolamento, identificação e quantificação de <i>Bacillus</i> sp.	68
2.8.1 <i>Bacillus cereus contagem de células vegetativas</i>	68
2.8.2 <i>Bacillus cereus contagem de esporos</i>	69
2.9 Identificação fenotípica do grupo <i>Bacillus cereus</i> sensu lato.....	69
2.9.1 <i>Teste de resistência a lisozima</i>	69
2.9.2 <i>Utilização anaeróbica de glicose</i>	69
2.9.3 <i>Redução do nitrato</i>	70
2.9.4 <i>Teste de Voges-Proskauer (VP).....</i>	70

2.9.5 Decomposição da tirosina.....	70
2.9.6 Cristais parasporais.....	70
2.9.7 Motilidade.....	71
2.9.8 Crescimento rizoide.....	71
2.9.9 Atividade hemolítica.....	71
2.9.10 Teste de catalase.....	71
2.9.11 Coloração de Gram.....	71
2.9.12 Atividade proteolítica, amilolítica e lipolítica.....	72
2.9.13 Teste de psicrotolerantes.....	72
2.10 Identificação molecular por Maldi-ToF MS.....	72
2.11 Análise filogenética.....	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
3.1 Coleta de amostras e isolamento de micro-organismos presentes no tucupi.....	74
3.2 Identificação molecular de BAL em amostras de tucupi comercial.....	76
3.3 Monitoramento molecular das culturas iniciadoras durante a fermentação da mandioca para produção de tucupi.....	78
3.4 Identificação de <i>Bacillus cereus</i> “sensu lato”.....	82
3.5 Identificação molecular por MALDI-TOF MS.....	84
3.6 Análise filogenética.....	86
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS.....	89
CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NA FERMENTAÇÃO DA MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI.....	95
1 INTRODUÇÃO.....	96
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
2.1 Coleta de amostras.....	97
2.2 Análise do perfil dos compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	97
2.2.1 Extração dos compostos voláteis.....	97
2.2.2 Identificação de compostos voláteis.....	97
3 RESULTADOS.....	99

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE A - Identificação de <i>Bacillus</i> sensu stricto através de testes bioquímicos..	107
ANEXO A – Artigo.....	112

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os alimentos fermentados têm grande importância mundial, pois a fermentação de determinadas matérias-primas ajudam a eliminar fatores antinutricionais e toxinas, melhorando assim o valor nutricional (Liu; Han; Zhou, 2011; Santos *et al.*, 2012; Freire, 2013; Terefe, 2016; Waisundara, 2018), as propriedades organolépticas e prolongando a vida de prateleira do produto em comparação às matérias-primas utilizadas no processamento de alimentos. A mandioca é o substrato utilizado em diversos alimentos fermentados e é a base da dieta alimentar das populações nos países sul-americanos, asiáticos e africanos. A fermentação não só aumenta a detoxificação destes alimentos, mas também enriquece a dieta através do desenvolvimento de variedade de sabores, aromas e texturas, ao mesmo tempo que melhora a qualidade e segurança higiênica, uma vez que durante este processo os micro-organismos produzem uma série de metabólitos (ácidos orgânicos, etanol e bacteriocinas) que podem impedir o crescimento e a sobrevivência de micro-organismos indesejados (Liu; Han; Zhou, 2011; Santos *et al.*, 2012; Freire, 2013; Waisundara, 2018).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), também conhecida como tapioca, *manioc* ou *yuca* (Alonso-Gomez *et al.*, 2016; Waisundara, 2018), é uma planta nativa da Amazônia (Demiate; Kotovicz, 2011). No Brasil, ela é um dos principais cultivos tradicionais no setor agrícola (Santos *et al.*, 2012). Ela serve como uma fonte de alimento para as famílias nas regiões norte e nordeste do país, onde muitos habitantes rurais dependem da produção e processamento da farinha de mandioca para seu sustento (Chisté; Cohen, 2011). A raiz tuberosa da mandioca, que é rica em carboidratos, é a parte mais utilizada da planta. É empregada de várias maneiras, seja como alimento para humanos e animais, seja como matéria-prima na indústria alimentícia para a produção de itens importantes como farinha de mandioca, fécula, tucupi, *chicha*, *lafun* e o polvilho doce e azedo (Coelho, 2008; Corrêa, 2010; Starling, 2010; Ogori; Gana, 2013; Adebayo-Oyetero *et al.*, 2013; Piló *et al.*, 2018; Brito *et al.*, 2023).

A produção de farinha é uma das maneiras de se aproveitar as raízes de mandioca. No processo de fabricação, as raízes são trituradas e prensadas para remover o líquido, e a massa resultante é torrada. O líquido residual deste processo é conhecido como manipueira (Campos; Carvalho; Mattietto, 2016). Após a fermentação espontânea da manipueira, obtém-se o tucupi, um molho fermentado (Chisté; Cohen; Oliveira, 2007; Campos; Carvalho; Mattietto, 2016). Este

ingrediente é muito valorizado e amplamente utilizado na culinária do Pará e do norte do Maranhão (Chisté; Cohen, 2011; Campos; Carvalho; Mattietto, 2016).

Considerando a importância da mandioca na dieta global, é necessário o estudo da microbiota envolvida durante o processo fermentativo do tucupi. Além disso, é fundamental uma revisão que integre as recentes descobertas e apresente de maneira estratégica os benefícios e limitações dos produtos derivados da mandioca, incluindo os micro-organismos envolvidos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é propor o uso de culturas iniciadoras para a padronização do processo de produção de tucupi.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo a caracterização molecular da microbiota presente na de fermentação espontânea da mandioca para produção do tucupi, bem como a microbiota envolvida no processo fermentativo utilizando culturas iniciadoras selecionadas, com o objetivo de melhorar a qualidade do produto final. Além disso, as amostras coletadas durante a fermentação e do produto final foram avaliadas quanto ao perfil de compostos voláteis por cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar Bactérias lácticas (BAL) e Leveduras das amostras envolvidas na produção de tucupi;
- Isolar e identificar bactérias do ácido láctico e leveduras do tucupi, produzido em escala piloto e no produto final comercial;
- Isolar e identificar *Bacillus cereus* sensu stricto no tucupi produto final;
- Produzir o tucupi em escala piloto utilizando culturas puras e mistas das linhagens de bactérias do ácido láctico (BAL) e levedura selecionadas;
- Realizar o monitoramento molecular das culturas iniciadoras durante a fermentação de mandioca para produção de tucupi, em escala piloto;
- Analisar o perfil volátil por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa de amostras de tucupi em fermentação e do tucupi comercial.

CAPÍTULO 1

SUCESSÃO MICROBIANA ENVOLVIDA NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA: Revisão bibliográfica

1 MANDIOCA

A mandioca foi domesticada há cerca de 9.000 anos por populações pré-cabralinas, na região entre a floresta Amazônica e o Cerrado. Atualmente estão localizadas no Amazonas, Mato Grosso e Rondônia. A domesticação ocorreu com a espécie endêmica de *Manihot flabellifolia* resultando na espécie *Manihot esculenta* que tem a capacidade de se propagar vegetativamente por meio de pequenos seguimentos das hastes (Valle; Lorenzi, 2014). É uma planta arbustiva lenhosa perene com raízes tuberosas e pertencentes à família Euphorbiaceae (Alonso-Gomez *et al.*, 2016) originada na região amazônica (Demiate; Kotovicz, 2011).

É uma importante cultura alimentar cultivada em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, América Latina e África (Di-Tanno, 2001; Coelho, 2008; Ferrarezzo, 2011; Caetano, 2018; Okoth; Matofari; Nduko, 2022). Com uma produção de cerca de 285 milhões de toneladas de raízes não processadas, ela é o quinto alimento básico mais importante do mundo (Brito *et al.*, 2019). Entre as tuberosas, é um dos principais alimentos energéticos, perdendo apenas para o arroz, o trigo e o milho (Di-Tanno, 2001; Coelho, 2008; Ferrarezzo, 2011; Caetano, 2018; Okoth; Matofari; Nduko, 2022).

Em fevereiro de 2018, a produção brasileira de raízes de mandioca foi de 20,8 milhões de toneladas em 1,4 milhões de hectares, segundo o IBGE (Soares, 2018). O Pará é a maior safra do Brasil, com uma produção de 4,19 milhões de toneladas em 2017, e a agricultura familiar é responsável por mais da metade da produção de mandioca no país. O cultivo de mandioca é de grande importância para a comunidade amazônica. Isso porque o cultivo de mandioca e a produção da farinha são realizados pelas famílias, sendo a principal fonte de renda das mesmas (Lobo; Júnior; Nunes, 2018).

No Brasil, os estados que se destacaram como principais produtores foram o Pará (4.234,597 t), o Paraná (3.046,721 t) e a Bahia (2.078,752 t). Minas Gerais ocupou a oitava posição, com uma produção de 840.897 t, enquanto o Distrito Federal ficou em último lugar, com apenas 10.185 t (Leopoldo; Fernandes, 2017).

A mandioca é uma planta cianogênica, ou seja, acumula dois glicosídeos cianogênicos, a linamarina e lotaustralina (Cassoni, 2008; Starling, 2010; Nwosu *et al.*, 2014; Rosales-Soto *et al.*, 2016). É classificada em três categorias de acordo com seu teor de ácido cianídrico (HCN). Se mais de 100 mg de HCN for produzido por quilo de polpa fresca, é altamente tóxico. É

moderadamente tóxico, produzindo 50-100 mg de HCN por quilo de polpa fresca. Não é tóxico quando produz menos de 50 mg de HCN por quilo de polpa fresca (Nicolau, 2016; Lu *et al.*, 2020).

A ingestão da mandioca crua pode resultar em envenenamento por cianeto, levando a sintomas como vômitos, náuseas, tonturas, dores abdominais e de cabeça, e pode ser fatal se a exposição for a doses letais (Nicolau, 2016). O consumo constante e regular de cianogênicos pode levar ao bócio e, em situações mais severas, a um distúrbio neurológico chamado *konzo*, que provoca paralisia irreversível das pernas, afetando principalmente crianças e mulheres jovens (Oliveira *et al.*, 2012; Banea *et al.*, 2012, 2013; Okoth; Matofari; Nduko, 2022). A maior concentração de cianeto se encontra nas raízes e na casca da mandioca, sendo que a casca é removida durante o processamento. O processo de secagem ao sol, seguido de fermentação e/ou cozimento, evapora esse composto, tornando a mandioca mais segura para o consumo humano (Nicolau, 2016).

A farinha de mandioca é o principal produto derivado da mandioca e sua aplicação mais comum na indústria (Dias; Leonel, 2006; Souza *et al.*, 2008; Shittu *et al.*, 2016; Isa *et al.*, 2021). Em muitos países em desenvolvimento, é frequentemente usada tanto como ração para animais quanto como alimento para humanos. No norte do Brasil, é uma das principais fontes de energia, onde o amido constitui 20-25% de todos os carboidratos (Dias; Leonel, 2006; Souza *et al.*, 2008; Isa *et al.*, 2021). Conforme a legislação brasileira, a farinha de mandioca é caracterizada como um produto obtido das raízes de mandioca do gênero *Manihot*, após passar por um processo de produção e processamento tecnológico adequado (Brasil, 2011). O preparo envolve o descascamento e a ralação das raízes de mandioca, seguidos de uma breve torrefação (Dias; Leonel, 2006).

As folhas de mandioca possuem aproximadamente 17 a 38% de proteína (Chaiareekitwat *et al.*, 2022), 12 a 16% de carboidratos, 1% de lipídio e minerais como ferro e cálcio. Apesar do alto valor nutricional das folhas, a presença de antinutrientes de ocorrência natural, como glicosídeos cianogênicos tóxicos, ácidos fítics, alto teor de fibras, polifenóis, saponinas, oxalatos e até mesmo taninos, reduz o seu uso (Okoth; Matofari; Nduko, 2022).

No norte do Brasil, as folhas da mandioca são utilizadas para preparar a maniçoba, um prato típico da cozinha regional. As folhas de mandioca são tradicionalmente moídas e cozidas por

aproximadamente oito dias. Adiciona-se artigos defumados como charque, toucinho, chouriço e outros, e é servido com arroz branco cozido e é encontrada nos melhores restaurantes e barracas de comidas típicas (Cereda; Vilpoux, 2003; Caetano, 2018). Nos países da África Central e Ocidental, como Congo, Guiné, Serra Leoa e Libéria, as folhas representam cerca de 60% dos vegetais consumidos. Na região costeira do Quênia, as folhas são consumidas em quantidades moderadas, porém grandes quantidades não são utilizadas e são descartadas após a colheita das raízes (Okoth; Matofari; Nduko, 2022).

2 TUCUPI

Durante o processo de produção da farinha de mandioca, é gerado um líquido residual conhecido como manipueira (Chisté; Cohen; Oliveira, 2007; Cassoni, 2008; Dias; Rodrigues; Calixto, 2016; Caetano, 2018; Brito *et al.*, 2019; Carmo *et al.*, 2019; Campos; Mattietto; Carvalho, 2019). Esse líquido passa por um processo de fermentação espontânea que dura até 24 horas. Após a cocção, é possível obter um produto de alto valor comercial na região norte do país, conhecido como tucupi (Chisté; Cohen; Oliveira, 2007; Modesto Júnior, 2012; Campos; Carvalho; Mattietto, 2016; Caetano, 2018; Costa; Carmo; Pena, 2018; Carmo *et al.*, 2019; Brito *et al.*, 2023).

O tucupi, um molho fermentado produzido de forma artesanal, é um condimento característico do Pará, Amazonas e norte do Maranhão (Cereda; Vilpoux, 2003; Cassoni, 2008; Costa; Rodrigues; Pena, 2019). Com um sabor único, é o ingrediente principal do famoso prato paraense, o pato no tucupi. Além disso, é usado no preparo do tradicional tacacá e em molhos de pimenta-de-cheiro e malagueta. Sua versatilidade permite que seja utilizado no preparo de vários pratos à base de molho como peixe, camarão, entre outros (Cereda; Vilpoux, 2003; Chisté; Cohen; Oliveira, 2007; Modesto Júnior, 2012; Modesto Júnior; Alves, 2014; Caetano, 2018; Carmo *et al.*, 2019; Campos; Mattietto; Carvalho, 2019).

O Regulamento Técnico de Padrão de Identidade e Qualidade caracteriza o tucupi como um produto ou subproduto derivado da raiz de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e suas variedades, obtido através de processos tecnológicos adequados. Este produto é amplamente utilizado na culinária paraense e deve apresentar as seguintes características: duas fases distintas, uma sólida e outra líquida, cor que varia do amarelo claro ao amarelo intenso quando homogeneizado; sabor e aroma levemente ácidos. Ingredientes como sal, açúcar, alho e vegetais tradicionalmente usados na culinária podem ser adicionados (Brasil, 2008).

A produção do tucupi começa com a lavagem e o descascamento manual das raízes da mandioca (Cereda; Vilpoux, 2003; Campos; Carvalho; Mattietto, 2016; Caetano, 2018; Brito *et al.*, 2023). As raízes são então trituradas no *catitu* (ralador) para formar uma massa (Cereda; Vilpoux, 2003; Chisté; Cohen; Oliveira, 2007; Cassoni, 2008; Campos; Carvalho; Mattietto, 2016; Dias; Rodrigues; Calixto, 2016; Caetano, 2018). A massa é prensada para extrair um líquido

conhecido como manipueira, que contém altas concentrações de HCN (Figura 1) (Cereda; Vilpoux, 2003; Dias; Rodrigues; Calixto, 2016; Caetano, 2018; Brito *et al.*, 2023).

A manipueira passa por um processo de fermentação que reduz os níveis de HCN. Isso ocorre através de uma hidrólise do cianeto livre, mediada pela enzima linamarina, diminuindo a toxicidade do líquido e tornando-o seguro para o consumo (Chisté; Cohen, 2011; Dias; Rodrigues; Calixto, 2016; Caetano, 2018; Brito *et al.*, 2023). A fermentação é realizada à temperatura ambiente por cerca de 24 horas. Durante esse tempo, o amido no líquido decantado se transforma em goma (Chisté; Cohen; Oliveira, 2007; Dias; Rodrigues; Calixto, 2016; Caetano, 2018).

Geralmente, a fermentação é realizada em tanques de cimento revestidos com azulejos ou em bombonas de plástico. Após a fermentação, o líquido sobrenadante (tucupi cru) é fervido por cerca de uma hora, onde pode observar a formação de uma espuma. Nos últimos 20 minutos de fervura, podem ser adicionados temperos como chicória, sal e pimenta de cheiro (Chisté; Cohen; Oliveira, 2007; Dias; Rodrigues; Calixto, 2016; Caetano, 2018).

É comum que as unidades de processamento no Norte do país adicionem corantes artificiais ao tucupi. Embora essa prática não seja oficialmente documentada, é uma rotina nas unidades de processamento. O objetivo é dar ou intensificar a cor amarela do produto, tornando-o mais atraente para os consumidores. Corantes como o amarelo de tartrazina (limite máximo de 0,005-0,03g/100g ou 100 mL) são usados sem critérios definidos. Grupos de saúde e órgãos reguladores discutem o uso do amarelo de tartrazina, pois tem sido associado a reações alérgicas, como asma brônquica e urticaria, especialmente em pessoas alérgicas ao ácido acetilsalicílico (Abreu; Mattietto, 2016; Caetano, 2018).

Figura 1 - Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de tucupi



Fonte: Adaptado de COHEN *et al.* (2007, p.12).

3 MICROBIOTA ENVOLVIDA NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA

A fermentação da mandioca, que pode ser realizada em estado sólido ou imersa em água por períodos variáveis (dias, semanas ou meses), resulta na produção de diversos alimentos e bebidas. Este processo ocorre devido a uma variedade micro-organismos que elevam a acidez titulável durante o processo, resultando em uma população dominada por bactérias produtoras de ácido láctico e leveduras (Caetano, 2018; Coelho, 2008; Di-Tanno, 2001; Lacerda, 2002, 2006). Durante a fermentação, a fécula de mandioca passa por várias alterações, graças à presença de uma microbiota diversificada proveniente da matéria-prima, da água e do ambiente. O único substrato utilizado é uma suspensão de amido granular em água (Caetano, 2018; Coelho, 2008; Lacerda, 2002, 2006; Penido, 2019).

3.1 Bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico (BAL), são um conjunto variado de micro-organismos que se encontram em diferentes ecossistemas. Elas são amplamente utilizadas em processos de fermentação para a produção de alimentos (Avancini, 2007; Caetano, 2018; Huertas, 2010).

Segundo Zheng *et al.* (2020), as BAL constituem um grupo natural de organismos Gram-positivos, que não formam esporos, são anaeróbicas facultativas e fermentam carboidratos e álcoois para produzir principalmente ácido láctico como principal produto final (Todorov; Franco, 2010). São heterotróficas, possuem necessidades nutricionais complexas e são negativas para catalase (Coelho, 2008; Huertas, 2010; Todorov; Franco, 2010; Penido, 2019; Ringø *et al.*, 2018).

Na indústria alimentícia, as bactéria do ácido láctico têm um papel crucial durante a fermentação, não apenas pela sua capacidade de acidificar, reduzindo o pH para um valor suficientemente baixo para inibir o crescimento de bactérias patogênicas mais comuns, mas também por preservar os alimentos (Caetano, 2018; Penido, 2019). Além disso, elas contribuem para o desenvolvimento da textura, sabor, cheiro e aroma dos alimentos fermentados (Huertas, 2010; Caetano, 2018). As bactérias lácticas são classificadas em dois grupos, homofermentativas e heterofermentativas, com base no produto final de sua fermentação (Carr; Chill; Maida, 2002; Todorov; Franco, 2010; Caetano, 2018). As bactérias homofermentativas produzem principalmente o ácido láctico a partir da fermentação da glicose. Por outro lado, as

bactérias heterofermentativas, além do ácido láctico, produzem dióxido de carbono, ácido acético e etanol. Os gêneros *Streptococcus* e *Pediococcus*, são exemplos de bactérias homofermentativas, enquanto *Leuconostoc* e *Lactobacillus* são exemplos de bactérias lácticas heterofermentativas (Carr; Chill; Maida, 2002; Todorov; Franco, 2010; Caetano, 2018).

Recentemente, os cientistas concordaram em resolver uma questão relacionada ao gênero *Lactobacillus*. Eles perceberam que, devido à estrutura genética dessas bactérias, o gênero *Lactobacillus* atual era muito diversificado e não seguia as convenções de nomenclatura. Portanto, foi proposta e aceita uma nova classificação. As espécies que antes pertenciam ao gênero *Lactobacillus* agora são divididas em 25 gêneros, incluindo 23 novos. Por exemplo, *Lactobacillus plantarum* agora é conhecido como *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* e *Lactobacillus fermentum* agora é *Limosilactobacillus fermentum* (Zheng *et al.*, 2020).

3.2 Leveduras

As leveduras, que são micro-organismos unicelulares, de formato oval e de tamanho superior às bactérias (Tortora; Funke; Case, 2012), são classificadas como fungos (Raven; Eichhorn, 2014). Seu crescimento vegetativo ocorre principalmente através de processo de brotamento ou fissão, e não formam seus estados sexuais dentro ou sobre um corpo frutífero (Kurtzman; Fell; Boekhout, 2011).

Na fermentação tradicional de produtos derivados da mandioca, as leveduras são comumente associadas às BAL, que são predominantes neste tipo de fermentação (Penido, 2013; Caetano, 2018; Penido, 2019). Há evidências da possível relação entre BAL e leveduras presentes em vários alimentos produzidos pela fermentação da mandioca. Isso ocorre porque as BAL criam um ambiente ácido que inibe o crescimento de alguns micro-organismos, mas favorece o crescimento das leveduras, durante a fermentação submersa, somente as bactéria lácticas e as leveduras conseguem resistir às condições extremamente ácidas que geralmente se formam no final da fermentação (Lacerda, 2002; Caetano, 2018).

3.3 *Bacillus sensu lato*

O gênero *Bacillus* é composto por uma ampla variedade de espécies bacterianas. Essas bactérias podem ser caracterizadas como bastonetes Gram-positivos, que são aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, capazes de produzir esporos. Além disso, são resistentes a condições adversas, como calor, desidratação, ambientes ácidos e à radiação ultra violeta (UV) (Ehling-Schulz; Frenzel; Gohar, 2015; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018; Ehling-Schulz; Lereclus; Koehler, 2019). Esses micro-organismos que são saprófitos e móveis, são catalase-positivos e produzem células vegetativas que têm a capacidade de se multiplicar e possuem a habilidade genética para a formação de esporos (Rabinovitch; Oliveira, 2015). Devido à sua alta resistência, as espécies do grupo *Bacillus cereus* são encontradas em todo o mundo, sendo principalmente isoladas do solo, que é seu principal reservatório (Ehling-Schulz; Frenzel; Gohar, 2015; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

Entre as espécies mais importantes do gênero *Bacillus*, destacam-se aquelas do grupo *Bacillus cereus sensu lato*, como *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* e *B. mycoides*. Essas espécies possuem linhagens com variados potenciais patogênicos e *B. thuringiensis*, que é comumente usado como agente de controle biológico em plantações. As espécies *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* e *B. toyonensis* também pertencem ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*, entretanto, são menos estudadas (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018; Ehling-Schulz; Lereclus; Koehler, 2019).

3.4 *Bacillus cereus sensu stricto*

A espécie *Bacillus cereus sensu stricto* é caracterizada como um bastonete Gram-positivo e aeróbio, que produz esporos centrais e subterminais. Ela é resistente a várias condições ambientais devido à sua habilidade de produzir endosporos (Ehling-Schulz; Frenzel; Gohar, 2015; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018; Ehling-Schulz; Lereclus; Koehler, 2019). Este micro-organismo tem grande relevância sanitária, pois a contaminação de alimentos por *B. cereus* tem sido associada à surtos alimentares, como a síndrome diarreica e a síndrome emética sendo as principais manifestações nos indivíduos (Paiva *et al.*, 2009; Carroll *et al.*, 2019; Bağcıoğlu *et al.*, 2019). No entanto, a simples presença dessa bactéria não implica necessariamente risco à saúde, a menos que a bactéria seja capaz de se multiplicar e atingir populações superiores a 10^3 células viáveis por grama (Silva *et al.*, 2010).

A síndrome diarreica está associada a presença de três enterotoxinas em alimentos contaminados: a enterotoxina Hemolisina BL (HBL), que é um agente hemolítico, formada por três componentes e é possivelmente o primeiro fator de virulência relacionado ao *Bacillus cereus*; a enterotoxina não hemolítica (*nhe*), que é semelhante à HBL e apresenta os mesmos sintomas em pessoas infectadas; e a citotoxina proteica *CytK* (Logan; Vos, 2009; Paiva *et al.*, 2009). Essas três enterotoxinas podem atuar sinergicamente entre si ou em conjunto com outros fatores de virulência, o que dificulta a previsão do potencial enterotóxico de uma cepa (Ehling-Schulz; Lereclus; Koehler, 2019). A síndrome diarreica é caracterizada por um período de incubação de 8 a 16 horas, mais comum entre 6 a 12 horas, apresentando os principais sintomas a diarreia intensa, dor abdominal, tenesmo retal e raramente náuseas e vômitos (Franco; Landgraf, 2005; Jay, 2005). Geralmente é uma doença autolimitada, porém, em alguns casos, a gravidade dos sintomas exigem internação hospitalar, o que pode levar o paciente à óbito (Ehling-Schulz; Lereclus; Koehler, 2019). Os principais alimentos envolvidos na patogênese desta doença são os vegetais crus e cozidos, massas, leite, sorvetes, produtos cárneos, pescados, arroz, pudins, sopas, purê de batata, entre outros (Jay, 2000).

A síndrome emética compreende em uma doença aguda e mais grave associada à intoxicação causada pela toxina cerulida, composta por um dipeptídeo ionofórico contendo α -amino e α -hidroxiácidos alternados (Ehling-Schulz; Frenzel; Gohar, 2015; Ehling-Schulz; Lereclus; Koehler, 2019). Trata-se de uma molécula altamente resistente ao calor e ao pH, sendo pré-formada no alimento e atuando no intestino delgado do indivíduo (Ehling-Schulz; Frenzel; Gohar, 2015). Os sintomas ocorrem rapidamente após a ingestão de alimentos contaminados, pois o período de incubação da doença é curto (1 a 6 horas). As principais manifestações clínicas associadas à síndrome emética são náuseas, vômitos, mal-estar geral e, em casos graves, podem ocorrer insuficiência hepática aguda e encefalopatia aguda. Os principais alimentos envolvidos nessa patogenia consistem em pratos de arroz fritos ou cozidos, creme pasteurizado, espaguete, purê de batata e brotos, além de vegetais (Jay, 2000; Franco; Landgraf, 2005; Ehling-Schulz; Lereclus; Koehler, 2019).

3.5 Presença de *Bacillus* spp. mandioca

Bacillus cereus é descrito como um patógeno de importância sanitária durante a fermentação de mandioca, Almeida *et al.* (2007), após analisarem a microbiota da bebida fermentada de mandioca *cauim* encontraram as espécies de *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus* e *B.*

circulans, das quais *B. licheniformis* foi a espécie predominante durante o processo fermentativo.

Chiste & Cohen (2006), em um estudo para avaliar o padrão de qualidade da farinha de mandioca do grupo seca, subgrupo fina, tipo 1, comercializadas nos principais supermercados e feiras da cidade de Belém, PA, foram encontradas em pequenas quantidades ($< 1 \times 10^1$ UFC/g) a espécie de *Bacillus cereus*, sendo que essa contagem está no limite permitido pela Resolução RDC n° 12 de 2001 (Brasil, 2001).

3.6 Bactéria acética

As bactérias acéticas são frequentemente conhecidas como agentes deteriorantes nas indústrias de bebidas, devido à sua capacidade de produzir sabores indesejáveis, aumentar a viscosidade e gerar formação de gás (Oliveira *et al.* 2010). Essas bactérias pertencem à família *Acetobacteraceae* e são classificadas em dois gêneros: *Acetobacter* e *Gluconobacter* (Cassoni, 2008; Spinosa, 2002).

As bactérias pertencentes ao gênero *Acetobacter* apresentam dimensões que variam entre 0,6 e 0,8 μm e possuem um formato de bastonetes elipsoidais, que podem ser retos ou ligeiramente curvados, ou cocos Gram negativos ou Gram variáveis e são aeróbicas. A motilidade dessas células é variável, e, quando são móveis, os flagelos estão localizados de forma periférica ou lateral. As colônias são geralmente pálidas e podem ser encontradas isoladas, em pares ou formando cadeias. No entanto, uma pequena proporção dessas colônias pode produzir pigmentos marrons solúveis em água ou apresentar colônias de cor rosa. Em termos de características bioquímicas, essas bactérias são catalase positiva, oxidase negativas, não apresentam liquefação gelatinosa, nem formação de indol e H_2S (Cassoni, 2008; Spinosa, 2002).

Essas bactérias desempenham um papel crucial na acidificação bacteriana de sucos de frutas e bebidas alcóolicas, como cervejas e vinhos, além de serem fundamentais na produção de vinagre. Elas têm capacidade de fermentar diversos açúcares e oxidar o etanol em ácido acético. As melhores fontes de carbono para o crescimento do *Acetobacter* incluem glicerol, lactato e etanol (Cassoni, 2008).

O gênero *Gluconobacter* apresenta diversas semelhanças as bactérias do gênero *Acetobacter*, pois ambas são constituídas por bastonetes Gram negativos e não formam esporos. Essas bactérias podem ser móveis ou não, quando móveis as células possuem 3-8 flagelos polares, sendo raro encontrar um flagelo único. São aeróbicas obrigatórias, catalase positivas e negativas para oxidase, formação de nitrato, liquefação da gelatina, e produção de indol e formação de H₂S. Essas bactérias já foram isoladas de diversos substratos, incluindo sidra, cerveja, vinho, vinagre de vinho, frutas, mel de abelha, seiva de palmeira e flores (Cassoni, 2008; Oliveira *et al.* 2010). Na indústria, as bactérias do gênero *Gluconobacter* são de grande importância devido à sua capacidade de realizar a conversão oxidativa de sorbitol a sorbose, um intermediário crucial na produção química e do ácido L-ascórbico (vitamina C) (Oliveira *et al.* 2010; Spinosa, 2002).

3.7 Produtos fermentados obtidos da fermentação da mandioca

A fermentação é o processo mais comum para a valorização dos subprodutos da mandioca (Ray; Sivakumar, 2009). Este método não só melhora a preservação dos alimentos, mas também enriquece o sabor, o aroma e proporciona texturas que são agradáveis e atraentes para os consumidores (Ray; Sivakumar, 2009; Flibert; Abel; Aly, 2016). Estudos mostram que as espécies de BAL, leveduras e *Bacillus* são frequentemente encontradas durante o processo de fermentação da mandioca, isolados de uma variedade de produtos.

3.7.1 Tucupi

Em um estudo sobre identificação de bactéria do ácido láctico e leveduras durante o processo de fermentação da mandioca para produção de tucupi, foi observado que *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* esteve presente tanto na massa de mandioca moída quanto durante a fermentação. *Limosilactobacillus fermentum* foi a mais frequentemente encontrada, sendo isolada durante todas as etapas do processo de fermentação, inclusive no produto final. *Lactobacillus acidophilus* foi detectado no final da fermentação e *Lentilactobacillus parabuchneri* foi identificado apenas no produto final. Em relação à contagem de espécies de BAL, foi observado que *L. plantarum* apresentou contagens que variam entre log de 3,00 a 5,50 UFC.mL⁻¹. *Limosilactobacillus fermentum* teve contagens que variaram log de 4,30 a 7,30 UFC.mL⁻¹. As espécies *L. acidophilus* e *L. parabuchneri* tiveram contagens log de 5,47 e 8,00

UFC.mL⁻¹, respectivamente. Isso sugere que a espécie *L. fermentum* é a mais comumente isolada na produção de tucupi, seguida por *L. plantarum* (Caetano, 2018).

No que diz respeito às leveduras, a *Candida ethanolica* foi detectada na massa de mandioca moída, durante o processo de fermentação, na amostra de tucupi cru (antes do cozimento) e no produto final, com contagens log variando de 2,70 a 3,85 mL UFC.mL⁻¹. A *Yarrowia lipolytica* foi identificada na massa, na manipueira, no final da fermentação e no produto final, com contagens log que variam de 2,49 a 3,48 UFC.mL⁻¹. A *Pichia scutulata* foi encontrada na massa, na manipueira, no tucupi cru e no produto final, com contagem log de 3,60 UFC.mL⁻¹. As espécies de *Candida tropicalis* (log de 2,90 log UFC.mL⁻¹) e *Candia humilis* (log de 3,00 UFC.mL⁻¹) foram identificadas tanto em amostras de tucupi cru quanto no produto final. Por fim, *Wickerhamomyces anomalus* (log de 1,78 UFC.mL⁻¹) e *Pichia exigua* (log de 3,52 log UFC.mL⁻¹) foram detectados apenas no produto final (Caetano, 2018).

3.7.2 Polvilho doce e azedo

O polvilho azedo é um produto típico de Minas Gerais, produzido por empresas de pequeno e médio porte (Aquino; Gervin; Amante, 2016; Caetano, 2018). É um produto muito consumido na América Latina, utilizado na fabricação de biscoitos, sequilhos, bolos, pães (como o pão de queijo brasileiro e o *pandebono* e *pan de yuca*, amos produtos colombiano) e amendoim japonês (Penido, 2013; Díaz *et al.*, 2018; Penido *et al.*, 2018; Diaz *et al.*, 2019).

A produção do polvilho é realizada de forma artesanal ou com uso de equipamentos simples (Lacerda, 2006; Chaves-López *et al.*, 2014; Penido, 2019). A fermentação espontânea do amido é um processo realizado por vários micro-organismos que estão naturalmente presentes na matéria-prima, na água e nos recipientes que são usados na fermentação (Lacerda, 2002; Almeida, 2009; Penido, 2013; Aquino; Gervin; Amante, 2016; Caetano, 2018).

Lacerda (2002), estudou a caracterização da microbiota associada ao processo de fermentação da mandioca para produção de polvilho, e observou que *P. scutulata* foi encontrada em números significativos durante o processo. De forma semelhante, Penido (2013) também caracterizou a microbiota do mesmo produto e encontrou *P. scutulata* como o isolado mais numeroso. Este foi seguido por *Kazachstania exigua* (17,39%), enquanto *C. humilis* e *Geotrichum fragrans*

foram encontrados na mesma proporção (13,01%). A espécie *C. ethanolica* foi encontrada em menor proporção, representando 4,35% dos isolados.

No que se refere às BAL, foi observado por Lacerda *et al.* (2005) que, durante a fermentação da mandioca para produção de polvilho em Conceição dos Ouros (MG), as espécies predominantes eram *L. plantarum* e *L. fermentum*, com uma presença menor de *Levilactobacillus brevis*. Em uma pesquisa posterior, Lacerda *et al.* (2011) identificaram após 5 dias de fermentação as espécies *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc citreum* e *Enterobacter* sp. Penido *et al.* (2018) verificaram que *Levilactobacillus brevis* foi a espécie mais predominante, representando 21,52% dos isolados, seguida por *L. fermentum* (15,19%) e *L. plantarum* (13,92%) no polvilho produzido em uma fábrica em Formiga (MG).

3.7.3 Cauim

Cauim (*kawi*) é uma bebida não alcoólica produzida pelos índios da tribo Tapirapé, utilizando diversas técnicas de processamento. Ela é fermentada a partir de vários substratos, além da mandioca, como milho, amendoim, banana, semente de algodão, arroz e outras frutas fermentáveis (Almeida; Rachid; Schwan, 2007; Gomes *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2010, 2013; Faria-Oliveira *et al.*, 2015; Freire; Ramos; Schwan, 2017; Schwan *et al.*, 2007). Dependendo do método de preparação, o *cauim* pode ser classificado como cozido e/ou fermentado, sendo consumido por todos os membros da tribo Tapirapé, incluindo as crianças (Almeida; Rachid; Schwan, 2007; Schwan *et al.*, 2007; Almeida, 2009; Gomes *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2010; Faria-Oliveira *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2015; Freire; Ramos; Schwan, 2017).

Conforme relatado por Almeida *et al.* (2007), após a fermentação da *cauim* produzido com mandioca e batata doce usada como inoculo, foram identificadas as seguintes espécies: *Bacillus pumilis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium vitrarumen*, *Corynebacterium xerose*, *Enterobacter algeriensis*, *Enterobacter cloacae*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *L. plantarum*, *Paenibacillus macerans*, *Serratia plymuthica* e *Strenotrophomonas maltophilia*.

3.7.4 Caxiri

Caxiri é uma bebida alcóolica, produzida pela fermentação das raízes de mandioca (Cerroni *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012; Miguel *et al.*, 2014, 2015; Faria-Oliveira *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2015; Freire; Ramos; Schwan, 2017), conhecida como "cerveja", cerveja não salivada ou “vinho” (Pineli; Ginani; Xavier, 2018). A bebida que é tradicionalmente preparada pelas mulheres da tribo *Pakaya* no Brasil (Faria-Oliveira *et al.*, 2015; Miguel *et al.*, 2015; Alonso-Gomez *et al.*, 2016), está associada a cerimônias e rituais sagrados (Santos *et al.*, 2012; Miguel *et al.*, 2015; Pineli; Ginani; Xavier, 2018; Resende *et al.*, 2018).

Santos *et al.* (2012), em um estudo para caracterização físico-química do *caxiri*, foi observado que as espécies de *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Sphingomonas* sp., *L. plantarum* e *Pediococcus acidilactici* estavam presentes no início do processo fermentativo. Após a adição do inóculo (batata doce), detectaram-se as espécies *S. cerevisiae* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Após 24 horas de fermentação, *P. acidilactici* foi a espécie predominante, e se observou a presença de *B. pumilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. simplex*, *L. plantarum*, e *Sphingomonas* sp. *S. cerevisiae* predominou após 48 horas de fermentação, com uma redução da população bacteriana. *Enterobacter* sp., *B. amyloliquefaciens*, *Pichia guilliermondii* e *Pichia membranifaciens* foram detectadas após 72 horas de fermentação. A população bacteriana permaneceu estável após de 96 horas de fermentação, e a espécie contaminante *Cryptococcus luteolus*, foi identificada. No final da fermentação (120 horas), apenas as espécies de *S. cerevisiae* e *Thalassobacillus devorans* foram identificadas.

Os achados indicam que *S. cerevisiae* é predominante durante a fermentação da mandioca, sendo a principal responsável pela produção de etanol na bebida. O ácido láctico, produzido pela BAL, quando combinado com o etanol, torna a bebida segura para o seguro, mesmo que seja produzida de maneira rudimentar e sem higiene (Santos *et al.*, 2012; Miguel *et al.*, 2015).

3.7.5 Puba

A puba ou *carimã*, que é obtida através da fermentação espontânea das raízes de mandioca, é um alimento básico brasileiro (Almeida, 1992; Crispim *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2017; Perez, 2014). É produzida em pequenas fábricas ou com base no conhecimento artesanal de várias tribos indígenas brasileiras (Crispim *et al.*, 2013). Comum nas regiões Norte e Nordeste do

Brasil, a puba é amplamente utilizada na culinária local, especialmente nas áreas mais carentes da população (Almeida, 1992).

Em um estudo para identificar as espécies de BAL mais frequentemente encontradas no processo de fermentação da puba, Crispim *et al.* (2013) observam as seguintes espécies: *L. brevis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus delbruecki*, *L. fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus lactics* subsp. *lactics*, *Liquorilactobacillus nagelii*, *L. plantarum*, *Lactobacillus pseudomesenteroides* e *Limosilactobacillus reuteri*.

3.7.6 Chicha

Chicha ou cerveja é um termo genérico que se refere a bebidas fermentadas ou não, que podem ser feitas a partir de uma variedade de ingredientes, incluindo mandioca, cereais e frutas (Gomes *et al.*, 2010; Vallejo *et al.*, 2013; Colehour *et al.*, 2014; Faria-Oliveira *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2016; Piló *et al.*, 2018; Grijalva-Vallejos; Aranda; Matallana, 2020). É uma bebida tradicional de cor amarela clara e espumante, com baixo teor alcoólico (2-5%), a mais antiga dos países da América do Sul, sendo utilizada pelos incas em rituais de fertilidade, grandes celebrações e eventos religiosos (Vallejo *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2017; Piló *et al.*, 2018; Grijalva-Vallejos; Aranda; Matallana, 2020).

No estudo realizado sobre a comunidade de micro-organismos que participam da fermentação da *chicha*, foram identificadas nas amostras coletadas as seguintes espécies: *Acetobacter pasterianus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus* sp., *L. delbrueckii*, *L. fermentum* e *Limosilactobacillus reuteri* (Colehour *et al.*, 2014). Piló *et al.* (2018), identificou as espécies *C. tropicalis*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Kodamace ahmeri*, *Pichia kudriavzevii*, *S. cerevisiae* e *Toruslaspora delbrueckii* em amostras de *chicha* produzidas a partir da mandioca. Freire *et al.* (2016), identificou as espécies de *Aspergillus* sp., *Aspergillus versicolor*, *Cyberlindnera* sp., *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hyphopichia burtonii*, *L. fermentum*, *L. lactics*, *L. mesenteroides*, *Penicillium citrinum*, *Pichia burtonii*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia* sp. *S. cerevisiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Wallemia muriae* e *Wallemia* sp.

3.7.7 Lafun / Kokonte

Lafun ou *kokonte* se refere a uma farinha fina de mandioca fermentada, que é produzida predominantemente na região da África Ocidental, com destaque para Nigéria e o Benin (Oyewole; Odunfa, 1988; Balagopalan, 2002; Avancini, 2007; Ray; Sivakumar, 2009; Padonou *et al.*, 2009, 2010; Falade; Akingbala, 2011; Adebayo-Oyetero *et al.*, 2013; Panda; Ray, 2016; Oyeyinka *et al.*, 2020).

Oyewole & Odunfa (1988) conduziram um estudo sobre a microbiota envolvida na fermentação da mandioca para a produção de *lafun*. Durante o estudo, eles conseguiram isolar cinco grupos de micro-organismos: *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Leuconostoc* sp., *Corynebacterium* sp., *Candida* sp., e *Lactobacillus* sp. Além disso, identificaram duas espécies de fungos: *Geotrichum* sp., e *Aspergillus* sp. Ao longo de um período de fermentação de 96 horas, foi observado que tanto as bactérias aeróbias quanto as BAL estavam presentes em todas as fases. Embora suas contagens fossem mais baixas no início, elas aumentaram progressivamente ao longo do processo. Os fungos estavam presentes no início, mas sua presença diminuiu com o tempo, desaparecendo após 36 horas de fermentação. As leveduras foram detectadas após 24 horas de fermentação, e suas contagens aumentaram significativamente, mantendo-se até o final do processo, ou seja, 96 horas (Oyewole; Odunfa, 1988).

Uma pesquisa realizada com o objetivo de estudar a microbiota envolvida na fermentação da mandioca para produção de *lafun* produzido no Benin (Kétou), mostra de predominância de *Bacillus cereus*, *L. plantarum* e *Weissella confusa*. *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans* e leveduras foram encontradas em quantidades menores. Após 24 horas de fermentação, houve um aumento nas espécies *L. fermentum*, *B. cereus*, *W. confusa*, *L. plantarum* e *Kluyveromyces marxianus*. Depois de 28 horas, as espécies de *Bacillus* desapareceram, enquanto as espécies de *L. plantarum*, *L. fermentum*, *W. confusa*, *Leuconostoc fallax*, *Weissella* sp., *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia scutulata* e *K. marxianus* permaneceram constantes. Este estudo sugere que a qualidade do *lafun* pode ser padronizada através de fermentação controlada com culturas iniciadoras, e identificou potenciais candidatos para isso (Padonou *et al.*, 2009).

3.7.8 Gari

O *gari* é um alimento granulado e desidratado, caracterizado por um leve sabor ácido, sendo uma das formas de preparo mais populares no oeste da África (Bechoff *et al.*, 2015). É amplamente consumido em vários países africanos, incluindo Benin, Gana, Quênia, Libéria, Nigéria e África do Sul (Awoyale *et al.*, 2018).

Os principais gêneros de BAL isolados da fermentação de *gari* são *Lactobacillus* (especificamente *L. plantarum*), *Leuconostoc* e *Weisella* (Kostinek *et al.*, 2007; Oguntoyinbo; Dodd, 2010; Banwo *et al.*, 2012; Adeniran; Ajifolokun, 2015; Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2017). Além disso, uma nova cepa de BAL, *Lactobacillus garii* sp. Nov. (Diaz *et al.*, 2020), foi isolada desta fermentação. Outros gêneros de bactérias identificados incluem *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas* (Ijabadeniyi, 2007; Ahaotu *et al.*, 2011; Adeniran; Ajifolokun, 2015).

Apesar das baixas contagens iniciais, as espécies de leveduras *Candida guilliermondii*, *C. krusei*, *Candida maris* e *C. glabrata* foram consistentemente isoladas da fermentação do *gari*, conforme relatado por Oguntoyinbo (2008). A contagem de leveduras tende a aumentar ao longo do tempo, o que pode ser atribuído à sua capacidade de se adaptar a um ambiente de pH ácido (Oyewole, 1997; Oguntoyinbo, 2008). As espécies de fungos isoladas deste produto incluem *Scolecotrichum graminis*, *Tallaspera áspera*, *Passalora bacilligea*, *Variscoprium* sp., *Culicidospora grávida*, *Diplococcium spicatum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamari*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium exposum* (Ijabadeniyi, 2007; Ahaotu *et al.*, 2011). A presença de *Aspergillus* e *Penicillium* em amostras de *gari* ressalta a importância de aderir a boas práticas de fabricação e higiene, pois algumas espécies podem produzir micotoxinas sob condições favoráveis (Ahaotu *et al.*, 2011; Awoyale *et al.*, 2018).

Oguntoyinbo & Dodd (2010) realizaram um estudo no qual empregam a caracterização genômica polifásica, abrangendo técnicas fenotípicas e genômicas, para investigar a comunidade bacteriana envolvida da fermentação da mandioca em estado sólido para produção de *gari*. Durante a fase inicial da fermentação, de 0 a 12 horas, a diversidade de BAL é restrita, aumentando significativamente de 24 a 96 horas de fermentação. Nesse período, foram identificadas as espécies *L. fermentum* e *L. plantarum*. A espécie *Lactiplantibacillus pentosus* foi observada a partir das 48 horas de fermentação, permanecendo até o final do processo (96

horas). No final da fermentação, foram detectadas as espécies *L. casei* e *L. acidophilus* (Oguntoyinbo; Dodd, 2010).

3.7.9 Fufu

Fufu, também conhecido como *akpu*, é uma pasta produzida a partir da fermentação das raízes de mandioca. A fermentação é amplamente dominada por BAL. As espécies de BAL identificadas na produção de *fufu* incluem: *L. brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *W. cibaria* (antigo *Lactobacillus coprophilus*), *L. fermentum*, *Lactobacillus jensennii*, *Lactobacillus leichamannii*, *Lactococcus lactis* (presente no início da fermentação), *L. mesenteroides* (presente no meio da fermentação) e *L. plantarum* (presente no final da fermentação). Além disso, foram identificadas bactérias de outros gêneros, incluindo: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* (Brauman *et al.*, 1996; Olasupo; Olukoya; Odunfa, 1997; Omafuvbe *et al.*, 2007; Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2017).

Depois de 48 horas de fermentação, leveduras do gênero *Candida* começaram a aparecer na maceração (Brauman *et al.*, 1996; Omafuvbe *et al.*, 2007). As linhagens amilolíticas *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *Pichia saitoi*, *S. cerevisiae*, *Pichia anomala* e *Zygosaccharomyces bailii* foram encontradas na água de fermentação da mandioca no início do processo (Brauman *et al.*, 1996; Oyewole, 2001; Omafuvbe *et al.*, 2007). Essas leveduras amilolítica desempenham um papel crucial na sobrevivência das BAL durante a produção de *fufu*, pois conseguem converter o amido de mandioca em açúcares simples. As BAL, por sua vez, transformam esses açúcares em ácidos orgânicos e contribuem com propriedades antimicrobianas (Oyewole, 2001). Durante a fermentação láctica tradicional para a produção de *fufu*, bactérias anaeróbias, como *Clostridium* spp., produzem ácidos graxos voláteis (principalmente butirato), que, juntamente com o lactato, conferem o sabor característico à mandioca fermentada. No final do processo de maceração, um aumento no número de leveduras (principalmente *Candida* spp.) pode influenciar o sabor final do produto (Brauman *et al.*, 1996).

Brauman *et al.* (1996) conduziram um estudo para a caracterização microbiológica e bioquímica da fermentação da mandioca para a produção de *fufu*, no qual isolaram 104 linhagens de BAL. Em relação à microbiota epífita das raízes de mandioca, a BAL representou 67%. Além disso, várias espécies importantes foram identificadas: *W. cibaria* (53,3%), *L.*

delbrueckii (13,3%), *L. mesenteroides* (20%), *L. fermentum* e *L. lactis* (6,7%). No primeiro estágio da fermentação, após 24 horas, o *L. lactis* predominou, representando 65% do total posteriormente, a bactéria heterofermentativa *L. mesenteroides* se tornou predominante, representando 59% em 48 horas e 71% após 72 horas de fermentação. Na etapa final, após 8 dias de fermentação, houve um aumento expressivo de *L. plantarum* (homofermentativa), que chegou a representar até 100% da BAL (Brauman *et al.*, 1996).

Em um estudo realizado por Oyewole (2001), que investigou as características das leveduras na fermentação de mandioca para produção de *fufu*, não identificou no início do processo de fermentação (tempo 0) nenhuma espécie de levedura. No entanto, após 12 horas de fermentação, foram identificadas seis linhagens distintas de leveduras: *C. krusei*, *C. tropicalis*, *P. saioti*, *S. cerevisiae*, *P. anomala* e *Z. bailii*. Depois de 24 horas, as espécies observadas foram *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Z. bailii*, *S. cerevisiae* e *P. saioti*. Após 36 horas, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Z. bailii* e *S. cerevisiae* já não estavam presentes. Nos períodos de 48, 60, 72, 84 e 96 horas de fermentação, as espécies identificadas foram *C. krusei*, *C. tropicalis* e *Z. bailii*. De acordo com o estudo, a levedura isolada da mandioca tem um papel crucial na sobrevivência e atividade das BAL durante a fermentação da mandioca. A levedura é capaz de quebrar o amido da mandioca em monossacarídeos, que são então convertidos em ácidos orgânicos pelas BAL. Assim, a combinação de BAL e levedura é apropriada para a criação de culturas iniciadoras para processos de fermentação submersa da mandioca, como na fabricação de *fufu* (Oyewole, 2001).

3.7.10 Agbelima

Agbelima, uma massa macia e azeda feita de mandioca, é um alimento popular em Gana. Geralmente, é preparada como uma refeição, sendo cozida com massa de milho fermentada para criar um purê, que é consumido com ensopados (Amoa-Awua *et al.*, 1997; Mante; Sakyi-Dawson; Amoa-Awua, 2003; Obilie; Tano-Debrah; Amoa-Awua, 2003).

Durante o processo de fermentação, a acidez da *agbelima* aumenta devido à produção de ácido láctico por BAL, como *L. plantarum* (a espécie predominante), *L. brevis*, *L. mesenteroides* e *Streptococcus* spp. *Bacillus* spp. (incluindo *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilis*, *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. polynya*) e fungos (como *Penicillium sclerotiorum*, *P. citrinum*, *P. nodulum* e *Geotrichum candidum*) produzem celulase microbiana, que hidrolisa a celulose da mandioca, resultando na quebra da textura grossa da mandioca e na produção de

uma massa de textura lisa. *C. tropicalis* e *Zygosaccharomyces* spp. também contribuem para o amolecimento do tecido da mandioca. Todas as leveduras, incluindo *C. krusei*, e fungos exibem atividades linamarase, sendo assim capazes de hidrolisar os glicosídeos cianogênicos, auxiliando na desintoxicação. Bactéria do ácido láctico e leveduras produzem compostos aromáticos voláteis, como propanol, álcool isoamílico, aceto de etila, 3-metil-1-butanol e acetoina (Amoa-Awua; Jakobsen, 1995; Kofi *et al.*, 1996; Amoa-Awua *et al.*, 1997).

Mante *et al.* (2003) conduziram uma pesquisa sobre as interações antimicrobianas das espécies envolvidas na fermentação de *agbelima*, com foco no efeito inibitório das BAL em cinco patógenos entéricos. O efeito antimicrobiano das BAL, incluindo linhagens de *L. plantarum* (a espécie dominante nesta fermentação), foi avaliado pelo método de difusão em poço de ágar. *Levilactobacillus brevis* foi identificada como a segunda BAL predominante isolada desta fermentação. Os patógenos entéricos inoculados na massa de mandioca no início da fermentação não foram mais detectados após 24 horas. Os autores atribuíram o efeito antimicrobiano das linhagens de BAL principalmente à produção de ácidos, já que as linhagens testadas não conseguiram produzir bacteriocinas ou peróxido de hidrogênio e perderam efeito inibitório após a neutralização do sobrenadante.

Neste estudo, foi demonstrando que o processo de fermentação da massa de mandioca em *agbelima* é caracterizado por interações entre BAL e a espécie dominante *L. plantarum*. Essas interações podem suprimir o crescimento de certas espécies, como *L. fermentum* e *L. brevis*. Algumas BAL demonstraram a capacidade de inibir o crescimento de certos isolados de *B. subtilis*. No entanto, em relação às leveduras não foram observadas nenhuma inibição. Isso é atribuído à associação sinérgica existente entre as BAL e as leveduras (Mante; Sakyi-Dawson; Amoa-Awua, 2003).

4 CULTURAS INICIADORAS

Culturas iniciadoras, sejam elas puras ou mistas, são amplamente empregadas tanto na produção de alimentos fermentados em escala piloto quanto na produção industrial de pequena escala (Aidoo; Nout; Sarkar, 2006; Franz *et al.*, 2014). Essas culturas são desenvolvidas através da seleção de micro-organismos que possuem características adequadas para predominar no processo de fermentação e contribuir para a qualidade do produto final. Além disso, é essencial que essas culturas possam ser usadas de maneira confiável e reproduzível. As características desejáveis de um micro-organismo para compor uma cultura iniciadora incluem a capacidade de reduzir o tempo de fermentação, produzir compostos que conferem um aroma e sabor agradáveis ao produto, ter uma atividade antagonista contra patógenos e ser capaz de acidificar rapidamente o meio (Padonou *et al.*, 2010; Penido, 2013; Menezes *et al.*, 2018; Penido, 2019).

Produtos tradicionais fermentados de mandioca geralmente contêm BAL e leveduras. Esses micro-organismos são reconhecidos por apresentar um potencial probiótico (Murooka; Yamshita, 2008; Penido, 2013), são comumente empregados como culturas iniciadoras e geralmente estão associadas entre si (Penido, 2013). Muitas das espécies presentes nesses produtos, mencionadas em diversos estudos, são derivadas da fermentação da mandioca e de outras matérias-primas. Assim, os alimentos fermentados se tornam-se veículos de probióticos e podem ser considerados reservatórios naturais de novas linhagens com esse potencial, oferecendo vários benefícios à saúde do consumidor, incluindo enriquecimento nutricional, efeitos imunológicos e propriedades protetoras (Murooka; Yamshita, 2008; Cuamatzin-García *et al.*, 2022).

A associação desses micro-organismos é benéfica, pois as BAL criam um ambiente ácido que inibe o crescimento de alguns micro-organismos e favorece o crescimento de leveduras (Lacerda, 2002). Além disso, ambas apresentam características ideais para aplicação como culturas iniciadoras, visto que as leveduras são as principais responsáveis pela produção de aromas, enquanto as BAL são capazes de acidificar o meio através da produção de ácido láctico e produzir compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas, que promovem ação antagonista inibitória ao crescimento de micro-organismos patogênicos no produto fermentado final (Nardi *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2018; Menezes *et al.*, 2018; Botthoulath; Upaichit; Thumarat, 2018).

As BAL são fundamentais para os processos de fermentação na indústria alimentícia, pois ajudam a preservar os alimentos e aprimoram sua textura, sabor, cheiro e aroma (Huertas, 2010). Elas são comumente usadas como culturas iniciadoras comerciais no processamento de produtos lácteos como leites fermentados, iogurtes, queijos e manteiga, além de serem utilizadas na fabricação de embutidos, salsichas, vinhos e cerveja (Huertas, 2010; Lacerda, 2002), contribuindo para a preservação e melhoria das propriedades sensoriais e nutricionais dos produtos (Huertas, 2010). A espécie *Lactiplantibacillus plantarum*, anteriormente conhecida como *Lactobacillus plantarum*, é frequentemente encontrada em fermentações espontâneas de mandioca. Esta bactéria contribui para o sabor e a textura dos alimentos fermentados, produz ácido láctico e compostos antimicrobianos, atua com potencial probiótico e ajuda a garantir a segurança do produto final. Por isso, este micro-organismo tem sido amplamente utilizado no desenvolvimento de culturas iniciadoras para a fermentação de laticínios, vegetais, carnes, peixes, produtos de panificação e bebidas (Todorov; Franco, 2010).

O estudo dos micro-organismos envolvidos na fermentação da mandioca contribui com novas informações sobre as espécies que dominam o processo. Isso possibilita o desenvolvimento e a aplicação de novas culturas iniciadoras, com o objetivo de aprimorar os processos fermentativos, contribuindo para uma melhora na qualidade dos produtos (Coelho, 2008; Penido, 2019).

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. F.; MATTIETTO, R. DE A. Procedimentos de fabricação dos derivados de mandioca: recomendações para obtenção de produtos seguros e de qualidade. Em: **Cultura da mandioca: Aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, sistemas de cultivo, manejo de pragas e doenças e agroindústria**. Brasília: Embrapa, 2016. p. 224–241.
- ADEBAYO-OYETORO, A. O. *et al.* Microbiological safety assessment of fermented cassava flour “lafun” available in Ogun and Oyo States of Nigeria. **International Journal of Food Science**, v. 2013, 2013.
- ADENIRAN, H. A.; AJIFOLOKUN, O. M. Microbiological studies and sensory evaluation of breadfruit and cassava co-fermented into gari analogue. **Nigerian Food Journal**, v. 33, n. 1, p. 39–47, out. 2015.
- ADESULU-DAHUNSI, A. T. *et al.* Genetic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains from some indigenous fermented foods in Nigeria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 199–206, out. 2017.
- AHAOTU, I. *et al.* Protein improvement in gari by the use of pure cultures of microorganisms involved in the natural fermentation process. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 20, p. 933–938, 2011.
- AIDOO, K. E.; NOUT, M. J. R.; SARKAR, P. K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 30–39, 2006.
- ALMEIDA, E. G. **Caracterização físico-química e microbiológica de bebidas fermentadas produzidas pelos índios Tapirapé**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2009.
- ALMEIDA, E. G.; RACHID, C. C. T. C.; SCHWAN, R. F. Microbial population present in fermented beverage ‘cauim’ produced by Brazilian Amerindians. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 146–151, out. 2007.
- ALMEIDA, P. F. Processamento e caracterização da puba. p. 137, 1992.
- ALONSO-GOMEZ, L. *et al.* Physicochemical transformation of cassava starch during fermentation for production of sour starch in Colombia. **Starch - Stärke**, v. 68, n. 11–12, p. 1139–1147, out. 2016.
- AMOA-AWUA, W. K. *et al.* The contribution of moulds and yeasts to the fermentation of “agbelima” cassava dough. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 288–296, 1997.
- AMOA-AWUA, W. K. A.; JAKOBSEN, M. The role of *Bacillus* species in the fermentation of cassava. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, n. 3, p. 250–256, out. 1995.
- AQUINO, A. C. M. D. S.; GERVIN, V. M.; AMANTE, E. R. Avaliação do processo produtivo de polvilho azedo em indústrias de Santa Catarina. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016.

AVANCINI, S. R. P. Caracterização química, microbiológica e toxicológica da água da fermentação do amido de mandioca. p. 104, 2007.

AWOYALE, W. *et al.* Assessment of heavy metals and microbial contamination of *gari* from Liberia. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 62–66, out. 2018.

BAĞCIOĞLU, M. *et al.* Detection and identification of bacillus cereus, bacillus cytotoxicus, bacillus thuringiensis, bacillus mycoides and bacillus weihenstephanensis via machine learning based FTIR spectroscopy. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 902, 2019.

BALAGOPALAN, C. Cassava Utilization in Food, Feed and Industry. Em: ANTHONY BELLOTTI R. J. HILLOCKS, J. M. T. (Ed.). **Biology, Production and Utilization**. New York, NY: Cabi, 2002. p. 301–318.

BANEA, J. P. *et al.* Control of konzo in DRC using the wetting method on cassava flour. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1517–1523, maio 2012.

BANEA, J. P. *et al.* Control of konzo by detoxification of cassava flour in three villages in the Democratic Republic of Congo. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 60, p. 506–513, out. 2013.

BANWO, K. *et al.* Phenotypic and Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Nigerian Traditional Fermented Foods. **Food Biotechnology**, v. 26, p. 124–142, 2012.

BECHOFF, A. *et al.* Carotenoid stability during storage of yellow *gari* made from biofortified cassava or with palm oil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 36–44, 2015.

BOTTHOULATH, V.; UPAICHIT, A.; THUMARAT, U. Identification and in vitro assessment of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of. **J Food Sci Technol**, v. 55, n. 7, p. 2774–2785, 2018.

BRASIL. **Instrução Normativa Adepará n° 1 de 24/06/2008**. 2008.

BRASIL. **Instrução Normativa MAPA n° 15, de 31.01.2011**. 2011.

BRASIL. Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001. p. 43, 2001.

BRAUMAN, A. *et al.* Microbiological and Biochemical Characterization of Cassava Retting, a Traditional Lactic Acid Fermentation for Foo-Foo (Cassava Flour) Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2854–2858, 1996.

BRITO, B. *et al.* Influence of spontaneous fermentation of manipueira on bioactive amine and carotenoid profiles during tucupi production. **Food Research International**, v. 120, p. 209–216, out. 2019.

BRITO, B. *et al.* Total and Free Hydrogen Cyanide Content and Profile of Bioactive Amines in Commercial Tucupi, a Traditionally Derived Cassava Product Widely Consumed in Northern Brazil. **Foods**, v. 12, p. 4333, 1 dez. 2023.

- CAETANO, R. G. **Isolamento e identificação molecular de bactérias lácticas e leveduras envolvidas no processo fermentativo da mandioca para produção de tucupi e avaliação higiênico sanitária**. Dissertação—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.
- CAMPOS, A. P. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. DE A. **Efeito da fermentação e cocção nas características físico-químicas e teor de cianeto durante o processamento de tucupi**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2016.
- CAMPOS, A. P. R.; MATTIETTO, R. DE A.; CARVALHO, A. V. Optimization of parameters technological to process tucupi and study of product stability. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 365–371, out. 2019.
- CARMO, J. R. D. *et al.* Tucupi-added mayonnaise: Characterization, sensorial evaluation, and rheological behavior. **CyTA-Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 479–487, 2019.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.
- CARROLL, L. M. *et al.* Characterization of emetic and diarrheal *Bacillus cereus* strains from a 2016 foodborne outbreak using whole-genome sequencing: Addressing the microbiological, epidemiological, and bioinformatic challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, 2019.
- CASSONI, V. **Valorização De Resíduo De Processamento De Farinha De Mandioca (Manipueira) Por Acetificação**. Dissertação—Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2008.
- CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. Produtos regionais a base de mandioca ou derivados. Em: **Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. [s.l.: s.n.]. v. 3p. 693–711.
- CERRONI, M. P. *et al.* Outbreak of beriberi in an Indian population of the Upper Amazon Region, Roraima State, Brazil, 2008. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1093–1097, out. 2010.
- CHAIAREEKITWAT, S. *et al.* Protein composition, chlorophyll, carotenoids, and cyanide content of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) as influenced by cultivar, plant age, and leaf position. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131173, out. 2022.
- CHAVES-LÓPEZ, C. *et al.* Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, p. 1031–1048, 2014.
- CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. D. O. Influência da fermentação na qualidade da farinha de mandioca do grupo d’água. v. 41, n. 2, p. 279–284, 2011.
- CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. D. O.; OLIVEIRA, S. S. Study of tucupi physicochemical properties. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 437–440, 2007.

COELHO, L. M. **Verificação da microbiota e ocorrência de aflotoxinas em farinha de puba consumida em Palmas, Tocantis**. Dissertação—Palmas: Universidade Federal do Tocantis, 2008.

COLEHOUR, A. M. *et al.* Local domestication of lactic acid bacteria via cassava beer fermentation. **PeerJ**, v. 2014, n. 1, 2014.

COSTA, T. DOS S.; CARMO, J. R. DO; PENA, R. DA S. Powdered tucupi condiment: Sensory and hygroscopic evaluation. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 33–40, out. 2018.

COSTA, T. DOS S.; RODRIGUES, A. M. DA C.; PENA, R. DA S. Rheological behavior of concentrated tucupi. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 684–690, 2019.

CRISPIM, S. M. *et al.* Molecular identification of *Lactobacillus* spp. Associated with puba, a Brazilian fermented cassava food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 15–21, 2013.

CUAMATZIN-GARCÍA, L. *et al.* Traditional Fermented Foods and Beverages from around the World and Their Health Benefits. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, out. 2022.

DEMIATE, I. M.; KOTOVICZ, V. Cassava starch in the Brazilian food industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 388–397, 2011.

DIAS, L. T.; LEONEL, M. Caracterização Físico-Química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 692–700, 2006.

DIAS, V. L.; RODRIGUES, N. L.; CALIXTO, M. DA S. **A fabricação do tucupi e seu uso na preparação de molhos de pimenta artesanais**. XVIII ENCONTRO NACIONAL DE ENSINO DE QUÍMICA (XVIII ENEQ). **Anais...**2016.

DÍAZ, A. *et al.* Technological properties of sour cassava starches: Effect of fermentation and drying processes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, n. December 2017, p. 116–123, 2018.

DIAZ, M. *et al.* Comparison of the microbial composition of African fermented foods using amplicon sequencing. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, out. 2019.

DIAZ, M. *et al.* *Lactobacillus garii* sp. nov., isolated from a fermented cassava product. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 3012–3017, 2020.

DI-TANNO, M. F. P. Influência da temperatura, tempo e concentração de pectinase na textura, rendimento e características físico-químicas da mandioca (*Manihot esculenta* C.) durante a fermentação. p. 105, 2001.

EHLING-SCHULZ, M.; FRENZEL, E.; GOHAR, M. Food-bacteria interplay: Pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUN, 2015.

EHLING-SCHULZ, M.; LERECLUS, D.; KOEHLER, T. M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 3, 2019.

FALADE, K. O.; AKINGBALA, J. O. Utilization of Cassava for food. **Food Reviews International**, v. 27, n. 1, p. 51–83, out. 2011.

FARIA-OLIVEIRA, F. *et al.* The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America. Em: **Food Production and Industry**. [s.l.] InTech, 2015.

FERRAREZZO, E. M. Desenvolvimento de mandioca chips, moldada e frita. p. 190, 2011.

FLIBERT, G.; ABEL, T.; ALY, S. African cassava Traditional Fermented Food: The Microorganism's Contribution to their Nutritional and Safety Values–A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 10, p. 664–687, 15 out. 2016.

FRANCO, B. D. G. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. [s.l.: s.n.].

FRANZ, C. M. A. P. *et al.* African fermented foods and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 84–96, out. 2014.

FREIRE, A. L. *et al.* Bacteria associated with human saliva are major microbial components of Ecuadorian indigenous beers (chicha). **PeerJ**, v. 2016, n. 4, 2016.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Effect of symbiotic interaction between a fructooligosaccharide and probiotic on the kinetic fermentation and chemical profile of maize blended rice beverages. **Food Research International**, v. 100, p. 698–707, out. 2017.

GÁLVEZ, A. *et al.* Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 51–70, 2007.

GOMES, F. C. O. *et al.* Traditional foods and beverages from South America: microbial communities and production strategies. Em: KRAUSE, J.; FLEISCHER, O. (Eds.). **Industrial Fermentation: food processes, nutrient sources and producing strategies**. [s.l.] Nova Science Pub, 2010. p. 386.

GRIJALVA-VALLEJOS, N.; ARANDA, A.; MATAALLANA, E. Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 317, out. 2020.

HUERTAS, R. A. P. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. v. 8, p. 93–105, out. 2010.

IJABADENIYI, A. O. Microbiological safety of gari, lafun and ogiri in Akure metropolis, Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 22, p. 2633–2635, 2007.

ISA, N. L. M. *et al.* Physicochemical properties and characterization of fermented cassava flour by lactic acid bacteria. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 736, 2021.

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

KOFI, W. *et al.* **Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima**. **International Journal of Food Microbiology**, 1996.

KOSTINEK, M. *et al.* Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 342–351, out. 2007.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Chapter 1 - Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. Em: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.). **The Yeasts (Fifth Edition)**. London: Elsevier, 2011. p. 3–5.

LACERDA, I. C. A. **Caracterização da microbiota associada ao processo fermentativo da mandioca para produção do polvilho azedo**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

LACERDA, I. C. A. **Caracterização fisiológica e molecular das bactérias lácticas e leveduras na produção de polvilho azedo e utilização de culturas iniciadoras para processo fermentativo**. Tese—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

LACERDA, I. C. A. *et al.* Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture-independent 16s rRNA gene sequence analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 650–657, 2011.

LEOPOLDO, G.; FERNANDES, C. **Análises gráficas dos principais produtos agropecuários do Estado do Pará Cultura da Mandioca Regiões do Brasil Área Plantada de Mandioca (ha)**. 2017.

LOBO, I. D.; JÚNIOR, C. F. DOS S.; NUNES, A. Importância socioeconômica da mandioca (*Manihot esculenta* crantz) para a comunidade de Jaçapetuba, município de Cametá/PA. **Multítemas**, p. 195–211, 16 out. 2018.

LOGAN, N. A.; VOS, P. DE. Genus I. Bacillus. Em: VOS, P. *et al.* (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York, NY: Springer New York, 2009. v. 3p. 21–128.

LU, H. *et al.* Study on quality characteristics of cassava flour and cassava flour short biscuits. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 521–533, 2020.

LV, X. *et al.* Purification, characterization and action mechanism of plantaricin JY22, a novel bacteriocin against. **Food Sci Biotechnol**, v. 27, n. 3, p. 695–703, 2018.

MANTE, E. S.; SAKYI-DAWSON, E.; AMOA-AWUA, W. K. Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 41–50, 2003.

- MENDOZA, L. M. *et al.* Yeast diversity during the fermentation of Andean chicha: A comparison of high-throughput sequencing and culture-dependent approaches. **Food Microbiology**, v. 67, p. 1–10, 2017.
- MENEZES, A. G. T. *et al.* Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, p. 187–197, set. 2018.
- MIGUEL, M. G. C. P. *et al.* Physicochemical and microbiological description of Caxiri – a cassava and corn alcoholic beverage. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 12, p. 2537–2544, out. 2015.
- MIGUEL, M. G. DA C. P. *et al.* Bacterial dynamics and chemical changes during the spontaneous production of the fermented porridge (Calugi) from cassava and corn. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 9, p. 839–849, 2014.
- MODESTO JÚNIOR, M. DE S. **Fabricação artesanal de derivados de mandioca: tucupi e goma**. 2012. Disponível em: <www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/>
- MODESTO JÚNIOR, M. DE S.; ALVES, R. N. B. Rentabilidade da Produção Artesanal de Derivados de Mandioca: Tucupi e Goma. p. 20, 2014.
- MUROOKA, Y.; YAMSHITA, M. Traditional healthful fermented products of Japan. **Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 791–798, 2008.
- NARDI, R. M. D. *et al.* Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 649–656, 2005.
- NICOLAU, A. I. Safety of Fermented Cassava Products. Em: **Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 319–335.
- NWOSU, J. N. *et al.* Quality parameters of bread produced from substitution of wheat flour with cassava flour using soybean an improver. **American Journal of Research Communication**, v. 2, n. 3, 2014.
- OBILIE, E. M.; TANO-DEBRAH, K.; AMOA-AWUA, W. K. Microbial modification of the texture of grated cassava during fermentation into akyeke. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2–3, p. 275–280, 2003.
- OGUNTOYINBO, F. A. Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale gari production in Nigeria. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 465–469, 2008.
- OGUNTOYINBO, F. A.; DODD, C. E. R. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in gari production. **Food Control**, v. 21, p. 306–312, 2010.
- OKOTH, R. A.; MATOFARI, J. W.; NDUKO, J. M. Effectiveness of *Levilactobacillus brevis* fermentation on antinutrients and protein quality of leaves of selected cassava varieties. **Applied Food Research**, v. 2, n. 2, p. 100134, 2022.

- OLASUPO, N. A.; OLUKOYA, D. K.; ODUNFA, S. A. Identification of *Lactobacillus* species associated with selected African fermented foods. **Zeitschrift fur Naturforschung Section C - Journal of Biosciences**, v. 52, n. 1–2, p. 105–108, 1997.
- OLIVEIRA, N. T. *et al.* Ácido cianídrico em tecidos de mandioca em função da idade da planta e adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 10, p. 1436–1442, 2012.
- OLIVEIRA, A. L. D. D. *et al.* Estudo de bactérias do gênero *Gluconobacter*: isolamento, purificação, identificação fenotípica e molecular. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, mar. 2010.
- OMAFUVBE, B. O. *et al.* Microbial diversity in ready-to-eat fufu and lafun-fermented cassava products sold in Ile-Ife, Nigeria. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 831–837, 2007.
- OYEWOLE, O. B. Lactic fermented foods in Africa and their benefits. **Food Control**, v. 8, n. 5–6, p. 289–297, out. 1997.
- OYEWOLE, O. B. Characteristics and significance of yeasts' involvement in cassava fermentation for “fufu” production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 213–218, 2001.
- OYEWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Microbiological studies on cassava fermentation for “lafun” production. **Food Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 125–133, out. 1988.
- OYEYINKA, S. A. *et al.* Chemical and physicochemical properties of fermented flour from refrigerated cassava root and sensory properties of its cooked paste. **Journal of Food Processing and Preservation**, n. March, p. 1–9, 2020.
- PADONOU, S. W. *et al.* The microbiota of Lafun, an African traditional cassava food product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 22–30, out. 2009.
- PADONOU, S. W. W. *et al.* Development of starter culture for improved processing of Lafun, an African fermented cassava food product. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1402–1410, out. 2010.
- PAIVA, E. P. DE *et al.* *Bacillus cereus* e suas toxinas em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 23, p. 87–92, 2009.
- PANDA, S. K.; RAY, R. C. **Fermented Foods and Beverages from Tropical Roots and Tubers**. [s.l.] Wiley Blackwell, 2016.
- PENIDO, F. C. L. Isolamento e identificação molecular da microbiota predominante na fermentação natural de mandioca: seleção de culturas iniciadoras para produção de polvilho azedo em escala piloto. p. 101, 2013.
- PENIDO, F. C. L. *et al.* Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 823–831, out. 2018.

PENIDO, F. C. L. Produção de polvilho azedo em escala piloto a partir de bactérias do ácido láctico e leveduras. p. 123, 2019.

PEREZ, K. J. **Caracterização de lipopéptidos antimicrobianos e surfactantes produzidos por *Bacillus* spp. isolados de puba**. Tese—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

PEREZ, K. J. *et al.* *Bacillus* spp. isolated from puba as a source of biosurfactants and antimicrobial lipopeptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 61, out. 2017.

PILÓ, F. B. *et al.* Biotechnology and Industrial Microbiology *Saccharomyces cerevisiae* populations and other yeasts associated with indigenous beers (chicha) of Ecuador. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 808–815, 2018.

PINELI, L. DE L. DE O.; GINANI, V. C.; XAVIER, R. N. Caxiri. Em: **Bebidas alcólicas: Ciência e Tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blucher Ltda, 2018. v. 1p. 39–49.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. DE. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015.

RAMOS, C. L. *et al.* Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 225–231, 2010.

RAMOS, C. L. *et al.* Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. **Food Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 22–29, out. 2013.

RAMOS, C. L. *et al.* Microbiological and chemical characteristics of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. **Food Microbiology**, v. 49, p. 182–188, out. 2015.

RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2014.

RAY, R. C.; SIVAKUMAR, P. S. Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops: Review. v. 44, n. 6, p. 1073–1087, out. 2009.

RESENDE, L. V. *et al.* Microbial community and physicochemical dynamics during the production of ‘Chicha’, a traditional beverage of Indigenous people of Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 1–11, out. 2018.

RINGØ, E. *et al.* Lactic acid bacteria in finfish—An update. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 376234, out. 2018.

ROSALES-SOTO, M. U. *et al.* Microbiological and physico-chemical analysis of fermented protein-fortified cassava (*Manihot esculenta* Crantz) flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 355–360, 2016.

SANTOS, C. C. A. DO A. *et al.* Microbiological and physicochemical characterisation of caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Juruna people of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 112–121, out. 2012.

SCHWAN, R. F. *et al.* Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 6, p. 966–972, out. 2007.

SHITTU, T. A. *et al.* Cassava flour and starch: processing technology and utilization. Em: **Tropical Roots and Tubers: Production, Processing and Technology**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 415–450.

SILVA, N. DA *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SPINOSA, W. A. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre**. [s.l.] [s.n.], 2002. Disponível em: <<https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/236984>>. Acesso em: 12 jul. 2024.

SOARES, F. M. S. **Mandioca**. Disponível em: <www.conab.gov.br>.

SOUZA, J. M. L. DE *et al.* Variabilidade físico-química da farinha de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 907–912, 2008.

STARLING, C. A. Otimização dos parâmetros de produção do amido de mandioca fermentado. p. 110, 2010.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. DE M. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and application in food production. **Food Reviews International**, v. 26, n. 3, p. 205–229, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VALLE, T. L.; LORENZI, J. O. Variedades melhoradas de mandioca como instrumento de inovação, segurança alimentar, competitividade e sustentabilidade: contribuições do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 31, n. 1, p. 15–34, 2014.

VALLEJO, J. A. *et al.* Atypical yeasts identified as *Saccharomyces cerevisiae* by MALDI-TOF MS and gene sequencing are the main responsible of fermentation of chicha, a traditional beverage from Peru. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 560–564, 2013.

VILLARREAL-DELGADO, M. F. *et al.* The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95–130, out. 2018.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of

Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA PRESENTE NO PROCESSO FERMENTATIVO DE MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI

1 INTRODUÇÃO

Uma das formas de aproveitamento das raízes da mandioca é a produção de farinha. Durante a produção da farinha de mandioca, as raízes trituradas são prensadas para retirada do líquido e a massa prensada é torrada, o resíduo líquido resultante é denominado manipueira (Campos *et al.*, 2016). O tucupi, um molho fermentado, é obtido após a fermentação espontânea da manipueira (Campos *et al.*, 2016; Chisté; Cohen; Oliveira, 2007).

As principais informações sobre a qualidade e a microbiota do tucupi disponíveis até o momento dizem respeito a alterações de pH, sólidos solúveis, qualidade microbiana, acidez total, perfil de aminas bioativas e ácido cianídrico (Chisté; Cohen; Oliveira, 2007; Chisté; Cohen, 2011; Campos *et al.*, 2016; Campos; Carvalho; Mattietto, 2016; Brito *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2023; Brito *et al.*, 2023). Em relação a microbiota envolvida na fermentação do tucupi, sabe-se que durante o seu processamento ocorre acidificação (Cassoni, 2008), e que as bactérias produtoras de ácido láctico, leveduras e *Bacillus* estão envolvidas no processo fermentativo (Caetano, 2018).

A importância do conhecimento sobre a dinâmica dos micro-organismos em alimentos fermentados, bem como a complexidade dos ecossistemas microbianos alimentares, são ideias amplamente aceitas na pesquisa em microbiologia (Berg *et al.*, 1993; Dolci *et al.*, 2015). Os métodos tradicionais atualmente empregados para a identificação de micro-organismos se baseia no isolamento, cultivo e na avaliação das características fenotípicas desses micro-organismos. Contudo, esses métodos são trabalhosos, demorados e frequentemente insuficientes para diferenciar espécies que apresentam semelhanças fenotípicas (Dolci *et al.*, 2015; Buszewski *et al.*, 2017). Embora as BAL e leveduras sejam as principais responsáveis pela fermentação de alimentos, existem outros grupos microbianos que têm a capacidade de colonizar alimentos, interagir e possivelmente competir com a microbiota fermentativa (Dolci *et al.*, 2015).

Os métodos moleculares (genotípicos) são eficazes para a identificação de bactérias, servindo como um complemento ou substituto para os métodos fenotípicos. Eles aumentam a sensibilidade e a especificidade do processo de detecção e minimizam a subjetividade associada à interpretação de dados morfológicos e biológicos. O DNA, em essência, permanece inalterado

durante o ciclo de vida microbiano e após a exposição a estresses ambientais de curta duração (Settanni; Corsetti, 2007).

Atualmente, na classificação de micro-organismos, técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA), a reação em cadeia da polimerase (PCR) e outros métodos relacionados baseados em PCR, são amplamente utilizadas. Essas técnicas são conhecidas por sua alta sensibilidade, rapidez, especificidade e reprodutibilidade (Mafra; Ferreira; Oliveira, 2008; Buszewski *et al.*, 2017). O sequenciamento do gene 16S rRNA é visto como o método mais exato e é tido como padrão ouro para a identificação de micro-organismos a nível de espécie (Buszewski *et al.*, 2017).

Outra técnica empregada para identificação de micro-organismos é o MALDI TOF MS, uma ferramenta usada para a identificação rápida de micro-organismos. Este método se baseia na ionização suave de células microbianas intactas com pulsos de laser curtos (Lay Jr, 2001; Dušková *et al.*, 2012; Wieser *et al.*, 2012; Buszewski *et al.*, 2017), seguida pela aceleração das partículas no vácuo através de um campo elétrico. A ionização do micro-organismo resulta em uma assinatura molecular específica (perfil espectral) que pode ser registrada. A identificação do micro-organismo é feita comparando o perfil espectral do micro-organismo analisado com um banco de dados, utilizando um programa automatizado (Buszewski *et al.*, 2017). A técnica de MS mais frequentemente usada para a identificação de micro-organismos é a análise de proteínas. O espectro obtido possibilita a identificação de bactérias não apenas em nível de gênero e espécie, mas em alguns casos também em nível de subespécie (Dušková *et al.*, 2012; Buszewski *et al.*, 2017).

A substituição dos métodos fenotípicos, resulta em diferenciação apenas em nível de gênero, por técnicas moleculares, pode ser uma resposta, pois oferecem uma classificação e identificação mais robusta (Dolci *et al.*, 2015; Buszewski *et al.*, 2017). Os métodos moleculares são uma ferramenta valiosa no estudo de ecossistemas alimentares e das linhagens que conduzem os processos de fermentação (Dolci *et al.*, 2015). Nesse estudo, empregamos a combinação de métodos tradicionais e moleculares para obter uma visão mais completa dos vários aspectos microbianos envolvidos no processo de fermentação da mandioca para produção de tucupi.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Para a realização do presente estudo, foram obtidas amostras de tucupi em diferentes estágios do processamento, incluindo o produto final. As amostras coletadas foram: raiz / massa de mandioca (n = 3), manipueira (n= 71), tucupi cru (n = 2) e tucupi produto final (n = 43). Essas amostras foram codificadas como T1 (Tabela 1). Todas as amostras foram coletadas assepticamente e enviadas ao laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB) da Faculdade de Farmácia da UFMG, onde foram processadas e congeladas a -21 °C para posterior análise.

Tabela 1 - Amostras de tucupi envolvidas na produção de tucupi

Produto	Ano	Origem	n
Raiz / massa de mandioca	2019	Belém	3
Manipueira	2019 / 2022 / 2023	Belém / Belo Horizonte	71
Tucupi cru	2019	Belém	2
Tucupi produto final	2019 / 2020 / 2021 / 2022 / 2023	Belém / Manaus / Ananindeua / Belo Horizonte	43

2.2 Isolamento, quantificação e identificação dos micro-organismos

2.2.1 Bactérias do ácido láctico

Para o isolamento e quantificação das bactérias do ácido láctico (BAL) foram pipetados volumes de 100 µL de cada amostra em tubos *ependorfs* previamente estéreis, homogeneizados e diluídos em 900 µL de água peptonada 0,1% estéril com 0,1% de ágar. As amostras constituídas de massa e raiz de mandioca, foram pesadas 25g, homogeneizadas e diluídas em 225 mL de água peptonada estéril à 0,1%. Das diluições seriadas, foram retiradas alíquotas de 10 µL e inoculadas em ágar MRS (Man, Rogosa e Sharper- Difco) acidificadas (0,1% de ácido sórbico e ácido clorídrico à 5N) pela técnica de *drop plate* (Silva *et al.*, 2010).

As placas foram incubadas invertidas em anaerobiose por 48 horas a 37°C (Caetano, 2018; Penido, 2019). Decorrido este período, foram feitas as contagens das colônias e subsequente purificação em ágar MRS dos diferentes morfotipos, e então congelados no freezer a -21°C em tubos *ependorfs* esterilizados contendo 10% de glicerol estéril, para posterior identificação. A partir das colônias puras foram realizadas reação de catalase e coloração de Gram (Norris *et al.*, 1981; Caetano, 2018; Penido, 2019).

2.2.2 Leveduras

As leveduras foram isoladas pela técnica de *drop plate* em ágar extrato de malte extrato de levedura (YM) (peptona 0,5%, extrato de malte 0,3%, glicose 1,0%, extrato de levedura 0,3% e ágar 2,0%) contendo 0,02% de cloranfenicol e 0,125% de tetraciclina. As amostras constituídas de massa e raiz de mandioca, foram pesadas 25g, homogeneizadas e diluídas em 225 mL de água peptonada estéril à 0,1%. As placas foram incubadas invertidas em aerobiose por 48 horas a 30°C (Caetano, 2018; Lacerda, 2002). Após este período foram feitas as contagens das colônias e subsequente purificação em ágar YM, e então congeladas a -21°C em tubos *ependorfs* esterilizados, contendo 20% de glicerol estéril para posterior identificação (Caetano, 2018; Penido, 2019).

2.3 Identificação molecular das bactérias do ácido láctico em amostras de tucupi comercial

2.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA de BAL foi realizada através do método descrito por Hoffman & Winston (1987) modificado. As colônias crescidas em ágar MRS foram ressuspendida em 100 µL de Tris-EDTA (TE), sendo adicionado em seguida 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) e duas pérolas de vidro à suspensão. Os tubos tipo *ependorfs* contendo a mistura foram levados ao Vortex (QL-901, Biomixer) por três minutos e meio e centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos (MiniSpin[®] Eppendorf). Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo tipo *ependorf*. Adicionou-se 50 µL de etanol 96% gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm. A fase líquida foi descartada e os tubos foram secos em estufa a 37°C por aproximadamente 2 horas. O DNA

foi ressuspendido em 50 μL de TE e a dosagem foi realizada em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) (Caetano, 2018; Penido, 2019).

2.3.2 Amplificação por PCR da região 16S do gene rRNA

A amplificação da região 16S do gene rRNA do DNA das BAL foi realizada através da reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). No experimento realizado utilizou-se 1 μL do iniciador 1492R $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen, EUA), 1 μL do iniciador 27F μmol^{-1} (Invitrogen, EUA), 5 μL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 μL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 3 μL de MgCl_2 1,5 mM (MBI Fermentas), 0,25 μL de Taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1 μL de DNA. Foi adicionado água deionizada q.s.p 50 μL . A reação foi realizada no termociclador Eppendorf (Mastercycler® Pro) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, trinta ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto e meio, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos (Caetano, 2018; Lane, 1991; Penido, 2019).

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0) a 120 V por 25 minutos para obtenção de bandas. Solução de GelRed™ (Biotium EUA) e tampão 6X foram usados para corar os géis e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilbert Lourmat, França) (Caetano, 2018; Penido, 2019).

2.3.3 Agrupamento pela análise dos perfis moleculares obtidos por RFLP

As BAL foram agrupadas por análise dos perfis moleculares obtidos por polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) por meio da digestão com enzimas de restrição *MspI*, *HaeIII* e *HinfI*, capazes de diferenciar as espécies de BAL, seguindo a metodologia de Brightwell *et al.* (2006) modificada. Para a reação de digestão, foram adicionados a cada tubo 2 μL de tampão 10X, 2 μL de albumina de soro bovino (BSA) apenas para a enzima *MspI*, 1 μL de DNA na dosagem $\geq 1.500 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e água q.s.p. 20 μL . Os tubos foram incubados a 37°C por três horas (Caetano, 2018; Penido, 2019).

Os fragmentos de restrição obtidos foram separados em gel de agarose à 2% por eletroforese em tampão TBE 0,5% a 100 V por 2 horas. Os géis foram corados com solução GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob UV por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França) (Caetano, 2018; Penido, 2019).

2.4 Identificação molecular das leveduras

2.4.1 Extração de DNA

O DNA total de cada isolado de levedura das amostras foi extraído usando o procedimento descrito por Silva-Filho *et al.*, (2005) modificada. Após o crescimento em ágar YM, as leveduras foram ressuspensas em 100 µL de tampão lise (Tris-HCl-trishidroximetilaminometano – 0,05M, EDTA 0,5M, NaCl 0,1M e SDS – sódio dodecil sulfato – 1%). Os tubos tipo *ependorf* contendo essa suspensão, foram incubados em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após esse tempo foi adicionado 200 µL de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1) aos tubos e esses foram homogeneizados gentilmente por inversão e centrifugados a 13.400 rpm por 15 minutos (MiniSpin® Eppendorf). O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo tipo *ependorf*, onde foi adicionado 100 µL de isopropanol, homogeneizados novamente por inversão e deixados à temperatura ambiente por 15 minutos. Decorrido este tempo, os tubos foram centrifugados a 13.400 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 200 µL de etanol 70% gelado e homogeneizado por inversão. Os tubos foram centrifugados a 13.400 rpm por 10 minutos. Descartou-se o etanol e os tubos foram secos em estufa a 37°C por aproximadamente 2 horas. O *pellet* de DNA foi ressuspensado em 50 µL de tampão TE, e armazenados em freezer a -20°C (Penido, 2013; Caetano, 2018).

2.4.2 Agrupamento por PCR fingerprinting

Os perfis moleculares obtidos por reação de PCR *fingerprinting* foram obtidos pela utilização do *primer* microssatélite (GTG₅), seguindo a metodologia de Lieckfeldt *et al.* (1993). Para a reação foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,1 mM (Invitrogen, EUA), 1,5 µl de MgCl₂ 1,5 mM (MBI Fermentas), 2 µL de iniciador (GTG₅) 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada para 25 µL. A PCR foi realizada no termociclador Eppendorf (Mastercycler® Pro) nas seguintes condições:

desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguidos de extensão final a 72°C por seis minutos (Penido, 2013; Caetano, 2018).

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5% a 80 V por uma hora para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz UV por meio de um sistema de captação de imagem (Vilbert Lourmat, França) (Penido, 2013; Caetano, 2018).

2.5 Produção de tucupi em escala piloto e micro-organismos utilizados no estudo

Em um estudo anterior (Caetano, 2018), isolados de *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum* e *Pichia scutulata* previamente identificados nas amostras de tucupi coletadas em Belém, foram utilizados para a produção de tucupi em escala piloto. *P. scutulata* foi representada pelo isolado F7RGC, *L. plantarum* pelo isolado 1ERGC e *L. fermentum* pelo isolado 2ERGC.

2.5.1 Produção de tucupi em escala piloto

Para a produção de tucupi em escala piloto, primeiramente foi conduzida uma escala de bancada (P1). Neste processo, cerca de 1 quilo de mandioca amarela foi utilizado. As raízes passaram por um processo de lavagem, descascamento manual, nova lavagem e trituração com o auxílio de uma centrífuga (modelo *juicer*). A massa resultante foi então prensada em um tecido de algodão, resultando na extração do líquido (conhecido como manipueira), com rendimento aproximado de 200 mL (Figuras 2 e 3). As amostras obtidas a partir desta produção de tucupi em bancada foram codificadas como T2. Todo o procedimento foi conduzido sob rigoroso controle. Inicialmente, todos os materiais utilizados foram submetidos a uma lavagem com álcool 70%, garantindo a desinfecção adequada. Em seguida, esses materiais foram expostos à radiação ultravioleta (UV) por um período de 15 minutos, assegurando uma desinfecção adicional e minimizando o risco de contaminação.

Figura 2 – Fluxograma de obtenção da manipueira

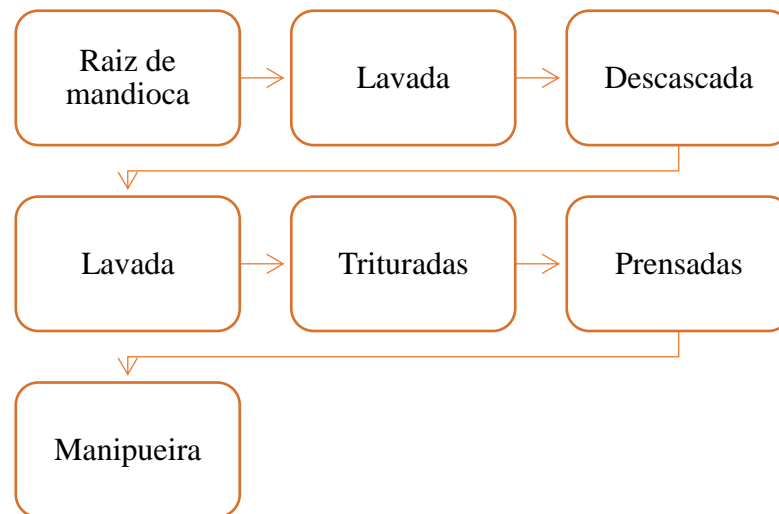


Figura 3 – Manipueira em fermentação



Fonte: Fotografia da autora (2022/2023).

A produção do tucupi em escala piloto (P2, P3, P4 e P5), foram utilizados cerca de 20 quilos de mandioca amarela para a obtenção de 5 litros de manipueira (Figura 2). O método de extração da manipueira seguiu o mesmo procedimento do teste de bancada (P1). As amostras coletadas na escala piloto também receberam a codificação T2.

Para a produção de tucupi, em escala piloto, foram testadas cinco culturas iniciadoras, sendo duas culturas puras (BAL) e três, culturas mistas (associação de BAL e levedura). As culturas iniciadoras testadas estão citadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Culturas iniciadoras testadas para produção de tucupi em escala piloto

Micro-organismos	
P1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (2ERGC); <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> (1ERGC); <i>Pichia scutulata</i> (F7RGC)
P2	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (2ERGC)
P3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (2ERGC); <i>Pichia scutulata</i> (F7RGC)
P4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> (1ERGC)
P5	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> (1ERGC); <i>Pichia scutulata</i> (F7RGC)

De acordo com a metodologia modificada de Bernucci *et al.* (2017) e Brito (2022), o inóculo foi padronizado com contagens de $9 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$. Inicialmente, foi transferido 1 mL de cada BAL para 10 mL de caldo MRS, incubado por 24 horas à 37°C em condições de microaerofilia. Posteriormente, a escala foi aumentada para 40 e 450 mL de caldo MRS nas 48 e 72 horas seguintes, respectivamente.

Após o período de incubação, as culturas foram submetidas a um processo de centrifugação sob condições de refrigeração, utilizando a centrífuga Novatecnica NT825, por um período de 10 minutos a uma velocidade de 4.900 rpm. O sobrenadante resultante foi cuidadosamente removido. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de caldo MRS ao concentrado de células, que foram homogeneizados utilizando um vórtex e, em seguida, novamente centrifugados por mais 10 minutos. Este processo foi repetido com a adição de 10 mL de caldo MRS. O sobrenadante obtido foi então descartado, e as células foram lavadas com uma solução de água peptonada estéril a 0,1% (Bernucci *et al.*, 2017; Brito, 2022).

A suspensão de micro-organismos foi padronizada com base na turbidez, utilizando a escala McFarland como referência. No teste P1, a suspensão de BAL foi ajustada para uma concentração de 10^8 UFC/mL . Nos testes subsequentes, P2 a P5, essa concentração foi aumentada para 10^9 UFC/mL , a fim de garantir a precisão dos resultados experimentais.

Em seguida, foi realizada uma diluição seriada decimal até 10^{-8} . Uma alíquota de 100 μL foi transferida para 900 μL de água peptonada estéril a 0,1%, contendo 0,1% de ágar bacteriológico, seguida de uma homogeneização. As diluições foram então plaqueadas em micro-gotas (*drop plate*) de 10 μL em meio MRS e incubadas a 37°C por um período de 48 horas em condições de anaerobiose. Após esse período, procedeu-se à contagem de *L.*

plantarum e *L. fermentum* em UFC/mL. A quantidade ideal de BAL obtida na suspensão foi então inoculada na manipueira previamente obtida para iniciar o processo de fermentação do tucupi (Bernucci *et al.*, 2017; Brito, 2022). A obtenção da cultura de levedura foi realizada de maneira semelhante à metodologia empregada para as BAL, com diferença no meio de cultivo utilizado, que consistiu em caldo e ágar YM, e na temperatura de 30°C. A suspensão de levedura foi padronizada para uma concentração de 10⁶ UFC/mL.

A manipueira foi submetida a um processo de fermentação em estufa com temperatura controlada de 30°C com variação de +/- 2°C. Essa fermentação ocorreu em recipientes de aço inox, o quais foram previamente higienizados com álcool 70% e exposto a luz UV por 15 minutos. Além disso, os recipientes foram cuidadosamente cobertos com papel kraft.

No teste P1, alíquotas de 1 mL foram coletadas em intervalos de uma hora nos tempos 0 até 12h e 24 horas. Nos testes P2 a P5, amostras de 15 mL foram coletadas no mesmo período. Após o esse período, o tucupi (produto final) foi submetido à fervura por cerca de 10 minutos no teste P1, e por uma hora nos testes P2 a P5. Essas amostras obtidas durante o processo de fermentação foram inoculadas em ágar MRS acidificado e YM pela técnica de plaqueamento *drop plate* até a diluição 10⁻⁸.

2.6 Monitoramento molecular das culturas iniciadoras durante a fermentação da mandioca para produção de tucupi

O monitoramento da permanência das linhagens iniciadoras foi realizado utilizando as técnicas moleculares de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para BAL e reação de PCR *fingerprinting* com o uso *primer* microssatélite GTG₅ para as leveduras em amostras coletadas durante o processo fermentativo para produção de tucupi.

2.6.1 Isolamento das bactérias do ácido lático

As BAL foram isoladas a partir do plaqueamento em ágar MRS acidificada (0,1% de ácido sórbico e ácido clorídrico à 5N) de amostras coletadas durante a fermentação da mandioca para produção de tucupi. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose com gerador e indicador de anaerobiose a 37°C durante 48 horas. Após esse intervalo de tempo, foram realizadas as contagens de colônias expressas em log UFC/mL. Uma colônia de cada cultura

iniciadora foi selecionada e purificada em caldo MRS, incubadas a 37°C por 48 horas e depois congelada a -21°C após a adição de glicerol estéril a 10% para posterior identificação (Norris *et al.*, 1981; Penido, 2019).

2.6.2 Monitoramento molecular

A extração de DNA foi realizada pelo método descrito por Hoffman e Winston (1987) modificado, descrito anteriormente no item 2.3.1. A amplificação por PCR da região 16S do gene rRNA foi realizada como no item 2.3.2. A análise do perfil molecular obtido por RFLP foi realizada como descrito no item 2.3.3.

2.7 Isolamento das leveduras

As leveduras foram isoladas em ágar extrato de malte de levedura (YM) (0,5% de peptona, 0,3% de extrato de malte, 1% de glicose, 0,03% de extrato de levedura e 2% de ágar) contendo 0,02% de cloranfenicol e 0,125% de tetraciclina. As placas foram incubadas aerobicamente a 30°C por 48 horas. As leveduras foram quantificadas e as contagens dos isolados expresso em log/mL. Uma colônia de cada cultura iniciadora foi selecionada e purificada em caldo YM a 30°C por 48 horas e então congeladas em tubo *eppendorf* a -21°C com adição de 20% de glicerol estéril análise posterior.

2.7.1 Extração de DNA das leveduras

A extração de DNA foi realizada de acordo com Silva-Filho *et al.* (2005) modificada, descrito anteriormente no item 2.4.1.

2.7.2 Análise dos perfis moleculares obtidos por PCR fingerprinting

A análise dos perfis moleculares foi realizada como descrito no item 2.4.2.

2.8 Isolamento, identificação e quantificação de *Bacillus* sp.

2.8.1 *Bacillus cereus* contagem de células vegetativas

Foram pipetados volumes de 0,1 mL de cada amostra em eppendorfs previamente estéreis, homogeneizados e diluídas em 0,9 mL de água peptonada 0,1% estéril com 0,1% de ágar. Das diluições decimais seriadas, foram retiradas alíquotas de 10 µL e inoculadas pela técnica de *drop plate*, no ágar MYP (*Manitol Egg Yolk Polymyxin* Ágar), enriquecido com emulsão gema de ovo e solução de Polimixina B a 1%. As amostras constituídas de massa e raiz de mandioca, foram pesadas 25g, homogeneizadas e diluídas em 225 mL de água peptonada estéril à 0,1%. Diluições seriadas foram realizadas e inoculadas alíquotas de 10 µL no ágar MYP. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas (Tallent *et al.*, 2021).

2.8.2 *Bacillus cereus* contagem de esporos

Para promover a esporulação bacteriana, as amostras processadas foram colocadas em banho-maria a 70°C por 15 minutos seguido de banho de gelo até que a temperatura atingisse 4°C. Após esse período, alíquotas de 10 µL de diluições seriadas foram inoculadas em superfície do ágar MYP por *drop plate*. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas (Silva *et al.*, 2010; Lima, 2021).

2.9 Identificação fenotípica do grupo *Bacillus cereus* sensu lato

Os isolados pertencentes ao grupo *Bacillus cereus* sensu lato que apresentaram colônias de cor rosa rodeada por um halo de aparência opaca, indicando a ação de lecitinase, foram identificadas através de testes bioquímicos convencionais. A identificação das espécies do grupo *Bacillus cereus* sensu lato foi realizada conforme o método de Tallent *et al.* (2021).

2.9.1 Teste de resistência a lisozima

Para a realização do teste, uma alçada da cultura foi inoculada em caldo nutriente contendo 0,001% de lisozima e adicionalmente inoculada em caldo nutriente sem lisozima (controle). Os tubos foram incubados por 48 horas a 35°C (Tallent *et al.*, 2021).

2.9.2 Utilização anaeróbica de glicose

O teste foi realizado com a inoculação de uma alçada da cultura pura em caldo vermelho de fenol glicose à 1%, previamente desaerado (fervura em banho-maria por 15 minutos, seguida

de resfriamento imediato em banho de gelo). A superfície do caldo foi coberta com vaselina estéril e os tubos incubados a 35°C por 24 horas (Tallent *et al.*, 2021).

2.9.3 Redução do nitrato

Uma alçada da cultura pura foi inoculada em tubos contendo caldo nitrato e incubado por 24 horas a 35°C. Após o período de incubação, 0,25 mL da solução A (0,8% de ácido sulfanílico) e 0,25 mL da solução B (0,5% de α -naftol) foram adicionados aos tubos (Tallent *et al.*, 2021).

2.9.4 Teste de Voges-Proskauer (VP)

Os tubos contendo caldo VP modificado para *Bacillus* foram inoculados com uma alçada do inóculo e incubadas por 48 horas a 35°C. Após esse período, foram adicionados 0,6 mL de solução de α -naftol 5%, solução de KOH 40% e uma pitada de cristais de creatina para cada 1 mL da cultura. Os tubos foram agitados vigorosamente e observado periodicamente, e deixados em repouso por até uma hora para que ocorresse o desenvolvimento de uma cor vermelha no meio de cultura (Tallent *et al.*, 2021).

2.9.5 Decomposição da tirosina

Uma alçada da cultura foi estriada no ágar tirosina inclinado e incubado por 72 horas a 35°C (Tallent *et al.*, 2021).

2.9.6 Cristais parasporais

Em ágar nutriente inclinado, uma alçada da cultura foi inoculada e incubada por 24 horas a 30°C. Após esse período, os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 30 dias para que ocorresse o envelhecimento da cultura, permitindo a esporulação e lise dos esporângios. Decorrido esse tempo, foi realizado um esfregaço da cultura em lâminas de vidro e coradas com solução de Azul Brilhante Coomassie e observadas ao microscópio óptico por imersão (Tallent *et al.*, 2021).

2.9.7 Motilidade

A cultura foi inoculada em um tubo de ágar motilidade para *B. cereus* perfurando o centro do meio a uma profundidade de 1 cm a partir do fundo do tubo. Os tubos foram incubados a 30°C por 24 horas e observou se ocorreu a migração das células para região fora da linha de inoculação (Tallent *et al.*, 2021).

2.9.8 Crescimento rizoide

Em ágar nutriente, uma alçada da cultura foi depositada no centro sem espalhar. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas e foi observado se a colônia desenvolvida apresentava crescimento rizoide (Tallent *et al.*, 2021).

2.9.9 Atividade hemolítica

O inóculo foi depositado em ágar tripticase de soja suplementado com sangue de carneiro, através de simples contanto do inóculo para um único ponto do meio. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas para observar se ocorreria a formação de um halo claro de hemólise havia se formado ao redor das colônias (Tallent *et al.*, 2021).

2.9.10 Teste de catalase

Uma alçada de cada isolado foi inoculada em tubos contendo meio ágar tripticase de soja inclinado. Os tubos foram incubados a 30°C por 24 horas. Após esse período, uma alçada de cada cultura foi emulsificada em peróxido de hidrogênio a 3% sob uma lâmina de vidro. Observou-se o borbulhamento imediato, o que caracteriza teste positivo (Silva *et al.*, 2010).

2.9.11 Coloração de Gram

As colônias foram inoculadas em tubos contendo ágar nutriente inclinado e incubadas por 24 horas a 30°C. Foi realizado o esfregaço de cada cultura em lâminas de microscópio. Em seguida, foram corados utilizando cristal violeta, bicarbonato de sódio, lugol e solução de Safranina. As lâminas foram observadas em microscópio óptico usando as objetivas de 40x e 100x (Silva *et al.*, 2010).

2.9.12 Atividade proteolítica, amilolítica e lipolítica

Para avaliar a atividade proteolítica dos isolados, 10 µL foi adicionada no centro da placa de ágar leite, suplementado com 20% de leite em pó desnatado, e incubado por 48 horas a 30°C (Tebaldi *et al.*, 2008).

A atividade amilolítica foi realizada em ágar amido modificado, contendo 10% de extrato de levedura, 20% de peptona de caseína, 10% de amido solúvel, 0,02% de cloranfenicol e 20% de ágar bacteriológico. Dez microlitros de cada cultura foram incubados no centro do ágar e incubados a 30°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a revelação com solução de iodo para visualizar a hidrólise do amido, que se caracteriza pela formação de uma área incolor ao redor da colônia (Kostinek *et al.*, 2005).

A atividade lipolítica foi realizada em ágar oliva, contendo 0,5% de extrato de levedura, 2% de sais biliares, 10% de azeite de oliva, 5% de sulfato de amônio, 2% de ureia, 1% de sulfato de magnésio, 1% de cloreto de sódio e 20% de ágar. Para visualizar o halo de proteólise, 10 µL de cultura foi depositada no centro do ágar e incubado a 30°C por 24 horas (Oliveira *et al.*, 2006).

2.9.13 Teste de psicrotolerantes

Os isolados foram inoculados em ágar TSA (Ágar Triptona de Soja) e incubados a 6°C por 28 dias e a 43°C por 4 dias (Tallent *et al.*, 2021).

2.10 Identificação molecular por Maldi-ToF MS

Todos os isolados foram reativados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Kasvi) e incubados por 24 horas a 30°C. Em seguida, as culturas bacterianas foram cultivadas em ágar nutriente (NA) por 8 horas a 30°C (Fernández-No *et al.*, 2013).

Para análise de Maldi-ToF foi realizada a extração de DNA de acordo com Assis *et al.* (2017) modificado. As colônias foram ressuspensas em 900 µL de água Milli-Q, sendo adicionada logo em seguida 300 µL de álcool absoluto. Os eppendorfs contendo a mistura foram levados ao vórtex por 15 segundos e centrifugados a 15.000 rpm por 2 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado e o pellet deixado secar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, foi adicionado aos pellets 50 μ L de ácido fórmico à 70%, vortexização por 15 segundos e deixado descansar por mais 5 minutos. Decorrido esse tempo, os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm por 2 minutos. Um microlitro do sobrenadante foi aplicado no *spot* da placa de Maldi-ToF. Adicionou-se 1 μ L de Maldi-ToF matriz (solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e foi deixado secar por 30 minutos em temperatura ambiente antes da leitura no equipamento.

A calibração do equipamento foi realizada com uma cepa padrão de *Escherichia coli* (DH5 alfa, Bruker Daltonics). Os critérios de avaliação de pontuação da identificação em tempo real, foram utilizados de acordo com recomendação do fabricante. Pontuação ≥ 2.000 indica uma identificação em nível de espécie. Pontuação ≥ 1.700 e < 2.000 indica uma identificação confiável (Assis *et al.*, 2017).

2.11 Análise filogenética

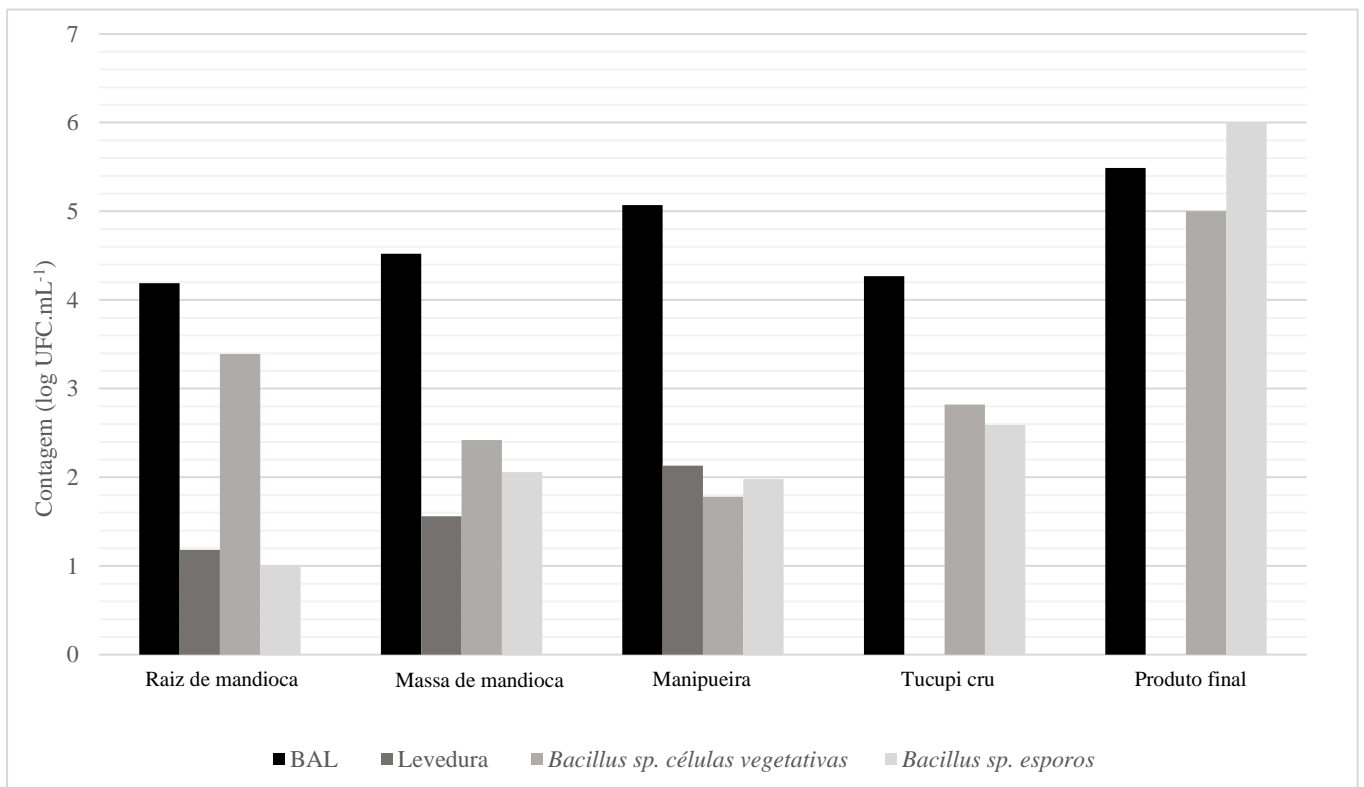
A análise filogenética foi realizada com base na sequência obtida no banco de dados da *National Library of Medicine* (NCBI), utilizando o programa de alinhamento múltiplo CLUSTAL W. A árvore filogenética foi posteriormente construída usando o método *Neighbour-Joining* (NJ), que se baseia no modelo Tamura de 3 parâmetros, com o auxílio do software Mega 11, versão 11.0.13. As sequências usadas na análise filogenética foram as mesmas identificadas pelo MALDI TOF, que são: *Bacillus cereus strain* DSMZ 31T, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis strain* DSM 10T, *Bacillus subtilis strain* DSM 5552, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis strain* DSM 5660, *Bacillus atrophaeus strain* DSM 5551, *Bacillus atrophaeus strain* DSM 2277 e *Bacillus mojavensis strain* DSMZ 9205 (Mascarenhas *et al.*, 2024).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Coleta de amostras e isolamento de micro-organismos presentes no tucupi

Para o presente estudo, foram coletadas um total de 119 amostras obtidas do processo de produção de tucupi e também do produto final. Foi possível isolar destas amostras BAL ($n = 67$), leveduras ($n = 57$) e *Bacillus* sp. ($n = 100$). Nas amostras identificadas como T1, que incluíam raiz / massa de mandioca, manipueira, tucupi cru e tucupi produto final, foram isolados, BAL, leveduras e *Bacillus* sp. BAL e *Bacillus* sp. (células vegetativas e esporos) foram encontradas em todas as amostras. Os níveis populacionais variaram de log de 1,00 a 5,49 UFC.mL⁻¹ para BAL, log de 1,00 a 5,00 UFC.mL⁻¹ para células vegetativas de *Bacillus* sp. e log de 1,00 a 6,00 UFC.mL⁻¹ para os esporos. As leveduras foram isoladas na raiz / massa de mandioca e manipueira, com contagens variando entre log de < 0,95 a 2,13 UFC.mL⁻¹ (Figura 4). No entanto, não foi possível isolar nenhuma colônia indicativa de levedura no produto final. Acredita-se que este fato aconteceu devido à danos irreversíveis às estruturas celulares causado pelo congelamento prolongado.

Figura 4 - Contagens populacionais de BAL, leveduras e *Bacillus* sp. (log UFC.mL⁻¹) – amostras em fermentação e produto final



Foi possível observar que nas amostras T1 as contagens de bactérias lácticas (3 logs) foram ligeiramente maiores em comparação com as contagens de leveduras, sugerindo que as BAL são predominantes e podem ter um papel mais significativo durante a fermentação da mandioca para produção de tucupi. A interação entre bactérias e leveduras durante a fermentação da mandioca é fundamental para aprimorar as características sensoriais do produto fermentado, graças às propriedades importantes desses micro-organismos, como a capacidade de produzir enzimas e compostos voláteis (Ramos *et al.*, 2015). O processo de associação ocorre da seguinte forma: as bactérias lácticas acidificam o ambiente, criando uma condição ácida que inibe o crescimento de patógenos e favorece o crescimento de leveduras, que utilizam os ácidos orgânicos produzidos como fonte de carbono. As leveduras, por outro lado, tornam o ambiente mais propício para a sobrevivência das bactérias e aprimoram as características sensoriais dos produtos fermentados, através da síntese de diferentes ésteres aromáticos e da degradação de fatores antinutricionais (Liu; Holland; Crow, 2004; Swierges, 2005). Além disso, algumas espécies de bactérias lácticas são amilolítica e, ao hidrolisar o amido, liberam derivados que podem ser utilizados pelas leveduras (Hattingh *et al.*, 2015).

Vários estudos relatam a predominância de bactérias lácticas na fermentação de mandioca (Almeida; Rachid; Schwan, 2007; Caetano, 2018; Crispim *et al.*, 2013; Lacerda, 2002, 2006; Lacerda *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2015; Omar *et al.*, 2000; Penido, 2013, 2019; Penido *et al.*, 2018). Em um estudo realizado por Caetano (2018) sobre identificação molecular de bactérias lácticas e leveduras envolvidas no processo fermentativo da mandioca para produção de tucupi, foi observada a predominância das BAL durante o processo de fermentação. As contagens variaram log de 1,80 a 7,25 UFC.mL⁻¹ para a BAL e log de 1,84 a 8,11 UFC.mL⁻¹ para as leveduras.

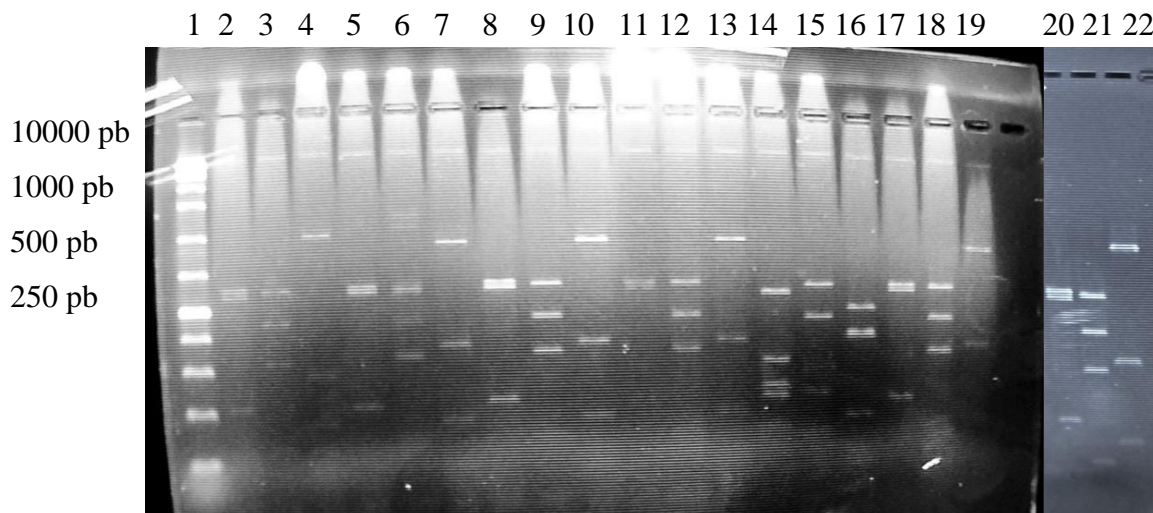
Os *Bacillus* foram encontrados em todas as amostras T1 (fermentação de mandioca para produção de tucupi e produto final). Segundo a Instrução Normativa Adepará n° 1 de 2008 (Brasil, 2008), a contagem de *B. cereus* no produto final deve ser inferior a 10² UFC/mL. No entanto, os resultados encontrados (log de 1,00 a 6,00 UFC.mL⁻¹) nessas amostras não estão em conformidade com o estipulado pela legislação. O solo é o principal reservatório de *Bacillus*, sendo a principal fonte de contaminação das raízes de mandioca (Ehling-Schulz; Frenzel; Gohar, 2015; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). O tucupi estudado é produzido em estabelecimentos de estrutura familiar, em ambientes domésticos, que não cumprem as exigências legislativas para uma unidade de produção ideal.

Caetano (2018), isolou *Bacillus cereus* durante a fermentação de mandioca para produção de tucupi e no produto final, com contagens variando log de 2,90 a 4,58 UFC.mL⁻¹, sendo essa maior contagem encontrada no produto final. Lacerda (2002), identificou *B. cereus* durante a fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo com contagens de 10³ a 10⁴ UFC/g de amostra. As contagens de *B. cereus* foram baixas no início do processo fermentativo, aumento posteriormente e permaneceram constantes até o 14º dia de fermentação. Depois desse período, houve uma diminuição nas contagens desses micro-organismos, e no final do processo, eles não foram detectados. Sánchez-Chica *et al.* (2021) detectaram a presença de espécies de *B. cereus* sensu lato em 57% das amostras de fécula de mandioca analisadas, as quais foram coletadas de padarias e indústrias de alimentos em pó em Medellín (Colômbia).

3.2 Identificação molecular de BAL em amostras de tucupi comercial

De todas as amostras de tucupi de produto final analisada (T1), foram obtidas 14 isolados de BAL. A análise microscópica desses isolados mostrou a predominância de bastonetes Gram positivos, e todos os isolados testaram negativo para catalase. Estas características iniciais sugerem a presença de bactéria do ácido láctico. Portanto, procedeu-se a identificação molecular através da análise do perfil de restrição. Este perfil foi obtido por digestão da região intergênica 16S-23S do DNA ribossomal com enzimas de restrição *HinfI*, *HaeIII* e *MspI*, resultando na discriminação de duas espécies, *L. plantarum* e *L. fermentum* (Figura 5).

Figura 5 - Perfil de digestão de espécies de *Lactobacillus* spp. isolados do tucupi. Canaleta 1: 1 KB DNA padrão de peso molecular; 2-13 e 20-22: *L. plantarum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*); 14-16: *L. fermentum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*)



Fonte: Foto da autora (2022)

Durante a fermentação de mandioca para a produção de tucupi, Caetano (2018) identificou quatro espécies de *Lactobacillus*. Na produção 1, apenas duas espécies foram detectadas: *L. plantarum*, que foi isolada na massa de mandioca e em uma única amostra em fermentação (manipueira), e *L. fermentum* que foi isolado em apenas uma amostra em fermentação. As amostras de tucupi da Produção 2, houve uma maior presença de *L. fermentum*, que foi isolado em todas as amostras em fermentação coletadas durante o processamento e no produto final. Além disso, outras duas espécies foram isoladas, embora em menor frequência: *Lactobacillus acidophilus* e *Lentilactobacillus parabuchneri*, encontrados em uma amostra em fermentação e no produto final, respectivamente. No entanto, a espécie *L. plantarum* não foi encontrada.

Penido *et al.* (2018), estudaram a seleção de culturas iniciadoras com propriedades adequadas para a produção de polvilho azedo durante o processo de fermentação em escala piloto. Nesse estudo, a espécie *Levilactobacillus brevis* foi identificada como a espécie que tinha o maior número de isolados (21,5%), seguida por *Enterococcus faecium* (16,5%), *L. fermentum* (15,2%) e *L. plantarum* (13,9%).

Lacerda (2006), em um estudo sobre a microbiota presente durante a fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo, identificou que as espécies de BAL predominantes pertencem ao gênero *Lactobacillus*. As espécies encontradas incluíram *L. plantarum* com 68,8%, *L. fermentum* com 11,7%, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* com 6,8%, *Lentilactobacillus hilgardii* e *Weissella confusa* (antigo *Lactobacillus confusus*) com 4,9% e *Amylolactobacillus amylophilus* (antigo *Lactobacillus amylophilus*) com 2,9%. Esses resultados estão de acordo com os encontrados no presente estudo, onde as espécies mais envolvidas na fermentação de mandioca para diferentes produtos foram *L. fermentum* e *L. plantarum*.

A fermentação de mandioca é utilizada na produção de vários produtos tradicionais africanos como *lafun*, *fufu*, *gari* e *attieké*, e tem sido observada a predominância de BAL. Em um estudo realizado por Oyewole & Odunfa (1990), foram identificadas várias espécies, incluindo *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Weissella cibaria*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc lactis*, na microbiota da fermentação de mandioca para a produção de *fufu*. No processo de fermentação do *lafun*, Padonou *et al.* (2009) encontraram uma predominância de *L. plantarum* (30%) e *L. fermentum* (42%), além de *Weissella confusa* (18%).

3.3 Monitoramento molecular das culturas iniciadoras durante a fermentação da mandioca para produção de tucupi

O tucupi foi produzido, inicialmente em escala de bancada (P1), onde foi testada a cultura iniciadora *L. plantarum*, *L. fermentum* e *P. scutulata*. A fermentação foi acompanhada por 24 horas e após esse período, o produto foi submetido ao processo de cocção por aproximadamente 10 minutos. Para produção de tucupi em escala piloto foram testadas quatro culturas iniciadoras, P2: *L. fermentum*, P3: *L. fermentum* e *P. scutulata*, P4: *L. plantarum* e P5: *L. plantarum* e *P. scutulata*. A fermentação foi acompanhada por 24 horas e, em seguida, o produto obtido foi submetido a cocção por aproximadamente 1 hora. A análise microscópica dos isolados previamente realizados revelou uma predominância de bastonetes Gram-positivos. Essa característica é consistente com a morfologia de típica de BAL. Além disso, os testes para catalase resultaram negativos. Essa reação negativa é esperada, pois essas bactérias geralmente não produzem catalase.

As culturas iniciadoras selecionadas (BAL e leveduras), que foram usadas na produção de tucupi em escala piloto, foram quantificadas e monitoradas por técnicas moleculares. As contagens obtidas foram log de 4,30 a 10,60 UFC.mL⁻¹ para BAL, seguidas por leveduras com contagens log de 4,22 a 8,00 UFC.mL⁻¹. Estes micro-organismos estiveram presentes durante todo o processo de produção de tucupi em escala piloto (T2) (Figura 6).

Em geral, as contagens de BAL apresentaram um ligeiro aumento no teste que incluía a associação das linhagens *L. plantarum*, *L. fermentum* e *P. scutulata* (P1) (Figura 6). A contagem mais alta foi registrada no início da fermentação (até 6h), reduzindo-se de forma gradual na metade do processo (12h). No final (24h), observou-se um crescimento das BAL, resultando na contagem mais elevada. As contagens de leveduras se mostraram inferiores às de BAL, sendo que a contagem mais elevada foi observada na produção P1, que incluía a associação das três linhagens selecionadas.

Figura 6 - Contagens populacionais de BAL e leveduras (log UFC.mL⁻¹) – no tucupi produzido em escala piloto

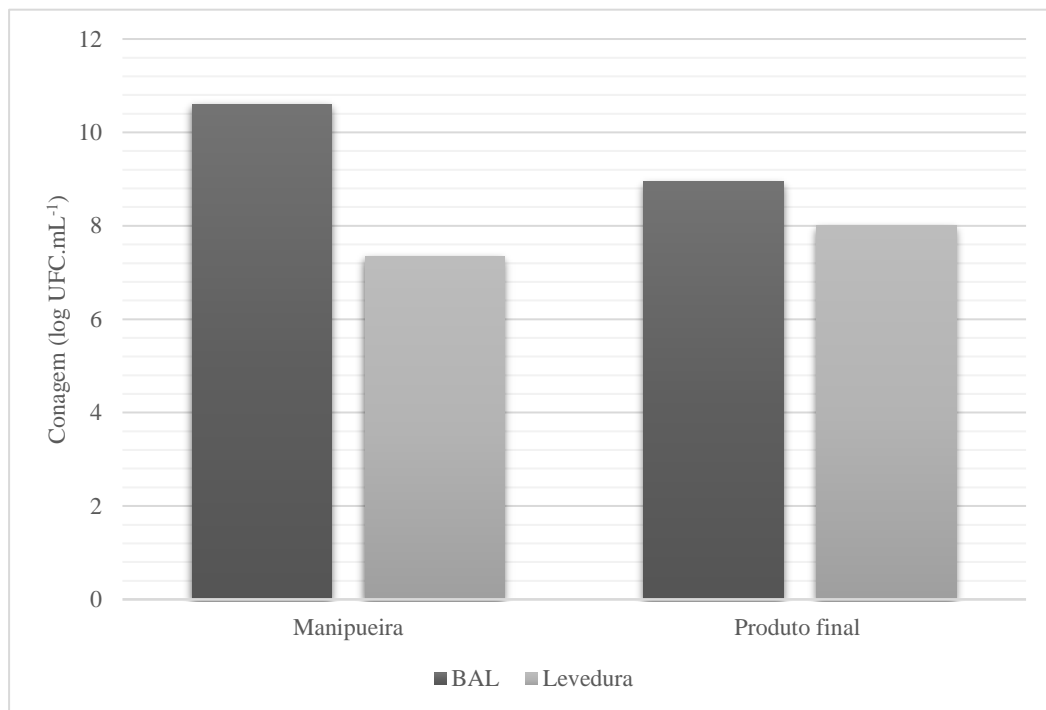
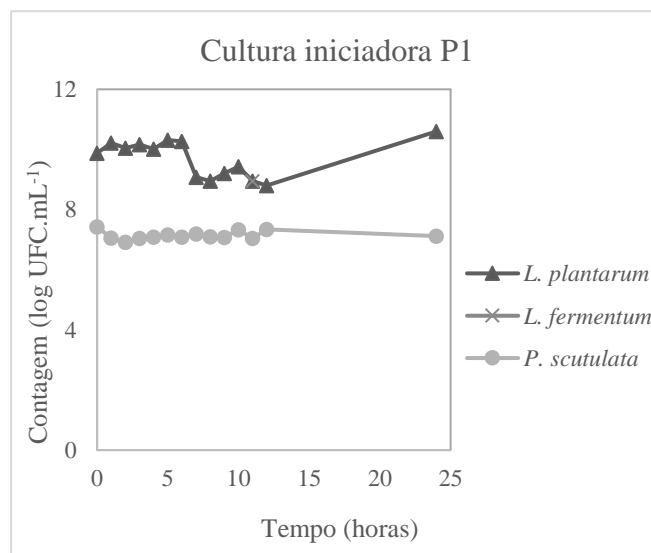


Figura 7 - Contagens populacionais (log UFC.mL⁻¹) de BAL e levedura durante a fermentação de mandioca para produção de tucupi em escala piloto (teste de bancada)



Na cultura iniciadora P2, observou-se uma menor presença de *L. fermentum* em comparação com o inoculo inicial (com uma contagem de log de 9 UFC.mL⁻¹) (Figura 7). Durante o processo de fermentação, as contagens permaneceram relativamente estáveis, com a maior contagem ocorrendo no tempo de 24h (log de > 3,00 UFC.mL⁻¹). No inoculo P3, que incluía a associação

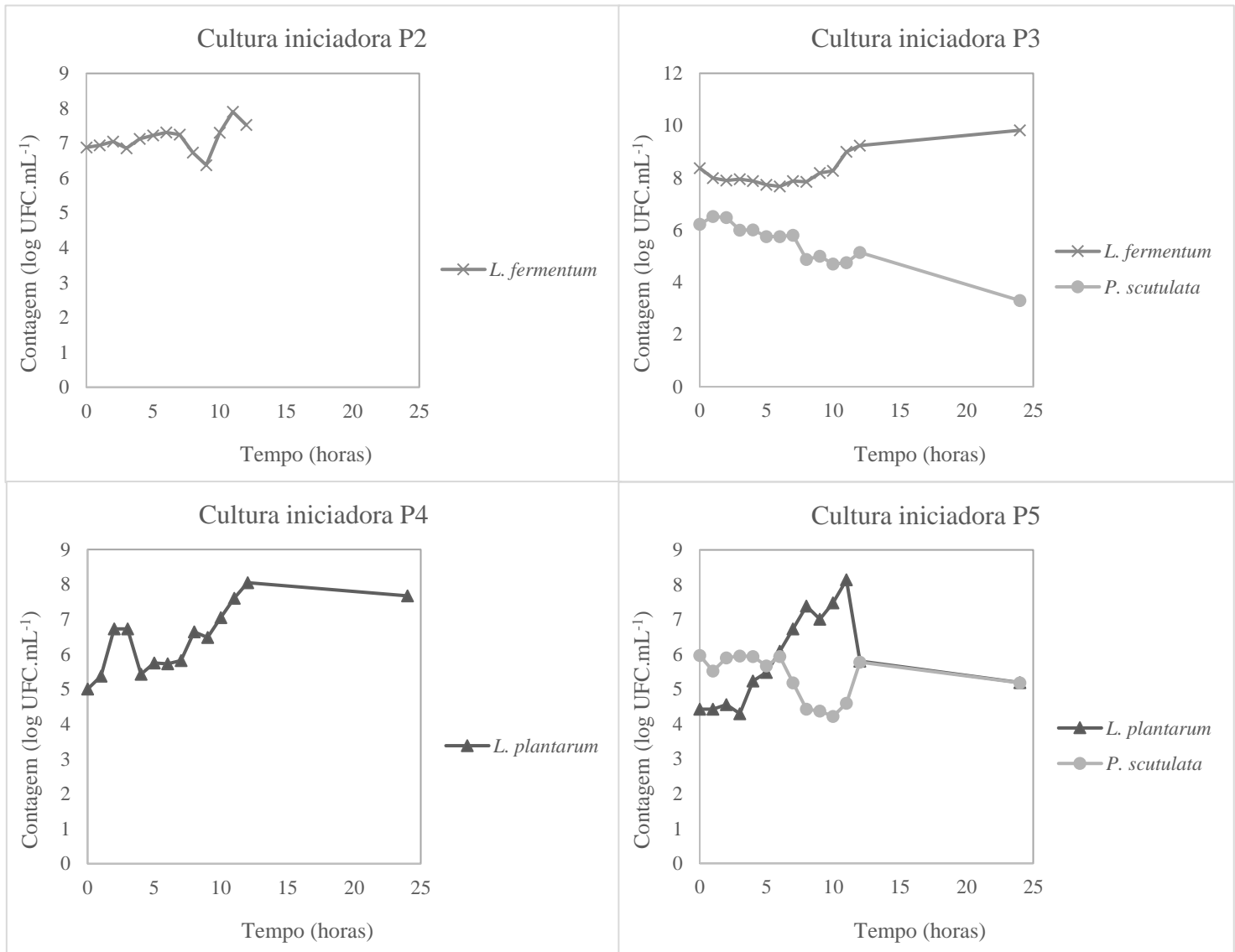
de *L. fermentum* e *P. scutulata*, a contagem da BAL foi superior tanto em relação a *L. fermentum* isoladamente quanto em relação as leveduras. Esta diferença pode ser atribuída ao ácido láctico, um metabólito importante que desempenha um papel crucial nas fermentações lácticas. Em fermentações que envolvem a associação de BAL e leveduras, a elevação da concentração de ácido láctico no meio pode resultar no aumento populacional da BAL e na redução do crescimento das leveduras (Penido, 2019).

Nas culturas iniciadoras P4 e P5, a contagem de *L. plantarum* foi semelhante, tanto quando isolada quanto em associação com *P. scutulata*. Durante o período de 1 a 5 horas na cultura de associação (P5), a contagem de *P. scutulata* foi ligeiramente superior à de *L. plantarum*. No entanto, a partir das 6 horas até o final da fermentação (24h), a *L. plantarum* apresentou contagens superiores à da levedura (Figura 8).

As colônias que apresentaram características indicativas de BAL foram submetidas à análise do perfil de restrição. Esse perfil foi obtido por meio de digestão da região intergênica 16S-23S do DNA ribossomal utilizando enzimas de restrição *HinfI*, *HaeIII* e *MspI*. Essa abordagem permitiu a identificação de duas espécies: *L. plantarum* e *L. fermentum*, onde a *L. plantarum* foi a espécie mais frequentemente isolada. Durante o processo de fermentação da cultura iniciadora P1, *L. plantarum* foi detectada em diferentes momentos, especificamente nos tempos 1, 3, 8 e 10 horas. Além disso, essa espécie também foi encontrada na cultura iniciadora P4, nos tempos 4 e 12 horas. Por outro lado, a espécie *L. fermentum* foi identificada na cultura iniciadora P1 apenas no tempo de 24 horas e na cultura iniciadora P4 no tempo de 8 horas.

Muitos autores relatam a predominância das BAL na fermentação de mandioca (Mugula; Narvhus; Sørhaug, 2003; Obilie; Tano-Debrah; Amoa-Awua, 2003; Lacerda *et al.*, 2005; Almeida; Rachid; Schwan, 2007; Kostinek *et al.*, 2007; Padonou *et al.*, 2009; Lacerda *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012; Crispim *et al.*, 2013; Penido, 2013; Franz *et al.*, 2014; Miguel *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2015; Menezes *et al.*, 2018; Penido *et al.*, 2018; Penido, 2019). Entre essas espécies *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *L. brevis* se destacam. Neste estudo foi observado a predominância das BAL sobre as leveduras, destacando o papel crucial que estas bactérias desempenham neste tipo de fermentação.

Figura 8 - Contagens populacionais (log UFC.mL⁻¹) de BAL e levedura durante a fermentação de mandioca para produção de tucupi em escala piloto



P2 = *Limosilactobacillus fermentum*; P3 = *Limosilactobacillus fermentum* + *P. scutulata*; P4 = *Lactiplantibacillus plantarum*; P5 = *Lactiplantibacillus plantarum* + *P. scutulata*.

Por meio da análise de perfis moleculares obtidos por PCR *fingerprinting* GTG₅, identificaram-se duas espécies distintas na cultura iniciadora P1. A primeira espécie, *P. scutulata* foi isolada nos tempos 0, 1, 9 e 11 horas. A segunda espécie, *Yarrowia lipolitica* foi encontrada nos tempos 0, 2, 3, 4, 6 e 8 horas.

Caetano (2018), identificou as espécies de *C. ethanolica* (20,5%), *Y. lipolitica* (28,2%), *Candida tropicalis* (17,95%), *P. scutulata* (15,4%) e *Pichia exigua* (2,6%) na fermentação de mandioca para produção de tucupi. Na produção 1, as espécies *C. ethanolica* e *Y. lipolitica* foram detectadas durante as etapas de fermentação, especificamente na 2^a e 3^a etapa para *C.*

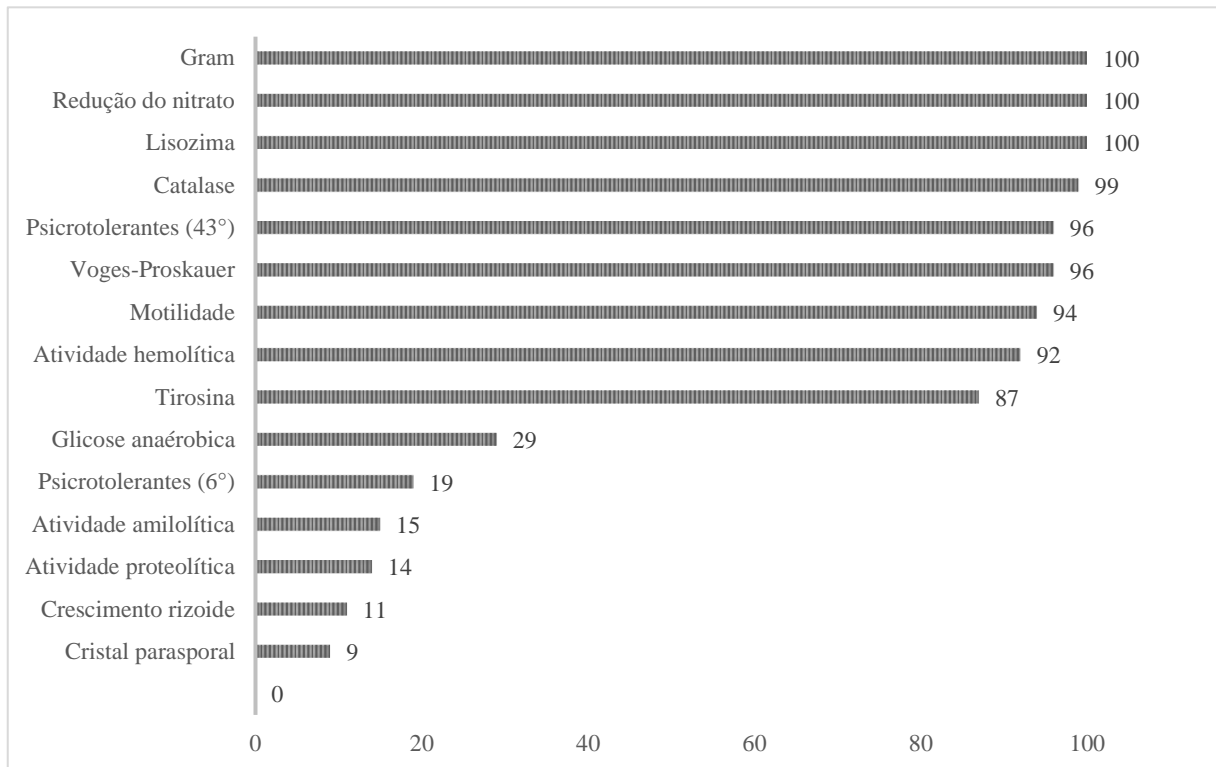
ethanolica e na 1ª e 3ª etapa para *Y. lipolitica*. Na Produção 2, a espécie *C. ethanolica* foi observada na 2ª etapa de fermentação, enquanto *Y. lipolitica* foi identificada na 1ª etapa de fermentação e no produto final. A espécie *C. tropicalis* foi encontrada na 3ª etapa de fermentação e no produto final.

No estudo de seleção de culturas iniciadoras para a produção do polvilho azedo em escala piloto, Penido *et al.* (2018) identificaram as espécies de *C. ethanolica*, *C. humilis*, *Geotricum fragans*, *Kazachstania exigua* e *P. scutulata*. Em um estudo semelhante, Lacerda (2002) analisou a microbiota durante a fermentação de mandioca para a produção de polvilho azedo e identificou as espécies *C. cylindracea*, *C. ethanolica-similar*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *Galactomyces geothricum*, *Issatchenkia scutulata* var *exigua-similar*, *Issatchenkia terricola*, *Klyveromyces lactis*, *Pichia membranifaciens* e *Saccharomyces exigus*. Os resultados encontrados ao de Penido *et al.* (2018) que encontrou as espécies de *C. humilis* e *P. scutulata* e Lacerda (2002), que encontrou *C. tropicalis*.

3.4 Identificação de *Bacillus cereus* “sensu lato”

A análise presuntiva foi realizada em meio MYP, onde as colônias que exibiram características de *Bacillus* sp, como coloração rosa, bordas definidas, aparência plana, seca, translúcida ou cremosa, e um halo de precipitação ao redor (indicativo da enzima lecitinase pelos microorganismos), foram submetidas a testes bioquímicos, após a coloração de Gram e a coloração de esporos com Verde Malaquita a 5%. A partir das amostras T1 da produção de tucupi e produto final, foram obtidos 100 isolados. Os resultados desses testes estão listados na Figura 9 e Apêndice A.

Figura 9 – Testes bioquímicos convencionais para identificação das espécies do grupo *B. cereus* sensu lato (%)



Com base nos resultados dos testes presuntivos, microscópicos e bioquímicos, foi possível identificar as espécies pertencentes ao grupo *Bacillus cereus* sensu stricto, seguindo o método proposto por Tallent *et al.* (2021). Os resultados indicam que 80% das amostras foram classificadas como *Bacillus cereus* sensu stricto. Além disso, 11% foram identificadas como *B. mycoides* e 9% como *B. thuringiensis*. Dos isolados identificados como *B. cereus* s.s., 55% provêm de amostras do produto final. Em todas essas amostras, a contagem ultrapassou o limite estabelecido pela Instrução Normativa Adepará n° 1 de 2008, que é de 10^2 UFC/mL (Brasil, 2008). Isso pode levar à síndrome diarreica e síndrome emética, que são consequências da ação das enterotoxinas *nhe*, *hl* e *cytK* ou toxina cerulida (Chaves, 2015; Ulrich *et al.*, 2019; Doellinger *et al.*, 2020; Manzulli *et al.*, 2021). Essas linhagens eméticas de *B. cereus* representam um grande perigo e frequentemente são relatadas como o agente causador de surtos de contaminação alimentar (Ulrich *et al.*, 2019).

Os *Bacillus* desempenham um papel crucial na fermentação de mandioca, uma vez que produzem enzimas que hidrolisam oligossacarídeos em açúcares de fácil digestão. Além disso, eles também estão envolvidos na alteração da textura do tecido da mandioca (Chantawannakul *et al.*, 2002; Joo; Hur; Han, 2007).

Em um estudo realizado por Barus *et al.* (2013), o objetivo era explorar a diversidade de linhagens *Bacillus* spp. que produzem amilase baseada em sequências de genes 16S rRNA em amostras de *tape*. As espécies encontradas foram *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. megaterium*, todas com diversas atividades amilolíticas.

No estudo de Caetano (2018), *Bacillus cereus* sensu stricto foi isolado em amostras de tucupi durante a fermentação e no produto final. Além disso, em um trabalho prévio, (Mascarenhas *et al.*, 2024), estas linhagens de *B. cereus* isoladas de tucupi, foram analisadas e os genes que codificam fatores de virulência foram identificados. Todos os isolados testaram positivos para dois genes que codificam o complexo NHE. O gene *cytK-2* foi encontrado em 81% das amostras. Todas as linhagens foram negativo para os genes *ces* e *cytK-1*. Os genes do complexo HBL (*hbla*, *hblC* e *hblD*) foram encontrados em 72% das amostras. O gene que codifica hemolisina cereolisina O foi encontrado em todas as linhagens. O gene que codifica a hemolisina II foi detectado em 9% das linhagens e o gene que codifica a hemolisina III foi detectado em 72% das linhagens. Devido à alta presença de genes que codificam fatores de virulência, essas linhagens de *B. cereus* sensu stricto são consideradas potencialmente patogênicas.

Ickofa *et al.* (2020), realizou um estudo com o intuito de isolar e analisar a capacidade fermentativa das espécies de *Bacillus* presentes nas raízes de mandioca. O objetivo era identificar possíveis linhagens candidatas para serem utilizadas como culturas iniciadoras em produtos fermentados derivados de mandioca. As espécies identificadas foram *B. subtilis* MT994787, *B. subtilis* MT994789, *B. tequilensis* MT994788k, *B. safensis* e *B. subtilis*. Foi observado que essas linhagens têm a capacidade de diminuir o tempo de fermentação da mandioca para 24 horas, tornando-as fortes candidatas para uso como culturas iniciadoras.

3.5 Identificação molecular por MALDI-TOF MS

Na análise MALDI-TOF, os resultados são normalmente apresentados como valores de *score* entre 0 e 3.000 (Assis *et al.*, 2017; Manzulli *et al.*, 2021). A identificação do micro-organismo é realizada comparando sua impressão digital de massa peptídica (PMF) com as PMFs armazenadas no banco de dados, ou combinando as massas de seus biomarcadores com o banco de dados do proteoma (Singhal *et al.*, 2015). Um *score* de 0 a 1.699 indica que a identificação do gênero ou espécie da cepa não foi possível. Um *score* entre 1.700 e 1.999 indica uma

provável identificação do gênero. Um *score* de 2.000 a 2.299 indica uma identificação confiável do gênero e uma provável identificação da espécie, enquanto um *score* 2.300 a 3.000 indica alta probabilidade de identificação do organismo em nível de espécie (Assis *et al.*, 2017; Manzulli *et al.*, 2021).

As análises das amostras T1 por MALDI-TOF, que foram obtidas do processo de fermentação da mandioca para produção de tucupi e produto final, foram consideradas *scores* ≥ 2.000 . Foi constatado que 69% dos isolados pertenciam à espécie *Bacillus cereus* sensu stricto. Embora as espécies de *B. thuringiensis* e *B. mycoides* não tenham sido identificadas, outras espécies de *Bacillus* foram encontradas, incluindo *Bacillus subtilis* (8%), *B. atrophaeus*, *B. mojavensis* e *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* representando 1% dos isolados.

A identificação de membros do grupo *B. cereus* é um desafio, devida à sua semelhança genética e fenotípica, provavelmente resultante de uma origem evolutiva comum. A análise por MALDI-TOF revelou resultados diferentes dos obtidos através de testes bioquímicos. Os métodos convencionais de identificação de micro-organismos dependem em grande parte de testes bioquímicos, que podem ser demorados e gerar resultados ambíguos e incompletos. Além disso, esses testes estão sujeitos a erros de interpretação, leitura e o uso de reagentes degradados pode comprometer a precisão dos resultados (Ha *et al.*, 2019; Manzulli *et al.*, 2021).

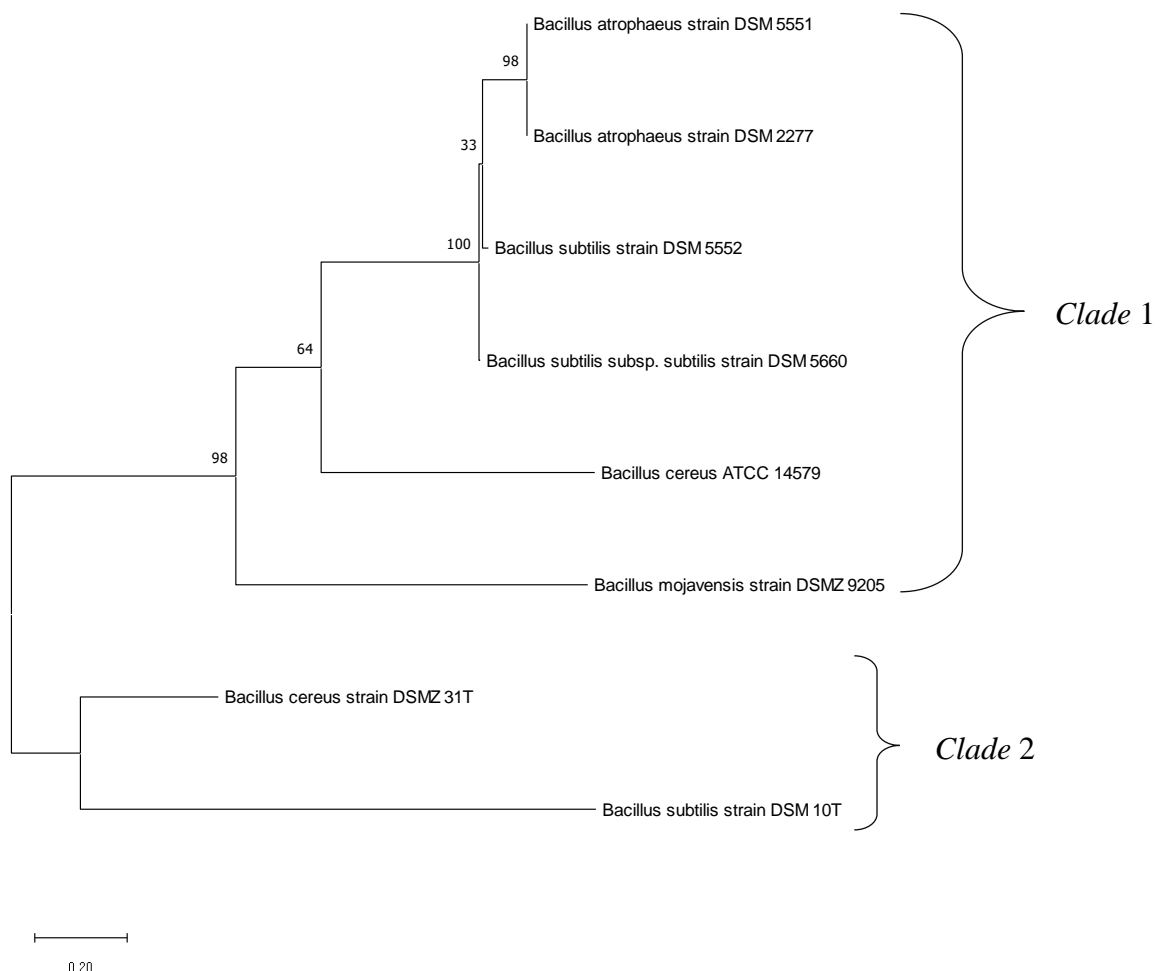
O uso do método de MALDI-TOF é extremamente robusto, rápido e apropriado para ser operado por pessoas que não possuem um conhecimento aprofundado da técnica em si. Isso ocorre porque os resultados são produzidos automaticamente por um software estatístico de alta complexidade. Portanto, o uso de métodos moleculares se mostra eficaz, podendo oferecer uma identificação mais rápida e precisa dos isolados de *Bacillus* spp (Ulrich *et al.*, 2019).

Fernández-No *et al.* (2013) em um estudo para avaliar a eficácia da impressão digital em massa do MALDI-TOF na identificação de espécies de *Bacillus* spp. relevantes para a indústria de alimentos, como *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*, e a sua caracterização em relação a outras espécies de *Bacillus* spp. A análise possibilitou a distinção entre as espécies bacterianas do grupo *B. subtilis* (*B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*). Isso demonstra que a análise por MALDI-TOF é uma ferramenta valiosa para diferenciar essas duas espécies.

3.6 Análise filogenética

A árvore filogenética foi construída usando o método *Neighbor-Joining* (Saitou; Nei, 1987). A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados foram agrupados no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) é mostrada acima dos ramos (Felsenstein, 1985). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura de 3 parâmetros (Tamura, 1992) e estão nas unidades do número de substituições de bases por local. Esta análise envolveu 8 sequências de nucleotídeos. As posições dos códons incluídas foram 1^a+2^a+3^a+Não codificada. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão aos pares). Houve um total de 15.251 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021) (Figura 10).

Figura 10 – Árvore filogenética de *Bacillus*



A árvore filogenética mostra dois grupos principais, conhecidos como *clades*. O primeiro grupo, *clade 1*, engloba todas as linhagens de *B. atrophaeus*, *B. mojavensis* e *B. subtilis* subsp. *subtilis*, além de algumas de *B. subtilis* e a cepa ATCC de *B. cereus*. Já o segundo grupo, *clade 2*, é formado por todas as linhagens de *B. cereus* s.s. e algumas de *B. subtilis*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As BAL e *B. cereus* são os micro-organismos que apresentaram altas contagens tanto nas amostras associadas à produção de tucupi quanto no produto final. Por outro lado, as leveduras apresentaram uma contagem menor nas amostras durante a fermentação e, no entanto, não foram isoladas no produto final, conforme observado neste estudo.

A cultura iniciadora P1, que inclui *L. plantarum*, *L. fermentum* e *P. scutulata*, apresentou um melhor desempenho para *L. plantarum*, sendo a espécie mais presente durante a fermentação. Quando *L. fermentum* e *P. scutulata* (P3) foram combinadas, houve um aumento na contagem da *L. fermentum*. Por outro lado, a combinação de *L. plantarum* e *P. scutulata* (P4) não mostrou diferenças significativas nas contagens de *L. plantarum*, seja quando associada com levedura ou inoculada sozinha. No entanto, *P. scutulata* atingiu sua maior contagem nas primeiras 5 horas de fermentação quando combinada com *L. plantarum* (P5).

Em relação ao tucupi produto final, a técnica de RFLP permitiu a identificação de duas espécies de BAL, *L. plantarum* e *L. fermentum*, onde *L. plantarum* foi a espécie mais prevalente. No entanto, não foi possível isolar nenhuma colônia sugestiva de levedura.

No que diz respeito as amostras T1 analisadas por identificação fenotípica do grupo *Bacillus*, a espécie de *B. cereus* s.s. foi identificada em 80% delas, enquanto as espécies de *B. mycoides* e *B. thuringiensis* foram encontradas em menores proporções. A espécie *B. cereus* s.s. foi encontrada em todas as amostras do produto final. Além disso, todas essas amostras excederam o limite de 10^2 UFC/mL estabelecido pela Instrução Normativa Adepará n° 1 de 2008, sugerindo que as condições higiênico-sanitárias são inadequadas no que diz respeito à presença deste patógeno.

Através da análise de MALDI-TOF, foi possível identificar que 69% das amostras eram *B. cereus* s.s., enquanto em menores proporções outras espécies como *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis* e *B. subtilis* subsp. *subtilis* foram identificadas. A discrepância na identificação por meio de testes bioquímicos pode ser atribuída à semelhança fenotípica do grupo *B. cereus*, bem como a possíveis erros na interpretação dos resultados, comprometendo a precisão da identificação final.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. G.; RACHID, C. C. T. C.; SCHWAN, R. F. Microbial population present in fermented beverage ‘cauim’ produced by Brazilian Amerindians. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 146–151, out. 2007.
- ASSIS, G. B. N. *et al.* Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of gram-positive fish pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, out. 2017.
- BARUS, T.; KRISTANI, A.; YULANDI, A. SHORT COMMUNICATION Diversity of Amylase-Producing *Bacillus* spp. from “Tape” (Fermented Cassava). **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 20, n. 2, p. 94–98, 2013.
- BERG, D. J. C. VAN DEN *et al.* Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. **Food Biotechnology**, 1 nov. 1993.
- BERNUCCI, B. S. P. *et al.* Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 51A. **LWT**, v. 80, p. 341–347, 1 jul. 2017.
- BRASIL. **Instrução Normativa Adepará n° 1 de 24/06/2008**. 2008.
- BRIGHTWELL, G. *et al.* Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, 2006.
- BRITO, B. *et al.* Influence of spontaneous fermentation of manipueira on bioactive amine and carotenoid profiles during tucupi production. **Food Research International**, v. 120, p. 209–216, out. 2019.
- BRITO, B. *et al.* Total and Free Hydrogen Cyanide Content and Profile of Bioactive Amines in Commercial Tucupi, a Traditionally Derived Cassava Product Widely Consumed in Northern Brazil. **Foods**, v. 12, p. 4333, 1 dez. 2023.
- BRITO, L. M. **Efeito do uso de ultrassom na viabilidade das culturas tradicionais do iogurte e culturas probióticas**. Dissertação—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2022.
- BUSZEWSKI, B. *et al.* Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 6, p. 1607–1623, 1 nov. 2017.
- CAETANO, R. G. **Isolamento e identificação molecular de bactérias lácticas e leveduras envolvidas no processo fermentativo da mandioca para produção de tucupi e avaliação higiênico sanitária**. Dissertação—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.
- CAMPOS, A. P. R. *et al.* **Avaliação das Características Físico-Químicas e Microbiológicas de Tucupi Comercial**. 1. ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2016.

CAMPOS, A. P. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. DE A. **Efeito da fermentação e cocção nas características físico-químicas e teor de cianeto durante o processamento de tucupi**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2016.

CASSONI, V. **Valorização De Resíduo De Processamento De Farinha De Mandioca (Manipueira) Por Acetificação**. Dissertação—Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2008.

CHANTAWANNAKUL, P. *et al.* Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. **Science Asia**, v. 28, 1 jan. 2002.

CHAVES, J. Q. **Caracterização de linhagens pertencentes ao grupo *Bacillus cereus* lato sensu isoladas no Brasil: filogenia e avaliação do potencial toxigênico e de virulência**. Tese—Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2015.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. D. O. Influência da fermentação na qualidade da farinha de mandioca do grupo d'água. v. 41, n. 2, p. 279–284, 2011.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. D. O.; OLIVEIRA, S. S. Study of tucupi physicochemical properties. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 437–440, 2007.

CRISPIM, S. M. *et al.* Molecular identification of *Lactobacillus* spp. Associated with puba, a Brazilian fermented cassava food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 15–21, 2013.

DOELLINGER, J. *et al.* Evaluation of MALDI-ToF Mass Spectrometry for Rapid Detection of Cereulide From *Bacillus cereus* Cultures. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, out. 2020.

DOLCI, P. *et al.* Advanced methods for the identification, enumeration, and characterization of microorganisms in fermented foods. Em: **Advances in Fermented Foods and Beverages**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 157–176.

DUŠKOVÁ, M. *et al.* Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 107–114, 1 out. 2012.

EHLING-SCHULZ, M.; FRENZEL, E.; GOHAR, M. Food-bacteria interplay: Pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUN, 2015.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985.

FERNÁNDEZ-NO, I. C. *et al.* Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. 2013.

FRANZ, C. M. A. P. *et al.* African fermented foods and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 84–96, out. 2014.

- HA, M. *et al.* Reliable identification of *Bacillus cereus* group species using low mass biomarkers by MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 887–896, out. 2019.
- HATTINGH, M. *et al.* Amylolytic strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from barley. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 310–318, out. 2015.
- HOFFMAN, C. S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 57, n. 2–3, p. 267–272, 1987.
- ICKOFA, J.; KAYATH, C. A.; GADET, M. D. First Development of a Biotechnological Ferment Based on a Consortium of the Genus *Bacillus* for the Optimization of the Fermentation Process of Cassava Tubers. **Advances in Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 563–574, 23 out. 2020.
- JOO, M.; HUR, S.; HAN, Y. S. Isolation, Identification, and Characterization of *Bacillus* strains from the Traditional Korean Soybean-fermented Food, Chungkookjang. **Journal of Applied Biological Chemistry**, 2007.
- KOSTINEK, M. *et al.* Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 527–540, out. 2005.
- KOSTINEK, M. *et al.* Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 342–351, out. 2007.
- LACERDA, I. C. A. **Caracterização da microbiota associada ao processo fermentativo da mandioca para produção do polvilho azedo**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.
- LACERDA, I. C. A. *et al.* Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 213–219, out. 2005.
- LACERDA, I. C. A. **Caracterização fisiológica e molecular das bactérias lácticas e leveduras na produção de polvilho azedo e utilização de culturas iniciadoras para processo fermentativo**. Tese—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
- LACERDA, I. C. A. *et al.* Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture-independent 16s rRNA gene sequence analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 650–657, 2011.
- LAY JR, J. O. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria*. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 172–194, 2001.
- LIMA, L. L. DE S. **Estudo do comportamento de *Bacillus cereus* em leite em pó reconstituído submetidos a diferentes tratamentos térmicos e condições de**

armazenamento. Dissertação—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

LIU, S.-Q.; HOLLAND, R.; CROW, V. L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 923–945, 2004.

MAFRA, I.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Food authentication by PCR-based methods. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 3, p. 649–665, 1 jul. 2008.

MANZULLI, V. *et al.* Discrimination of *Bacillus cereus* Group Members by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1202, jun. 2021.

MASCARENHAS, L. R. DOS S. *et al.* Molecular characterization and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolates from foodstuff and food poisoning outbreaks in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 6 mar. 2024.

MENEZES, A. G. T. *et al.* Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, p. 187–197, set. 2018.

MIGUEL, M. G. C. P. *et al.* Physicochemical and microbiological description of Caxiri – a cassava and corn alcoholic beverage. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 12, p. 2537–2544, out. 2015.

MUGULA, J. K.; NARVHUS, J. A.; SØRHAUG, T. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 307–318, out. 2003.

NORRIS, J. R. *et al.* The genus *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. Em: **The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria**. Berlin: Springer Berlin, Heidelberg, 1981. p. 1711–1742.

OBILIE, E. M.; TANO-DEBRAH, K.; AMOA-AWUA, W. K. Microbial modification of the texture of grated cassava during fermentation into akyeke. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2–3, p. 275–280, 2003.

OLIVEIRA, A. N. DE *et al.* Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, n. 26, p. 204–210, 2006.

OMAR, N. B. *et al.* Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 285–291, out. 2000.

OYEWOLE, O. B.; ODUNFA, S. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 145–152, 1990.

PADONOU, S. W. *et al.* The microbiota of Lafun, an African traditional cassava food product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 22–30, out. 2009.

- PENIDO, F. C. L. **Isolamento e identificação molecular da microbiota predominante na fermentação natural de mandioca: seleção de culturas iniciadoras para produção de polvilho azedo em escala piloto**. Dissertação—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- PENIDO, F. C. L. *et al.* Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 823–831, out. 2018.
- PENIDO, F. C. L. Produção de polvilho azedo em escala piloto a partir de bactérias do ácido láctico e leveduras. p. 123, 2019.
- RAMOS, C. L. *et al.* Microbiological and chemical characteristics of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. **Food Microbiology**, v. 49, p. 182–188, out. 2015.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, jul. 1987.
- SÁNCHEZ-CHICA, J. *et al.* Enterotoxin Gene Distribution and Genotypes of *Bacillus cereus* sensu lato Isolated from Cassava Starch. **Toxins 2021, Vol. 13, Page 131**, v. 13, n. 2, p. 131, out. 2021.
- SANTOS, C. C. A. DO A. *et al.* Microbiological and physicochemical characterisation of caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Juruna people of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 112–121, out. 2012.
- SETTANNI, L.; CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 1, p. 1–22, 1 abr. 2007.
- SILVA, N. DA *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.
- SILVA, A. P. R. E *et al.* Tucupi: a review of uses, physical-chemical, nutritional properties and technologies. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 05, p. 17467–17487, 23 maio 2023.
- SILVA-FILHO, E. A. *et al.* Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Springer**, v. 88, p. 13–23, 2005.
- SINGHAL, N. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 5 ago. 2015.
- SWIERGES, J. H. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. 2005.
- TALLENT, S. M. *et al.* BAM Chapter 14: *Bacillus cereus*. Em: **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. [s.l: s.n.].

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 678–687, jul. 1992.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 25 jun. 2021.

TEBALDI, V. M. R. *et al.* Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 3, p. 753–760, 2008.

ULRICH, S. *et al.* Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. **Food Microbiology**, v. 82, p. 75–81, out. 2019.

VILLARREAL-DELGADO, M. F. *et al.* The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95–130, out. 2018.

WIESER, A. *et al.* MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 965–974, 1 fev. 2012.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NA FERMENTAÇÃO DA MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI

1 INTRODUÇÃO

A mandioca, uma cultura tropical importante, serve como alimento básico e fonte de energia para milhões de indivíduos. Suas raízes, ricas em amido, são uma fonte acessível e eficaz de carboidratos (Aryee *et al.*, 2006; Pinto-Zevallos; Pareja; Ambrogi, 2016). No entanto, essas raízes são altamente perecíveis devido ao seu elevado teor de umidade após colheita. O processamento é empregado para valorizar as raízes brutas, transformando-as em uma variedade de produtos de relevância econômica diversa. Esses produtos são consumidos por seres humanos e animais, ou usados como matéria-prima em outros processo de produção (Shittu *et al.*, 2016).

A mandioca gera compostos que contribuem para sua proteção direta, incluindo glicosídeos cianogênicos, flavonóides glicosídeos e hidroxycumarinas. Além disso, a defesa indireta contra herbívoros é realizada através de compostos orgânicos voláteis, que são ativados pela herbivoria, e pela produção de néctar extrafloral (Pinto-Zevallos; Pareja; Ambrogi, 2016; Ribeiro *et al.*, 2023).

A fermentação de mandioca, realizada por culturas iniciadoras de BAL e leveduras, produz uma variedade de compostos voláteis, como ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éter, fenol e hidrocarbonetos. Penido (2019), identificou vários compostos em amostras de polvilho azedo, incluindo ácido palmítico, ácido caproico, ácido 9-hexadecenoico, álcool estearílico, benzoato de benzila, hexacosano, entre outros. Freire *et al.* (2015) identificaram em amostras de mandioca em fermentação os compostos ácido acético, ácido láctico, 2-hexanol, álcool feniletílico, o álcool isoamílico e a acetoína, entre outros.

Assim, este estudo tem como objetivo identificar os compostos voláteis produzidos durante o processo de produção de tucupi, em escala piloto, empregando as espécies de *L. plantarum*, *L. fermentum* e *P. scutulata* como culturas iniciadoras. Adicionalmente, avaliou-se a comparação entre os compostos produzidos no tucupi em escala piloto com o tucupi comercial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Neste estudo, foram avaliadas amostras de produtos comerciais ($n = 35$) adquiridos em estabelecimentos comerciais de Belém, Manaus e Ananindeua, e amostras da produção de tucupi em escala piloto ($n = 18$). As amostras comerciais foram adquiridas entre os anos de 2019 e 2022 e mantidas congeladas até o momento da análise.

2.2 Análise do perfil dos compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

2.2.1 Extração dos compostos voláteis

A extração dos compostos voláteis foi realizada utilizando Álcool Etílico Absoluto (Vetec) e Tripolifosfato de sódio (Adicel). A amostra foi misturada na proporção 1:1:1, homogeneizada em vórtex e deixada em mesa agitadora por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4.900 rpm por 5 minutos e 750 μ L do sobrenadante foi recuperado em tubo tipo *vials*. Os tubos foram armazenados em temperatura de 4°C até a execução das análises.

2.2.2 Identificação de compostos voláteis

Os compostos voláteis presentes nas amostras de tucupi foram detectados utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). O experimento foi realizado em um Cromatógrafo a Gás, equipado com um sistema de detecção por espectrometria de massas (modelo GCMS-QP2010 da Shimadzu). A coluna capilar utilizada era do tipo Elite Wax, com dimensões de 30m de comprimento, 0,25 μ m de espessura e 0,32 mm de diâmetro.

O forno foi ajustado para uma temperatura inicial de 35°C, que foi mantida por 7 minutos. Após isso, a temperatura foi aumentada em incrementos de 15°C até atingir 200°C. Em seguida, a temperatura continuou a subir até alcançar a temperatura final de 240°C. Todo esse processo resultou em uma corrida analítica com duração de 30 minutos. O gás hélio foi utilizado como

gás de arraste. O método de injeção adotado não envolveu a divisão de fluxo (*splitness*) (Penido *et al.*, 2019).

Os dados foram analisados no modo SCAN, utilizando a razão massa/carga (m/z) que varia de 25 a 250. A interface que conecta o cromatógrafo e o detector foi mantida a temperatura de 220°C, e a ionização por impacto de elétrons também foi realizada a 220°C. A massa e o perfil de fragmentação dos picos identificados foram comparados com a biblioteca de espectros do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) (Penido *et al.*, 2019).

3 RESULTADOS

A análise por GC-MS de amostras do tucupi de produto final, comercializado em diversos locais do Pará e em amostras de escala piloto com *L. plantarum*, *L. fermentum* e *P. scutulata*, permitiu a identificação de compostos voláteis. Foram detectados 11 compostos voláteis, que incluíam 3 ácidos carboxílicos, 6 álcoois, 1 aldeído e 1 aminoácido (Tabela 3). Entre os compostos voláteis identificados, os álcoois foram os mais abundantes, seguidos por ácidos carboxílicos, aldeído e aminoácido (Figuras 11 a 15).

As leveduras têm a capacidade de gerar uma ampla gama de compostos voláteis. Estes incluem álcoois, ésteres, terpenos, lactonas, aldeídos e cetonas. Esses compostos desempenham um papel crucial na formação do sabor dos alimentos fermentados e nas suas características organolépticas (Freire; Ramos; Schwan, 2015)

Figura 11 – Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi em fermentação com inoculo *L. fermentum*

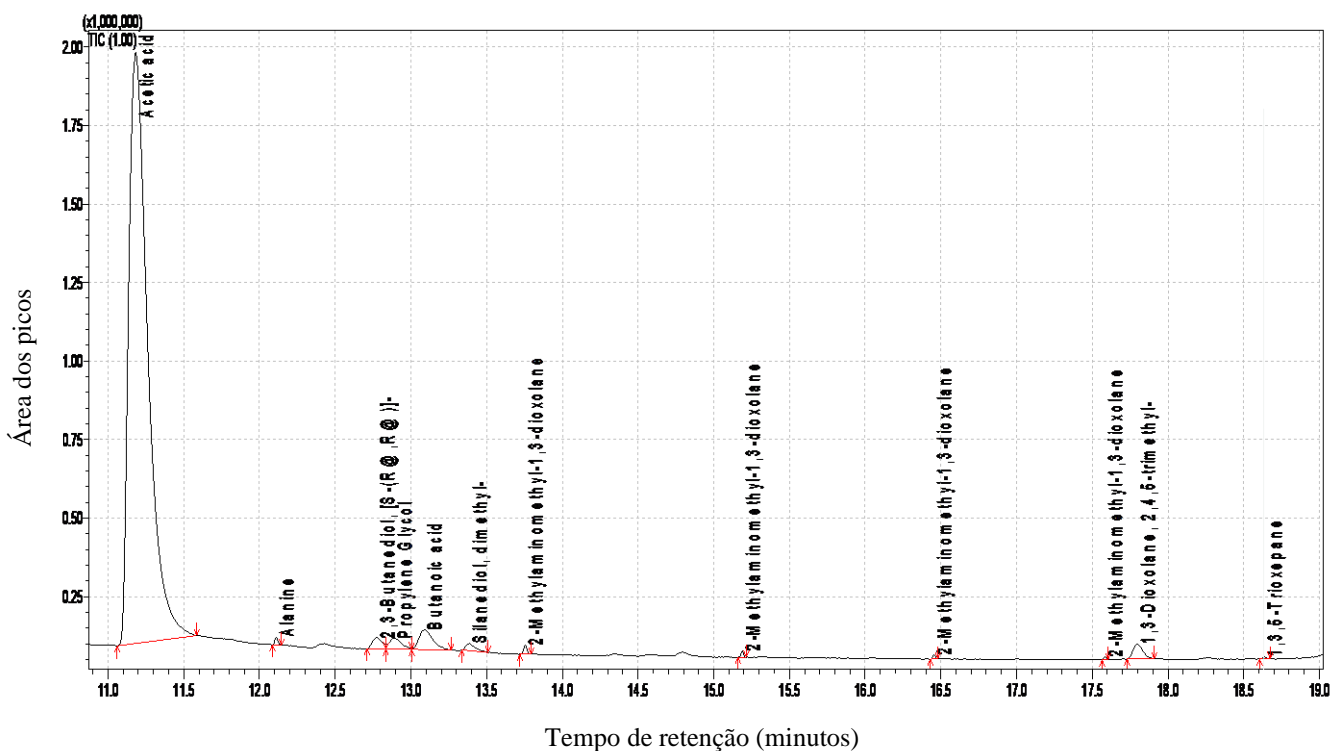


Figura 12 – Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi em fermentação com inoculo *L. fermentum* e *P. scutulata*

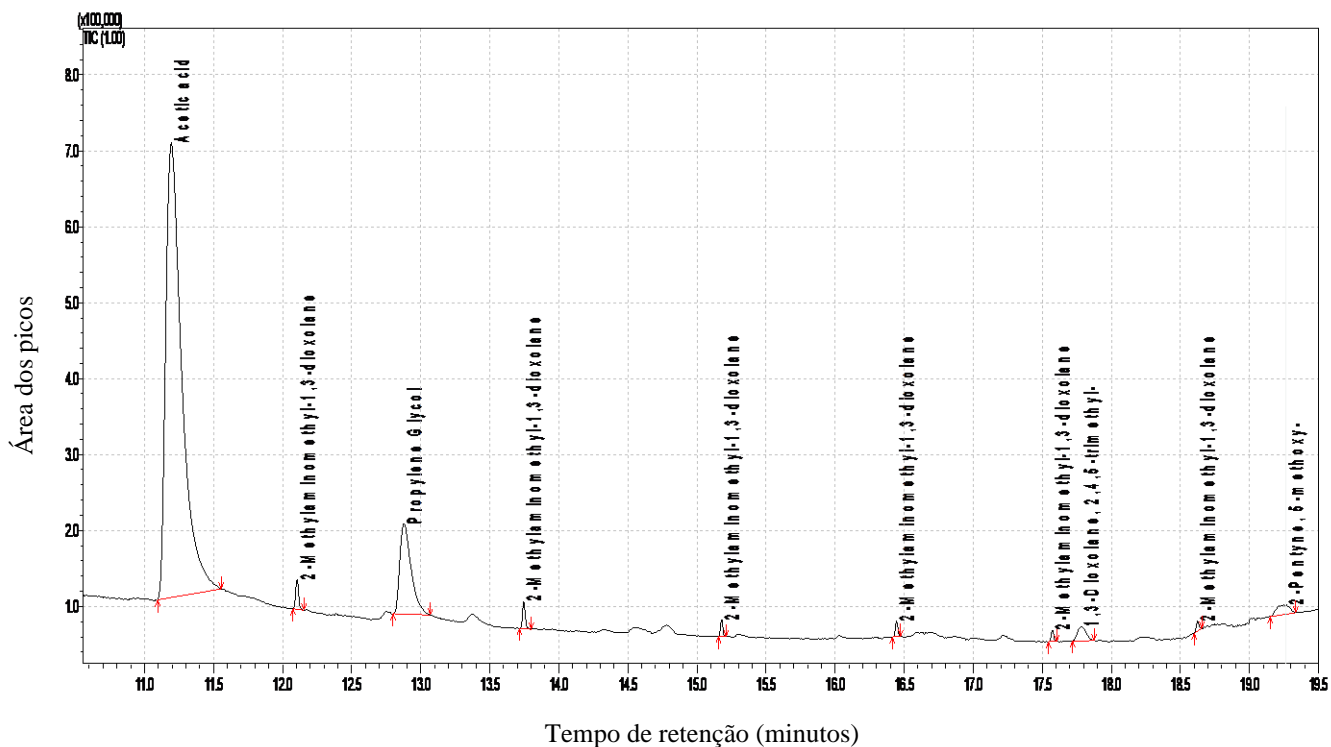


Figura 13 - Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi em fermentação com inoculo *L. plantarum*

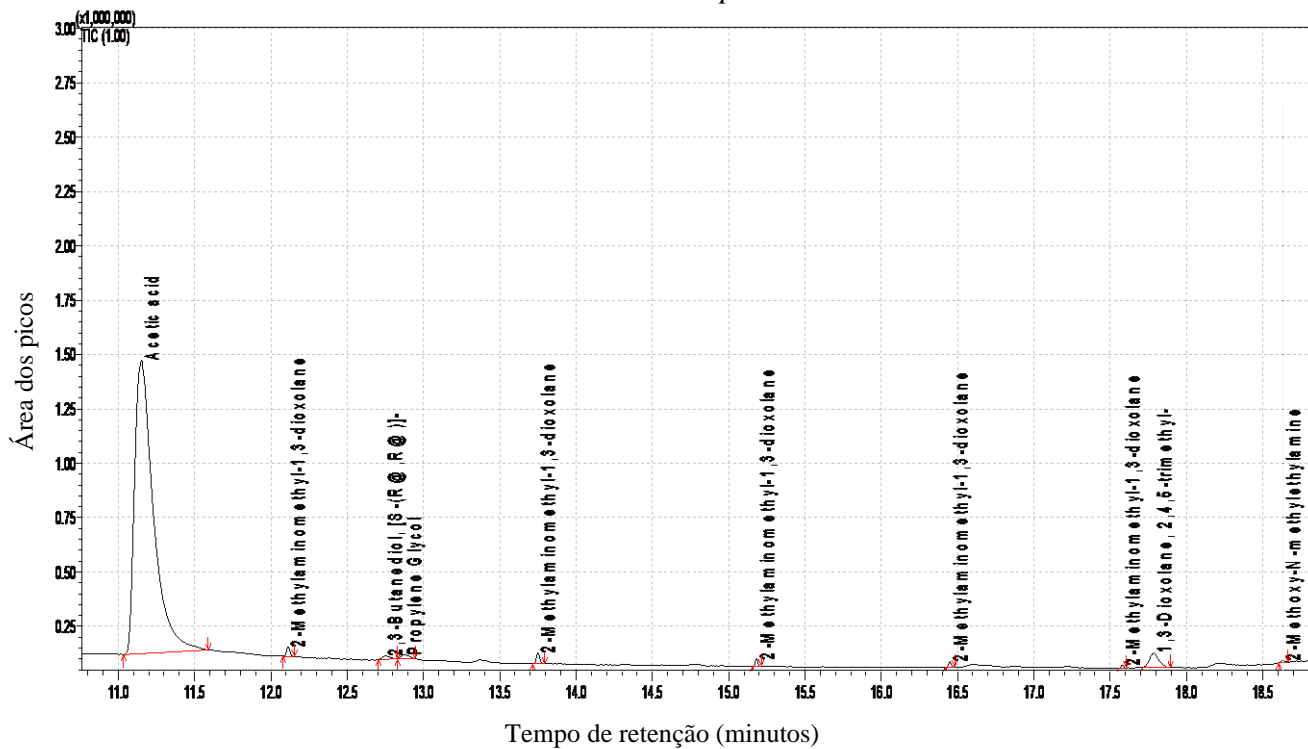


Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi em fermentação com inoculo *L. plantarum* e *P. scutulata*

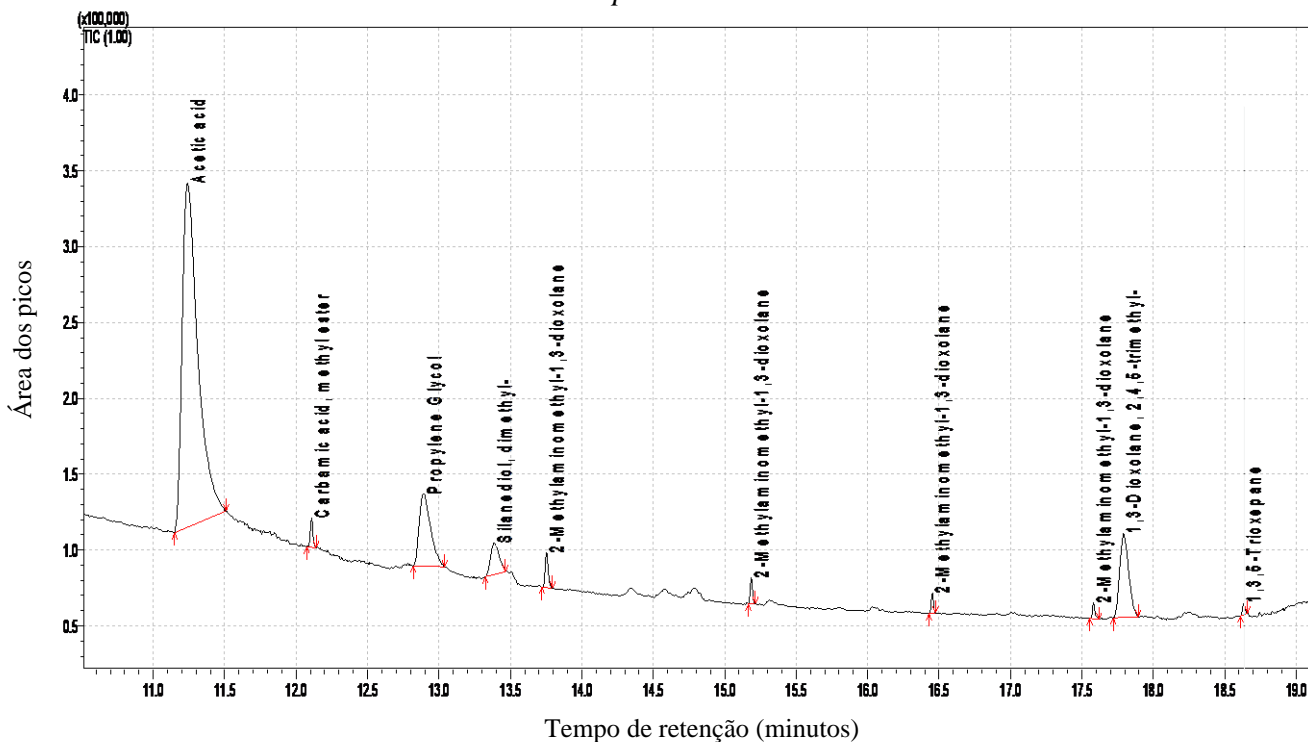


Figura 15 - Perfil cromatográfico obtido por CG-MS para amostra de tucupi produto final

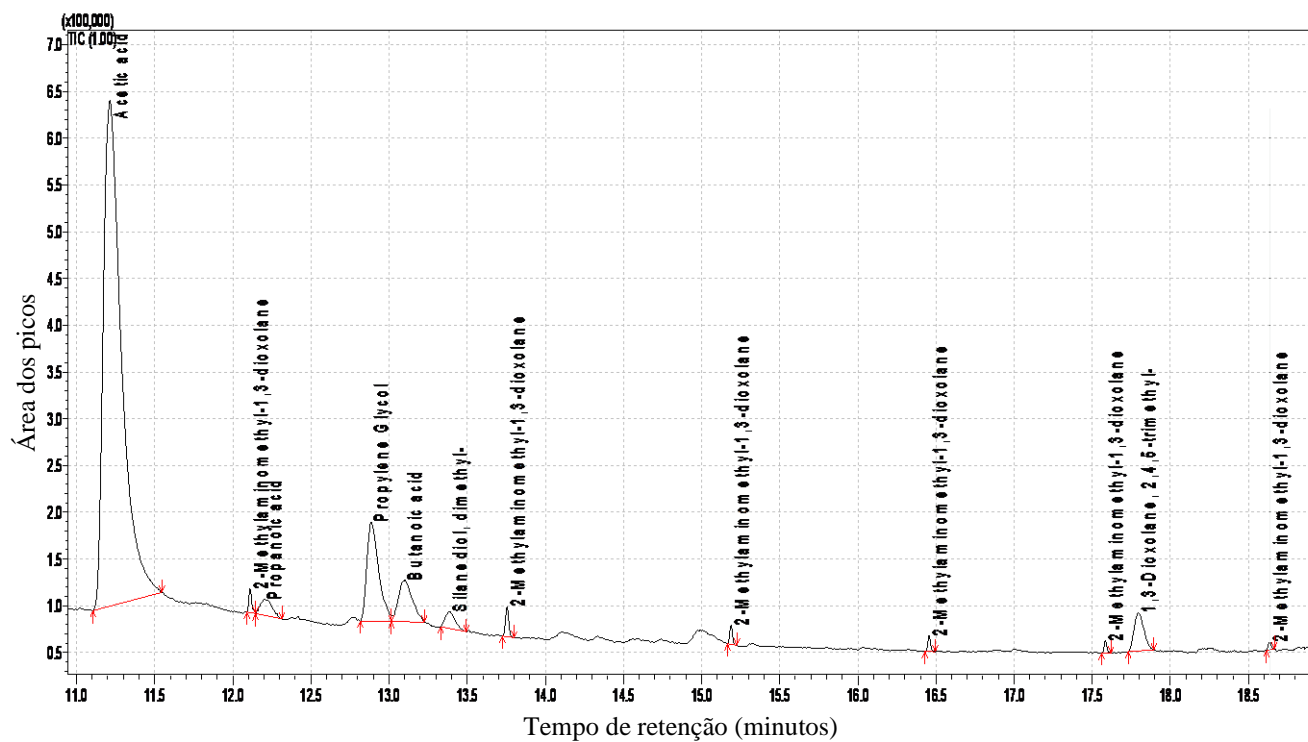
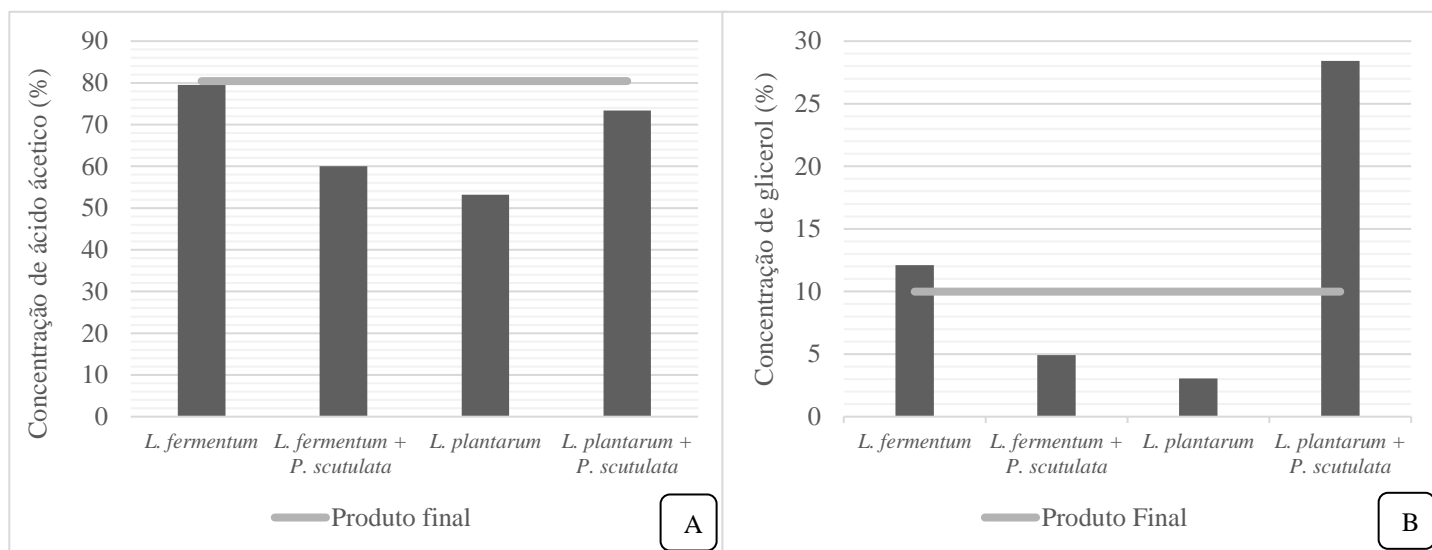


Tabela 3 – Identificação e concentração (%) de compostos voláteis identificados em amostras de tucupi em escala piloto e produto final após análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Composto	Fórmula	Manipueira Concentração em %				Produto final
		P2	P3	P4	P5	
Ácidos carboxílicos:						
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	93,71	96,93	94,61	91,63	97,69
Ácido butanoico	C ₄ H ₈ O ₂	4,08				5,44
Ácido propanóico	C ₃ H ₆ O ₂					2,34
Álcoois:						
2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	2,56	0,49	0,45		13,94
2-butanol	C ₄ H ₁₀ O				0,97	0,13
3-hexanol	C ₆ H ₁₄ O		0,16			0,13
Etileno glicol	C ₂ H ₆ O ₂					1,29
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	21,77	6,63	3,06	28,43	25,06
Propileno glicol	C ₃ H ₈ O ₂	3,45	11,51	0,57	11,20	22,53
Aldeído:						
Pentanal	C ₅ H ₁₀ O					2,60
Aminoácido:						
Alanina	C ₃ H ₇ NO ₂	0,51	0,33			0,84

Entre os ácidos carboxílicos identificados, o ácido acético se destacou como o composto mais predominante durante o processo de fermentação da mandioca para a produção de tucupi em escala piloto, comparado aos demais compostos identificados. Na produção de tucupi em escala utilizando como cultura iniciadora *L. fermentum*, a concentração de ácido acético inicial (tempo 0h) foi de 50,39% e aumentou progressivamente durante a fermentação, alcançando o pico de 93,71% após 24h de fermentação. Na produção com cultura iniciadora composta por *L. fermentum* e *P. scutulata* (P3), a concentração inicial de ácido acético foi de 45,34%, diminuindo durante as primeiras 4 horas de fermentação e depois aumentando após 8 horas, com uma concentração final de 96,93% (24h). A cultura iniciadora *L. plantarum* apresentou um comportamento semelhante ao inóculo P3, com a maior concentração de ácido acético sendo alcançada no final da fermentação 94,61%. No inóculo P5 (*L. plantarum* + *P. scutulata*), a concentração inicial do ácido acético foi de 73,70%, aumentou para 90,19% após 4 horas, caiu para 38,01% após 8 horas, e finalmente aumentou para 91,63% no final da fermentação. Na amostra do produto final, a concentração média de ácido acético foi de 80,42%, um valor que se mostrou similar ao observado nas amostras em escala piloto (Figura 16A).

Figura 16 – Concentração média de ácido acético e glicerol em amostras de tucupi em fermentação e no produto final



A = concentração de ácido acético (%); B = concentração de glicerol (%).

O ácido butanoico é um composto volátil que é produzido durante o processo de fermentação. Este composto foi detectado apenas na fermentação que continha o inóculo *L. fermentum* e em algumas amostras de produto final. Freire *et al.* (2015) identificaram a presença desse ácido durante a fermentação de mandioca, observando sua maior concentração nos ensaios realizados individualmente com as leveduras *Torulaspota delbrueckii* CCMA 0234 e *Pichia caribbica* CCMA 0198. Ele é conhecido por seu odor desagradável e sabor ácido, sendo responsável por aromas rançosos que lembram manteiga. Devido a essas características indesejáveis, sua presença é considerada prejudicial para a qualidade do produto final.

O ácido propanoico, um subproduto do metabolismo de proteínas pelas leveduras (Santos, 2018), foi identificado apenas no produto final, apresentando uma concentração de 2,34 %. Este composto é caracterizado por seu odor pungente e aroma e sabor suave, sendo responsável pelo cheiro característico do queijo suíço. Além disso, pode ser usado como aromatizante. Este ácido é também empregado como agente antifúngico em alimentos e sementes, bem como aditivo e conservante na produção de ração animal (Ngome, 2013).

Entre os álcoois que foram identificados, o glicerol apresentou a maior concentração quando houve uma combinação de *L. plantarum* com *P. scutulata* durante um período de fermentação de 8 horas, atingindo 28,43%. No produto final, as concentrações de glicerol variaram entre 1,38 e 25,06% (Figura 16B). A formação de glicerol está associada ao crescimento das

leveduras e pode ser induzida como resposta a condições de estresse, que podem ser causadas pela competição com as BAL (Freire; Ramos; Schwan, 2015). No vinho seco, é o composto mais abundante, ficando atrás apenas da água e etanol. Ele desempenha um papel de grande relevância sensorial no que se refere à sua viscosidade. Além disso, este composto contribui com um leve sabor adocicado (Mamede, 2003).

O 2,3-butanediol é considerado o diol mais significativo presente no vinho, caracterizando-se por seu aroma e um suave sabor de manteiga (Mamede, 2003). Durante o processo de fermentação, a concentração deste álcool foi relativamente baixa, variando entre 0,45% e 2,56%. No entanto, sua concentração aumentou atingindo 13,94% no produto final.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de compostos voláteis indica a possibilidade do uso conjunto de BAL e levedura como cultura iniciadora no processo de fermentação de mandioca para produção de tucupi.

O uso de cultura iniciadora em fermentações tradicionais que envolvem levedura e BAL visa aprimorar as condições de processamento e a qualidade do produto através de atividades metabólicas rápidas (como a produção de ácidos orgânicos, incluindo ácido acético), aprimorando os atributos sensoriais e aumento da segurança do produto.

Os ácidos orgânicos produzidos por leveduras e BAL auxiliam na formação do aroma, além de atuarem no controle do crescimento de micro-organismos que causam a deterioração em alimentos.

REFERÊNCIAS

- ARYEE, F. N. A. *et al.* The physicochemical properties of flour samples from the roots of 31 varieties of cassava. **Food Control**, v. 17, n. 11, p. 916–922, 1 nov. 2006.
- FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **Food Research International**, v. 76, p. 787–795, 1 out. 2015.
- GOMES, P. T. C. **Avaliação de características da mandioca e de seus híbridos interespecíficos**. Dissertação—Brasília: Universidade de Brasília, 2010.
- JANSZ, E. R.; ULUWADUGE, I. Biochemical aspects of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with special emphasis on cyanogenic glucosides - a review. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 25, n. 1, p. 1, 31 mar. 1997.
- MAMEDE, M. E. DE O. **Produção de aroma em mosto de uva destinado a produção de vinho espumante**. Tese—Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- NGOME, M. T. **Produção de ácido propiônico em soro lácteo por cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus***. Dissertação—Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2013.
- PENIDO, F. C. L. **Produção de polvilho azedo em escala piloto a partir de bactérias do ácido láctico e leveduras**. Tese—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.
- PENIDO, F. C. L. L. *et al.* Volatile compounds and fatty acids present in sour cassava starch produced with the starter cultures *Lactobacillus plantarum* and *Pichia scutulata*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 75, p. 373–378, out. 2019.
- PINTO-ZEVALLOS, D. M.; PAREJA, M.; AMBROGI, B. G. Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry**, v. 130, p. 10–21, 1 out. 2016.
- RIBEIRO, T. F. L. *et al.* Volatile Organic Compounds from Cassava Plants Confer Resistance to the Whitefly *Aleurothrixus aepim* (Goeldi, 1886). **Insects**, v. 14, n. 9, p. 762, set. 2023.
- SANTOS, G. DOS. **Perfil volátil do queijo de coalho artesanal e industrializado durante vida de prateleira**. Dissertação—São Cristovão: Universidade Federal de Sergipe, 2018.
- SHITTU, T. A. *et al.* Bread from composite cassava–wheat flour. II: Effect of cassava genotype and nitrogen fertilizer on bread quality. **Food Research International**, v. 41, n. 6, p. 569–578, out. 2008.

APÊNDICE A - Identificação de *Bacillus sensu stricto* através de testes bioquímicos

Código	Teste de VP	Glicose anaeróbica	Cristais parasporais	Colônias rizóides	Redução do nitrato	Motilidade	Hemólise	Decomposição de tirosina	Resistência a lisozima	Atividade amilolítica	Catalase	Coloração Gram	Psicrotolerantes (6°C)	Psicrotolerantes (43°C)	Protease	Lipase	Identificação bioquímica
RMBPN 1C1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
RMBPN 1C2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
RMBPN 2C1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
RMBPN 2C2	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. thuringiensis</i>
RMBPN CHOQUE 1C1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPN 1C1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPN 1C2	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
C1BPN 2C1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPN 2C2	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B. thuringiensis</i>
C1BPN CHOQUE 1C1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPN CHOQUE 2C1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPVP 1C1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPVP 1C2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPVP 2C1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPVP 2C2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPVP CHOQUE 1C1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C1BPVP CHOQUE 1C2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
TCBPN 1C1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
TCBPN 1C2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
TCBPN 2C1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
TCBPN 2C2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
TCBPN CHOQUE 1C1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
TCBPN CHOQUE 1C2	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. thuringiensis</i>

Código	Teste de VP	Glicose anaeróbica	Cristais parasporais	Colônias rizóides	Redução do nitrato	Motilidade	Hemólise	Decomposição de tirosina	Resistência a lisozima	Atividade amilolítica	Catalase	Coloração Gram	Psicrotolerantes (6°C)	Psicrotolerantes (43°C)	Protease	Lipase	Identificação bioquímica
TCBPN CHOQUE 2C1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
TCBPN CHOQUE 2C2	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. thuringiensis</i>
MMBPN 1C1	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
MMBPN 1C2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
MMBPN 2C1	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
MMBPN CHOQUE 1C1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
MMBPN CHOQUE 1C2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
MMBPN CHOQUE 2C2	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
MMBPVP 1C1	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B. thuringiensis</i>
MMBPVP 1C2	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
MMBPVP 2C2	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
MMBPVP CHOQUE 1C1	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
MMBPVP CHOQUE 2C1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
MMBPVP CHOQUE 2C2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C2AA04	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C2AA05	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C2AAx07	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C2AAx08	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C2AAx09	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C2AAx10	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C3BC01	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C3BB03	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C3BCx13	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C3BCx14	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>

Código	Teste de VP	Glicose anaeróbica	Cristais parasporais	Colônias rizóides	Redução do nitrato	Motilidade	Hemólise	Decomposição de tirosina	Resistência a lisozima	Atividade amilolítica	Catalase	Coloração Gram	Psicrotolerantes (6°C)	Psicrotolerantes (43°C)	Protease	Lipase	Identificação bioquímica
C3BCx15	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CC02	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CFx11	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CFx12	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CCx17	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CD01	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CD02	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CDx03	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
C4CDx04	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
C4CG05	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CGx06	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CGx07	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. thuringiensis</i>
C4CDx08	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CI09	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CIx10	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. thuringiensis</i>
C4CIx11	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CO012	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CO013	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4COx14	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C4CMx06	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C5DE01	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C5DE02	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
C5DEx03	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C5DEx04	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>

Código	Teste de VP	Glicose anaeróbica	Cristais parasporais	Colônias rizóides	Redução do nitrato	Motilidade	Hemólise	Decomposição de tirosina	Resistência a lisozima	Atividade amilolítica	Catalase	Coloração Gram	Psicrotolerantes (6°C)	Psicrotolerantes (43°C)	Protease	Lipase	Identificação bioquímica
C5DEx05	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DCx06	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DC08	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C5DL09	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DL10	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DLx11	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DLx12	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DO13	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C5DOx14	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DI16	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C5DI17	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DIx18	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DIx19	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DBx20	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DBx21	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DB22	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DJ23	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DJx24	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DNx25	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DN26	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. mycoides</i>
C5DN27	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. thuringiensis</i>
C5DNx28	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DD01	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DF02	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>
C5DFx03	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C5DKx04	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. thuringiensis</i>
C5DPx07	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. cereus sensu stricto</i>

Código	Teste de VP	Glicose anaeróbica	Cristais parasporais	Colônias rizóides	Redução do nitrato	Motilidade	Hemólise	Decomposição de tirosina	Resistência a lisozima	Atividade amilolítica	Catalase	Coloração Gram	Psicrotolerantes (6°C)	Psicrotolerantes (43°C)	Protease	Lipase	Identificação bioquímica
C6EA02	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>
C6EA02	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B.cereus sensu stricto</i>

ANEXO A – Artigo

Current Food Science and Technology Reports
<https://doi.org/10.1007/s43555-024-00030-y>

REVIEW

Traditional Fermented Products: Potential Origin for Probiotic Strains

Renata Gomes Caetano¹ · Isabella Bassoto Xavier¹ · Vanessa Feldmann¹ · Inayara Cristina
Alves Lacerda¹

Inayara Cristina Alves Lacerda inayarac@farmacia.ufmg.br

¹ Department of Food, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Accepted: 18 March 2024

©The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2024

Abstract

Purpose of Review This review highlights the importance of exploring microorganisms with probiotic potential—mainly lactic acid bacteria and yeasts—which are isolated from traditional fermented products that come from Africa, Asia, and Latin America. We greatly underline the potential these microorganisms have when it comes to conceiving non-dairy foods. After all, these microorganisms resulted in products with greater nutritional value and improved sensory characteristics, such as aroma, texture, and flavor.

Recent Findings Studies indicate that demand for products containing probiotics is increasing in markets as consumers seek healthier options for their diets. In response to this trend, the food industry has strived to produce more fermented products based on cereals, legumes, roots, and tubers so as to serve specific target groups. It is well known that consuming probiotics has several health benefits, including reduced acute inflammation and decreased risk of cardiovascular disease. These benefits occur due to the ability these microorganisms have of reducing cholesterol through the deconjugation of bile salts.

Summary Microorganisms play a fundamental role in our existence, being essential assets in the production of a variety of fermented foods and drinks that are part of our diets. Much

research has focused on elucidating the benefits these microorganisms can bestow our health. This study emphasizes the relevance of microorganisms with probiotic potential, which are isolated from various food sources, including cereals, roots, tubers, and vegetables. These sources are of great economic and social importance in African, Asian, and South American countries, as they represent a source of income for thousands of families and small farmers, in addition to comprising the nutritional foundation of these populations. The utilization of these probiotic strains presents a significant economic impact, as it improves the quality and safety of food as well as contributing towards the improvement of human health.

Keywords: Potential probiotics · Fermentation · Traditional foods · Yeast · Lactic acid bacteria

Introduction

A wide variety of fermented foods are produced and consumed in different regions of the world [1••]. They are defined as food produced through controlled microbial growth and the enzymatic transformation of major and minor components [2]. Fermented products are important food sources in Asia, Africa, and Latin America due to their sensory properties, high nutritional value, and ease of digestion [3]. Furthermore, these foods can act on the human body, as it is an important vehicle for probiotics [4••].

Fermentation is an old food processing method employed throughout the world that emerged with the goal of food conservation. Moreover, it is a part of the cultures of people whose knowledge spans generations. These products serve nutritional sources for many families in which several individuals live on account of the production of these foods [5•]. These fermented foods are produced from local raw materials and develop important products in the overall composition of diets [6], as well as foods with high nutritional value and with more enticing aromas, flavors, and textures [5•]. Fermented foods are produced from a variety of raw materials such as milk, cereals, legumes, roots, fruits, vegetables, meats, and fish [5•]. Africa is one of the continents that rely heavily on fermented foods in order to attain balanced and ideal diets. In Latin America, fermented food has been produced and associated with its tradition since pre-Hispanic times [4••]. Asians consume a variety of vegetables—both domesticated and wild—across different recipes, using indigenous knowledge of bio preservation [7].

A variety of traditional fermented products containing probiotic bacteria are sold in popular establishments in Asia [8]. Among these products, one can highlight fermented soy and

vegetables such as cabbage, beet, turnips, cauliflower, green beans, and cucumber [9]. The food found in African culture plays a key role: It is prepared from cereals such as corn, rice, millet, or sorghum. The native population of Latin America produces fermented foods and beverages mainly from maize, rice, and cassava that are important nutritional sources for these communities [10, 11]. Despite the abundance of fermented foods and their microbiological variety, there are still several challenges when it comes to deciphering the real health benefits obtained from the consumption of these products [12].

Preparation, fermentation time, and raw materials differ across the globe [13]. The fermentation process used to obtain traditional products happens spontaneously and in rustic environments, with a diverse microbiota found in its raw materials and environment (Table 1) [13, 14]. These fermented foods are also produced via traditional methods which employ pure and mixed cultures of various microorganisms such as lactic acid bacteria, yeasts, and non-lactic acid bacteria and fungi [4, 8]. Some species of LAB and yeast possess characteristic antibiotic compounds with bio-technological applications. They also have probiotic effects, which result in intestinal modulation, prevention and the treatment of gastrointestinal diseases, hypocholesterolemia effects, and antihypertensive, hypoglycemic, and immunomodulator properties [15, 16]. To be used in food, these probiotic microorganisms must be able to survive the passage through the digestive tract in order to grow within the intestine. This means that they must either resist gastric fluid and be able to grow in the presence of bile under intestinal conditions, or be consumed in a food vehicle that allows them to survive during the passage through the stomach and exposure to bile (Fig.1) [17].

Demand for probiotic foods is increasing due to their health benefits and growing consumer preferences. Although most probiotic products are derived from milk, lactose intolerance, milk protein allergy, high cholesterol content, high contents of saturated fatty acids, and vegetarianism limit their consumer population and inspired the idea of developing dairy-free probiotic products [47]. Therefore, non-dairy fermented foods with unique organoleptic properties derived from raw materials (cereals, tubers, legumes, and roots) need to be further explored. The food industry uses probiotic microorganisms isolated predominantly from substrates of animal origin such as dairy fermented food; however, they are also found in non-dairy fermented foods [5]. Therefore, this review aims to present different microbial strains that have probiotic potential found in non-dairy fermented foods.

Probiotic Potential of Traditional Fermented Food

Microorganisms with probiotic potential are found in traditional fermented foods [4, 7]. Probiotics are defined as live microorganisms that provide health benefits to the host when administered according to specific needs [17, 23, 52, 53]. Strains considered probiotics have various characteristics, including safety and physiological features and technological properties such as antibiotic susceptibility, acid tolerance, bile salt deconjugation, cell surface hydrophobicity, self-aggregation, co-aggregation with pathogens, activity against pathogens, and survival in gastrointestinal conditions which must all be taken into account. In the food matrix, NaCl tolerance, exopolysaccharides, and lipolytic and proteolytic enzyme production should also be considered (Fig.1) [15•, 54].

In this review, we will introduce some of the main traditional fermented products from Asia, Africa, and Latin America, while highlighting the presence of microbial strains that possess probiotic potential. Among the products described in this study are *gari*, *agbelima*, *lafun*, *fufu*, *jalebi*, *tapuy*, *puba*, *tucupi*, *sour cassava starch*, *calugi*, *yakupa*, *tarubá*, *cauim*, *masato* of *yuca*, *chicha*, *dégué*, *tempe*, among others (Table 1).

Lactic-Acid Bacteria

Products fermented by lactic-acid bacteria (LAB) represent a wide variety of functional foods and can provide probiotic strains. These microorganisms could be attractive for the food industry, mainly for producing gluten-free, lactose-free, and plant-based products [13•]. LABs can produce an active probiotic substance such as BLISs (bacteriocin-like substances)—a cellular complex—that allows the interaction with the host's mucous membranes, modulating the immune system beneficially [5•, 55]. Since they stimulate the inter-action between microorganisms and hosts, promoting their survival within the intestine and ensuring intestinal barrier protection through various mechanisms, the adhesion of lactic acid bacteria to epithelial cells and mucosal surfaces has been employed as a potential probiotic marker [26].

Lactobacillus, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, and *Lacticaseibacillus*

Lactiplantibacillus plantarum stands out among other LABs as one of the microorganisms most frequently found in the vegetable fermentation process. This species is predominant in several products from Africa, such as *gari*, *ogi*, *uji*, *agbelima*, *ting*, *lafun*, and *fufu* [4, 5•, 12, 18, 27]; from Asia, such as *jalebi*, *tapuy*, and *chinese steamed bun (comme)* [9, 19, 24]; and from Latin America, such as *puba*, *tucupi*, *sour cassava starch*, *calugi*, *yakupa*, *tarubá*, *cauim*, *tocosh*, *pozol*, *masato* of *yuca*, *chicha*, and *atol agrio* [14, 20, 29].

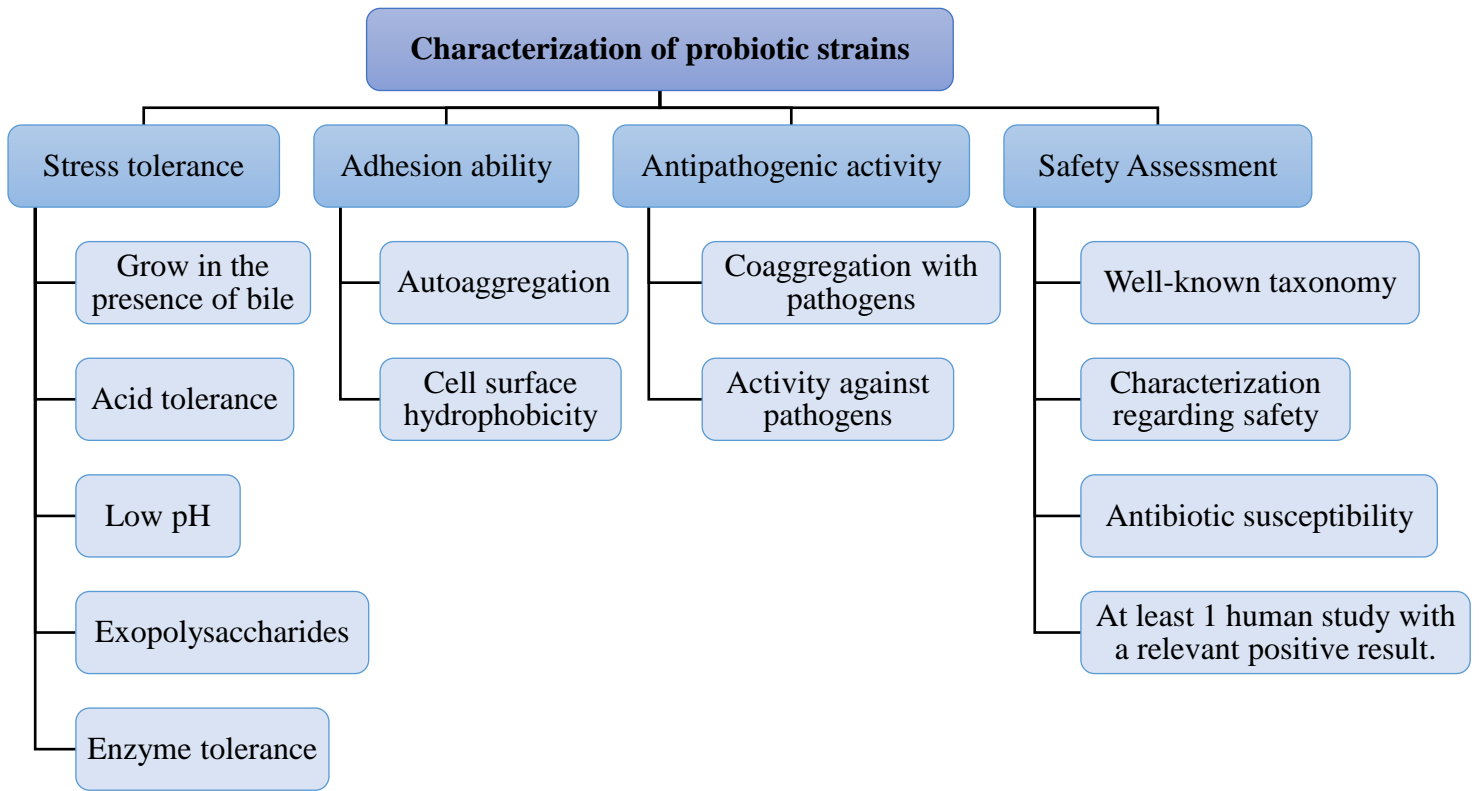
Table 1 Potential probiotic microorganism in traditional fermented products

	Substrate	Product	Area of production	Potential probiotic microorganism	References
África	Maize, sorghum or millet	Ogi	Nigeria, Benin	<i>Ped. pentosaceus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>Debaromyces hansenii</i>	[3, 11, 18-22]
		Uji	East Africa	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Ped. acidilactici</i> , <i>Ped. Pentosaceus</i>	[11, 21, 23]
		Mahewu	South Africa	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. lactis</i>	[3, 18, 19, 21, 24, 25]
	Cassava	Agbelima	Ghana	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	[18, 21, 26]
		Gari	West Africa	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. fallax</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. scutulata</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	[3, 18, 19, 21, 26, 27]
		Fufu	Nigeria	<i>Ped. pentosaceus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>S. cerevisiae</i>	[18, 20, 24, 26]
	Sorghum	Lafun	Nigeria	<i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. scutulata</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. rhodanensis</i> , <i>K. marxianus</i>	[18, 23, 26, 28]
		Hussuwa	Sudan	<i>L. fermentum</i> , <i>Ped. acidilactici</i> , <i>S. cerevisiae</i>	[28, 23]
		Ting	Botswana, South Africa	<i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i>	[18]
	Millet, sorghum	Kunu-zaki	Nigeria	<i>L. fermentum</i> , <i>L. casei</i> , <i>Ped. pentosaceus</i>	[18, 20, 24, 29]
Dégué		Burkina Faso	<i>L. gasseri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i>	[3, 18]	
Latin America	Maize, rice	Atole agrio	Mexico	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> , <i>Ped. pentosaceus</i>	[30, 31]
		Chicha	Equador, Argentina, Brazil,	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. brevis</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. casei</i>	[32-35]
	Cassava	Champús	Equador	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. fermentans</i>	[17]
		Pozol	Mexico	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> ,	[36, 37]
		Calugi	Brazil	<i>L. plantarum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. fermentans</i>	[38]
		Caxiri	Brazil,	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Ped. acidilactici</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>L. fermentum</i>	[16, 39]
		Tarubá	Brazil	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	[40]
		Yakupa	Brazil	<i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. kudriavzevii</i>	[41]
		Sour cassava starch	Brazil	<i>Lc. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> , <i>P. scutulata</i>	[41-44]
		Puba	Brazil	<i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i>	[45]

Table 1 (continued)

	Substrate	Product	Area of production	Potential probiotic microorganism	References
		Tucupi	Brazil	<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i>	[46]
	Cassava, rice, peanut, sweet potatoes	Cauim	Brazil	<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. guilliermondii</i>	[14, 47, 48•]
	Cassava, sweet potatoes	Masato de yuca	Peru	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i>	[49]
Asia	Rice, glutinated rice, wheat	Idli	India, Sri Lanka	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i>	[4]
		Selroti	India, Himalaia, Bhutan, Nepal,	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i>	[4]
		Saké	Japan	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Leuc. Mesenteroides</i>	[4]
		Tapuy	Filipinas	<i>D. hansenii</i> , <i>Leuconostoc</i>	[4, 12]
		Takju	Korea	<i>S. cerevisiae</i>	[12]
		Puto	Filipinas	<i>Leuc. Mesenteroides</i>	[12]
		Kha nhom Jeen (rice noodle)	Tailandia	<i>L. delbrueckii</i>	[1]
		Jalebi	India, Bangladesh, Nepal	<i>L. fermentum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. plantarum</i>	[4, 50]
		Sourdough	South Kirea	<i>L. brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Leuc. citreum</i>	[4, 12, 51]
		Chinese steamed bun (Comme)	Vietnã	<i>L. plantarum</i>	[51]
		Tape ketan	Indonesia	<i>P. pentosaceus</i>	[51]
Soybean		Tempe	Indonesia	<i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	[4••]
		Doenjang	Korea	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>D. hansenii</i>	[4••]
		Tauco	Indonesia	<i>L. delbrueckii</i>	[4••]

Fig. 1 Characterization of pro-biotic strains according to FAO/WHO and IPA



Strains of *L. plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* could tolerate the high-temperature thermal treatment (50–56°C) and were selected to verify their probiotic ability. These strains also presented high inhibitory activity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* with a medium inhibition diameter higher than 15mm. These species also showed tolerances to pH 3.0 and 0.3% (v/v) oxgall bile. Hence, the authors concluded that due to their properties, both strains are potentially probiotic and can be employed in the industrial processing of probiotic products in the future [21].

The CCMA 0743 strain of *L. plantarum* isolated from cassava cauim, a beverage produced by indigenous people in the North of Brazil, was able to tolerate pH 2.0 and grow in the presence of 0.3% biliary salts. This resistance is required in order to reach the human intestine and showcases their probiotic potential. In this paper, it was also observed that the *L. plantarum* isolates reached the desirable levels for a product to be considered probiotic (8.0 log UFC/mL) [10]. A probiotic food must contain at least 10⁸ UFC/g of viable microorganisms, depending on the microorganism and the consumer’s physiological conditions [28, 52]. Rebaza-Cardenas *et al.* [51] examined different strains of *L. plantarum* isolated from the poli-cereal

mixture chicha. One of the *L. plantarum* strains showed better resistance to in vitro gastrointestinal traffic and a major ability of adhesion to the intestinal epithelium in comparison to commercial probiotic strains [51].

Limosilactobacillus fermentum strains of these micro-organisms were isolated from a wide variety of fermented foods, such as *gari*, *ogi*, *uji*, *hussuwa*, *ting*, *agbelima*, *kunu-zaki*, *dégué*, *lafun*, *fufu* [4••, 5•, 18, 27, 46, 48•, 50], *jalebi* and *tempe* [7, 19], *puba*, *sour cassava starch*, *tucupi*, *yakupa*, *caxiri*, *pozol*, and *cassava's chicha* [14, 30, 32, 36, 38, 40–42, 45, 56].

Nascimento *et al.* [49] reported that the ingestion of *L. fermentum* strains from different sources, including fermented food, is capable of improving the composition of intestinal microbiota, reducing acute systemic inflammation, enhancing the short-chain fat acid compound in the colon, lowering blood pressure and dyslipidemia, and enhancing antioxidant defenses in the colon, liver, heart, and kidneys [49]. Lacerda *et al.* [31] evaluated various studies that reported the use of *L. fermentum* strains isolated from different sources, such as Chinese rice noodle wastewater—among others—with probiotic potential concerning the management of diabetes mellitus and observed that the consumption of different strains provided varying effects. Furthermore, some strains showed advantages when handling type 2 diabetes and their daily ingestion could be responsible for mitigating the complications of type 1 diabetes [31].

Strains of *Lactobacillus gasseri* are predominant in the small intestine and are also found in different fermented foods such as *dégué*, *sour cassava starch*, and *puba* [12, 38, 41, 50]. Studies reported that these strains contribute to immunological regulation, preventing bacterial and viral infections, reducing allergic symptoms, inhibiting lipid absorption, and exerting anti-tumor effects [43, 57].

In Africa, *Levilactobacillus brevis* strains are part of the microbial diversity of *dégué*, *mahewu*, *gari*, and *agbelima* [5•, 27, 50, 58, 59]. In Latin products, *L. brevis* strains are found in *agrijo*, *rice cauim*, *corn chicha*, *tarubá*, *sour cassava starch*, and *puba* [14, 33, 37, 38, 41, 42, 56, 60, 61]. In Asia, they are present in sourdough [24]. Several strains of this species are classified as probiotic because different studies showed that *L. brevis* improves immunity and mind health, relieving gastrointestinal tract irritation and enhancing the natural resistance to pathogens [62, 63].

Lacticaseibacillus casei can be isolated from food, but also from human reproductive and gastrointestinal tracts, which explains its wide implementation as a probiotic [64]. *L. casei* strains were identified in some fermented foods like *dégué*, *fufu*, *ogi*, and *kunu-zaki* (Africa) [50, 59]; *Chinese steamed bun (comme)* (Asia) [24]; and *pozol*, *tocosh*, *rice chicha*, and *puba* (Latin America) [33, 41, 65, 66]. Several strains of this species represent not only potential but

actual probiotic bacteria. Studies showed that *L. casei* strains are effective in immunological response modulations, in the protection against diabetes mellitus, in exerting anti-inflammatory effects over intestinal epithelial cells, in reducing time and preventative measures required for respiratory infections, as well as anti-arthritic properties, the modulation of intestinal microbiota [64].

Lacticaseibacillus paracasei compounds the microbiota of *Uji* and *Mahewu* [50, 67]. Recently, new strains were described as potential probiotics due to their ability to inhibit pathogens and functional properties. Hence, this species is a good candidate for a starter culture with probiotic claims [67]. In addition, results pointed out the ability to inhibit the growth of common pathogenic bacteria, highlighting their probiotic potential. Thus, these results can be useful for a deeper comprehension of *L. paracasei* as well as for the development of new starter cultures and probiotic preparations based on this LAB in the future [67].

Lactobacillus delbrueckii are the predominant bacteria during the mahewu fermentation process and can be found in *ogi* and *fufu* fermentation [48, 50, 59, 68]. In Asia, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* was isolated in *tempe* and the *L. delbrueckii* species in *kha nhom* Jeen (rice noodle) and *tauco* [7, 24]. Between the Latin American products, *L. delbrueckii* was found in cassava *chicha*, *pozol*, and *puba* [36, 41, 65].

A study performed by Guglielmotti *et al.* [34] showed that different strains of *L. delbrueckii* presented a limited resistance to bile, while most strains tolerated lysozymes, growing in bile salts and fermenting in prebiotic presence. Moreover, they showed strong antibacterial activity because of the lactic acid production. The studied strains were also capable of joining Caco-2/TC-7 monolayers and significantly inhibited the invasion of *Salmonella enterica* sero-var Enteritidis in Caco-2/TC-7 cell. Hence, all tested strains presented probiotic characteristics, suggesting an important probiotic potential role for *L. delbrueckii* [34].

***Pediococcus* spp**

Pediococcus spp. are frequently found in foods obtained from vegetable fermentation processes. Among the African and Asian products obtained from vegetable fermentation, *Pediococcus* were isolated from *uji* (*Ped. acidilactici* and *Ped. pentosaceus*); *hussuwa*, *sufu*, *maesura*, and *rabadi* (*Ped. acidilactici*); and *ogi*, *kunu-zaki*, *fufu*, *selroti*, *sourdough*, and *tape ketan* (*Ped. pentosaceus*) [5, 7, 24, 48, 50]. In Latin American products, they were found in *atole agrio* (*Ped. pentosaceus*), *caxiri*, *corn chicha* (*Ped. acidilactici*), and *rice cauim* (*Ped. guilliermondii*) [14, 25, 60, 61].

Ped. acidilactici, isolated from milk products, exhibits a probiotic potential due to its ability to reduce high blood sugar levels and low-density lipoprotein and inhibit pathogens. The capacity to reduce blood sugar levels is more effective than metformin. Consequently, this potential probiotic prevents hyperglycemia, hypercholesterolemia, and gastrointestinal infections [69]. Likewise, *Ped. pentosaceus* produces BLISs with antibacterial properties and anti-inflammatory, anticancer, antioxidant, detox, and lipid reducer abilities [39].

Leuconostoc

The probiotic claim for *Leuconostoc* resides in antimicrobial activities due to the production of BLISs [70]. *Leuconostoc* species were already found in Asian products such as *doenjang*, *idli*, *selroti*, *puto*, and *saké* (*Leuc. mesenteroides*) and *sourdough* (*Leuc. citreum*) [7, 9, 24]. *Leuconostoc* strains were also isolated from African foods, such as *mahewu* (*Leuconostoc* spp.), *gari* (*Leuc. fallax* and *Leuc. pseudomesenteroides*), *fufu* (*Leuc. mesenteroides*), *agbelima* (*Leuc. mesenteroides*), and *lafun* (*Leuconostoc* sp.) [4, 5, 18, 27, 46, 48, 50]. Across Latin American products, *Leuconostoc* strains were identified in *atole agrio* (*Leuc. pseudomesenteroides*), *corn chicha* (*Leuc. mesenteroides* and *Leuc. lactis*), *rice chicha* (*Leuc. lactis*), *tarubá* (*Leuc. mesenteroides* and *Leuc. lactis*), *sour cassava starch* (*Leuc. mesenteroides*, *Leuc. pseudomesenteroides*, and *Leuc. citreum*), and *puba* (*Leuc. mesenteroides*) [33, 37, 41, 56, 60, 66, 71].

Lactococcus lactis

Lactococcus lactis was identified in Latin-American products, such as *atole agrio*, *sour cassava starch*, and *puba* [33, 38, 41, 56, 61, 71], as well as in African products such as *mahewu* and *gari* [46, 50]. In Asia, this species was isolated from *kha nhom Jeen* (*rice noodles*) [24].

Lactococcus lactis is an LAB that is widely used for the fermentation of dairy and non-dairy foods, such as cheese, yogurt, and sauerkraut. This LAB species is generally recognized as safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA). Beyond the acid production, these bacteria are capable of producing bacteriocin, presenting antagonistic effects against pathogens [70]. *Lc. lactis* has gastrointestinal tract resistance, immunomodulatory activity, anti-allergy, anti-cancer, and healing capabilities [72, 73]. A study with two strains of *Lc. lactis* reported the resistance to bile salts, low pH, osmotic stress, and adhesion to intestinal cells, in addition to presenting antiproliferative effects in colorectal cancer cells [44, 73]. A study with an *Lc. lactis* strain isolated from a fermented product showed healing activities for induced colitis in animal models and inhibited intestinal inflammation through the suppression of

inflammatory factors, improvement of the epithelial intestinal barriers and short-chain fat acid concentration regulation. A verified inflammation inhibition mechanism was the inhibition of the NF- κ B and MAP, signaling routes that are key regulators during inflammatory processes [44].

Yeasts

Yeasts, due to their natural resistance to antibacterials [74], have advantageous characteristics when used as probiotics. They can help treat gastrointestinal conditions, whether acute, such as retroviral and bacterial diarrhea, or chronic, such as inflammatory diseases. Additionally, yeasts can reinforce humoral, innate immunity, and improve the composition of intestinal microflora in healthy individuals [75].

Saccharomyces

Saccharomyces strains are directly associated to the fermentation of several African, Asian, and Latin American products. *Saccharomyces cerevisiae* ferments foods such as *ogi*, *lafun*, *gari*, *fufu* [4, 5, 18, 27, 46, 48, 68], *selroti*, *saké*, *idli*, *jalebi*, *takju* [7, 9], *calugi*, *yakupa*, *cauim*, *chicha*, and *champús* [11, 14, 25, 30, 36, 45, 76, 77].

S. cerevisiae 905, isolated from cachaça, was able to reach potentially functional population levels in the gastrointestinal regions of mice, against the enteropathogenic bacteria *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium difficile*. However, antagonism against any pathogenic bacteria was not shown by this yeast in gnotobiotic mice's digestive tracts. The mortality was lower, and the liver tissue was better preserved in conventional animals treated with yeast against *S. Typhimurium* comparison to the control group. Intestinal histopathological results showed a good protective effect against oral problems with *C. difficile* in gnotobiotic mice [35].

Menezes *et al.* [78] evaluated the probiotic potential of *S. cerevisiae* strains isolated from cassava *caxiri* with a chewed sweet potato inoculum. The isolated majority showed the capability of co-aggregating with the *Escherichia coli* pathogens, while some also showed this ability with *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. Yeasts reduced pathogen adhesion and bacterial infection in Caco-2 cells [78]. In a previous study performed with *S. cerevisiae* strains isolated from caxiri, Menezes *et al.* [16] reported the capability the isolates showcased of tolerating the gastrointestinal tract conditions (low pH, bile salts, and 37°C temperature). Furthermore, strains were able to produce phytase, increasing nutrient availability. Yeasts showed high hydrophobicity, auto-aggregation, and co-aggregation with *E.*

coli and Caco-2 cell adhesion. These characteristics are relevant for new probiotic strain research [16].

Debaryomyces hansenii

Debaryomyces hansenii, involved in the fermentation of *ogi* [46] and Asian products such as *idli*, *selroti*, *doenjang*, and *tapuy* [7, 9], has probiotic properties. Oral administration of these species' strain result in immunostimulatory effects, intestinal microbiota modulation, increases in cell proliferation and differentiation as well as improvements in digestive function [79].

Pichia spp

Pichia strains are part of the microbial diversity of some African and Latin American products such as *P. kudriavzevii* (*ogi* and *yakupa*), *P. scutulata*, *P. kudriavzevii*, *P. rhodanensis* (*lafun*), *P. scutulata* (*gari* and *sour cassava starch*), *P. guilliermondii* (*rice cauim*), *P. fermentans* (*champús*), *P. kluyveri*, and *P. kudriavzevii* (*rice chicha*) [11, 18, 22, 27, 30, 38, 48•, 50, 68, 77, 80].

Two strains of *P. kudriavzevii* isolated from *ogi* showed the optimal ability of auto-aggregation, capabilities to remove cholesterol and eliminate free radicals on the methanol reaction system, and enhanced co-aggregation for a strain of *P. kudriavzevii*, and *Escherichia coli* [80].

Kluyveromyces marxianus

Kluyveromyces marxianus can be found during the fermentation process of African products such as *gari* and *lafun* [18, 27, 48•, 50].

Five strains of *K. marxianus*, tested in a simulated gastro-intestinal environment, showcased the best survival capabilities compared to the probiotic yeast strain *S. boulardii* MYA-796. Additionally, the five strains showed different lactose, xylitol, D-sorbitol and lactate assimilation, great cell surface hydrophobicity, biofilm production, and auto-aggregation capabilities. These characteristics indicate a major survival potential in the host's gastrointestinal tract, suggesting its use as a probiotic [81].

Conclusion

This review focuses on the microbial diversity in fermented foods in Africa, Asia, and Latin America, high-lighting the importance of the probiotic potential of the microorganisms involved in these fermentative processes. In this way, fermented foods become vehicles for

probiotics and can be considered natural reservoirs of new strains with this potential, providing different health benefits to the consumer. Probiotic abilities include functional properties, nutritional enrichment, immunological effects, and protective properties.

In recent years, interest in and consumption of fermented products has increased due to the natural presence or direct incorporation of probiotics. However, choosing appropriate food systems to deliver probiotics is crucial. Always consider when developing probiotic foods. Although most probiotic products are sold as dairy products, there is growing interest in creating new probiotic foods, mainly plant-based products. Furthermore, despite the strains probiotic potential, they must meet strict safety, functionality, and quality criteria. Although probiotics are GRAS (recognized as safe) organisms, variation in regulatory standards between countries adds another layer of complexity to incorporating probiotics into food products.

It is essential to raise awareness among those producing probiotic foods and teach them about advanced production technologies. Furthermore, adopting policies and guidelines that provide food security and promote sustainability is necessary. During the development of probiotic food, several technological difficulties arise, such as the selection of the food matrix for the probiotic, the appropriate choice of strain for industrial production, the microbial stability of the starter culture, sensory acceptance, the nutritional value of the new product, stability during storage, and the type of packaging, which can also affect the survival of probiotics. Economic aspects, health benefits, and the practicality of developed foods also play a crucial role. Studies point to the feasibility of using probiotic starter cultures derived from plant products, legumes, and cereals.

The future of probiotic foods will lie in product innovation, such as plant-based foods fermented with probiotic starter cultures. Recognizing the potential of these foods is just the beginning. It is equally crucial to dedicate significant efforts to uncovering different probiotic capabilities.

Author Contribution All authors contributed to the study's conception and design. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding This study received financial support from Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, process number APQ-02451–21).

Data availability Not applicable.

Declarations

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals carried out by any authors.

Competing Interests The authors declare no competing interests.

References

Papers of particular interest, publish recently, have been highlighted as:

- Of importance
 - Of major importance
- 1.•• Adebo OA, Chinma CE, Obadina AO, Soares AG, Panda SK, Gan R-Y. An insight into indigenous fermented foods for the tropics. Adebo OA, Chinma CE, Obadina AO, Soares AG, Panda SK, Gan R-Y, organizadores. *Indi Ferm Foods for the Trop.* 2023;1–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98341-9.00003-7>. This book chapter discusses the importance of fermented products in Africa, Asia, and South America and provides a brief overview of the fermented food products available. Many of the products mentioned here have their entire production process described in this book.
 2. Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foli-gné B, *et al.* Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol.* 2016;44:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>.
 3. Wood BJB. *Microbiology of Fermented Foods.* 1998;2. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1>.
 - 4.•• Cuamatzin-García L, RodríguezRrugarcía P, El-Kassis EG, Galicia G, Meza-jiménez M de L, Baños-Lara MDR, *et al.* Tra-ditional fermented foods and beverages from around the world and their health benefits. *Microorganisms.* 2022;10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061151>. This work focuses on studies that use traditional fermented foods and beverages as important in promoting human health. Many microorgan-isms mentioned here were described in this paper.
 5. Ilango S, Antony U. Probiotic microorganisms from non-dairy traditional fermented foods. *Trends Food Sci Technol.* 2021;118:617–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.034>. This paper is an attempt to compare scientific progress regarding probiotics in fermented foods from Africa and Asia, where these foods can serve as affordable probiotic supplements. Some foods and microorganisms mentioned here are described in this article.
 6. Gomes FCO, Lacerda ICA, Libkind D, Lopes CA, Carvajal J, Rosa CA. Traditional foods and beverages from South America: microbial communities and production strategies. Em: Krause J, Fleischer O, Organizadores. *Industrial Fermentation: food processes, nutrient sources and producing strategies.* Nova Science Pub; 2010. pp. 386.
 7. Tamang B, Tamang JP. Role of lactic acid bacteria and their functional properties in goyang, a fermented leafy vegetable product of the sherpas. *J Hill Res.* 2007;20(2):53–61.
 8. Murooka Y, Yamshita M. Traditional healthful fermented prod-ucts of Japan. *Ind Microbiol Biotechnol.* 2008;35:791–8. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0362-5>.
 9. Rhee SJ, Lee J-E, Lee C-H. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories.* 2011;10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S5>.
 10. Freire AL, Ramos CL, Schwan RF. Effect of symbiotic interac-tion between a fructooligosaccharide and probiotic on the kinetic fermentation and chemical profile of maize blended rice bever-ages. *Food Res Int.* 2017;100:698–707. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.070>.
 11. Schwan RF, Almeida EG, Souza-Dias MAG, Jespersen L. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. *FEMS Yeast Res.* 2007;7:966–72. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00241.x>.
 12. Anukam KC, Reid G. African traditional fermented foods and probiotics. *J Med Food.* 2009;12:1177–84. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0163>.

13. Carboni AD, Martins GN, Gómez-Zavaglia A, Castilho PC. Lactic acid bacteria in the production of traditional fermented foods and beverages of Latin America. *Fermentation*. 2023;9:315. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040315>. This review summarizes the main characteristics of fermented foods and beverages made with LAB traditionally elaborated by the native population of Latin America. Some products mentioned here are described in this article.
14. Ramos CL, de Almeida EG, de Melo Pereira GV, Cardoso PG, Dias ES, Schwan RF. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol*. 2010;140:225–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.029>.
15. Pimentel TC, Gomes de Oliveira LI, de Lourdes Chaves Mac-edo E, Costa GN, Dias DR, Schwan RF, et al. Understanding the potential of fruits, flowers, and ethnic beverages as valuable sources of techno-functional and probiotics strains: current scenario and main challenges. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;114:25–59. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.024>. This review explored the added-value microorganisms isolated from unconventional sources and their techno-functional and probiotic properties. Some microorganisms with probiotic potential cited here are discussed in this article.
16. Menezes AGT, Ramos CL, Cenzi G, Melo DS, Dias DR, Schwan RF. Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics Antimicro Prot*. 2020;12:280–8. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9518-z>.
17. FAO/WHO. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome: FAO and WHO; 2006.
18. Padonou SW, Nielsen DS, Hounhouigan JD, Thorsen L, Nago MC, Jakobsen M. The microbiota of Lafun, an African traditional cassava food product. *Int J Food Microbiol*. 2009;133:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.019>.
19. Shangpliang HNJ, Tamang JP. Metagenomics and metagenome-assembled genomes mining of health benefits in jalebi batter, a naturally fermented cereal-based food of India. *Food Res Int*. 2023;172:113130. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113130>.
20. Jiménez E, Yépez A, Pérez-Cataluña A, Ramos Vásquez E, Zúñiga Dávila D, Vignolo G, et al. Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh - traditional Peruvian fermented potatoes - by high throughput sequencing (HTS) and culturing. *LWT*. 2018;87:567–74. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.033>.
21. Fossi BT, Ndjouenkeu R. Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from “Gari” a cassava-based African fermented food. *J App Biol Biotech*. 2017;5:001–5. <https://doi.org/10.7324/JABB.2017.50401>.
22. Osorio-Cadavid E, Chaves-López C, Tofalo R, Pararella A, Suzzi G. Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiol*. 2008;25:771–7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.014>.
23. Wojtyniak K, Szajewska H. Systematic review: probiotics for functional constipation in children. *Eur J Pediatr*. 2017;176:1155–62. <https://doi.org/10.1007/s00431-017-2972-2>.
24. Ashaolu TJ, Reale A. A holistic review on Euro-Asian lactic acid bacteria fermented cereals and vegetables. *Microorganisms*. 2020;8:1176. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081176>.
25. do Santos CCA, de Almeida EG, de Melo GVP, Schwan RF. Microbiological and physicochemical characterisation of caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Juruna people of Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2012;156:112–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.010>.

26. Sharma S, Kanwar SS. Adherence potential of indigenous lactic acid bacterial isolates obtained from fermented foods of Western Himalayas to intestinal epithelial Caco-2 and HT-29 cell lines. *J Food Sci Technol*. 2017;54:3504–11. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2807-1>.
27. Flibert G, Abel T, Aly S. African cassava traditional fermented food: the microorganism's contribution to their nutritional and safety values-a review. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2016;5:664–87. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.510.074>.
28. Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and pro-biotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res Int*. 2003;36:895–904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X).
29. Almeida EG, Rachid CCTC, Schwan RF. Microbial population present in fermented beverage ‘cauim’ produced by Brazilian Amerindians. *Int J Food Microbiol*. 2007;120:146–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.020>.
30. Freire AL, Ramos CL, de Almeida EG, Duarte WF, Schwan RF. Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of yakupa, an indigenous beverage produced by Brazilian Amerindians. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014;30:567–77. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1476-0>.
31. Lacerda DC, da Costa PCT, Pontes PB, dos Santos LAC, Neto JPRC, Luis CCS, *et al*. Potential role of *Limosilactobacillus fermentum* as a probiotic with anti-diabetic properties: a review. *World J Diabetes*. 2022;13:717–28. <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i9.717>.
32. Brito B de N do C, Chisté RC, Lopes AS, Glória MBA, Chagas Junior GCA, Pena R da S. Lactic acid bacteria and bioactive amines identified during Manipueira fermentation for Tucupi production. *Microorganisms*. 2022;10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050840>.
33. Pérez-Cataluña A, Elizaquível P, Carrasco P, Espinosa J, Reyes D, Wachter C, *et al*. Diversity and dynamics of lactic acid bacteria in Atole agrio, a traditional maize-based fermented beverage from South-Eastern Mexico, analysed by high throughput sequencing and culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111:385–99. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0960-1>.
34. Guglielmotti DM, Marcó MB, Golowczyc M, Reinheimer JA, del Quiberoni AL. Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *Int Dairy J*. 2007;17:916–25. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.11.004>.
35. Martins FS, Nardi RMD, Arantes RME, Rosa CA, Neves MJ, Nicoli JR. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *J Gen Appl Microbiol*. 2005;51:83–92. <https://doi.org/10.2323/jgam.51.83>.
36. Freire AL, Zapata S, Mosquera J, Mejia ML, Trueba G. Bacteria associated with human saliva are major microbial components of Ecuadorian indigenous beers (chicha). *PeerJ*. 2016;2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.1962>.
37. Ramos CL, de Sousa ESO, Ribeiro J, Almeida TMM, do Santos CCA, Abegg MA, *et al*. Microbiological and chemical characteristics of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. *Food Microbiol*. 2015;49:182–8. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2015.02.005>.
38. Penido FCL, Piló FB, de Cicco Sandes SH, Nunes AC, Colen G, de Souza OE, *et al*. Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. *Braz J Microbiol*. 2018;49:823–31. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.001>.

39. Jiang S, Cai L, Lv L, Li L. *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. *Microb Cell Fact*. 2021;20:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01537-y>.
40. López-Sánchez R, Hernández-Oaxaca D, Escobar-Zepeda A, Cerrillo BR, López-Munguía A, Segovia L. Analysing the dynamics of the bacterial community in pozol, a Mexican fermented corn dough. *Microbiology* 2023;169. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001355.46>.
41. Crispim SM, Nascimento AMA, Costa PS, Moreira JLS, Nunes AC, Nicoli JR, *et al.* Molecular identification of *Lactobacillus* spp. associated with puba, a Brazilian fermented cassava food. *Braz J Microbiol*. 2013;44:15–21. <https://doi.org/10.1590/S1517-8382013005000007>.
42. Lacerda ICA, Miranda RL, Borelli BM, Nunes AC, Nardi RMD, Lachance MA, *et al.* Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2005;105:213–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.010>.
43. Kasuga G, Tanaka M, Harada Y, Nagashima H, Yamato T, Waki-moto A, *et al.* Homologous expression and characterization of Gassericin T and Gassericin S, a novel class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA327. *Am Soc Microbiol* 2019;85. <https://doi.org/10.1128/AEM.02815-18>.
44. Liu M, Zhang X, Hao Y, Ding J, Shen J, Xue Z, *et al.* Protective effects of a novel probiotic strain, *Lactococcus lactis* ML2018, in colitis: in vivo and in vitro evidence. *Food Funct*. 2019;10:1132–45. <https://doi.org/10.1039/C8FO02301H>.
45. Miguel MGCP, Collela CF, de Almeida EG, Dias DR, Schwan RF. Physicochemical and microbiological description of Caxiri – a cassava and corn alcoholic beverage. *Int J Food Sci Technol*. 2015;50:2537–44. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12921>.
46. Tamang JP, Kailasapathy K. *Fermented foods and beverages of the world*. Boca Raton: CRC Press; 2010. <https://doi.org/10.1201/EBK1420094954>.
47. Yang Z, Zhu X, Wen A, Qin L. Development of probiotics beverage using cereal enzymatic hydrolysate fermented with *Limosilactobacillus reuteri*. *Food Sci Nutr*. 2022;10:3143–53. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2913>.
48. Obafemi YD, Oranusi SU, Ajanaku KO, Akinduti PA, Leech J, Cotter PD. African fermented foods: overview, emerging benefits, and novel approaches to microbiome profiling. *Nature Partner J*. 2022;6. <https://doi.org/10.1038/s41538-022-00130-w>. This review provides an overview of African fermented foods, their microbiota, and the health-promoting potential of these foods and microorganisms. Some products mentioned here are very well described in this article.
49. do Nascimento LCP, Lacerda DC, Ferreira DJS, de Souza EL, de Brito Alves JL. *Limosilactobacillus fermentum*, current evidence on the antioxidant properties and opportunities to be exploited as a probiotic microorganism. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2022;14:960–79. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09943-3>.
50. Franz CMAP, Huch M, Mathara JM, Abriouel H, Benomar N, Reid G, *et al.* African fermented foods and probiotics. *Int J Food Microbiol*. 2014;190:84–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.033>.
51. Rebaza-Cardenas TD, Silva-Cajaleón K, Sabater C, Delgado S, Montes-Villanueva ND, Ruas-Madiedo P. “Masato de Yuca” and “Chicha de Siete Semillas” two traditional vegetable fermented beverages from Peru as source for the isolation of potential probiotic bacteria. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2023;15:300–11. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09836-x>.
52. Chugh B, Kamal-Eldin A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Curr Opin Food Sci*. 2020;32:76–82. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.02.003>.

53. Sánchez MT, Ruiz MA, Morales ME. Probiotic microorganisms and health. *Ars Pharmaceutica*. 2015;56:45–59. <https://doi.org/10.4321/S2340-98942015000100007>.
54. Albuquerque TMR, Garcia EF, de Oliveira AA, Magnani M, Saarela M, de Souza EL. In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics Antimicro Prot*. 2018;10:704–16. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>.
55. Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1999;39:13–126. <https://doi.org/10.1080/10408699991279187>.
56. Lacerda ICA, Gomes FCO, Borelli BM, Faria CLL, Franco GR, Mourão MM, *et al*. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture-independent 16S rRNA gene sequence analysis. *Braz J Microbiol*. 2011;42:650–7. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200029>.
57. Motevaseli E, Shirzad M, Akrami SM, Mousavi A-S, Mirsalehian A, Modarressi MH. Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. *J Med Microbiol*. 2013;62:1065–72. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.057521-0>.
58. Mokoena MP, Mutanda T, Olaniran AO. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. *Food Nutr Res*. 2016;60:1–12. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.29630>.
59. Olasupo NA, Olukoya DK, Odunfa SA. Identification of *Lactobacillus* species associated with selected African fermented foods. *Zeitschrift für Naturforschung Section C - Journal of Biosciences*. 1997;52:105–8. <https://doi.org/10.1515/znc-1997-1-218>.
60. Elizaquível P, Pérez-Cataluña A, Yépez A, Aristimuño C, Jiménez E, Cocconcelli PS, *et al*. Pyrosequencing vs. culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina. *Int J Food Microbiol*. 2015;198:9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.027>.
61. Väkeväinen K, Valderrama A, Espinosa J, Centurión D, Rizo J, Reyes-Duarte D, *et al*. Characterization of lactic acid bacteria recovered from atole agrio, a traditional Mexican fermented beverage. *LWT*. 2018;88:109–18. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.004>.
62. Azam M, Saeed M, Ahmad T, Yamin I, Khan WA, Iqbal MW, *et al*. Characterization of biopolymeric encapsulation system for improved survival of *Lactobacillus brevis*. *Food Measure*. 2022;16:2292–9. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01334-0>.
63. Teixeira P. LACTOBACILLUS | *Lactobacillus brevis*. Em: Batt CA, Tortorello ML, organizadores. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2^o ed Oxford: Academic Press; 2014. pp. 418–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00178-6>.
64. Gobbetti M. *Lactobacillus casei*. Em: Minirvini F, organizador. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Oxford: Elsevier; 2014. pp. 432–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00180-4>.
65. Omar NB, Ampe F, Raimbault M, Guyot JP, Tailliez P. Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). *Syst Appl Microbiol*. 2000;23:285–91. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80016-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80016-8).
66. Puerari C, Magalhães-Guedes KT, Schwan RF. Bacaba beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians: microbiological and chemical characterization. *Braz J Microbiol*. 2015;46:1207–16. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140964>.
67. Moiseenko KV, Begunova AV, Savinova OS, Glazunova OA, Rozhkova IV, Fedorova TV. Biochemical and genomic characterization of two new strains of *Lactobacillus paracasei* isolated from the traditional corn-based beverage of South Africa, Mahewu, and

- their comparison with strains isolated from Kefir grains. *Foods*. 2023;12:1–19. <https://doi.org/10.3390/foods12010223>.
68. Mgbodile FC, Nwagu TNT. Probiotic therapy, African fermented foods and food-derived bioactive peptides in the management of SARS-CoV-2 cases and other viral infections. *Biotechnol Rep*. 2023;38:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00795>.
 69. Al-Emran HM, Moon JF, Miah ML, Meghla NS, Reuben RC, Uddin MJ, *et al*. Genomic analysis and in vivo efficacy of *Pediococcus acidilactici* as a potential probiotic to prevent hyperglycemia, hypercholesterolemia and gastrointestinal infections. *Sci Rep*. 2022;12:20429. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24791-5>.
 70. Shao X, Fang K, Medina D, Wan J, Lee J-L, Hong SH. The probiotic, *Leuconostoc mesenteroides*, inhibits *Listeria mono-cytogenes* biofilm formation. *J Food Saf*. 2020;40. <https://doi.org/10.1111/jfs.12750>.
 71. Ampe F, Sirvent A, Zakhia N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *Int J Food Micro-biol*. 2001;65:45–54. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00502-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00502-X).
 72. Song AA-L, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Fact*. 2017;16:55. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>.
 73. Sałański P, Kowalczyk M, Bardowski JK, Szczepankowska AK. Health-promoting nature of *Lactococcus lactis* IBB109 and *Lactococcus lactis* IBB417 strains exhibiting proliferation inhibition and stimulation of interleukin-18 expression in colorectal cancer cells. *Front Microbiol*. 2022;13:822912. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.822912>.
 74. Shruthi B, Deepa N, Somashekaraiah R, Adithi G, Divyashree S, Sreenivasa MY. Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: a review. *Biotechnol Rep*. 2022;28. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00716>.
 75. Sen S, Mansell TJ. Yeasts as probiotics: mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genet Biol*. 2020;137:103333. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103333>.
 76. da Cruz Pedrozo Miguel MG, Santos MRRM, Duarte WF, de Almeida EG, Schwan RF. Physico-chemical and microbiological characterization of corn and rice “calugi” produced by Brazilian Amerindian people. *Food Res Int*. 2012;49:524–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.012>.
 77. Grijalva-Vallejos N, Aranda A, Matallana E. Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. *Int J Food Microbiol*. 2020;317. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108462>.
 78. Menezes AGT, Melo D de S, Ramos CL, Moreira SI, Alves E, Schwan RF. Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 2020;140. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103969>.
 79. Angulo M, Reyes-Becerril M, Medina-Córdova N, Tovar-Ramírez D, Angulo C. Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104:7689–99. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10780-z>.
 80. Ogunremi OR, Sanni AI, Agrawal R. Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *J Appl Microbiol*. 2015;119:797–808. <https://doi.org/10.1111/jam.12875>.
 81. Youn H-Y, Kim D-H, Kim H-J, Bae D, Song K-Y, Kim H, *et al*. Survivability of *Kluyveromyces marxianus* isolated from Korean Kefir in a simulated gastrointestinal environment. *Front Micro-biol*. 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.842097>.

archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.