

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**CARMEN DE OLIVEIRA GOULART**

**UTILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM CO-  
CULTURA COM BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO PARA  
PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO**

**Belo Horizonte  
2017**

**CARMEN DE OLIVEIRA GOULART**

**UTILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM CO-  
CULTURA COM BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO PARA  
PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO**

Dissertação 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 título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

**Belo Horizonte  
2017**

G694u Goulart, Carmen de Oliveira.  
Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com bactérias do ácido láctico para produção de polvilho azedo / Carmen de Oliveira Goulart. – 2017.  
100 f. : il.

Orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.  
Coorientador: Carlos Augusto Rosa.

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

1. Mandioca – Teses. 2. Polvilho azedo – Teses. 3. Fermentação – Teses. 4. Bactérias – Teses. 5. Leveduras (Fungos) – Teses. 6. *Saccharomyces cerevisiae* – Teses. 7. Cultura e meios de cultura (Biologia) – Teses. 8. Alimentos – Qualidade – Teses. I. Lacerda, Inayara Cristina Alves. II. Rosa, Carlos Augusto. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 664.23



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

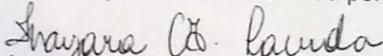
## FOLHA DE APROVAÇÃO

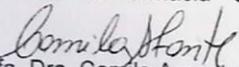
UTILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM CO-CULTURA COM  
BACTÉRIAS LÁCTICAS COMO CULTURA INICIADORA NA  
PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO

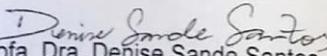
CARMEN DE OLIVEIRA GOULART

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

Aprovada em 26 de maio de 2017, pela banca constituída pelos membros:

  
Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda (Orientadora)  
Faculdade de Farmácia - UFMG

  
Profa. Dra. Camilla Argenta Fante  
Faculdade de Farmácia - UFMG

  
Profa. Dra. Denise Sande Santos  
Faculdade de Farmácia - UFMG

Belo Horizonte, 26 de maio de 2017.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, meu refúgio e fortaleza, e a todos que apoiaram, incentivaram, e contribuíram de alguma forma em minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que em tudo tem me conduzido por um caminho sobremodo excelente e tem me honrado, com vitórias e conquistas. Quão grande tem sido a tua fidelidade. À Jesus a honra desta vitória.

Aos meus pais, as minhas irmãs e ao meu cunhado pelo amor incansável, pelos gestos de carinho, pelas palavras de consolo, apoio e incentivo, e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu amigo Gustavo Kelher por me dizer incansavelmente que sou capaz.

A todos da minha família pelos conselhos, apoio, incentivo e amor prático.

À Igreja pelas orações, pelo apoio, incentivo e pelo amor dispensado a mim.

À professora Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda, minha orientadora, um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência, compreensão, competência e amizade, e pelo exemplo de profissional a ser seguido.

À Fernanda Penido pelo exemplo de dedicação, comprometimento, competência, disponibilidade, companheirismo, pelos esclarecimentos, sugestões e pelo apoio que foi essencial para o enriquecimento deste trabalho.

À minha querida estagiária Carolina Vasconcelos, pelo auxílio, dedicação, paciência e amizade.

Ao professor Dr. Carlos Augusto Rosa, pela coorientação.

À professora Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo e a professora Dra. Beatriz Martins Borelli pela colaboração.

Aos membros da banca examinadora, professora. Dra. Camila Argenta Fante e professora. Dra. Denise Sande Santos, pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise do departamento de Ciências de Alimentos (LAMIB) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade

Federal de Minas Gerais (UFMG) pelos momentos compartilhados e pela cooperação, e pelo apoio.

A todos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG pela cooperação e pelo apoio.

A todos do Laboratório de Bromatologia – Unidade de Pesquisa Química de Alimentos – BRO-UPQ da FAFAR/UFMG pela cooperação e pelo apoio.

A todos do Laboratório de Bromatologia - Unidade de Pesquisa - Análise de Alimentos (BRO-UPAA) da FAFAR/UFMG pela cooperação e pelo apoio.

A todos do Laboratório de Química Bromatológica da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) pela cooperação e pelo apoio.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, servidores, alunos e mestres, pela contribuição em minha formação científica e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

EM ESPECIAL, a todos os professores e mestres que já tive, pelos ensinamentos, pelo tempo dedicado à minha formação, e por serem exemplos que me motivaram a exercer a mesma profissão.

A todos que de alguma forma participaram desta conquista, sem vocês esse trabalho não seria possível.

*Tudo posso naquele que me fortalece.  
Filipenses 4.13*

## RESUMO

O Brasil tem se destacado como segundo maior produtor mundial de mandioca. Na indústria de alimentos, a mandioca é utilizada na elaboração de diversos produtos e subprodutos tais como: biscoitos, pão de queijo, entre outros. Estes produtos têm como principal ingrediente o polvilho, que é obtido por meio da fécula de mandioca fermentada. A principal etapa de produção do polvilho azedo é a fermentação. A população microbiana predominante durante a fermentação compreende bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras, as quais interagem durante o processo de fermentação. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de culturas iniciadoras puras e mistas durante a fermentação da fécula de mandioca e a qualidade do polvilho azedo final produzido. As bactérias do ácido láctico (BAL) *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*, isoladas da microbiota natural da fermentação de polvilho azedo foram testadas como culturas iniciadoras puras e em co-cultura com *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-A1007. Foram avaliadas as alterações de pH, acidez total titulável (ATT) e viabilidade das amostras de fermentação, além das características físico-químicas (acidez, pH, expansão, umidade, cinzas e amido) dos produtos finais obtidos. A qualidade microbiológica dos polvilhos azedos produzidos também foi investigada. *L. plantarum*, *L. brevis*, e *S. cerevisiae* foram isolados em contagens de 7,83, 7,84, e 6,94 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente no início da fermentação do polvilho. Estas culturas iniciadoras produziram polvilho com valores de pH entre 2,88 e 4,13 e valores de ATT entre 0,41% a 2,11% com 28 dias de fermentação. As amostras coletadas durante a fermentação, apresentaram comportamentos distintos ( $p < 0,001$ ), em relação ao pH, ATT e a viabilidade dos micro-organismos testados. Porém os resultados obtidos (ATT, pH, expansão, amido, cinzas e umidade) para os produtos finais não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as diferentes culturas iniciadoras estudadas, sendo que todos os produtos foram considerados como polvilho azedo. As análises microbiológicas realizadas indicaram que todas as culturas forneceram produtos seguros. *S. cerevisiae* e *L. plantarum* se mantiveram viáveis durante todo processo, enquanto *L. brevis* permaneceu por apenas 14 dias como cultura pura e por 28 dias como cultura mista. Sugerindo que *S. cerevisiae* apresenta um papel relevante durante a fermentação, uma vez que a mesma favoreceu a permanência

de *L. brevis* no processo fermentativo, permitindo que esta estivesse presente até o final da fermentação. As culturas iniciadoras utilizando *S. cerevisiae* em associação com as BAL apresentaram bom desempenho fermentativo e podem ser utilizadas para controlar e padronizar o processo de fabricação do polvilho azedo, fornecendo produtos homogêneos e de alta qualidade.

**Palavras-chave:** Culturas iniciadoras; mandioca; bactérias; leveduras; fermentação; produção de alimentos; qualidade alimentar

## ABSTRACT

Brazil has been the second largest producer of cassava in the world. In the food industry, cassava is used in the elaboration of various products and by-products such as: biscuits, cheese bread, among others. These products have as main ingredient the sour cassava starch, which is obtained by means of fermented cassava starch. The main production stage of the sour cassava starch is fermentation. The predominant microbial population during fermentation comprises lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, which interact during the fermentation process. The objective of this work was to evaluate the efficiency of pure and mixed starter cultures during the fermentation of cassava starch and the quality of the final sour cassava starch produced. Lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*, isolated from the natural microbiota from the fermentation of sour starch were tested as pure starter cultures and in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-A1007. Changes in pH, total titratable acidity (TTA) and viability of the fermentation samples, and the physical-chemical characteristics (acidity, pH, expansion, moisture, ash and starch) of the final products obtained were evaluated. The microbiological quality of the sour cassava starch produced was also investigated. *L. plantarum*, *L. brevis*, and *S. cerevisiae* were isolated at counts of 7.83, 7.84, and 7.09 log<sub>10</sub> CFU / g, respectively at the beginning of the fermentation of the sour cassava starch. These starter cultures produced pH values between 2.88 and 4.13 and ATT values between 0.41% and 2.11% at 28 days of fermentation. Samples collected during fermentation presented different behaviors ( $p < 0.05$ ), in relation to pH, ATT and viability of the microorganisms tested. However, the results obtained (ATT, pH, expansion, starch, ash and moisture) for the final products showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the different starter cultures studied, so that all products were considered as sour cassava starch. Microbiological analyzes indicated that all cultures provided safe products. *S. cerevisiae* and *L. plantarum* remained viable during the whole process, while *L. brevis* remained for only 14 days as a pure culture and for 28 days as a mixed culture. It suggests that *S. cerevisiae* plays a relevant role during fermentation, since it favors the presence of *L. brevis* in the fermentation process, enabling it to be present until the end of fermentation. The starter cultures using *S. cerevisiae* in

association with LAB presented good fermentative performance and can be used to control and standardize the production process of the sour cassava starch by providing homogeneous and high quality products.

**Keywords:** Starter culture; cassava; bacteria; yeast; fermentation; food production; food quality

## LISTA DE FIGURAS

1	Fluxograma do processo de produção de polvilho.....	28
2	Representação esquemática simplificada das vias do metabolismo homofermentativo e heretofermentativo em bactérias lácticas.....	33
3	Principais etapas do processo de produção de polvilho em escala piloto. 1. Inóculos contendo as culturas iniciadoras (A,B,C,D) em 500mL de meio de cultura líquido, incubados a temperatura ambiente por 48 horas. 2. Fermentação da fécula de mandioca em bacias utilizadas como biorreatores por 28 dias. 3. Secagem dos polvilhos produzidos a temperatura ambiente. 4. Polvilho produzido acondicionados em potes de vidros e armazenados sobre refrigeração a 4°C, para posterior realização de testes no produto final.....	56
4	Produção de polvilho utilizando culturas iniciadoras de BAL pura e em co-cultura com <i>S. cerevisiae</i> em biorreatores. Tratamento A: <i>L. plantarum</i> ; Tratamento B: <i>L. brevis</i> ; Tratamento C: <i>L. plantarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> ; Tratamento D: <i>L. brevis</i> + <i>S. cerevisiae</i> .....	62
5	Valores de pH durante o processo de fermentação de mandioca para a produção de polvilho em escala piloto. A: <i>L. plantarum</i> ; B: <i>L. brevis</i> ; C: <i>L. plantarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> ; D: <i>L. brevis</i> + <i>S. cerevisiae</i> .....	64
6	Variação dos índices de acidez (ATT) durante o processo de fermentação de mandioca para produção de polvilho em escala piloto. A: <i>L. plantarum</i> ; B: <i>L. brevis</i> ; C: <i>L. plantarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> ; D: <i>L. brevis</i> + <i>S. cerevisiae</i> .....	66
7	Acompanhamento da viabilidade das culturas iniciadoras utilizadas durante o processo de fermentação de mandioca para a produção de polvilho em escala piloto. A: <i>L. plantarum</i> ; B: <i>L. brevis</i> ; C: <i>L. plantarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> ; D: <i>L. brevis</i> + <i>S. cerevisiae</i> .....	69
8	Perfil de digestão de <i>L. plantarum</i> isoladas da fermentação de mandioca em escala piloto pelas enzimas <i>MspI</i> , <i>HaeIII</i> , e <i>Hinfi</i> . Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2: perfil de digestão pela enzima <i>MspI</i> ; 3: perfil de digestão pela enzima <i>HaeIII</i> ; 4: perfil de digestão pela enzima <i>Hinfi</i> .....	71
9	Perfil de digestão de <i>L. brevis</i> isoladas da fermentação de mandioca em escala piloto pelas enzimas <i>MspI</i> , <i>HaeIII</i> , e <i>Hinfi</i> . Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2: perfil de digestão pela enzima <i>MspI</i> ; 3: perfil de digestão pela enzima <i>HaeIII</i> ; 4: perfil de digestão pela enzima <i>Hinfi</i> .....	72
10	Perfis moleculares de <i>S. cerevisiae</i> isoladas de 2 biorreatores (C e D) durante o processo fermentativo da fécula de mandioca obtidos através da análise de	

polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* I. Na canaleta 1: marcador de peso molecular 1 Kb, nas canaletas de 2 a 4; perfil Molecular de *S. cerevisiae* UFMG-A1007..... 73

## LISTA DE QUADROS

1	Micro-organismos encontrados durante a fermentação de alimentos e bebidas derivados da mandioca em diferentes partes do mundo.....	36
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes produtos obtidos por fermentação da mandioca.....	40
3	Culturas iniciadoras utilizadas para a produção de polvilho em escala piloto.....	63

## LISTA DE TABELAS

1	ATT Índice de Expansão e pH do polvilho produzido em escala piloto com as culturas iniciadoras selecionadas.....	74
2	Umidade, Cinzas e amido do polvilho produzido em escala piloto a partir de culturas iniciadoras selecionadas .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAM	Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATT	Acidez Total Titulável
BAL	Bactérias do Ácido $\zeta$
BSA	Albumina Sérica Bovina
CERAT	Centro de Raízes Tropicais
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões Para Alimentos
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
HCN	Ácido cianídrico
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossômico
RFLP	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
TBE	Tris-Borato-EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
YM	Extrato de malte - extrato de levedura

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	34
<u>1 INTRODUÇÃO .....</u>	<u>20</u>
<u>2 OBJETIVOS .....</u>	<u>23</u>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<u>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</u>	<u>24</u>
3.1 MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DO POLVILHO – A MANDIOCA .....	24
3.2 POLVILHO DOCE E AZEDO .....	26
3.2.1 PROCESSO DE OBTENÇÃO DO POLVILHO DOCE E AZEDO .....	28
3.2.2 FERMENTAÇÃO LÁTICA E MICROBIOTA ENVOLVIDA EM PRODUTOS DERIVADOS DE MANDIOCA .....	31
3.2.2.1 BAL .....	31
3.2.2.2 LEVEDURAS .....	38
3.2.3 IMPORTÂNCIA DE <i>S. CEREVISIAE</i> EM PRODUTOS DERIVADOS DA MANDIOCA .....	40
3.4 CULTURAS INICIADORAS .....	42
3.5 TÉCNICAS MOLECULARES PARA MONITORAMENTO DE CULTURAS INICIADORAS .....	49
3.5.1 TÉCNICAS MOLECULARES PARA MONITORAMENTO DE BAL .....	49
3.5.2 TÉCNICAS MOLECULARES PARA MONITORAMENTO DE <i>S. CEREVISIAE</i> .....	52
<u>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</u>	<u>56</u>
4.1 FONTE DE MICRO-ORGANISMOS .....	56
4.2 PRODUÇÃO DE POLVILHO EM ESCALA PILOTO .....	56
4.3 AVALIAÇÃO DURANTE A PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA PILOTO .....	58
4.4 MONITORAMENTO DE CULTURAS INICIADORAS NO PROCESSO FERMENTATIVO .....	59
4.4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO .....	59
4.4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS .....	59
4.5 AVALIAÇÃO DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO .....	61
4.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO .....	62
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	62
<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</u>	<u>64</u>
5.1 PRODUÇÃO DE POLVILHO EM ESCALA PILOTO COM O USO DE CULTURAS INICIADORAS .....	64
5.1.1 PH .....	64
5.1.2 ACIDEZ .....	66
5.1.3 VIABILIDADE DAS CULTURAS INICIADORAS DURANTE A PRODUÇÃO DE POLVILHO EM ESCALA PILOTO .....	68
5.2 MONITORAMENTO MOLECULAR DAS CULTURAS INICIADORAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE POLVILHO EM ESCALA PILOTO .....	71

5.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO POLVILHO PRODUZIDO EM ESCALA PILOTO .....	73
5.3.1 AVALIAÇÃO DA ACIDEZ, PH E EXPANSÃO .....	73
5.3.2 AVALIAÇÃO DA UMIDADE, CINZAS E AMIDO, DOS POLVILHOS PRODUZIDOS EM ESCALA PILOTO .....	75
5.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO AZEDO OBTIDO EM ESCALA PILOTO .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta de origem brasileira extensivamente cultivada nas regiões tropical e subtropical devido à sua habilidade de crescer em diversas condições de clima e manejo (BOONNOP et al., 2009). O Brasil tem se destacado como segundo maior produtor mundial de mandioca, sendo que em 2015 a produção brasileira de mandioca foi de 22,74 milhões de toneladas em 2,1 milhões de hectares (IBGE, 2017). O país também ocupa posição de destaque como consumidor de mandioca, apresentando um consumo médio de raízes per capita de 41kg/habitante/ano, enquanto o consumo per capita mundial é em torno de 16kg/habitante/ano (CONAB, 2016; IBGE, 2016).

A raiz de mandioca é utilizada para consumo direto, podendo ser cozida ou frita sendo chamada de mandioca de mesa, comumente encontrada na cozinha brasileira. Na indústria de alimentos, a mandioca é utilizada na elaboração de diversos produtos e subprodutos tais como: biscoitos, sequilhos, pão de queijo, entre outros. Estes produtos têm como principal ingrediente o polvilho, que é obtido por meio da fécula de mandioca fermentada (LIMA et al., 2012). O polvilho constitui um dos principais produtos da mandioca e é definido pela Legislação Brasileira, regulamentada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), como um produto amiláceo extraído das partes subterrâneas comestíveis de tubérculos, raízes e rizomas da mandioca (BRASIL, 1978a; LACERDA, 2002; LACERDA, 2006; PENIDO, 2013).

A obtenção do polvilho azedo se dá por meio do processo fermentativo natural da fécula de mandioca, em condições de tempo e local variados, ou por meio da ação de enzimas microbianas, nos quais ácidos orgânicos são produzidos acarretando aumento na acidez titulável do produto (LADEIRA & PENA, 2011; LIMA et al., 2012). A classificação do polvilho pela legislação brasileira se baseia no teor de acidez do produto final, que, para o polvilho azedo, deve ser no máximo de 5 mL de NaOH/100g (BRASIL, 1978b). No entanto, é importante salientar que cerca de 60% da acidez total se deve ao ácido láctico, o que confirma a participação das bactérias do ácido láctico (BAL) no processo. Outros 40% são de ácido acético e de uma mistura do mesmo com o ácido butírico (LIMA et al., 2012). O polvilho azedo, além de apresentar sabor e odor característicos, sofre alterações em suas propriedades

físico-químicas (acidez, modificações no grânulo de amido, absorção de água, viscosidade e expansão dos produtos), tornando-se mais solúvel quando intumescido em água e menos viscoso em comparação com o polvilho doce (AQUINO et al., 2015).

A principal etapa de produção do polvilho azedo é a fermentação, que tem como objetivos aumentar o valor nutricional, diminuir a toxicidade e dar ao produto propriedades e aromas característicos (LACERDA et al., 2005; LACERDA et al., 2011; PENIDO, 2013). Os principais micro-organismos envolvidos nesta etapa são as BAL, sendo a prevalência das espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus brevis* relatada por diversos autores (OMAR et al., 2000; LACERDA et al., 2005; LACERDA et al., 2011; PENIDO, 2013). Dentre as BAL encontradas durante o processo de fermentação do polvilho azedo em escala piloto, Penido (2013), descreve as linhagens, *L. plantarum* e *L. brevis*, como as linhagens predominantes e de melhor desempenho como possíveis culturas iniciadoras. Além das BAL, as leveduras também são encontradas nas fermentações tradicionais de mandioca. Estudos realizados por Mante et al. (2003), Lacerda et al. (2005), Boonnop et al. (2009), Vogelmann et al. (2009) e Penido (2013), relatam que a associação entre BAL e leveduras pode contribuir para a melhoria das características organolépticas do polvilho azedo.

Existem relatos da presença de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação de mandioca para a produção de diferentes produtos tradicionais, como, *fufu*, *lafun*, *cauim*, *attiéké*, (OYEWOLE, 2001; OBOH & KINDAHUNSI, 2003; COULIN et al., 2006; SCHWAN et al., 2007; BOONNOP et al., 2009; PADONOU et al., 2009; VOGELMANN et al., 2009; PADONOU et al., 2010; GUNAWAN et al., 2015) contribuindo para o amolecimento da mandioca e para o enriquecimento nutricional do produto fermentado (SCHWAN et al., 2007; BOONNOP et al., 2009; PADONOU et al., 2010; GUNAWAN et al., 2015). Esta elevação do valor nutricional pode ser atribuída à capacidade da *S. cerevisiae* em secretar algumas enzimas extracelulares relevantes para as suas atividades metabólicas (PADONOU et al., 2010; GUNAWAN et al., 2015). Segundo Vogelmann et al. (2009) e Padonou et al. (2010) o uso de *S. cerevisiae* em associação com BAL como co-cultura em fermentação de mandioca pode ser uma alternativa interessante para a melhoria da produção de produtos fermentados da mandioca. Dessa forma, a fim de aprimorar e

padronizar as condições de fermentação do polvilho, no presente trabalho, utilizou-se uma linhagem de *S. cerevisiae* UFMG-A1007 em associação com BAL, na fermentação de fécula de mandioca visando à produção de um polvilho azedo com características desejáveis. Esta linhagem de *S. cerevisiae* UFMG-A1007 tem sido testada durante a produção de bebidas destiladas e fermentadas (GOMES et al., 2007; MARINI et al., 2008; ALVARENGA et al., 2011).

Cada vez mais a qualidade estável de polvilho azedo é exigência para sua comercialização. A pesquisa para o desenvolvimento de novos produtos também exige uma metodologia mais precisa e de maior reprodutibilidade. A *S. cerevisiae* tem sido encontrada juntamente com as BAL em fermentações de mandioca e demonstra ser uma espécie promissora neste tipo fermentação, uma vez que a associação entre estes microrganismos pode apresentar um impacto significativo para a produção segura de um polvilho azedo que contenha as propriedades organolépticas desejáveis e características do produto final.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem UFMG-A1007) em associação com BAL como cultura iniciadora na fermentação da mandioca para produção de polvilho azedo em escala piloto.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir polvilho azedo em escala piloto utilizando culturas puras de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*, e em culturas mistas com *S. cerevisiae* UFMG-A1007;
- Realizar análises microbianas e físico – químicas em diferentes períodos do processo de fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo;
- Monitorar as culturas iniciadoras (BAL e *S. cerevisiae* UFMG-A1007) durante a produção de polvilho por técnicas de biologia molecular;
- Realizar análises físico-químicas dos polvilhos produzidos em escala piloto;
- Avaliar parâmetros microbiológicos dos polvilhos obtidos em escala piloto.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DO POLVILHO – A MANDIOCA

A palavra mandioca origina-se do termo tupi *mãdi'og*, *mandí-ó* ou *mani-oca* que significa “casa de Mani”, a deusa benfazeja dos guaranis que se transforma em *mani-oca*. Assim como também “Aipim”, do tupi *ai'pi*. “Macaxeira” do tupi *maka'xera*. “Maniva” do tupi *mani'iwa*” (TEIXEIRA, 2014). Originária do Brasil, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta heliófita, perene, arbustiva e pertencente à família das Euforbiáceas. Suas raízes tuberosas, ricas em amido são utilizadas na alimentação humana e animal e constituem matéria-prima para indústrias. A parte aérea (ramas e folhas) rica em minerais, proteínas, vitaminas e carboidratos também são utilizadas como fonte de alimento para os animais (TIVANA, 2012).

A mandioca constitui-se um dos principais cultivos no mundo, sendo considerada social e economicamente importante. É uma tuberosa de grande representatividade no cenário econômico do Brasil, sendo este o segundo maior produtor do mundo. A produção no nordeste brasileiro é a maior do país, tendo um valor social, já que a maioria da produção é derivada da agricultura familiar, tornando essa, uma produção de subsistência (SILVA, 2015). No Brasil, a produção de mandioca vem sofrendo transformações ao longo do tempo. Além do mercado industrial (fécula e farinha), o mercado da mandioca de mesa é grande no país, onde disputa em volume com os principais hortigranjeiros. A mandioca de mesa é consumida, diretamente após a cocção, juntamente com especiarias e sal, ou misturado com vários outros vegetais (SILVA, 2015).

Tendo como base os critérios de toxicidade e palatabilidade das raízes, as variedades de mandioca são classificadas em dois grupos: mansas ou doces e bravas ou amargas. De maneira bastante subjetiva, as variedades bravas têm sabor amargo e as mansas são levemente adocicadas. O sabor amargo está associado ao potencial cianogênico, ou seja, à capacidade da liberação de ácido cianídrico (HCN), substância altamente tóxica. Evidências revelam que o sabor amargo é perceptível a partir de 100 mg HCN/kg de polpa das raízes. Quando a planta sofre algum tipo de lesão, pode desencadear a liberação do HCN. Os cianetos são extremamente venenosos devido à habilidade do íon em se combinar com o ferro da hemoglobina,

bloqueando a recepção do oxigênio pelo sangue. Para produzir alimentos a partir da mandioca, os cianogênicos devem ser eliminados durante o processamento (SEBRAE, 2008; TIVANA, 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS) especifica que os níveis de cianogênicos no amido devem ser menores do que 10 mg/kg (FAO/WHO, 1991).

Não há entre os grupos de mandioca qualquer característica morfológica da planta que permita distingui-los. A diferença mais concreta entre variedades bravas e mansas encontra-se no modo de consumo. As bravas são utilizadas para produzir farinha, extrair amido e outros produtos, e somente são consumidas após algum tipo de processamento industrial para efeito detoxificante. Variedades mansas são mais versáteis, podem ser destinadas ao processamento tal quais as variedades bravas, e também consumidas após preparos mais simples como cozidas, fritas ou assadas (FALADE & AKINGBALA, 2011).

O processamento industrial da mandioca está relacionado às suas folhas, ramas e as raízes. Entretanto, hoje, do ponto de vista comercial, o enfoque é dado às raízes, grande reservatório de amido (TEIXEIRA, 2014). A maioria das modificações ocorre no grânulo de amido por meio de processos físicos, químicos e enzimáticos, que causam alterações no nível molecular, afetando sua capacidade de inchaço, poder de ligação, fluidez, pH e estabilidade à temperatura (VARGAS-AGUILAR, 2010; CHAVES-LÓPEZ et al., 2014).

Em muitas partes do Brasil, a mandioca é consumida fresca, diretamente após a cocção, juntamente com especiarias e sal, ou misturada com vários outros vegetais. Entretanto vários produtos alimentares são processados e transformados em bebidas e alimentos fermentados e não fermentados. Estes produtos variam de acordo com seu modo de transformação (fritos, torrados, cozidos, secos, fermentados), e com seu modo de consumo. Os principais produtos fermentados incluem pão de mandioca, polvilho doce e azedo, *fufu*, *lafun*, *attiéké*, *agbelima* e *gari*, enquanto que os produtos não fermentados incluem farinha de mandioca, amido não fermentado (fécula nativa), tapioca, mandioca fresca, *chips* e *pellets* (FALADE & AKINGBALA, 2011).

### 3.2 POLVILHO DOCE E AZEDO

A fécula de mandioca é um polissacarídeo natural, constituído de cadeias lineares (amilose) e de cadeias ramificadas (amilopectina) (OSUNDAHUNSI & MUELLER, 2011). Representa o produto mais nobre extraído das raízes da mandioca e o seu uso é bastante diversificado. Os maiores demandantes são as indústrias alimentícias (principalmente de massa, biscoito e panificação), as de plásticos e a siderúrgicas (CEREDA & VILPOUX, 2003). Na indústria de alimentos a fécula de mandioca é um produto utilizado no processamento de outros alimentos, com a finalidade de aumentar o valor agregado do produto e conseqüentemente, elevar a renda dos setores envolvidos (NWOKOCHA et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; SILVA, 2011; PENA, 2016).

De acordo com a tecnologia de processamento da raiz de mandioca, o amido pode ser obtido na forma de fécula nativa ou fécula fermentada. Esta última, por sua vez, pode ser caracterizada como polvilho doce ou polvilho azedo. Estes três produtos apresentam características distintas, como cor, granulação, aroma e índices de pH, acidez titulável e expansão da massa, que determinam a sua utilização. A fécula nativa é um subproduto da fabricação da farinha de mandioca, consistindo-se da fécula decantada que é produzida a partir do líquido de prensagem da massa ralada da raiz de mandioca. Já o polvilho doce e o polvilho azedo são considerados amidos modificados obtidos por meio da fermentação natural e espontânea da fécula nativa ou da própria raiz de mandioca, processo desenvolvido por diversas espécies de micro-organismos naturalmente presentes na matéria-prima, na água e nos tanques de fermentação (LACERDA, 2002; APLEVICZ, 2006; CORRÊA, 2010). A produção de amidos fermentados de mandioca tem sido uma alternativa desenvolvida com o objetivo de superar as limitações dos amidos nativos e em consequência aumentar a utilidade deste polímero nas aplicações industriais (APLEVICZ, 2006).

O polvilho constitui um dos principais produtos derivados da mandioca e a Legislação Brasileira regulamentada pela CNNPA define o polvilho como um produto amiláceo extraído das partes subterrâneas comestíveis de tubérculos, raízes e rizomas da mandioca (BRASIL, 1978a). De acordo com o teor de acidez titulável, o polvilho é classificado como doce ou azedo. Para o polvilho azedo, a acidez titulável

deve ser no máximo de 5,0 mL NaOH 1N/100g de matéria seca, e para o polvilho doce, a acidez titulável deve ser no máximo 1,0 mL NaOH 1N/100g seca (BRASIL, 1978b). A Resolução 12 da CNNPA (BRASIL, 1978a) e a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 263 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005) definem parâmetros físico-químicos para determinar a qualidade do polvilho doce e azedo. Estes fatores são determinados quanto à umidade (14%); acidez máxima para o polvilho doce de 1 mL de solução N% (p/v) e 5 mL de solução N% (p/v) para polvilho azedo; amido (80%); e resíduo mineral (0,5%).

O polvilho azedo é um produto tipicamente regional, produzido principalmente nos estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, sendo processado, muitas vezes, por pequenas indústrias rurais. O produto é indispensável na fabricação do biscoito de polvilho e pão de queijo (LACERDA, 2006; SANTOS et al., 2011; PENIDO, 2013). Além de ser uma fonte reconhecida de carboidratos, também é um produto de panificação isento de glúten, o que o coloca como alimento alternativo para pacientes celíacos e para pacientes alérgicos às proteínas do trigo (PEREIRA et al., 2004). Recentemente o polvilho azedo teve seu volume de produção aumentado pela popularização do consumo de pão de queijo que, de um nicho tradicional na culinária mineira, passou a *fast food*, sendo consumido em larga escala, e exigindo uma maior padronização da qualidade do produto (ANJOS et al., 2014).

O polvilho doce e o azedo passam pelo mesmo processo de extração da fécula de mandioca. O polvilho doce e a fécula nativa são produtos similares, e constituem matéria-prima adequada na indústria alimentar devido à sua baixa temperatura de gelatinização (71 °C), baixa tendência a retrogradação, e alta viscosidade. O polvilho doce possui baixo teor lipídico (<0,01%), proteína (0,15-0,30%), cinzas (0,08-0,15%) e fósforo (2,04-2,45 mg/kg) (FALADE & AKINGBALA, 2011).

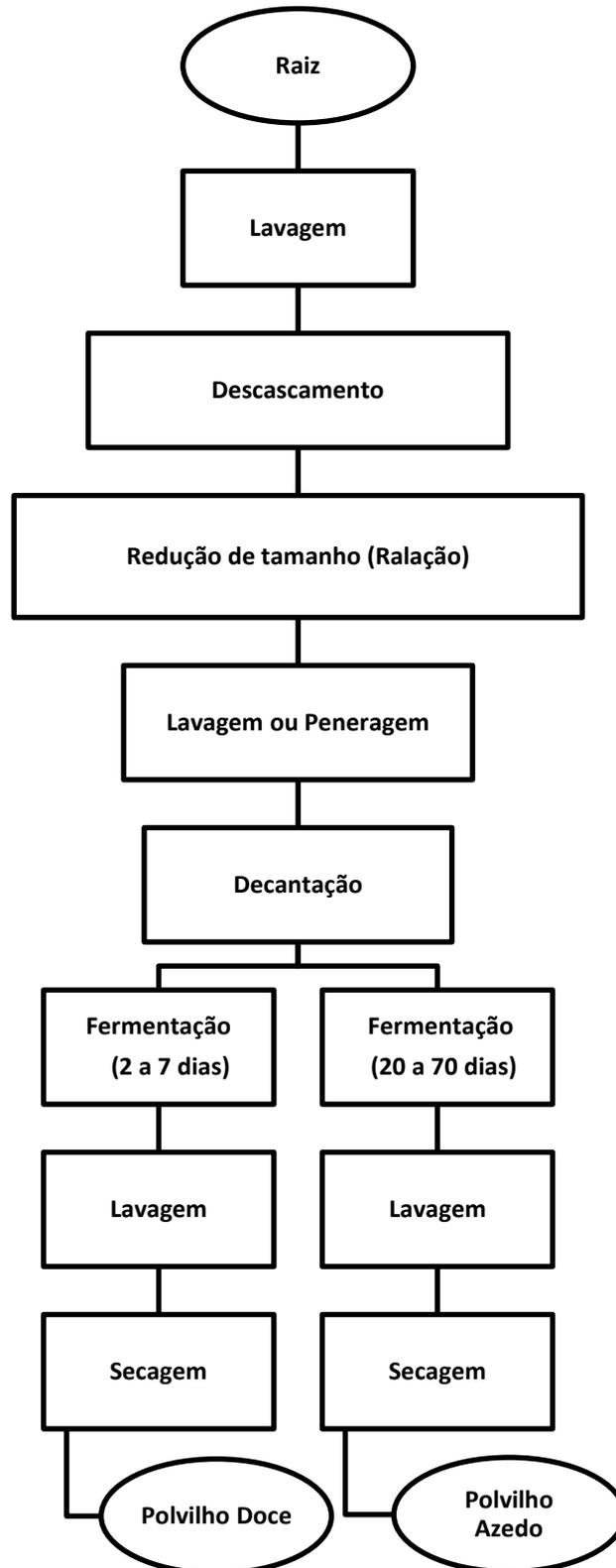
No comércio, a denominação de polvilho doce é comumente utilizada para o produto obtido por um curto período de fermentação da mandioca e seco ao sol, processado em pequenas e médias instalações rurais. Já o polvilho azedo é submetido a uma fermentação da mandioca mais prolongada, após a etapa de decantação da fécula e ambos são secos ao sol. A diferença entre o polvilho doce e a fécula de mandioca é que esta última não é fermentada e consiste basicamente do

amido extraído e seco em fornos (LACERDA, 2006; SANTOS et al., 2011; PENIDO, 2013).

Entretanto, a diferença entre o polvilho doce e azedo não está apenas nos índices de pH, acidez titulável, ou tempo de fermentação, mas em aspectos gerais como cor, granulação e aroma (LACERDA, 2006; AVANCINI, 2007; PENIDO, 2013; REBOUÇAS, 2015). A principal diferença entre a fécula fermentada e a fécula nativa de mandioca, reside na propriedade de expansão, a qual vem sendo apreciada de modo crescente pela indústria de panificação, em especial para o preparo de massas para consumidores celíacos, pois o polvilho azedo é livre de glúten (MARCON, 2009). Em geral, os amidos não fermentados não apresentam a propriedade de expansão, de forma que no preparo de produtos panificáveis, o aumento de volume é obtido pelo uso de fermento químico, biológico ou por extrusão (SANTOS & CEREDA, 2015). Na América do Sul, são elaborados produtos panificáveis tradicionais, nos quais é possível conseguir expansão da massa no forno, sem uso de fermento ou extrusão (SANTOS & CEREDA, 2015). No polvilho azedo, o aumento do volume específico da massa é atribuído à pressão interna de gases e vapor de água durante o forneamento, atuantes no desenvolvimento de uma rede polimérica por meio da formação de ligações de pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos carboxilas e hidroxilas do amido (MARCON et al., 2009).

### **3.2.1 Processo de obtenção do polvilho doce e azedo**

A obtenção do polvilho se dá por meio da fermentação natural da fécula de mandioca, ou pela ação de enzimas microbianas, com consequente produção de ácidos orgânicos, em condições e tempos variados (LADEIRA & PENA, 2011). Para o polvilho doce, a fécula é decantada e fermentada por um período de dois a sete dias e então submetida a sucessivas lavagens para retirada das demais impurezas (LIMA et al., 2012). Para o polvilho azedo, a fécula fica em processo de fermentação em tanques de alvenaria, por um período que varia de 20 a 70 dias (FALADE & AKINGBALA, 2011; SANTOS et al., 2011.) (Figura 1). Posteriormente, ocorre a etapa de secagem ao sol (COHEN, 2007; PENIDO, 2013).



**Figura 1** Fluxograma do processo de produção de polvilho (adaptado de Santos et al., 2011)

Em polvilharias de pequeno porte, as etapas do processo de obtenção do polvilho doce ocorrem manualmente. As raízes de mandioca são lavadas em tanques e, posteriormente, descascadas e raladas à mão, até sua desintegração. A massa resultante é, em seguida, lavada em peneiras até que a água de lavagem adquira uma coloração translúcida. Em seguida a água é recolhida, decantada e fermentada em cochos de madeira até que a fase sobrenadante se apresente límpida (DINIZ, 2006).

A produção do polvilho azedo pode ser realizada a partir do polvilho doce, da fécula nativa decantada e ou do líquido de prensagem da massa ralada obtida no processo de obtenção da farinha de mandioca. Entretanto, a maioria dos produtores inicia o processamento com o emprego direto da raiz da mandioca (MARCON, 2009). O amido de mandioca para a produção de polvilho azedo é também extraído por lavagem, descascamento e desintegração das raízes (DINIZ, 2006). A pasta de fécula é colocada de baixo de água abundante para liberar os grânulos de amido e separá-los das fibras e componentes solúveis. Em seguida, o amido, que já se encontra separado das fibras é diluído em água e colocado em tanques abertos de fermentação que podem ser desde cochos de madeira a tanques de alvenaria, revestidos ou não com cerâmica, cobertos ou descobertos (DINIZ, 2006; LACERDA, 2006; COHEN, 2007; PENIDO, 2013). A fermentação pode ser considerada semi sólida, e nesse processo o amido forma blocos compactos devido à evaporação da água durante a fermentação. O processo é finalizado, empiricamente, com o aparecimento de espuma na superfície e bolhas persistentes que se formam no interior da massa e desprendimento de forte odor característico (CHAVES-LÓPEZ, et al., 2014). Indústrias de pequeno porte empregam apenas a etapa de decantação enquanto indústrias de maior porte usam uma etapa prévia de centrifugação da fécula, com posterior decantação, com perda de água constante até formação de blocos compactos, normalmente cobertos por uma camada de água superficial de 10 a 20 cm (MARCON, 2009).

Após a fermentação predominantemente láctica, o polvilho azedo é seco ao sol até alcançar 30 a 50% de umidade, por um período que varia de acordo com o clima. Tradicionalmente, o produto fermentado é retirado e espalhado em jiraus de bambu trançado para secar ao sol. Acredita-se que a fermentação e os processos

de secagem ao sol não só podem alterar a reologia do amido, mas também aumentar a capacidade de expansão e a sua viscosidade (MACHADO et al., 2012).

A fermentação do amido de mandioca para produção de polvilho azedo é tradicionalmente realizada a partir da microbiota natural presente na mandioca. Esta microbiota é constituída principalmente por bastonetes gram-positivos, identificados como bactérias lácticas, homo e heterofermentativas com predominância do *L. plantarum*. Este tipo de fermentação produz diferentes tipos de ácidos orgânicos, além do láctico, estão presentes diversas concentrações entre eles, o acético, o butírico e o propiônico (CHELULE et al., 2010; SANTOS et al., 2011; PENIDO, 2013).

A natureza do processo fermentativo, utilizado comercialmente, é ainda pouco conhecida e caracteriza-se por ser um processo rudimentar e empírico, em que a maioria dos produtores não utiliza inóculo para garantir ou acelerar a fermentação. Essa fermentação resulta em modificações na superfície dos grânulos, com perfurações provocadas por enzimas amilolíticas, conferindo ao polvilho azedo características peculiares. Além do sabor e do aroma, as modificações ocorridas acarretam alterações na acidez, pH e nas propriedades reológicas do produto (MARCON, 2009).

### **3.2.2 Fermentação láctica e microbiota envolvida em produtos derivados de mandioca**

#### **3.2.2.1 BAL**

Por definição, o termo “fermentação” é usado para descrever o processo de catabolismo, ou seja, conversão anaeróbia, que se dá por meio de enzimas microbianas, de compostos orgânicos complexos, tais como carboidratos, em moléculas mais simples, como alcoóis e ácidos orgânicos, com consequente liberação de energia; entretanto, o entendimento geral do termo hoje, engloba processos aeróbios e anaeróbios, no processo de quebra dos compostos orgânicos complexos (BASTOS, 2010). Produtos fermentados são utilizados pelo homem desde épocas remotas, como forma de preservação de alimentos e também pelos atributos sensoriais (FELLOWS, 2006).

A fermentação assegura não somente o aumento da vida útil e a segurança microbiológica dos produtos, mas também pode produzir muitos alimentos mais digeríveis, e no caso da fermentação da mandioca, reduz a toxicidade do substrato quanto ao cianeto (CHAVES-LÓPEZ et al., 2014).

Muitos microrganismos têm sido também descritos como hábeis à destoxificação ou utilização de formas simples de cianeto. Linhagens de *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Candida tropicalis*, e *Penicillium sclerotium*, isoladas da fermentação de mandioca em estudo realizado por Amoa-Awua et al. (1996), foram avaliadas por Lei et al. (1999), quanto à habilidade à degradação de glicosídeos cianogênicos, incluindo linamarina, amidalina e uma mistura entre linustatina e neolinustatina. O estudo demonstrou alta atividade enzimática da A linhagem de *Penicillium sclerotium* e *Lactobacillus plantarum* sobre os substratos cianogênicos (PANTAROTO, 2001).

A preservação dos alimentos pela fermentação depende do princípio da oxidação de carboidratos, gerando produtos finais, os quais são geralmente ácidos, álcool e gás carbônico. Estes produtos finais controlam o crescimento de micro-organismos deteriorantes dos alimentos e, devido à oxidação ser somente parcial, os alimentos retêm energia potencial, que é suficiente para promover benefícios nutricionais para o consumidor. Através de processos industriais simples ou complexos, a atividade microbiana tem sido utilizada pelo homem na obtenção de compostos orgânicos de grande utilidade. Em alguns casos, a fermentação é realizada aproveitando a microbiota normal presente nos alimentos; em outros, são adicionadas culturas de micro-organismos específicos, chamadas de culturas iniciadoras (BASTOS, 2010; CHAVES-LÓPEZ, et al., 2014).

A fermentação natural ocorre quando as condições ambientais permitem interação entre o micro-organismo e substratos orgânicos susceptíveis. Entre as fermentações, é possível citar: fermentações acéticas, lácticas, cítricas, alcoólicas, butíricas, entre outras. A maioria dos alimentos fermentados, de diferentes fontes, é dependente das bactérias do ácido láctico (BAL) que são responsáveis pela fermentação láctica. Os produtos finais do catabolismo dos carboidratos por estas

bactérias contribuem, não somente para a preservação, mas, também, para o sabor, aroma e textura, formando determinado produto característico único. As bactérias do ácido láctico são capazes de controlar os micro-organismos específicos ou a sucessão de micro-organismos que determinam a microbiota dos alimentos (os quais são as bases para o desenvolvimento de culturas iniciadoras) as quais são muito desejáveis (BASTOS, 2010).

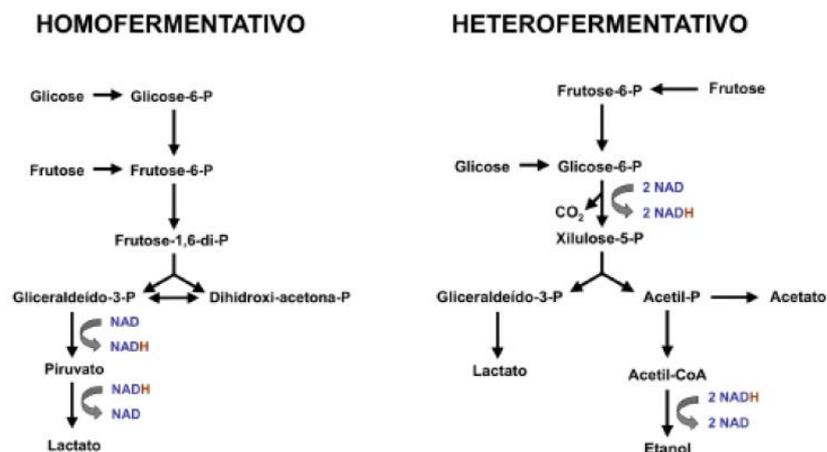
As bactérias lácticas têm sido utilizadas em todo o mundo em várias fermentações de alimentos. Estas bactérias, não formam esporos, e são Gram-positivas, ácido-tolerantes e catalase negativas (BALLUS et al., 2010). Essas bactérias existem nas formas de cocos ou bacilos (WOOD & HOLZAPFEL, 1995; CAPELLARI, 2010). *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* são os gêneros mais estudados entre as bactérias lácticas (DAVIDSON et al., 1995; STILES & HOLZAPFEL, 1997; JAY, 2000; ERCOLINI et al., 2001; HOLZAPFEL et al., 2001; AXELSSON, 2004; VODNAR et al., 2010). *Lactobacillus* é o maior destes gêneros, compreendendo cerca de 80 espécies reconhecidas (AXELSSON, 2004). As BAL são um grupo de bactérias que produzem ácido láctico como principal metabólito através da fermentação de carboidratos. São heterotróficas e têm necessidades nutricionais complexas (REDDY et al., 2008). De acordo com sua temperatura de crescimento as BAL podem ser classificadas em mesofílicas e termofílicas. Sendo que as mesofílicas são aquelas que crescem a uma temperatura ótima por volta de 30 °C e as termofílicas aquelas que crescem a uma temperatura ótima de 42 °C (SYBESMA et al., 2003).

As bactérias lácticas sobrevivem em presença de um pH relativamente baixo diferentemente de outros grupos microbianos com metabolismo respiratório. Esta característica é importante, pois capacita as BAL a eliminar competição da maioria de outras bactérias em ambientes ricos em nutrientes. As bactérias lácticas possuem ainda um sistema de transporte simultâneo de ácido láctico e prótons para o exterior celular, que contribuem para a homeostase do pH interno e originam energia (BERNARDEAU et al., 2008).

As bactérias lácticas possuem elevadas exigências nutricionais em relação ao substrato, possuindo metabolismo fermentativo estritamente sacarolítico. Todas as

BAL produzem ácido láctico a partir de hexoses. Com base nos produtos finais da fermentação elas podem ser divididas em dois grupos: as homofermentativas e as heterofermentativas. As BAL homofermentativas tais como *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e algumas espécies de *Lactobacillus* produzem ácido láctico como o principal ou único produto final da fermentação da glicose. As heterofermentativas tais como *Weisella* e *Leuconostoc* e algumas espécies de *Lactobacillus* produzem lactose, gás carbônico, e etanol a partir de glicose (BASTOS, 2010).

Dessa forma, duas principais vias de fermentação de açúcar podem ser distinguidas entre as BAL (Figura 2). As homofermentativas utilizam em seu metabolismo a via glicolítica (via Embden-Meyerhof-Parnas) que resulta em ácido láctico como produto final. Já as heterofermentativas realizam a fermentação via 6-fosfogluconato/fosfoquetolase, que resulta em quantidades significativas de outros produtos finais, como o etanol, acetato, e gás carbônico em adição ao ácido láctico produzido (GOMES, 2009).



**Figura 2** Representação esquemática simplificada das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias do ácido láctico (GOMES, 2009)

Na indústria de alimentos, estas bactérias são de grande interesse pela capacidade de diminuir tanto o conteúdo de carboidratos dos alimentos que fermentam quanto o pH. Um dos efeitos mais desejáveis do seu crescimento é este processo de acidificação. O pH pode diminuir para um valor próximo de 4,0, valor

baixo o suficiente para inibir o crescimento de várias bactérias, incluindo os patógenos mais comuns, prolongando, assim, a vida de prateleira desses alimentos. No entanto, em algumas situações, as BAL também podem ser responsáveis pela produção de sabores e aromas indesejáveis. A produção destes compostos indesejáveis ocorre devido estas bactérias serem tolerantes a temperaturas elevadas, ao baixo pH e por possuírem habilidade de crescimento extremamente rápida (REDDY et al., 2008).

Os processos de fermentação da mandioca apresentam uma grande importância cultural na base alimentar indígena e baseiam-se em conhecimentos empíricos e antigos, que foram adquiridos por observações e experiências e transmitidos de uma geração para outra. Estes conhecimentos têm sido utilizados como estratégia, para a preservação da raiz, uma vez que, além de fornecer sabor, variedade e preservar os produtos, os procedimentos de fermentação adotados também ajudam na desintoxicação das raízes de mandioca (FALADE & AKINGBALA, 2011). A fermentação artesanal do amido extraído das raízes da mandioca é uma tecnologia tradicional largamente usada na América Latina, especialmente na Colômbia e no Brasil (CHELULE et al., 2010; SANTOS et al., 2011; PENIDO, 2013). O polvilho azedo é um dos principais produtos brasileiros fermentados a partir da mandioca (LIMA et al., 2012). Com o estudo sobre a microbiota presente na fermentação de mandioca, autores subdividiram-na em três grupos, pela ordem de ocorrência, embora essas fases não sejam obrigatoriamente distintas (CEREDA et al., 1995; LACERDA, 2006; MARCON, 2004; MARCON, 2009).

As primeiras etapas da fermentação do polvilho azedo são caracterizadas pela geração de açúcares, a partir da ação de enzimas amilolíticas microbianas. Assim, a adição de glicose pode ser utilizada como oportunidade de se transpor etapas no processo, disponibilizando substratos em maior concentração para a etapa de fermentação, promovida por BAL, que são predominantes no processo de produção do polvilho azedo. As enzimas e ácidos gerados nas diferentes etapas da fermentação do polvilho azedo promovem importantes danos aos grânulos de amido (SILVA, 2014). A primeira fase da fermentação do amido de mandioca, na produção do polvilho azedo, é marcada por uma microbiota pouco exigente, com presença dos gêneros *Escherichia* sp., *Alcaligenes* sp., *Micrococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. Esse

início da fermentação é marcado pela rápida queda na concentração de oxigênio dissolvido, que é consumido por bactérias amilolíticas aeróbias, com consequente produção de gás carbônico e gás hidrogênio, além de ácidos orgânicos, como o ácido acético, butírico, láctico, propiônico, entre outros (DINIZ, 2006; CORRÊA, 2010; AQUINO, 2015). O aspecto alterado da superfície dos grânulos de amido de mandioca após a fermentação, com perfurações e rachaduras, comprova o efeito do ataque das amilases (CEREDA et al., 1995; MARCON, 2004). A segunda fase propicia o desenvolvimento de micro-organismos microaerófilos, anaeróbios facultativos ou estritos responsáveis pelas fermentações lácticas, acéticas, butíricas e propiônicas, entre outras. Alguns dos compostos formados durante a fermentação incluem ácidos orgânicos (palmítico, pirúvico, láctico, acético, propiônico e butírico), álcoois (principalmente etanol) aldeídos e cetonas (acetaldeído, acetoin, 2-metil butanol). As bactérias produzem enzimas como proteases, amilases e lipases que hidrolisam complexos alimentares em produtos simples não tóxicos com texturas desejáveis, aroma que os torna saborosos para consumo (REDDY et al., 2008).

Em regiões frias, a fermentação é lenta com predomínio da microbiota láctica com uma maior frequência do *Lactobacillus plantarum*, enquanto nas regiões quentes, a fermentação é mais rápida e predomina a microbiota butírica, sendo o *Clostridium butyricum* com maior relevância. Na terceira fase ainda aparecem os micro-organismos saprófitas e contaminantes, entre os quais diversas espécies de leveduras que seriam responsáveis pela formação dos compostos aromáticos (SILVA, 2014).

A fermentação natural da mandioca ocorre por meio de uma microbiota mista pertencente às bactérias e leveduras. BAL são predominantes e são encontradas durante a fermentação dos produtos derivados da mandioca, sendo os principais gêneros encontrados, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* e *Pediococcus* spp. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e outras BAL têm sido reportadas como os micro-organismos predominantemente associados com a fermentação espontânea do amido da mandioca (Quadro 1). Estes micro-organismos são conhecidos por serem responsáveis pela produção de ácidos orgânicos e compostos aromáticos (LACERDA, 2005; PENIDO, 2013).

**Quadro 1** Micro-organismos encontrados durante a fermentação de alimentos e bebidas derivados da mandioca em diferentes partes do mundo

TIPO DE PRODUTO	REGIÃO	PRODUTO	MICRO-ORGANISMOS IDENTIFICADOS	REFERÊNCIA
Alimento fermentado	Costa do Marfim	<i>Akyeké;</i>	<i>Bacillus, Candida, Zygosacchomyces, Leuconostoc, Lactobacillus, Enterobacter e Klebsiella.</i>	Obilie et al., 2003; Coulin et al., 2006
Produto de panificação	Gana, Togo, Benin	<i>Agbelima</i>	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus, Bacillus e Corynebacterium.</i>	Amoa- Awua & Feglo, 2005
Bebida fermentada	Brasil	Cauim	<i>Lactobacillus, Corynebacterium, Bacillus, Paenibacillus, Candida, Pichia, Saccharomyces, Trichosporon, Kluyveromyces e Rhodosporidium.</i>	Almeida et al., 2007; Schwan, 2007, Ramos et al., 2010.
Pasta fermentada	Nigéria, Congo	<i>Fufu</i>	<i>Streptococcus, Geotrichum, Corynebacterium, Lactobacillus, Leuconostoc, Candida, Pichia, Saccharomyces e Zygosaccharomyces.</i>	Oyewole, 2001
Farinha fermentada	Nigéria e Oeste da África	<i>Gari</i>	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Weissella, Staphylococcus e Candida.</i>	Oguntoyinbo, 2008; Kostinek et al., 2007; Oguntoyinbo & Dodd, 2010.
Alimento Fermentado	Benin e Nigéria	<i>Lafun</i>	<i>Bacillus, Klebsiella, Pantoea, Lactobacillus, Weissella, Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hanseniaspora, Candida e Trichosporon.</i>	Padonou et al., 2009; Padonou et al., 2010;
Fécula fermentada	Brasil e Colômbia	Polvilho azedo	<i>Bifidobacterium, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Bacillus, coliformes, Galactomyces, Issatchenkia e Candida.</i>	Ampe et al., 2001; Lacerda et al., 2005; Penido, 2013.

Fonte: Adaptado de Santos, 201 e Penido, 2013

### 3.2.2.2 LEVEDURAS

Além das BAL, as leveduras também são encontradas nas fermentações tradicionais de mandioca. As leveduras são micro-organismos eucariontes pertencentes ao Reino Fungi e presentes nos Filos dos Ascomycotas (grande maioria) e Basidiomycotas. São fungos unicelulares, não-filamentosos, ovais ou esféricos, podendo se reproduzir sexuadamente (sem apresentar um corpo de frutificação) ou assexuadamente por brotamento ou fissão binária. As leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo, podendo utilizar oxigênio ou um composto orgânico como aceptor final de elétrons. As leveduras estão tradicionalmente envolvidas em processos fermentativos que trazem como consequência o melhoramento ou a deterioração dos alimentos açucarados. Esses micro-organismos apresentam uma grande diversidade de espécies com propriedades fisiológicas diferentes e são utilizadas em vários processos industriais (KURTZMAN & FELL, 1998; KURTZMAN et al., 2011).

As leveduras encontradas em processos fermentativos de amiláceos são principalmente espécies pertencentes o gênero de *Saccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces* e *Kluyveromyces* (CHELULE et al., 2010). Vários estudos têm relatado a presença do gênero *Candida* na fermentação de mandioca. Algumas espécies do gênero *Candida* foram isoladas da fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo, *Candida rugosa*, *C. humilis* e *C. ethanolica* (LACERDA et al., 2005; PENIDO, 2013), para a produção de gari, *C. guilliermondii*, *C. maris* e *C. glabrata* (OGUNTOYINBO, 2008). Esta última também foi isolada do *lafun*, produto obtido da fermentação da mandioca consumido na Nigéria, juntamente com *Pichia scutulata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia kudriavzevii* e *Trichosporon asahii* (PADONOU et al., 2009).

Diversos povos indígenas utilizam processos fermentativos para a produção de alimentos e bebidas com valores nutricionais, medicinais e religiosos. Os mais variados substratos são utilizados destacando-se, principalmente, a mandioca, o milho e o arroz ou, ainda, amendoim, banana e abóbora. Entretanto, o conhecimento sobre os micro-organismos envolvidos nessas fermentações espontâneas ainda é escasso. O cauim é uma bebida não alcoólica produzida pela tribo indígena Tapirapé a partir de vários substratos como, mandioca, arroz, amendoim, abóbora,

semente de algodão e milho (RAMOS et al., 2010). No preparo do cauim, os diferentes substratos são cozidos e deixados resfriar a temperatura ambiente, quando então é adicionado o inóculo para iniciar a fermentação. O inóculo é obtido a partir da mastigação da batata-doce por uma índia da tribo (SCHWAN et al., 2007). Schwan et al (2007) estudaram o cauim de arroz e mandioca produzido pelos índios Tapirapé (Confresa, MT) e isolaram e identificaram a microbiota presente nessa bebida. Dentre os isolados bacterianos houve predomínio de *Lactobacillus pentosus* e *L. plantarum*, mas espécies dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Paenibacillus* também foram identificadas. Schwan et al. (2007) encontraram, em bebidas fermentadas de mandioca (cauim), predominância das leveduras *Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichosporon asahii*. O cauim produzido de semente de algodão e arroz, foi estudado por Ramos et al. (2011) que encontraram uma microbiota dominada por BAL, principalmente *Lactobacillus plantarum*, *L. vermiforme* e *L. paracasei*. Para leveduras, as espécies detectadas foram *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Clavispora lusitaniae* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Resultados semelhantes foram encontrados para o cauim de amendoim e arroz, no qual novamente as BAL (principalmente o gênero *Lactobacillus*), foram dominantes durante toda a fermentação, e espécies de leveduras (*P. guilliermondii*, *K. lactis*, *Candida sp*, *R. toruloides* e *Saccharomyces cerevisiae*) também estiveram presentes (RAMOS et al., 2010).

O caxiri é uma tradicional bebida alcoólica produzida pelos índios Juruna (Yudjá), a partir de mandioca e batata-doce, e é fermentada espontaneamente por 24 a 48h. A população de leveduras foi maior do que a de bactérias, e as espécies identificadas foram *Saccharomyces cerevisiae* (a espécie 31 dominante), *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia membranifaciens*, *P. guilliermondii* e *Cryptococcus luteolus*. Para bactérias, o gênero *Bacillus* spp. foi dominante, e incluiu espécies do grupo *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, além de *Sphingomonas sp.* e *Pediococcus acidilactici* (SANTOS et al., 2012).

O calugi é um mingau fermentado não alcoólico preparado a partir de milho e arroz pelos índios da etnia Javaé. (Miguel et al., 2012), identificaram, por métodos independentes de cultivo, as seguintes espécies durante o processo fermentativo: *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius*, *S. parasanguis*, *Weissella*

*confusa*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus* e *Bacillus* sp. e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans* e *Cândida* sp. (FREIRE, 2013).

### 3.2.3 Importância de *S. cerevisiae* em produtos derivados da mandioca

A levedura *S. cerevisiae* pode ser classificada como um fungo unicelular da classe Saccharomycetes (KURTZMAN, 1997; SILVA, 2009), frequentemente associado às indústrias de processamento de alimentos e bebidas (SILVA et al., 2009). Na indústria de alimentos e bebidas, esta levedura tem sido reconhecida como de fundamental importância no processo de obtenção de produtos fermentados. Vários estudos relatam o uso de *S. cerevisiae* em processos fermentativos para produção de bebidas alcoólicas, principalmente, no ambiente produtivo de cachaça, nos processos vinícolas e cervejeiros, e para produção de produtos de panificação (SILVA et al., 2009; ALBERTIN et al., 2011; ARAUJO, 2013; BOKULICH & BAMFORTH, 2013; CANONICO et al., 2014; LENTZ et al., 2014; MARONGIU et al., 2015; FURLAN, 2016).

Estudos realizados por Mante et al. (2003), Lacerda et al. (2005), Boonnop et al. (2009), Vogelmann et al. (2009) e Penido (2013) descreveram que a associação entre BAL e leveduras pode contribuir para a melhoria das características organolépticas em diferentes processos fermentativos da raiz de mandioca. Existem relatos da presença de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação de mandioca (Quadro 2), uma vez que contribui para o amolecimento da mandioca e para o enriquecimento nutricional do produto fermentado (OBOH & KINDAHUNSI, 2005; SCHWAN et al., 2007; BOONNOP et al., 2009; PADONOU et al., 2009; PADONOU et al., 2010; GUNAWAN et al., 2015). Segundo, Vogelmann et al. (2009) e Padonou (2010), o uso de *S. cerevisiae* em associação com BAL como co-cultura em fermentação de mandioca pode ser uma alternativa interessante para a melhoria da produção de polvilho azedo.

**Quadro 2** *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes produtos obtidos por fermentação da mandioca

	<b>NOME DO PRODUTO</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Attiéké</i>	Coulin et al., 2006.
	<i>Calugi</i>	Miguel et al., 2012.
	Cauim	Schwan, et al, 2007.
	Caxiri	<i>Santos, 2010.</i>
	<i>Fufu</i>	Oyewole, 2001.
	<i>Lafun</i>	Padonou et al., 2009.
	Yakupa	Freire et al., 2014.

Embora a mandioca apresente as vantagens de conveniência e versatilidade, apresentam como desvantagem o seu baixo teor proteico. Este problema pode ser aliviado pelo consumo de alimentos de mandioca com acompanhamentos proteína animal ou vegetal, por exemplo, o enriquecimento com soja para impulsionar o teor de proteína ou enriquecimento com células microbianas ou adição de óleo de palma. Por exemplo, Gari o produto fermentado de mandioca mais popular consumido na África Ocidental seria deficiente se não fosse suplementado com carne, peixe, ou outra proteína (AVANCINI, 2007). Oboh & Akindahunsi, (2005) estudaram o enriquecimento de nutrientes e desintoxicação de produtos da mandioca utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*, respectivamente. Seu resultado revelou que houve aumentos significativos no teor de proteína da farinha (10,9%) e do *Gari* (6,3%), assim como no teor de gordura da farinha (4,5%) e do *Gari* (3,0%). Por outro lado, houve diminuição significativa no teor de cianeto da farinha (9,5mg /kg farinha) e do *Gari* (9,1mg/kg), no teor de hidrato de carbono na farinha (77,9%) e no *Gari* (84,5%) e nos teores de todos os minerais (Zn, Mg, Fe, Ca, Na e K) presentes nos produtos da mandioca estudados, com exceção do *gari*, onde houve aumento significativo no conteúdo de Mg e Fe. Desta forma, a partir deste estudo, *Saccharomyces cerevisiae*, poderia ser utilizada para aumentar o potencial nutricional de produtos da mandioca, aumentando nutrientes (proteínas e gorduras) e diminuindo cianeto conteúdo. Os resultados da análise centesimal do trabalho citado acima mostraram que o conteúdo de proteína do produto fermentado a partir

de *Saccharomyces cerevisiae* foram maiores do que os produtos não fermentados. Este elevado teor de proteína pode ser atribuído à capacidade do *Saccharomyces cerevisiae* de secretar algumas enzimas extracelulares (proteínas).

Boonnop et al (2009), em estudo sobre enriquecimento nutritivo da mandioca por fermentação empregando *Saccharomyces cerevisiae*, observaram um aumento significativo no teor de proteínas, no aminoácido lisina e no teor lipídico em chips, para ração animal, e polpa fresca de mandioca fermentada, em comparação aos mesmos produtos não fermentados. Os autores discutiram que o aumento proteico pode ser explicado pelo crescimento das células de levedura durante a fermentação, e sugerem que, dessa forma, chips de mandioca podem ser nutricionalmente melhorados para uso na alimentação animal com uma técnica economicamente viável.

### **3.4 CULTURAS INICIADORAS**

A fermentação é uma importante etapa no processamento dos produtos derivados da mandioca. Geralmente, a fermentação tradicional de mandioca para a produção de diferentes produtos ocorre por uma microbiota complexa e mista, que se desenvolve espontaneamente, resultando em um número de alterações bioquímicas simultâneas. Em alguns casos, pequenas quantidades de lotes anteriores são mantidas e utilizadas para inocular os seguintes. Como resultado, o sabor, o aroma, e textura dos produtos variam com a estação, local e produtor. Recentemente, poucas informações são encontradas sobre os micro-organismos que podem ser usados como cultura iniciadora para a produção de produtos obtidos a partir da mandioca fermentada. A necessidade de otimizar o processo desta fermentação durante a produção de alimentos indígenas tem sido destacada (FALADE & AKINGBALA, 2011).

Culturas *starters* ou culturas iniciadoras utilizadas em processos fermentativos consistem na seleção de micro-organismos de alimentos com atividade metabólica estável e conhecida, portadores de outras características usadas para produzir alimentos e bebidas fermentadas de aparência, corpo, textura e sabor desejáveis (RAY, 2004). É uma preparação microbiana de um grande número de células de

pelo menos um micro-organismo que em contato com o substrato promove diante de seu metabolismo a produção do alimento fermentado (LEROY & VUYST, 2004).

Para as indústrias, o uso de culturas iniciadoras tem propiciado obter processos de fermentação e produtos mais uniformes e seguros, com redução do tempo de processamento dos alimentos, obtendo-se, desta forma, produtos com melhores características sensoriais, nutricionais, químicas e microbiológicas. A grande vantagem da utilização de culturas iniciadoras altamente ativas, em processos fermentativos, é que estas proporcionam produtos de alta qualidade em menor período de tempo (SCHEIDT et al., 2010).

Estudos relatam que a associação entre BAL e leveduras pode contribuir para a melhoria das características organolépticas do polvilho azedo (MIAMBI et al., 2003; PARAMITHIOTIS et al., 2006). As BAL produzem uma condição ácida que, apesar de inibir o crescimento de alguns micro-organismos, favorece o crescimento de leveduras. Por outro lado, as leveduras fornecem fatores de crescimento para as BAL. Além disso, algumas BAL são produtoras de  $\alpha$ -amilase que, ao hidrolisarem a molécula de amido formam derivados utilizáveis pelas leveduras. Algumas BAL e leveduras associadas em alimentos fermentados são capazes de degradar fatores antinutricionais, como ácidos e compostos fenólicos. A incorporação destes micro-organismos como culturas iniciadoras pode, no entanto, servir para melhorar ou aumentar o valor nutricional dos alimentos. Além disso, culturas selecionadas servem para aumentar os benefícios gerais da fermentação espontânea, tais como o aumento da digestão de proteínas e a biodisponibilidade de nutrientes, e contribuem mais especificamente para o enriquecimento biológico através da biossíntese de vitaminas e aminoácidos essenciais (REBOUÇAS, 2015).

Mugula et al. (2003), ao estudar o uso de BAL e leveduras como culturas iniciadoras para o preparo de *togwa*, um alimento fermentado da Tanzânia, feito a partir de milho e sorgo, observaram que as BAL mostraram habilidade de fermentar a massa e aumentar a acidez. Como culturas puras, as leveduras mostraram baixa atividade com 12 horas de fermentação, mas diminuíram levemente o pH e aumentaram a acidez do meio em 24 horas.

A grande variação e a complexidade da microbiota durante a fermentação espontânea de mandioca são apontadas como os principais fatores responsáveis

pela pouca homogeneidade e baixa qualidade dos produtos comercializados. Segundo Aidoo et al. (2006), a fermentação com a presença de culturas iniciadoras apresenta vantagens, como uma menor variação no conteúdo de compostos químicos, menor tempo de fermentação e, por consequência, maior rendimento e qualidade.

Alguns exemplos destes alimentos e bebidas que utilizam culturas iniciadoras nos processos fermentativos são o *gari*, *fufu*, *candi*, *kpokpogari* e *lafun* (Nigéria), *agbelima* e *akyeke* (Gana), e tapioca, cauim e caxiri (Brasil), (AMOA-AWUA, 2004; SCHWAN, 2007; SCHWAN et al., 2007;; OGUNTOYINBO & DODD, 2010; RAMOS et al., 2010; SANTOS et al., 2012). O *gari* é uma farinha granular de coloração creme e sabor levemente azedo, consumida na Nigéria e em outros países do oeste Africano (FREIRE, 2013). Para seu preparo, raízes de mandioca raladas são colocadas em sacos de pano e prensadas até que todo o líquido saia, e a fermentação ali ocorre por 3 a 5 dias. Em seguida as polpas desidratadas são torradas e o produto final é obtido (OJO & DEANE, 2002). A fermentação em estado sólido é um processo espontâneo na qual muitas mudanças microbiológicas e bioquímicas ocorrem (OGUNTOYINBO & DODD, 2010), como a metabolização do amido por bactérias do ácido láctico levando à produção de ácidos orgânicos (como o ácido láctico) e a redução do pH (COULIN et al., 2006). Espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Staphylococcus* e *Candida* são encontradas na produção do *gari* (KOSTINEK et al., 2007; OGUNTOYINBO, 2008; OGUNTOYINBO & DODD, 2010). Kostinek et al. (2007) e Huch et al. (2008) testaram *L. plantarum* como cultura iniciadora e concluíram que o sucesso das linhagens de *L. plantarum* para predominar na fermentação de mandioca demonstra o seu potencial para o desenvolvimento de cultura iniciadora na industrialização do processo de produção de *gari*. Edward et al. (2011) investigaram o uso de cepas liofilizadas de *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Weissella paramesenteroides* e *Leuconostoc mesenteroides* como culturas iniciadoras para a produção de *gari*. Nos testes, as cepas tiveram um bom desempenho e rapidamente aumentaram a acidez titulável de 1,1 a 1,3 % em 24 horas para 1,3 a 1,6 % em 48 horas. Estes autores também indicaram que *L. plantarum* poderia ser produzido como cultura iniciadora a baixo custo. Alguns autores também encontraram que a fermentação da mandioca com *Aspergillus niger* (OBOH et al., 2002) e *Saccharomyces cerevisiae* (OBOH &

AKINDAHUNSI, 2003) aumentaram o teor protéico de gari na proporção de 7,3% e 6,3% respectivamente. O aumento do teor protéico foi atribuído à secreção de enzimas extracelulares na mistura de mandioca para usar o amido como fonte de carbono (RAY & SIVAKUMAR, 2009). Em trabalho realizado por Kostinek (2006) um total de 375 bactérias lácticas foram isoladas da fermentação de mandioca. Sendo *L. plantarum* o principal micro-organismo identificado. Também foram encontrados, *Lactobacillus pentosus*, *Leuconostoc fallax*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides* e *Weissella*. Destes isolados, trinta e duas cepas foram pré-selecionadas como possíveis culturas iniciais para a produção de Gari (KOSTINEK, 2006).

O *Lafun* é uma forma fibrosa de farinha de mandioca. As raízes frescas de mandioca são cortadas em pedaços e deixadas em água para fermentar (3 a 4 dias) até se tornarem macias, em seguida são descascadas, maceradas e deixadas secar ao sol. Após secos, os pedaços são moídos, obtendo a farinha (FREIRE, 2013). A microbiota presente durante a produção deste alimento inclui espécies dos gêneros: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hanseniaspora*, *Candida* e *Trichosporon* (PADONOU et al., 2009). Padonou et al. (2010), investigaram a associação entre a levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, e as BAL, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, e *B. cereus* como culturas iniciadoras para fermentar raízes de mandioca submersas. Estes autores sugerem o uso de *S. cerevisiae* como cultura iniciadora, uma vez que a linhagem estudada foi a mais eficiente no amolecimento da mandioca durante a fermentação e levou à obtenção do *lafun* preferido nos testes de qualidade sensorial. E também sugerem a associação desta levedura com BAL, uma vez que estas últimas podem garantir um pH mais baixo, além de melhorar a qualidade do alimento.

O *fufu* é um alimento fermentado popular na África. Para sua produção as raízes de mandioca são maceradas, descascadas, lavadas, cortadas em pedaços de 20 cm e colocadas em potes de cerâmica com água ou em um pequeno fluxo de água, por 4 a 5 dias. Durante este período ocorre a fermentação e o amolecimento da mandioca, liberando HCN na água de maceração e produzindo sabor e aroma característicos. A mandioca é então desintegrada, peneirada, e em seguida deixada em repouso por 3 a 4 horas. O sedimento é então, decantado, colocado em sacos e

submetido à pressão para eliminar o restante da água (FAGBEMI & IJAH, 2006; AVANCINI, 2010). A sua produção envolve bactérias lácticas e leveduras que participam da etapa de fermentação. Espécies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* são relatadas na literatura como os micro-organismos predominantes na fermentação do *fufu*, juntamente com *Bacillus subtilis*, *Enterococcus*, *Klebsiella* e *Candida krusei* (BLANSHARD et al., 1994; OYEWOL, 2001; FAGBEMI & IJAH, 2006). Em estudo realizado por Fagbemi & Ijah (2006), uma linhagem de *Candida utilis* e uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* foram isoladas de burukutu (um vinho produzido a partir de sorgo) e exibiram alta capacidade de crescimento e utilização da mandioca como fonte de carbono. Estes dois isolados foram, portanto, selecionados como culturas iniciadoras puras e mistas para a produção de *fufu*. O *fufu* produzido a partir das culturas iniciadoras puras e mistas de *C. utilis* e *S. cerevisiae* apresentaram um teor de proteína superior ao teor de proteína do *fufu* comercial, assim como melhor aceitabilidade e melhores qualidades organolépticas (cor, sabor, textura e aroma) do produto final. Dentre as três culturas iniciadoras testadas, a cultura mista de *C. utilis* e *S. cerevisiae* apresentou melhor capacidade de enriquecimento em termos de porcentagem do teor de proteína.

De acordo com trabalho realizado por VOLGENMAN et al. (2009) *sourdoughs* foram preparados a partir de farinhas de cereais (trigo, centeio, aveia, cevada, arroz, milho e milheto), de pseudocereais (amaranto, quinoa, trigo-sarraceno) e de mandioca. Durante o processo fermentativo dos *sourdoughs* as espécies dominantes de BAL e de levedura foram *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus spicheri*, *Issatchenkia orientalis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Neste estudo, as linhagens de *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. paralimentarius*, *L. plantarum*, *L. pontis* e *S. cerevisiae* foram as mais competitivas. A *S. cerevisiae* foi a levedura dominante em todas as fermentações, exceto para o quinoa. Neste estudo os autores também observaram que ao final da fermentação, a maioria das linhagens utilizadas como culturas iniciadoras e inoculadas no início da fermentação, pertenciam a microbiota dominante do processo fermentativo.

A *agbelima* é um produto de mandioca fermentado muito consumido em alguns países da África (Gana, Benin e Togo). É uma farinha fermentada de mandioca, onde um inóculo produzido a partir da própria mandioca fermentada por 2

a 4 dias é triturado junto com a mandioca descascada e deixado fermentar por 2 a 3 dias. A microbiota predominante encontrada tanto no inóculo quanto na pasta fermentada é composta por BAL e leveduras, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lc. mesenteroides* e *Lactobacillus brevis*, bem como leveduras como *Candida krusei*, *C. tropicalis* e *Zygosaccharomyces bailii* foram os principais micro-organismos isolados durante todo o processo de fermentação da Agbelima (AMOA-AWUA et al. 2003; FALADE & AKINGBALA, 2011). Trabalho realizado por Amoa-Awua et al. (2005) demonstraram que a fermentação é influenciada pelo inóculo adicionado. Quatro tipos de inóculos foram estudados, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, e *L. mesenteroides*, e demonstraram que as BAL dominaram parcialmente a fermentação e foram responsáveis pelo amolecimento da textura da massa de mandioca e pela desintoxicação das raízes de mandioca, contribuindo para sua preservação.

O Attiéké é um dos poucos produtos cuja fermentação não é espontânea, mas envolve o uso de inóculo. Na produção de Attiéké, as raízes são descascadas, cortadas em pedaços e então lavadas três vezes com água e moídas. Antes da moagem, o inóculo, a água e o óleo de palma são adicionados às raízes de mandioca e as peças são moídas até a obtenção de uma pasta fina, que é colocada em grandes tigelas. O mosto é deixado fermentar por cerca de 12 a 15 horas à temperatura ambiente (30 e 37 °C). Depois de fermentada, a massa é pressionada e passada através de duas peneiras para obtenção de um pó fino, até que seja transformada em grãos. Em seguida é realizada a etapa de secagem ao sol. Após a secagem, as fibras e a sujidade são removidas e os grãos são cozidos durante cerca de 20 a 25 minutos obtendo-se, então, o attiéké (RAY & SIVAKUMAR, 2009). Na Costa do Marfim, vários inóculos tradicionais são usados para realizar a fermentação das raízes de mandioca e produzir o attiéké. Coulin et al. (2006) ao estudar o processo de fermentação das raízes de mandioca para obtenção do attiéké relatou a predominância de BAL como *L. Mesenteroides subsp. Mesenteroides* e *Enterococcus faecalis*, na fase inicial (inóculo), assim como no final da fermentação. Um estudo realizado por Djeni et al. (2015), mostrou que os inóculos tradicionais de mandioca utilizados para produzir três tipos de attiéké na Costa do Marfim diferem quantitativa e qualitativamente na sua composição bioquímica e microbiana. Os autores sugerem que as diferenças de qualidade dos attiéké produzidos sejam

devido à diferença entre os inóculos tradicionais usados para conduzir a fermentação. Os principais micro-organismos encontrados foram mesófilos aeróbios, BAL, leveduras e Enterobactérias. As principais BAL encontradas foram *L. mesenteroides*, *Pediococcus Acidilactici*, *L. plantarum*, *L. fermentum* e *Weissella cibaria*. Estes autores afirmam também que as cepas de BAL dominantes no processo podem ser potenciais culturas iniciadoras utilizadas para a fermentação da mandioca.

A bebida indígena *yakupa* é um produto ácido fermentado com mandioca, no qual as bactérias lácticas (BAL) são responsáveis pela acidez e diminuição do pH. As leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, também estão presentes durante a fermentação de *yakupa* (FREIRE et al., 2014). Freire (2015) utilizou *L. fermentum* isolado da bebida de mandioca fermentada indígena *yakupa* como cultura iniciadora única ou mista com estirpes de leveduras diferentes, como *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia caribbica* e *Saccharomyces cerevisiae* para fermentar mandioca e demonstrou que co-culturas de leveduras e BAL apresentaram a capacidade de melhorar o perfil do aroma do produto final e a segurança do produto diminuindo o pH.

Gunawan et al. (2015) investigaram a produção modificada de mandioca através da adição de culturas conhecidas de diferentes micro-organismos. O processo de fermentação da mandioca foi realizado por método de fermentação submersa. Foram adicionadas culturas puras de *L. plantarum*, *S. cerevisiae*, e *R. oryzae*, a raiz de mandioca lavada, para produção de três diferentes farinhas de mandioca fermentadas. As raízes acrescidas dos inóculos foram deixadas em fermentação por 120 horas e depois de realizada a etapa de secagem, obtendo-se mandioca fermentada seca. A mandioca fermentada seca foi moída e triturada para se obter farinha de mandioca fermentada. Verificou-se que *L. plantarum*, *S. cerevisiae* e *R. oryzae* na mandioca podem aumentar os níveis de proteína de 1,92% para 8,58%, 2,29%, e 4,72%, respectivamente. Além disso, pode reduzir o teor de amido após a fermentação num número de 55,40%, 71,03% e 48,20%, respectivamente. Além disso, os níveis de HCN diminuíram de 17,5 mg/kg para 1,8, 3,28 e 3,17 mg/kg, respectivamente. Dessa forma os autores concluíram que a farinha de mandioca fermentada pode ser produzida por fermentação com *L. plantarum*, *S. cerevisiae* e *R. oryzae* a fim de aumentar os níveis de proteína e

diminuir os níveis de HCN na farinha de mandioca fermentada, sendo *L. plantarum* a mais eficiente entre elas.

As BAL e leveduras, envolvidas em processos fermentativos de mandioca, tem demonstrado boa capacidade de crescimento e produção de metabólitos desejáveis, sendo então, culturas promissoras para serem utilizadas como iniciadoras para o desenvolvimento e controle das fermentações para a obtenção de produtos finais de melhor qualidade. Porém ainda são necessários mais estudos para garantir a eficiência do uso destas culturas iniciadoras.

### **3.5 TÉCNICAS MOLECULARES PARA MONITORAMENTO DE CULTURAS INICIADORAS**

#### **3.5.1 Técnicas moleculares para monitoramento de BAL**

A identificação e a caracterização das BAL são de grande importância para os processos de fermentações, uma vez que a qualidade dos alimentos produzidos depende da composição, da dinâmica e da frequência dos micro-organismos presentes. As técnicas de identificação e classificação das BAL mais empregadas são aquelas baseadas em características morfológicas e fisiológicas, denominadas técnicas tradicionais. A maioria destas técnicas é complexa e consome tempo, podendo, algumas vezes, levar a uma classificação incorreta (BERNARDI, 2007).

Técnicas de biologia molecular têm sido usadas como alternativa às técnicas tradicionais de identificação e caracterização de micro-organismos. Estas técnicas oferecem vantagens, como a identidade de linhagens por suas características genéticas e não por seu perfil fisiológico. Também eliminam ambiguidade taxonômica e simplificam a identificação de micro-organismos. As técnicas que utilizam DNA são independentes da expressão do gene não sendo influenciadas pelas condições de cultivo. As regiões do DNA com diferentes graus de variabilidade podem ser utilizadas para a identificação dos grupos de micro-organismos ou linhagens dentro de espécies (SANZ et al., 2005).

Estudos sobre a caracterização da microbiota de tais produtos tradicionais revelaram uma grande diversidade de BAL e leveduras envolvidas na fermentação (VOGELMANN et al., 2009). A diversidade de linhagens de BAL tem

sido extensivamente estudada em diferentes regiões produtoras de bebidas fermentadas, revelando a existência de grande polimorfismo entre linhagens de BAL isoladas em diferentes áreas e dentro de áreas específicas (BLANCO et al., 2006).

Técnicas baseadas em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) são específicas, podendo ser extremamente sensíveis e os resultados obtidos em poucas horas (MAYORAL et al., 2005). Com isso, elas têm sido muito utilizadas na detecção de BAL em alimentos e bebidas (SANZ et al., 2005). Esta técnica consiste na síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). As duas fitas do DNA servem como molde para a síntese, desde que seja fornecido um oligonucleotídeo primer para cada fita. Os primers utilizados irão demarcar a região alvo do DNA que deverá ser amplificada. Ao final, têm-se milhões de moléculas de DNA de fita dupla, que são cópias da sequência de DNA entre os primers (WATSON et al., 1997).

As técnicas baseadas em métodos moleculares para identificação de BAL em processos fermentativos têm sido realizadas com sucesso e caracterizam-se pela amplificação e/ou sequenciamento de sequências altamente conservadas nos genes (SANT'ANNA, 2015). A amplificação do gene codificador do RNA ribossomal do gene 16S com posterior sequenciamento gênico é um dos principais métodos de identificação molecular de BAL utilizado uma vez que combina rapidez, especificidade, simplicidade e sensibilidade (RODAS et al., 2003; SANT'ANNA, 2015).

A técnica PCR-DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) também tem sido aplicada com sucesso em diversos estudos para análise da composição de bactérias e de leveduras nos diferentes alimentos como, grãos de Kefir (MIGUEL et al., 2010), probióticos em produtos lácteos da África do Sul (THEUNISSEN et al., 2005), vinho (COCOLIN et al., 2000), salsicha (RANTSIOU et al., 2005), café (VILELA et al., 2010), cacau (NIELSEN et al., 2007) e produto de mandioca fermentado (VOGELMANN et al., 2009). Esta técnica baseia-se na separação de fragmentos de fita dupla do DNA de mesmo tamanho, porém com sequências distintas (ROSADO & DUARTE, 2002). Na separação do DNA no gradiente desnaturante os fragmentos migram diferencialmente, resultando em um padrão de bandas distinto (FREIRE, 2015).

A técnica baseada em restrições do fragmento randômico polimórfico amplificado (RFLP), também tem sido utilizada que são ferramentas rápidas e confiáveis para realizar o *fingerprinting* molecular, tendo como objetivo identificar e distinguir várias espécies de BAL seja de origem clínica, fecal, intestinal ou de alimentos. A aplicação desta técnica de restrição enzimática permite a seleção, identificação, caracterização e rastreamento de BAL presentes em diversos produtos alimentícios, como por exemplo o polvilho azedo (SANT'ANNA, 2015).

O princípio deste método consiste no corte da região amplificada por enzimas de restrição em diferentes posições da sequência, gerando um perfil de fragmentos característico para cada isolado. A amplificação desta região do DNA emprega iniciadores específicos na PCR e a separação dos fragmentos é feita em géis de eletroforese. Para a identificação mais precisa das BAL, utiliza-se o sequenciamento do DNA (FREIRE, 2015). No entanto, em casos de elevada similaridade filogenética existente entre espécies que constituem grupos de BAL diferentes esta técnica apresenta algumas limitações como é o caso da identificação dos grupos de *L. casei* e *L. plantarum*, que possuem entre 65 a 99% similaridade filogenética, uma vez que o sequenciamento do gene 16S rDNA utiliza primers que tem por alvo as regiões terminais do gene que são universalmente conversadas, e não levam em consideração as diferenças gênicas existentes entre esses dois grupos (TORRIANI et al., 2001; SANT'ANNA, 2015).

De acordo com trabalho realizado por Omar et al. (2000) foi possível identificar e discriminar estirpes de BAL isoladas a partir de polvilho azedo durante a fermentação da mandioca. Os resultados revelaram uma alta riqueza de espécies, incluindo *Lactobacillus manihotivorans*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *Ln. mesenteroides* e o gênero *Pediococcus*. As espécies predominantes foram *L. plantarum* e *L. manihotivorans*. Guyot et al. (2003) também obtiveram resultados satisfatórios em seus estudos, ao utilizar a técnica da análise de RFLP para a caracterização e diferenciação de linhagens de *L. manihotivorans* obtidas de polvilho azedo. Em trabalho realizado por Kostinek et al. (2007), foi descrito que durante a fermentação de mandioca para a produção de gari foram caracterizados 375 BAL por testes fenotípicos e genotípicos. Os grupos predominantes isolados foram cepas do grupo *L. plantarum*; *Lactobacillus*, *Weissella* e *Leuconostoc*. Vogelmann et al. (2009) avaliou a adaptabilidade de BAL e

leveduras em amido fermentado preparado a partir de cereais, pseudocereais e mandioca, através de comparação dos padrões de RAPD dos isolados e também obteve resultados positivos uma vez que foi possível rastrear a origem das BAL e leveduras predominantes na microbiota de todos os produtos analisados.

### **3.5.2 Técnicas Moleculares para monitoramento de *S. cerevisiae***

Tradicionalmente, a identificação das leveduras é feita por meio das características fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e sexuais (KURTZMAN et al., 2011). No entanto, o número de testes fenotípicos realizados para identificar uma levedura é muito grande, levando a uma identificação demorada e onerosa, e nem sempre se consegue chegar ao nível de espécie. Na identificação utilizando testes fenotípicos, a reprodutibilidade pode ser questionável, já que muitas vezes depende do estado fisiológico das células e muitas vezes não tem paralelo com aquelas determinadas a partir da análise de sequências gênicas (BARATA et al., 2012; KURTZMAN & ROBNETT, 2013).

A análise de sequências gênicas de *S. cerevisiae* tem sido analisada por diversos métodos, como reação em cadeia da polimerase (PCR), cariotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), análise de restrição do DNA 7 mitocondrial (RFLP-mtDNA) e fingerprinting baseado nas seqüências delta repetitivas (Schüller, et al., 2004).

Em relação à identificação de leveduras, a técnica de PCR *fingerprinting* tem se mostrado uma alternativa eficiente. O alto polimorfismo genético e a especificidade local de populações de leveduras sugerem a necessidade da utilização de técnicas rápidas e precisas que acompanhem a presença de leveduras, como *S. cerevisiae* iniciadoras de um processo fermentativo até o final do processo para garantir agilidade em possíveis intervenções, caso haja alguma contaminação, objetivando melhoras na qualidade do produto (LOPEZ et al., 2001; SCHULLER et al., 2004; VALERO et al., 2005).

Um grande passo em direção ao desenvolvimento de técnicas que permitissem a caracterização e diferenciação de linhagens de leveduras fermentadoras foi o desenvolvimento da PCR, utilizando a amplificação de

sequências aleatórias ou específicas (COSER et al., 2008). De posse desta poderosa ferramenta molecular, a caracterização ao nível de espécie das leveduras fermentativas se torna possível, por exemplo, pela análise dos perfis resultantes da digestão com enzimas de restrição do DNA amplificado pelos iniciadores ITS1 e ITS4, que codifica o gene ribossomal 5.8S e a região não codificadora ITS (internal transcribed spacers) (HOPFER et al. 1993; MOLINA et al. 1993; REDECKER et al. 1997; WYDER & PUHAN 1997). Ao nível polimórfico, outra técnica utilizando PCR que permite uma clara distinção entre as cepas é a RAPD-PCR. Esta técnica se baseia na amplificação de regiões randômicas usando iniciadores “específicos ou não”. De acordo com Guerra et al. (2001) a vantagem desta técnica é a de analisar várias amostras rapidamente permitindo monitorar a propagação das leveduras no processo fermentativo. A utilização dos iniciadores E11 e LA1 que contém sequências complementares ao sítio de *splicing* dos *introns* se torna eficiente nesta tarefa uma vez que os *introns* não sendo essenciais para as funções gênicas apresentam sequências não conservadas e variáveis que permitem a partir de sua amplificação, gerar diferentes perfis de bandejamento que podem ser usados para caracterização e diferenciação de indivíduos ao nível de espécie e intra-espécie.

Ainda se utilizando da reação de PCR, outra técnica desenvolvida para análises polimórficas foi estruturada na variação de posição e número dos *introns* no gene mitocondrial COXI, o qual codifica a maior subunidade da citocromo oxidase C e tem sido descrito como o gene mais rico em *introns* presente em leveduras (HARDY & CLARKWALKER, 1991; SEKITO et al. 1995; FOURY et al., 1998). De acordo com Lopez et al. (2003) uma reação de PCR multiplex com quatro primers selecionados mostrou-se muito efetiva na análise de polimorfismos de leveduras selvagens e comerciais para uso na fermentação do vinho.

Os métodos moleculares baseados no polimorfismo dos ácidos nucléicos são a melhor alternativa aos métodos tradicionais, uma vez que não dependem do estado fisiológico da célula e são mais reprodutíveis. Além disso, eles têm outras vantagens, como a alta precisão e discriminação, bem como a rapidez e simplicidade durante a realização da técnica (GUEROLA, 2006). Diferentes técnicas baseadas na detecção de polimorfismo molecular têm sido utilizadas para a análise da diversidade genética de *S. cerevisiae* associadas à processos fermentativos, são elas: por eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed Field Gel electrophoresis -

PFGE), análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP mtDNA), PCR, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Randomly Amplified polymorphic DNA - RAPD) e amplificação de sequências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repaeats - ISSR) (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001; SILVA-FILHO et al., 2005; ARAUJO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; GOMES et al., 2009b; BADOTTI et al., 2009)

A análise de restrição do DNA mitocondrial também apresenta-se como uma técnica muito utilizada na diferenciação de espécies de leveduras. Este método consiste do isolamento do DNA mitocondrial e no uso de endonucleases de restrição específicas (López et al., 2001). As mitocôndrias são organelas essenciais de células eucarióticas, onde são responsáveis pela maior parte da produção da energia gerada por meio da fosforilação oxidativa (Dimmer et al., 2002; Shutt & Gray, 2006). Estas organelas desempenham uma variedade de processos metabólicos, incluindo reações do ciclo do ácido tricarboxílico e biossíntese de intermediários metabólicos (Dimmer et al., 2002).

A análise de restrição do DNA mitocondrial foi inicialmente utilizada para distinguir linhagens de leveduras de cervejaria e tem sido recentemente aplicada para a seleção de leveduras de vinho, para monitorar fermentações espontâneas e inoculadas e para avaliar a diversidade genética e distribuição geográfica de linhagens de leveduras (Comi et al., 2000; Gutiérrez et al., 1997).

Um método para a extração do mtDNA foi desenvolvido por Querol E Barrio (1990). O método baseia-se na preparação de esferoplastos, lise da membrana celular e isolamento do mtDNA. O DNA resultante é utilizado para análises RFLP. Uma vez que fragmentos de restrição mitocondrial são facilmente observados por eletroforese em gel de agarose, é possível determinar diferenças no perfil de restrição do DNA mitocondrial de leveduras. O uso desta técnica na diferenciação de linhagens de leveduras é de particular interesse para indústrias que utilizam leveduras na produção de vinho, cerveja e pães e outros produtos, obtidos de diferentes processos fermentativos (QUEROL et al., 1992).

De acordo com Guillamón et al. (1994), as enzimas mais adequadas para diferenciar as linhagens de *S. cerevisiae* são *Hinfl* e *HaeIII*. O DNA mitocondrial

possui um alto conteúdo de bases AT (75%), e quando o DNA genômico é cortado por enzimas de restrição (ricas em GC) o DNA nuclear será quebrado completamente, pois apresenta uma alta proporção de sítios GC que serão clivados pelas enzimas de restrição. Entretanto, o DNA mitocondrial que possui um pequeno número de sítios de restrição para as bases GC, será clivado em fragmentos longos de vários tamanhos, possibilitando a visualização de polimorfismos intraespecíficos das *S. cerevisiae* sem precisar isolar o DNA mitocondrial (QUEROL et al., 1992). O DNA mitocondrial das *S. cerevisiae* é pequeno, podendo possuir de 60 a 80kb, altamente polimórfico (dependendo da linhagem) e estável (sofre poucas mutações) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; CARRASCOSA et al., 2011).

Diversos autores vêm utilizando esta técnica de RFLP-mtDNA para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae* de vinho (QUEROL et al., 1992; QUEROL et al., 1994; GUILLAMÓN et al., 1996; COMI et al., 2000; CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2004; SCHULLER et al., 2004; SCHULLER et al., 2005; MERCADO et al., 2007; NIKOLAOU et al., 2007; CAPECE et al., 2010; MAQUEDA et al., 2010; MERCADO et al., 2011; CAPECE et al., 2012; CAPECE et al., 2013; ORTIZ et al., 2013). Geralmente, estes estudos mostraram uma grande diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* associada com processos de fermentação espontânea na produção de vinhos e outras bebidas. Esta técnica também permite acompanhar linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* durante os processos de fermentação (MERCADO et al., 2011; CAPECE et al., 2012; CAPECE et al., 2013).

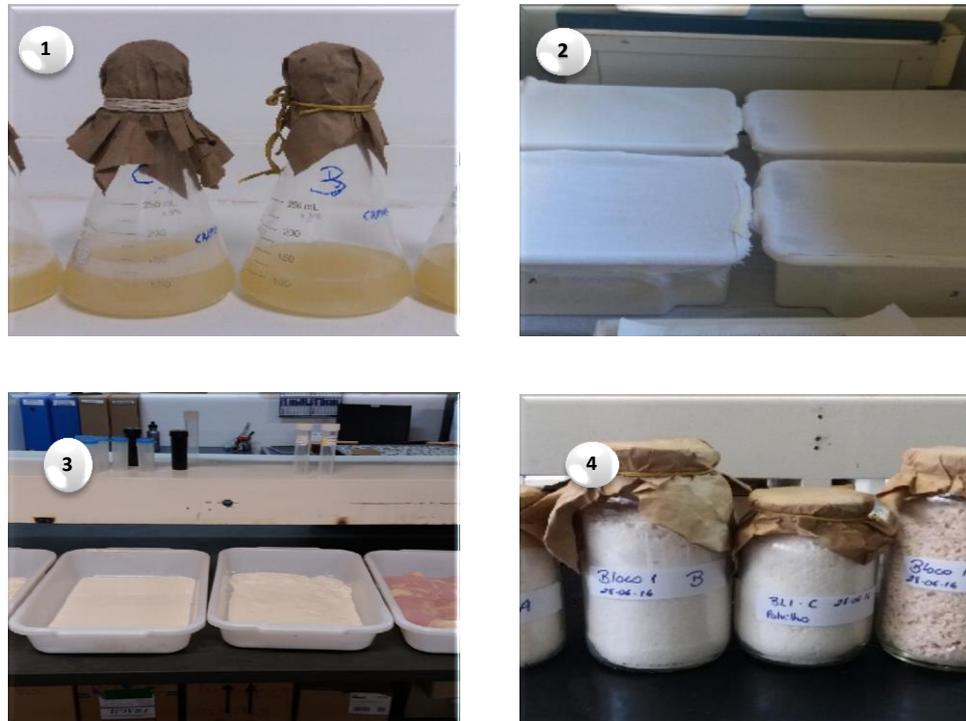
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 FONTE DE MICRO-ORGANISMOS

As linhagens de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* utilizadas neste estudo foram isoladas da fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo em estudos anteriores (PENIDO, 2013). A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG-A1007 foi obtida da coleção de culturas pertencente ao Laboratório de Ecologia, taxonomia e Biotecnologia de fungos, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG). As culturas de BAL e leveduras foram preservadas e mantidas em freezer -80 °C e foram reativadas em meios de cultura específicos.

### 4.2 PRODUÇÃO DE POLVILHO EM ESCALA PILOTO

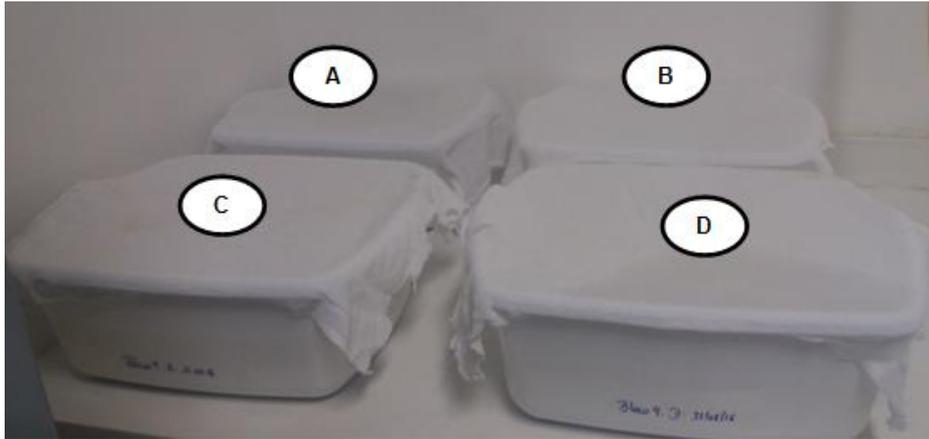
A fermentação de mandioca para a produção de polvilho foi realizada em escala piloto de acordo com metodologia padronizada por Penido (2013). Culturas puras de *L. plantarum* e *L. brevis*, e culturas mistas associadas a *S. cerevisiae* UFMG-A1007 foram inoculadas em 100 mL de meio de cultura líquido contendo 2% de fécula de mandioca, 1% de glicose, 0,5% de extrato de carne (LACERDA, 2006) e incubados a temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida, para o aumento de biomassa e preparo do inóculo, todo o cultivo foi inoculado em 500 mL do mesmo meio de cultivo, mantendo-se as mesmas condições de tempo e temperatura. Após o crescimento, o volume de 500 mL foi inoculado em 5 L de um meio contendo água destilada e 10% de fécula de mandioca, a temperatura ambiente por aproximadamente 28 dias. Estas fermentações foram realizadas em uma bacia de plástico retangular com 43,0 cm de comprimento, 27,5 cm de largura, 14,0 cm de profundidade e com um volume total de 12 L. As bacias foram cobertas com um tecido reticulado de algodão em formato retangular para evitar a entrada de insetos (Figura 3). Todos os ensaios foram realizados sem aeração (agitação). Foram retiradas amostras de 10 mL de vários pontos no início, meio e final do processo fermentativo (com 0, 7, 14, 21 e 28 dias). Estas amostras foram analisadas quanto ao valor de pH, acidez total titulável (ATT), e viabilidade das culturas iniciadoras. Todos os testes foram realizados em triplicata.



**Figura 3** Principais etapas do processo de produção de polvilho em escala piloto. 1. Inóculos contendo as culturas iniciadoras (A,B,C,D) em 500 mL de meio de cultura líquido, incubados a temperatura ambiente por 48 horas. 2. Fermentação da fécula de mandioca em bacias utilizadas como biorreatores por 28 dias. 3. Secagem dos polvilhos produzidos a temperatura ambiente. 4. Polvilho produzido acondicionados em potes de vidros e armazenados sobre refrigeração a 4 °C, para posterior realização de testes no produto final.

Após processo de fermentação, a secagem do produto obtido ocorreu a temperatura ambiente. Após este período os polvilhos foram acondicionados em vidros estéreis devidamente identificados e armazenados sob refrigeração para posterior realização dos testes.

Foram produzidos quatro polvilhos em escala piloto, a fermentação foi realizada em biorreatores (Figura 4) utilizando culturas iniciadoras, duas linhagens de bactérias lácticas, *L. plantarum*, *L. brevis* e uma linhagem de levedura, *S. cerevisiae*.



**Figura 4** Produção de polvilho utilizando culturas iniciadoras de BAL pura e em co-cultura com *S. cerevisiae* em biorreatores. Tratamento A: *L. plantarum*; Tratamento B: *L. brevis*; Tratamento C: *L. plantarum* + *S. cerevisiae*; Tratamento D: *L. brevis* + *S. cerevisiae*.

A partir destas três linhagens de micro-organismos foram feitos quatro tratamentos, sendo que dois deles utilizaram culturas puras de BAL (*L. plantarum* e *L. brevis*), e os outros dois utilizaram as BAL acima citadas em co-culturas com uma linhagem de *S. cerevisiae* UFMG-A1007.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DURANTE A PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA PILOTO

Para as amostras produzidas em diferentes tempos de fermentação foram realizadas análises físico-químicas de pH, ATT e verificação da viabilidade das culturas iniciadoras utilizadas. O pH e ATT foram determinados de acordo com a metodologia empregada pelo AOAC (2016). O pH foi medido pela leitura direta do líquido sobrenadante em potenciômetro. O teste de ATT foi realizado por titulação utilizando-se solução de NaOH 0,1N e solução alcoólica de fenolftaleína, como solução indicadora. A viabilidade das culturas iniciadoras foi avaliada pela contagem das bactérias lácticas em ágar MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) contendo 0,1% de ciclohexamida, e, contagem de leveduras em YM (extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1,0%, ágar 2,0%). Para isto, as amostras de polvilho em fermentação foram submetidas a diluições seriadas decimais e processadas pela técnica de semeadura em superfície nos respectivos meios de cultura, acima citados. As placas de contendo ágar MRS foram incubadas em jarras

de anaerobiose de 2,5 L (Permutation) por 48 horas a 37 °C (SIQUEIRA, 1995) para o crescimento bacteriano e as placas contendo ágar YM foram armazenadas à temperatura ambiente por 24 a 48 horas para o crescimento leveduriforme (ROSSITA & FLEET, 1996). Em seguida as placas foram refrigeradas a -4°C para posteriores análises.

#### **4.4 MONITORAMENTO DE CULTURAS INICIADORAS NO PROCESSO FERMENTATIVO**

##### **4.4.1 Isolamento e identificação molecular das bactérias do ácido láctico**

O monitoramento das BAL durante o período de fermentação foi realizado utilizando-se metodologia molecular por análise dos perfis moleculares obtidos por polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). Para isto, foram isoladas 3 a 5 colônias com morfotipos sugestivos das espécies utilizadas como culturas iniciadoras, purificadas e congeladas em freezer -80 °C, para posterior identificação. O DNA total destas colônias foi extraído a partir de uma adaptação do método descrito por Hoffman e Winston (1987). Em seguida o DNA extraído foi submetido à amplificação por PCR da região 16S do gene do rRna (LANE, 1991). Os resultados obtidos foram agrupados por análise dos RFLP, por meio da digestão com as três enzimas de restrição, *MspI*, *HaeIII* e *Hinf 1*, segundo Brightwell et al. (2006) e Penido (2013). E então, os perfis moleculares obtidos neste trabalho foram comparados com os perfis moleculares das BAL já conhecidos, e que foram obtidos em estudo anterior realizado por Penido (2013).

##### **4.4.2 Isolamento e identificação molecular de leveduras**

A extração do mtDNA das leveduras foi realizada conforme descrito por Querol & Barrio (1990) e Querol et al. (1992), com algumas modificações. As células foram crescidas em 1,2 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%; peptona 2% e glicose 1%) em temperatura 26-28 °C O/N (“overnight”) sob agitação e então centrifugadas a 12.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado em água destilada estéril e, em seguida, centrifugada sob as mesmas condições citadas acima. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o

sedimento ressuspensionado em 500 µL de Solução I (0,9M de Sorbitol e 0,1 M de EDTA) e adicionado 30 µL da enzima lítica Zimoliase 20T (1 µg/µL dissolvida em Solução I), homogeneizado no vortex, e incubado a 37 °C por 30 minutos para a liberação dos protoplastos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado, suavemente com a ajuda de uma ponteira, em 500 µL de Solução II (Tris-HCl 50 mM e EDTA 20 mM pH 7,4) e adicionado 13 µL de SDS 10%, homogeneizado por inversão e incubado a 65°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se às amostras 200 µL de acetato de potássio 3 M e estas foram colocadas no freezer a -20 °C por 1 hora. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. As amostras foram colocadas no gelo e o sobrenadante transferido, cuidadosamente, para outro tubo estéril, adicionado 700 µL de isopropanol, homogeneizado suavemente por inversão. Os tubos deixados por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado cuidadosamente. Adicionaram-se aos tubos 500 µL de etanol 70% para a lavagem do DNA, e os mesmos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o DNA foram deixados na posição invertida por 10 minutos para a evaporação do etanol. Para a eliminação completa do etanol dos tubos ficaram em estufa a 37 °C por 30 minutos. O DNA foi então hidratado com 20 µL de água ultra pura, e armazenado à temperatura de -20 °C.

A digestão do DNA foi realizada utilizando-se 20 µL do DNA total acrescido de 10µL de uma mistura contendo 4,0 µL de água de injeção estéril, 3 µL de tampão 10x da enzima *Hinf I*, 1,5 µL de RNase (Invitrogen, 20mg/mL), 1,5 µL da enzima de restrição *Hinf I* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os tubos foram incubados à temperatura de 37 °C O/V. Os produtos da digestão (acrescidos de GelRed com tampão de corrida 6X) foram separados e analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (80 V por 150 minutos) em TBE 0,5X. Os perfis de restrição do DNA mitocondrial gerados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados utilizando sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO

Para caracterização físico-química dos quatro polvilhos produzidos em escala piloto foram realizadas as seguintes análises: ATT (AOAC, 2016), pH (AOAC, 2016), análise de expansão da massa (MAEDA & CEREDA, 2001), umidade (AOAC, 2016), cinzas (AOAC, 2016), e amido (CEREDA et al., 2004). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos foram utilizados para avaliar a qualidade dos polvilhos produzidos a partir das diferentes culturas iniciadoras.

Para a determinação da ATT foi realizada titulação com solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol/L utilizando solução de fenolftaleína como indicador. A titulação foi expressa em mililitros de NaOH por 100 g de matéria seca (AOAC, 2016) e os resultados foram expressos em porcentagem de volume por massa. O pH foi determinado, de acordo com metodologia descrita por AOAC (2016), por leitura direta do líquido sobrenadante em potenciômetro, após mistura de 10 g da amostra em 100 mL de água destilada.

A propriedade de expansão do polvilho azedo foi determinada conforme procedimento proposto pelo Centro de Raízes Tropicais – CERAT (MAEDA & CEREDA, 2001). Para tanto foram pesados 50 g de amostra e adicionado 40 mL de água fervente. A massa foi posteriormente modelada, sendo confeccionados 35 biscoitos redondos de aproximadamente 10 g cada. Estes biscoitos foram distribuídos em assadeira e levados ao forno à temperatura de 200 °C, por 25 minutos. Com o uso de um paquímetro foi medido o diâmetro médio de cada biscoito antes e após o cozimento. Os índices de expansão foram calculados através da relação entre o diâmetro médio final (após assado) e o diâmetro médio inicial (antes de assado).

A determinação de umidade e cinzas do polvilho foi realizada de acordo com metodologias descritas pela AOAC (2016). A determinação do teor de umidade, foi determinada por meio de secagem do material em estufa a 105 °C, com circulação de ar forçado, até a obtenção de peso constante. Foram pesadas em torno de 3,0 g de amostra, em triplicata. O resíduo mineral fixo (cinzas) representa o total de resíduos inorgânicos presentes na amostra e foi obtido por incineração das amostras em forno mufla a 550 °C. Foram pesadas, em triplicata, aproximadamente 3,0 g de

amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem(g de cinzas/100g de alimento).

O teor de amido foi determinado pelo método de Lane–Eynon modificado por Cereda et al. (2004), através da hidrólise energética do amido em meio fortemente ácido. Para tal foram adicionados 10 mL de HCL concentrado à 5 g do polvilho produzido, mantendo – se as amostras sob refluxo em banho-maria à 100 °C por 2 horas. Posteriormente, os açúcares obtidos foram neutralizados com solução de NaOH a 12,5 mol/L, e a clarificação foi realizada empregando - se, ferrocianeto de potássio e sulfato de zinco. A determinação do teor final de amido foi realizada pelo método de Fehling empregando – se o REDUTEC (TE-086).

#### **4.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO**

Os diferentes polvilhos produzidos em escala piloto também foram avaliados quanto aos parâmetros microbiológicos referentes a contagem de *Bacillus cereus*, ao número mais provável de Coliformes a 45 °C e a pesquisa de *Salmonella* spp., conforme descrito por Bennett & Belay (2001). Os parâmetros que foram utilizados para avaliação dos resultados obtidos estão descritos na RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001).

#### **4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os tratamentos foram esquematizados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 4, sendo cinco tempos (0, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias) e quatro culturas iniciadoras (A- *L. plantarum*; B- *L. brevis*; C- *L. plantarum* + *S. cerevisiae*; D- *L. brevis* + *S. cerevisiae*), com quatro repetições (Blocos 1,2,3,4). Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA), ajustados a equações polinomiais de regressão e submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Minitab® 17.1.0/2013. Os parâmetros avaliados para os polvilhos obtidos a partir da fermentação com diferentes culturas iniciadoras foram submetidos à análise de

variância fator único e as diferenças significativas entre as médias também foram determinadas pelo Teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE POLVILHO EM ESCALA PILOTO COM O USO DE CULTURAS INICIADORAS

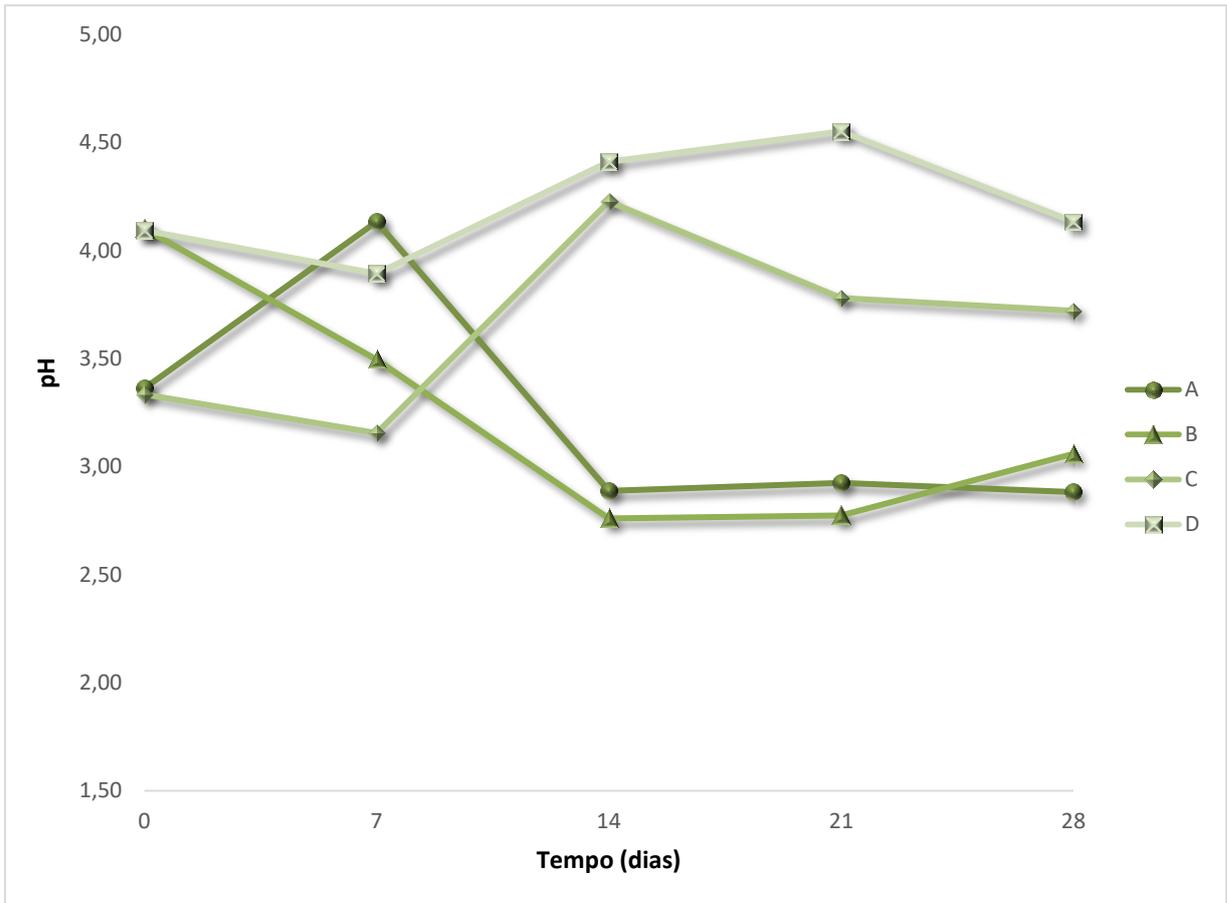
A fermentação de mandioca, pelas culturas iniciadoras propostas (Quadro 3), para a produção de polvilho foi acompanhada por 28 dias em escala piloto e, em seguida, o material obtido foi seco a temperatura ambiente. Os parâmetros de pH, acidez (ATT) e viabilidade das culturas iniciadoras foram analisados em cinco tempos, 0, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação, conforme quadro 3. Os resultados obtidos nestas análises estão dispostos em apêndice.

**Quadro 3** Culturas iniciadoras utilizadas para a produção de polvilho em escala piloto

Tratamento	Culturas Iniciadoras	
	BAL	Levedura
A	<i>L. plantarum</i>	-
B	<i>L. brevis</i>	-
C	<i>L. plantarum</i>	<i>S. cerevisiae</i> UFMG-A1007
D	<i>L. brevis</i>	<i>S. cerevisiae</i> UFMG-A1007

#### 5.1.1 pH

O valor de pH das amostras de polvilho produzidas foi medido durante os 28 dias de fermentação da fécula de mandioca e os resultados estão apresentados na Figura 5. Durante os 28 dias de fermentação, as diferentes culturas iniciadoras não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Contudo, houve diferenças significativas entre os valores de pH encontrados em um mesmo intervalo de tempo para as diferentes culturas iniciadoras ( $p < 0,001$ ) (Apêndice A).



**Figura 5** Valores de pH durante o processo de fermentação de mandioca para a produção de polvilho em escala piloto. A: *L. plantarum*; B: *L. brevis*; C: *L. plantarum* + *S. cerevisiae*; D: *L. brevis* + *S. cerevisiae*

No início da fermentação (tempo 0) o valor de pH encontrado durante a fermentação pelas culturas iniciadoras, com *L. plantarum* (pura e mista) foi de 3,36 para os tratamento A e 3,33 para o tratamento C. Já na fermentação utilizando as culturas iniciadoras com *L. brevis* (pura e mista), observou-se um valor de pH da fécula no tempo 0 de 4,10 (tratamento B) e 4,09 (tratamento D). Houve redução do valor do pH durante a fermentação em todos os tratamentos, e os menores valores foram encontrados com 14 dias, para os tratamentos B (2,76) e A (2,88). Houve diferença significativa entre os valores de pH encontrados ao final da fermentação (28 dias) ( $p < 0,05$ ) para as culturas puras e mistas, uma vez que foi encontrado um valor inferior para os tratamentos A e B (2,88 e 3,06, respectivamente) e em relação aos tratamentos C e D (3,72 e 4,13 respectivamente).

A redução do valor do pH ocorrida durante a fermentação de todos os tratamentos, deve-se, provavelmente, à produção de ácido láctico nas fermentações

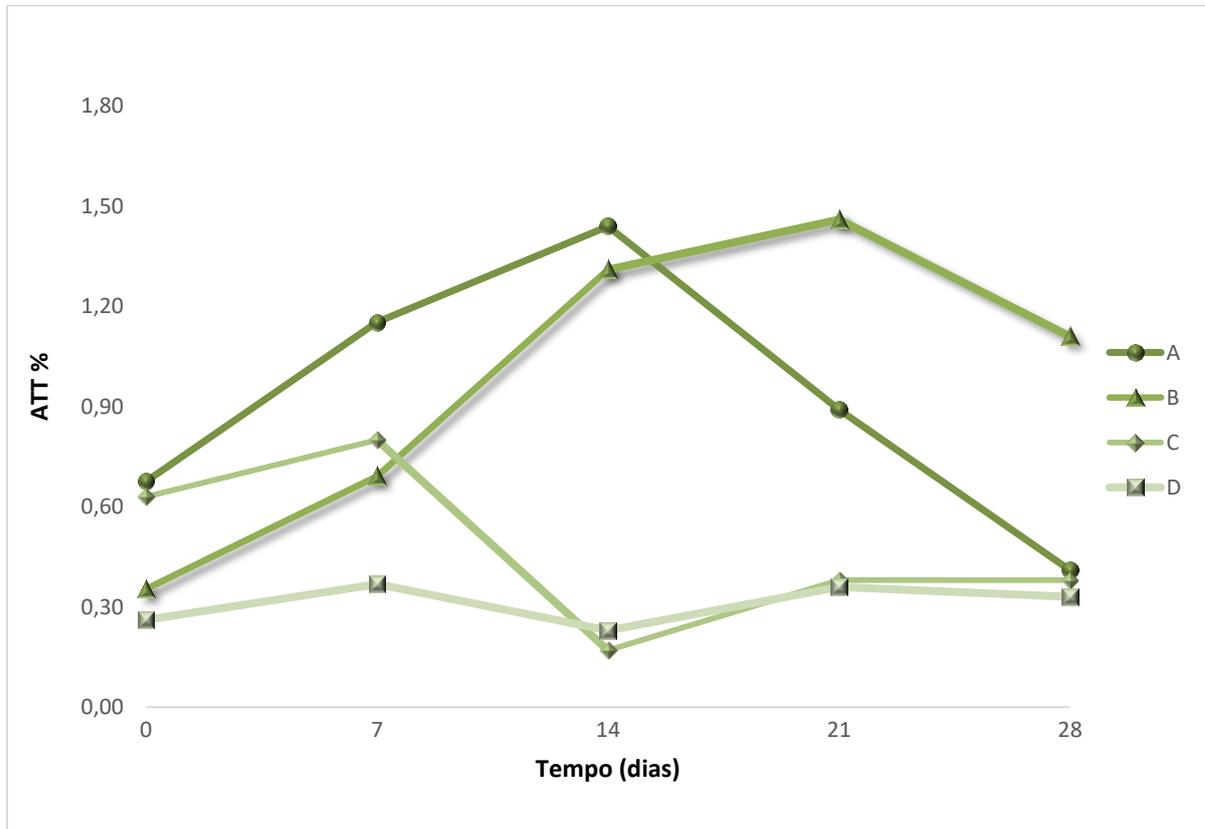
contendo BAL (pura e co-cultura). Os ácidos orgânicos produzidos pelas espécies de leveduras e bactérias contribuem para o sabor refrescante, aroma único e textura, ao mesmo tempo em que controlam o crescimento de micro-organismos que deterioram os alimentos (Duarte et al., 2010). Em estudo realizado por Aquino et al (2016), em amostras de polvilho azedo de Santa Catarina as maiores concentrações de ácidos orgânicos nas amostras de polvilho azedo foram de ácido láctico, com valores entre 54,46% a 97,52% do total. O ácido acético apresentou uma representatividade máxima de 13,10% do total de ácidos. Enquanto que para os ácidos propiônico os valores variaram entre 1,16% a 15,34% do total e butírico de 3,44% a 51,74% do total. Semelhante ao encontrado por esse autor, Demiate et al. (1999) ao analisarem, por CLAE, 29 amostras de amido de mandioca fermentado das regiões Sul e Sudeste adquiridos diretamente das fábricas ou do comércio, verificaram concentrações, em base seca, entre 120 e 830 mg.kg<sup>-1</sup> de ácido láctico, 0 e 680 mg.kg<sup>-1</sup> de ácido acético, 0 e 130 mg.kg<sup>-1</sup> de ácido propiônico, 0 e 570 mg.kg<sup>-1</sup> de ácido butírico.

Cadena et al. (2006) realizaram um estudo de avaliação da agroindústria de amido de mandioca em regiões produtoras de polvilho azedo na Colômbia. Estes autores observaram, assim como no presente trabalho, que houve diminuição no pH da água sobrenadante, na maioria das amostras analisadas. Penido (2013), ao testar culturas iniciadoras puras e mistas para produção de polvilho em escala piloto, encontrou após 28 dias de fermentação, valores de pH de 4,32 para cultura pura de *L. brevis*; 3,29 para cultura pura de *L. plantarum*; 3,79 para cultura mista de *L. brevis* + *P. scutulata* e 3,77 para cultura mista de *L. plantarum* + *P. scutulata*, os quais são, semelhantes aos valores de pH encontrados nas amostras de polvilho azedo produzidas neste trabalho, que variaram de 2,88 a 4,13.

### 5.1.2 Acidez

O valor de acidez (ATT) das amostras de polvilho produzidas foi medido durante os 28 dias de fermentação da fécula de mandioca (Figura 6). Durante os 28 dias de fermentação, as diferentes culturas iniciadoras não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Contudo, houve diferenças significativas entre os valores de ATT

encontrados em um mesmo intervalo de tempo para os quatro tratamentos ( $p < 0,001$ ) (Apêndice B).



**Figura 6** Variação dos índices de acidez (ATT) durante o processo de fermentação de mandioca para produção de polvilho em escala piloto. A: *L. plantarum*; B: *L. brevis*; C: *L. plantarum* + *S. cerevisiae*; D: *L. brevis* + *S. cerevisiae*

No início da fermentação os valores de ATT encontrado para as culturas puras de BAL foi de 0,68 para os tratamento A e 0,35 para o tratamento B. Para as culturas mistas (BAL e leveduras) foi de 0,63 para o tratamento C e 0,26 para o tratamento D. Houve redução do ATT durante a fermentação de todos os tratamentos. O pico de acidez acontece com 21 dias para o tratamento B (1,44).

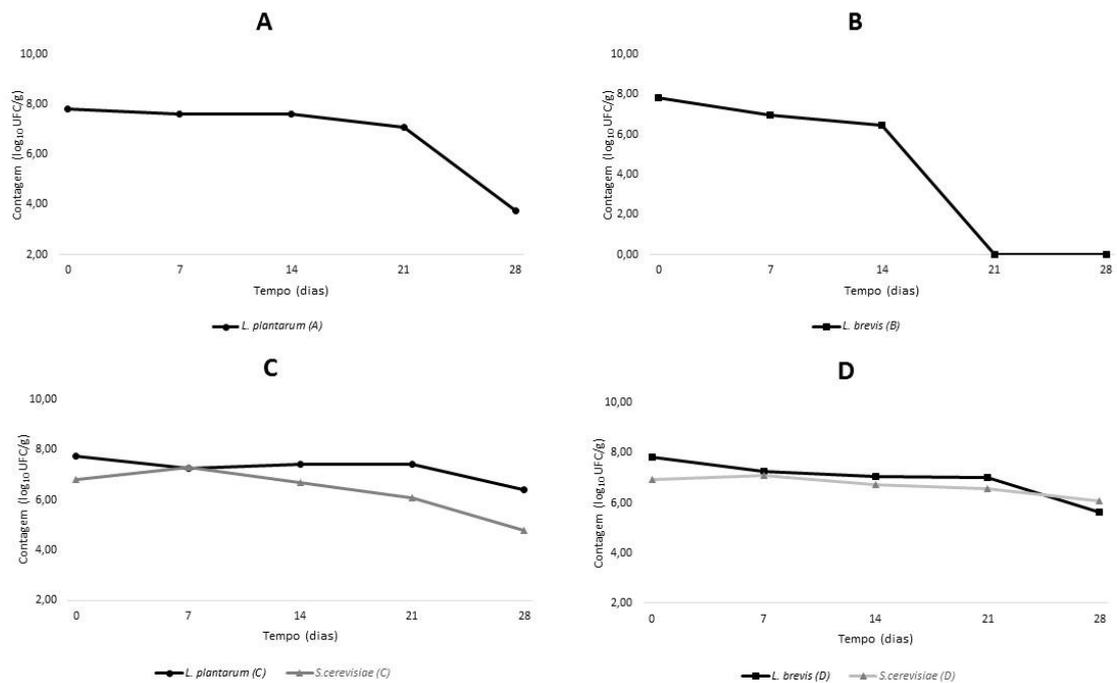
A redução do ATT ocorrida durante a fermentação de todos os tratamentos já era esperada, uma vez que as BAL são as principais responsáveis pela acidificação do meio na fermentação de mandioca, o que também foi comprovado por Oguntoyinbo & Dodd (2010). Mugula et al (2003), ao estudar o uso de BAL e leveduras como culturas iniciadoras para o preparo de togwa, testaram a capacidade de acidificação das leveduras. Como culturas puras, as leveduras abaixaram

levemente o pH e aumentaram a acidez do meio em 24 horas. Em associação com as BAL, tiveram pouca influência na acidez final, o que também foi observado no presente trabalho. Edward et al (2011) investigaram o uso de linhagens liofilizadas de *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Weissella paramesenteroides* e *Leuconostoc mesenteroides* como culturas iniciadoras para a produção de gari. Nos testes, as linhagens tiveram um bom desempenho e rapidamente aumentaram a acidez titulável de 1,1 a 1,3 % em 24 horas para 1,3 a 1,6 % em 48 horas. Avancini (2007) encontrou valores de acidez variando de 2,11 a 6,85 mL de NaOH 0,1 mol /L em processos fermentativos com amidos de diferentes origens e épocas do ano, após 17 e 30 dias de fermentação, respectivamente. Penido (2013), ao testar culturas iniciadoras puras e mistas para produção de polvilho em escala piloto, encontrou no final da fermentação, valores de ATT de 0,57 para cultura pura de *L. brevis*; 0,71 para cultura pura de *L. plantarum*; 0,23 para cultura mista de *L. brevis* + *P. scutulata* e 0,53 para cultura mista de *L. plantarum* + *P. scutulata*. Valores semelhantes de ATT foram encontrados no presente estudo para as amostras do tratamento A (0,41), C (0,38) e D (0,43). Entretanto para o resultado obtido para o tratamento B (2,11) foi muito superior. Neste tratamento, *L. brevis* não permaneceu após 21 dias de fermentação, no entanto, estes valores de ATT possivelmente são provenientes de outro micro-organismos que espontaneamente foram responsáveis por esta acentuada elevação do ATT .

### **5.1.3 Viabilidade das culturas iniciadoras durante a produção de polvilho em escala piloto**

As culturas iniciadoras (*L. plantarum* e *L. brevis*) foram inoculadas nos biorreatores para a produção de polvilho, na concentração de 7,8 log<sub>10</sub> UFC/g e a linhagem de *S. cerevisiae* (UFMG-A1007) na concentração de 6,8 log<sub>10</sub> UFC/g. As contagens das BAL e leveduras foram avaliadas e estão apresentadas na Figura 7. As contagens dos diferentes micro-organismos utilizados como culturas iniciadoras diferiram entre si (p < 0,001) (Apêndice C). No tratamento A e B as contagens de *L. plantarum* e *L. brevis* foram 7,83 e 7,84 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente, no início da fermentação, sendo que *L. plantarum* com 21 dias de fermentação apresentou uma redução nas contagens, atingindo 7,07 log<sub>10</sub> UFC/g, permanecendo na fermentação

até o tempo final. *L. brevis* com 14 dias apresentou contagens mais baixas, atingindo  $6,47 \log_{10}$  UFC/g, e não esteve mais presente após 21 dias de fermentação. No tratamento C e D, no início da fermentação as contagens de *L. plantarum* e *L. brevis* foram  $7,74$  e  $7,81 \log_{10}$  UFC/g, respectivamente. No tratamento C, foi possível observar um aumento na concentração de *L. plantarum* com 14 dias de fermentação ( $7,41 \log_{10}$  UFC/g), mantendo-se constante no tempo 21, e decaindo ao final da fermentação para  $6,62 \log_{10}$  UFC/g. Já no tratamento D, após 7 dias de fermentação a concentração de *L. brevis* foi decaindo até o final da fermentação, mas esteve presente durante toda a fermentação, diferente do que foi observado para cultura pura de *L. brevis* (tratamento B). Em ambos os tratamentos, a linhagem de *S. cerevisiae* (UFMG-A1007) foi encontrada em baixas contagens em comparação às BAL. Durante o início do processo fermentativo ( $6,82 \log_{10}$  UFC/g para o tratamento C e  $6,94 \log_{10}$  UFC/g para o tratamento D), e aumentou para  $7,30$  e  $7,09 \log_{10}$  UFC/g, respectivamente, após 7 dias de fermentação, em seguida apresentou uma redução nas contagens e manteve-se mais baixa até o final do processo, mas esteve presente até o final da fermentação (28 dias). Pode sugerir que esta linhagem de *S. cerevisiae* (UFMG-A1007) contribui para a multiplicação e manutenção das BAL utilizadas como culturas iniciadoras no presente trabalho, como também pode estar contribuindo na produção de compostos organolépticos para o produto final, uma vez que esta levedura permanece até o final do processo de fermentação de mandioca, o que normalmente, não é observado para outras espécies de leveduras encontradas na produção de polvilho (LACERDA et al., 2005; PENIDO 2013). Padonou et al. (2010), ao testar diferentes culturas iniciadoras puras e mistas para produção de *lafun*, observou que o produto obtido a partir da fermentação de mandioca, utilizando *S. cerevisiae*, apresentou a melhor qualidade sensorial e melhor eficiência no processo de amolecimento das raízes de mandioca, e selecionou esta levedura como a cultura iniciadora mais adequada para produção de *lafun*.



**Figura 7** Acompanhamento da viabilidade das culturas iniciadoras utilizadas durante o processo de fermentação de mandioca para a produção de polvilho em escala piloto. A: *L. plantarum*; C: *L. brevis*; C: *L. plantarum* + *S. cerevisiae*; D: *L. brevis* + *S. cerevisiae*

A contagem das culturas iniciadoras utilizadas no processo fermentativo de mandioca, em escala piloto, revelou algumas diferenças notáveis entre estes quatro tratamentos, entre os quais as BAL apresentaram contagens mais elevadas. Estes resultados são consistentes com os de outros produtos fermentados da mandioca (Assando et al., 2006 Coulin et al., 2006). Em relação às leveduras, em co-culturas, foi observado um aumento nos primeiros sete dias de fermentação em ambos os tratamentos (C e D), permanecendo até o final da fermentação. Diferente do encontrado por Penido (2013), que ao produzir polvilho azedo em escala piloto a partir de culturas iniciadoras contendo a levedura *Pichia scutulata*, a qual em ambos os tratamentos, se manteve presente apenas até 21 dias fermentação, desaparecendo no final do processo. Evidenciando assim, no presente estudo, um melhor desempenho da *S. cerevisiae* durante o processo fermentativo da fécula de mandioca. Conforme observado, a população de BAL variou e foi significativamente diferente entre os ensaios, dependendo da cultura iniciadora utilizada.

Os resultados encontrados neste trabalho para polvilho azedo foram consistentes com a literatura, uma vez que as BAL estiveram presentes em contagens mais elevadas durante o processo de fermentação de mandioca para a

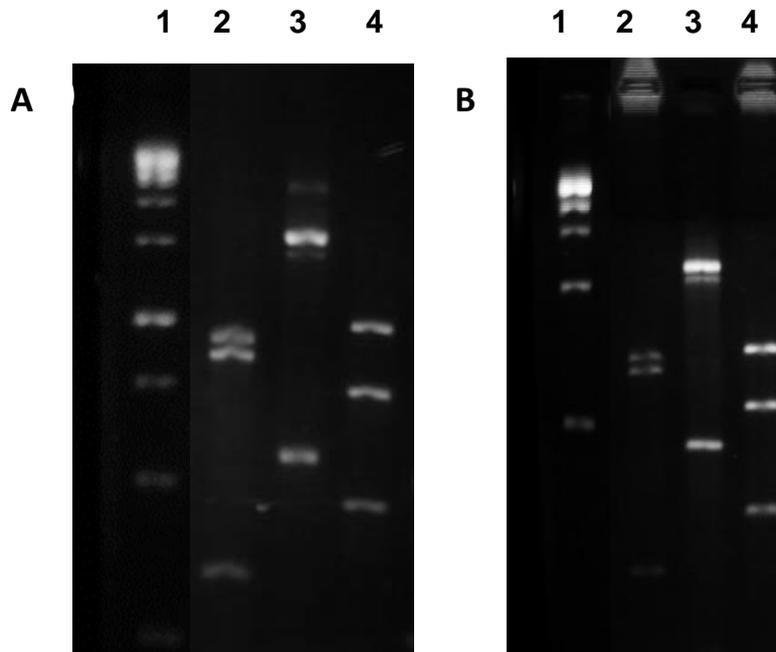
produção do polvilho em todos os tratamentos, evidenciando que estas espécies utilizadas como cultura pura e em co-cultura com *S. cerevisiae* podem atuar no processo fermentativo da fécula de mandioca, de uma forma cooperativa para a produção de polvilho. Destacando-se a cultura iniciadora utilizada no tratamento D, que apresentou contagens mais altas e significativas de *L. brevis*, uma vez que esta BAL não esteve presente a partir do vigésimo primeiro dia de fermentação quando utilizada como cultura pura, mas permaneceu até o final da fermentação quando associada a *S. cerevisiae*.

Tem sido relatado o envolvimento de *S. cerevisiae* na fermentação da mandioca, como na produção de *fufu* e *attieké* (OYEWOLE, 2001; COULIN et al., 2006) e na bebida alcoólica *caxiri* (SANTOS, 2010). Esta espécie é conhecida por metabolizar açúcares redutores em etanol e gás carbônico e converte carboidratos em álcoois e outros componentes aromáticos, como ésteres, ácidos orgânicos e compostos carbonílicos (ALVES, 2009). Além disso, pode estimular as BAL fornecendo metabólitos essenciais, como o piruvato, os aminoácidos e as vitaminas (REBOUÇAS, 2015). Depois das BAL, as leveduras são consideradas como os micro-organismos mais envolvidos na fermentação de mandioca. Semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, Lacerda et al. (2005) e Penido (2013) estudaram a microbiota da fermentação de mandioca para a produção de polvilho azedo, em duas polvilharias em Conceição dos Ouros e em uma polvilharia em Formiga, respectivamente, ambas no estado de Minas Gerais. Estes autores verificaram que a fermentação espontânea envolve espécies de bactérias do ácido láctico em maior número e leveduras em números relativamente baixos.

## **5.2 MONITORAMENTO MOLECULAR DAS CULTURAS INICIADORAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE POLVILHO EM ESCALA PILOTO**

Os morfotipos característicos de *L. plantarum* e *L. brevis* utilizados como culturas iniciadoras durante o processo fermentativo de mandioca em escala piloto, foram isoladas dos biorreatores de fermentação durante todo o período de produção de polvilho e identificados pela técnica de RFLP. Foi possível identificar molecularmente as duas espécies de BAL inoculadas como culturas iniciadoras

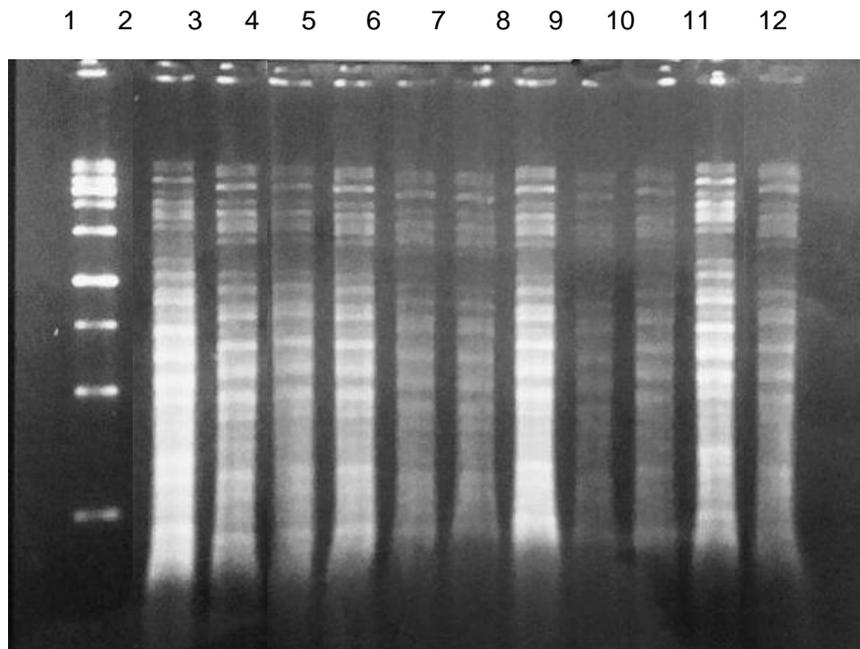
nesta fermentação, sendo elas, *L. plantarum* e *L. brevis* (Figura 8 e Figura 9). Estes micro-organismos foram detectados em todas as amostras durante os 28 dias de fermentação. Isso comprova a permanência destas espécies inoculadas como culturas iniciadoras e reforça seu potencial de uso com esta finalidade na produção de polvilho.



**Figura 8 A.** Perfil de digestão de *L. plantarum* isoladas da fermentação de mandioca em escala piloto pelas enzimas *MspI*, *HaeIII*, e *HinfI*. Canaletas: **1:** 1 kb DNA padrão de peso molecular; **2:** perfil de digestão pela enzima *MspI*; **3:** perfil de digestão pela enzima *HaeIII*; **4:** perfil de digestão pela enzima *HinfI*; **B.** Perfil de digestão de *L. brevis* isoladas da fermentação de mandioca em escala piloto pelas enzimas *MspI*, *HaeIII*, e *HinfI*. Canaletas: **1:** 1 kb DNA padrão de peso molecular; **2:** perfil de digestão pela enzima *MspI*; **3:** perfil de digestão pela enzima *HaeIII*; **4:** perfil de digestão pela enzima *HinfI*

Os morfotipos característicos de *S. cerevisiae* UFMG-A1007, utilizados em co-culturas com as BAL em escala piloto, foram isoladas dos biorreatores de fermentação durante todo o período de produção de polvilho. Quarenta isolados de *S. cerevisiae* foram caracterizados com base no perfil de restrição do mtDNA (*fingerprint*). A análise de restrição de mtDNA mostrou um padrão único de bandas para seu mtDNA e perfis de fingerprinting PCR. A análise de restrição de mtDNA mostrou um padrão único de bandas para todos os isolados obtidos no monitoramento. Sendo assim, todos os isolados foram considerados como linhagens de *S. cerevisiae* UFMG-A1007. Ou seja, todas as colônias estudadas apresentaram um perfil molecular dominante (padrão de banda), referente à linhagem *S. cerevisiae* (Figura 10). Desta forma, foi verificado que as enzimas de restrição que clivam o mtDNA em regiões específicas, foram capazes de criar um número característico de

fragmentos com vários comprimentos nas canaletas. As diferenças no número de bandas do DNA são regiões homólogas de diferentes tamanhos (BENITEZ e CODON, 2002; SANTOS, 2017). Sendo assim, foi possível observar que esta linhagem utilizada como co-cultura iniciadora na fermentação de mandioca, esteve presente durante todo o processo de produção de polvilho.



**Figura 9** Perfis moleculares de *S. cerevisiae* isoladas de 2 biorreatores (C e D) durante o processo fermentativo da fécula de mandioca obtidos através da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial utilizando a endonuclease *Hinf* 1I. Na canaleta 1: marcador de peso molecular 1 Kb, nas canaletas de 2 a 12; perfil Molecular de *S. cerevisiae* UFMG-A1007 em diferentes tempos de fermentação da fécula de mandioca.

### 5.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO POLVILHO PRODUZIDO EM ESCALA PILOTO

#### 5.3.1 Avaliação da acidez, pH e expansão

Na Tabela 1, são apresentados os resultados da caracterização físico-química realizada nas quatro amostras de polvilho obtidas a partir do uso de culturas iniciadoras de BAL e leveduras selecionadas (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. plantarum* + *S. cerevisiae*, *L. brevis* + *S. cerevisiae* UFMG-A1007). Para todos os parâmetros avaliados (ATT, pH, expansão), não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras estudadas.

**Tabela 1** ATT Índice de Expansão e pH do polvilho produzido em escala piloto com as culturas iniciadoras selecionadas

CULTURA INICIADORA	ATT	Índice de Expansão	pH
A	1,92 <sup>a</sup> ± 0,76	1,14 <sup>a</sup> ± 0,05	4,99 <sup>a</sup> ± 0,61
B	1,92 <sup>a</sup> ± 0,30	1,11 <sup>a</sup> ± 0,03	5,19 <sup>a</sup> ± 1,19
C	1,45 <sup>a</sup> ± 0,60	1,10 <sup>a</sup> ± 0,02	4,69 <sup>a</sup> ± 0,66
D	1,03 <sup>a</sup> ± 0,16	1,17 <sup>a</sup> ± 0,05	4,27 <sup>a</sup> ± 0,29

Valores médios ± desvio-padrão, na mesma coluna, seguidos pela mesma letra sobrescrita são significativamente iguais ( $p < 0,001$ ) em relação às culturas iniciadoras.

A ATT das amostras de polvilho do presente estudo, variou entre 1,03% e 1,92%, e o valor de pH variou de 4,27 a 5,19. Estes resultados estão semelhantes ao apresentado por Edward et al. (2011) que determinaram a acidez titulável de 1,6 e valor de pH de 6,2, ao empregarem linhagens liofilizadas de *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Weissella paramesenteroides* e *L. mesenteroides* como culturas iniciadoras para a produção de gari. Valores também muito próximos aos resultados obtidos por Castro et al. (2005), que encontraram acidez titulável de 1,85%, na produção de polvilho azedo.

Algumas características físico-químicas de amido de mandioca são determinadas pela Resolução 12 da CNNPA (BRASIL, 1978a) para a caracterização da fécula de mandioca. A acidez titulável é um parâmetro determinante na diferenciação de polvilho azedo e polvilho doce. O máximo permitido de índice de acidez para o polvilho doce é de 1% e, de no máximo 5 % para polvilho azedo. Dessa forma observa-se que todos os polvilhos produzidos a partir deste estudo são classificados como polvilho azedo, uma vez que apresentam ATT superior a 1% e inferior a 5%.

O índice de expansão das amostras de polvilho variou entre 1,10 cultura mista (*L. plantarum* em associação com *S. cerevisiae* UFMG-A1007) e 1,17 cultura mista (*L. brevis* em associação com *S. cerevisiae* UFMG-A1007). Em relação às diferentes culturas iniciadoras de fermentação, o índice de expansão dos polvilhos

produzidos foi estatisticamente igual em todos os tratamentos. Penido (2013) analisando amostras de polvilho azedo, obtidas em laboratório, ao longo de 28 dias de fermentação e secas ao sol, verificaram propriedade de expansão semelhante à deste trabalho, encontrando valores que variaram de 0,98 a 1,10, indicando que o processo fermentativo foi eficiente, promovendo uma modificação química enzimática adequada com consequente expansão do produto final. Pereira et al. (1999) avaliando amidos fermentados de fontes vegetais alternativas verificaram índices de expansão variando entre 0,88 e 1,99, para batata inglesa e polvilho azedo comercial, respectivamente. Ascheri e Vilela (2008) verificaram índices de expansão variando entre 2,24 e 3,49 em amidos de mandioca fermentados em tanque experimental, entre 1,84 e 3,34 em copo de Becker (bancada) e entre 1,80 e 3,69 em tanque industrial.

### 5.3.2 Avaliação da umidade, cinzas e amido, dos polvilhos produzidos em escala piloto

Os resultados da análise dos parâmetros físico-químicos, umidade, cinzas e amido, das amostras analisadas estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** Umidade, cinzas e amido do polvilho produzido em escala piloto a partir de culturas iniciadoras selecionadas

Cultura Iniciadora	Umidade	Cinzas	Amido
<b>A</b>	13,14 <sup>a</sup> ± 0,33	0,07 <sup>a</sup> ± 0,02	81,60 <sup>a</sup> ± 4,48
<b>B</b>	12,28 <sup>a</sup> ± 0,88	0,07 <sup>a</sup> ± 0,01	86,88 <sup>a</sup> ± 2,64
<b>C</b>	12,66 <sup>a</sup> ± 0,73	0,07 <sup>a</sup> ± 0,01	86,88 <sup>a</sup> ± 1,83
<b>D</b>	13,24 <sup>a</sup> ± 0,46	0,04 <sup>a</sup> ± 0,01	83,10 <sup>a</sup> ± 2,02

Valores médios ± desvio-padrão, na mesma coluna, seguidos pela mesma letra sobrescrita são significativamente iguais ( $p < 0,001$ ) em relação às culturas iniciadoras.

Os teores de umidade determinados para os polvilhos produzidos nos tratamentos A, B, C e D foram de 13,14; 12,28; 12,66 e 13,24%, respectivamente, sendo que as amostras não apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). A RDC nº 263, de setembro de 2005 não estabelece parâmetros de qualidade para o polvilho

azedo, apenas para o amido de mandioca, sendo 18% de umidade, o limite máximo permitido. Sendo, assim, de acordo com a legislação os produtos obtidos atendem os padrões legais, sendo caracterizados como polvilho azedo.

Os teores de umidade encontrados neste trabalho corroboram com os descritos na literatura. Machado et al. (2010), encontraram teor de umidade de 12 a 14 % em amostras de polvilho azedo em Minas Gerais. Maeda & Cereda (2001), encontraram teor de umidade de 13,6 a 14,3% amostras de polvilho azedo produzidas em Santa Catarina. Já Pereira (2001), encontrou teor de umidade de 13,6% em amostra de polvilho azedo produzidas no Paraná e Mato Grosso do Sul. Além disso, Marcon et al. (2009) verificaram que amostras comerciais de polvilho azedo fermentado e seco ao sol continham um teor de umidade de 14,2%, enquanto que para amido fermentado em laboratório e seco apresentou teor de umidade de 12,5%, sendo estes valores similares ao encontrado no trabalho atual.

O teor de cinzas encontrado variou entre 0,04 g e 0,07 g não sendo encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), entre os quatro tratamentos estudados. Atualmente a RDC nº 263, de setembro de 2005 não fixa nenhum padrão de identidade e qualidade para os teores máximos de proteínas e cinzas para amidos, féculas e farinhas (BRASIL, 2005, RODRIGUES, 2010). Os valores estão de acordo com o esperado, visto que o produto reconhecidamente apresenta baixo teor de cinzas, e apresenta alto teor de amido.

Os valores de cinzas encontrados por Diniz (2006), estudando polvilho azedo, produzido em diferentes regiões do estado de Minas Gerais foram de 0,23 g, valor superior ao encontrado nesse estudo. Em um estudo sobre as características físico-químicas de amidos de mandioquinha-salsa, Rocha, et al. (2008) obtiveram teores de cinzas (0,12 g e 0,09 g e 0,12 g). O teor de cinzas aproximou-se aos valores obtidos nesse estudo.

O teor de amido dos produtos obtidos neste trabalho variou de 81,60 a 86,88%), não havendo diferença estatística entre eles ( $p > 0,05$ ). O polvilho azedo proveniente da cultura pura de *L. plantarum* apresentou teor de amido inferior aos demais polvilhos, porém o teor desse constituinte está dentro do preconizado pela legislação, o que indica um grau satisfatório de todos os polvilhos azedos produzidos em escala piloto. Cereda e Vilpoux (2002) encontraram média de 94,79% de amido

em polvilhos azedos comerciais coletados em empresas nos estados de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. O teor de amido obtido nesta pesquisa está próximo ao resultado encontrado por Pereira e Leonel (2009) que ao avaliarem os teores de amido em polvilho doce, provenientes dos Estados do Paraná e São Paulo, encontraram teores de 86,55% e 86,29% de amido. Já Leonel et al. (1998), em estudo sobre o processamento industrial de fécula de batata no Estado do Mato Grosso do Sul, encontraram valores superiores, sendo eles, 96,6% e 98,10% de amido.

#### 5.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO AZEDO OBTIDO EM ESCALA PILOTO

Os polvilhos produzidos em escala piloto utilizando as culturas iniciadoras selecionadas foram avaliados quanto aos parâmetros microbiológicos prescritos na RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001). Em relação à pesquisa de *Salmonella* spp. foi verificado ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de todas as amostras analisadas. Quanto a presença de coliformes fecais ou termotolerantes os resultados das análises microbiológicas mostraram que a 45°C, independente das culturas iniciadoras utilizadas, todas as amostras de polvilho azedo apresentaram resultados negativos e estavam aptas para consumo. Não foi verificado o crescimento de colônias sugestivas de *B. cereus*, em valores superiores a tolerância permitida pela legislação que é de  $3,00 \times 10^3$  UFC/g do alimento. No tratamento D foi verificado contagem de  $1,9 \times 10^1$  UFC/g colônias sugestivas de *B. cereus*, para o todos os outros tratamentos não foram encontradas colônias sugestivas deste micro-organismo. Desta forma, todos os polvilhos azedos produzidos em escala piloto estariam apropriados para o consumo humano.

A verificação da presença de *B. cereus* no polvilho azedo é de extrema importância para garantir o controle dessa bactéria e prevenir o seu desenvolvimento, uma vez que a mesma se encontra amplamente distribuída na natureza e é encontrada naturalmente no solo, sendo potencial contaminante para vegetais, tubérculos e cereais, apresenta preferência por alimentos ricos em amido. Este micro-organismo além de causar a deterioração do alimento também produz

toxinas, emética ou diarreica, podendo causar intoxicação alimentar, e levar prejuízos à saúde do consumidor (RODRIGUES, 2010; PENIDO, 2013).

No presente estudo, não houve crescimento de população de patógenos no produto final da fermentação dos quatro tratamentos de polvilho azedo em escala piloto. Podendo-se sugerir que a produção de metabólitos antimicrobianos por *L. plantarum* e *L. brevis* associada a uma fermentação realizada com procedimentos de higienização adequados podem fornecer um controle dos micro-organismos patogênicos.

## 6. CONCLUSÕES

- Foram produzidos polvilhos azedos, em escala piloto, a partir das culturas iniciadoras puras de *L. plantarum* e *L. brevis* e em co-cultura com *S. cerevisiae*.
- Destaca – se a permanência da linhagem de *S. cerevisiae* durante todo o período de fermentação. Esta levedura também favoreceu a permanência de *L. brevis* no processo fermentativo. Desta forma, sugere-se utilizar *L. plantarum* e *L. brevis* em co-cultura com *S.cerevisiae* como culturas iniciadoras no processo de fermentação da mandioca para produção de polvilho azedo em escala piloto.
- As culturas iniciadoras utilizadas foram capazes de reduzir os valores de pH e aumentar os valores de ATT durante o processo fermentativo de mandioca para a produção de polvilho azedo, em escala piloto, com exceção do tratamento D (*L. brevis* + *S. cerevisiae*).
- Todos os polvilhos produzidos em escala piloto foram classificados como polvilho azedo, uma vez que os valores de ATT foram superiores a 1% e inferiores a 5%, e todos os outros parâmetros físico-químicos estão dentro dos padrões prescritos pela Resolução 12 da CNNPA (BRASIL, 1978a).
- As análises microbiológicas realizadas indicaram que os polvilhos azedos produzidos pelas culturas iniciadoras estão aptos para o consumo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOO, K. E., et al. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Research*, v. 6, n. 1, p. 30-39, 2006.

ALBERTIN, W., et al. Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 77, n. 8, p. 2772-2784, 2011.

ALMEIDA, E. G., et al. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Amerindians. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 120, n. 1/2, p. 146-151, Nov. 2007.

ALVARENGA, R. M., et al. Potential application of *Saccharomyces cerevisiae* strains for the fermentation of banana pulp. *African Journal of Biotechnology*, v.10, n.18, p.3608-3615, 2011.

AMOA-AWUA, W. K.; FEGLO, M. O. P. Utilization of unfermented cassava flour for the production of an indigenous African fermented food, agbelima. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v. 21, n. 6/7, p. 1201-1207, Oct. 2005.

AMOA-AWUA, W.K.A., et al. The contribution of moulds and yeasts to the fermentation of 'agbelima' cassava dough. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 288– 296. 2003

AMPE, F., et al. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative RNA hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 4554, Apr. 2001.

ANJOS, L. D., et al. Modified starches or stabilizers in preparation of cheese bread. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 44, n. 9, p. 1686-1691, 2014.

APLEVICZ, K. S. Caracterização de produtos panificados à base de féculas de mandioca nativas e modificadas. 2006. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná. 2006.

AQUINO, A. C. M. S., AZEVEDO, M.S.; RIBEIRO, D.H.B.; COSTA, A.C.O.; AMANTE, E.R. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. *Food Chemistry*, v. 172, p.725-730, 2015.

AQUINO, A. C. M.S., et al. Evaluation of the sour cassava starch productive processing on factories of Santa Catarina State. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas. v.19. 2017.

ARAÚJO, T.M. Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas. 2013. 112 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, 2016.

AVANCINI, S. R. P. Caracterização físico-química, microbiológica e toxicológica das águas de fermentação do amido de mandioca na produção do polvilho azedo. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, 2007.

AXELSSON L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von right A, Ouwehand A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 1-66, 2004.

BALLUS, C.A. et al. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v.28, n. 1, p.85-96, 2010.

BARATA A., et al. The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol* 153:243-259. 2012.

BASTOS, R. G. Tecnologia das fermentações: Fundamentos de Bioprocessos / Reinaldo Gaspar Bastos. -- São Carlo : EdUFSCar, 162 p. 2010.

- BENITEZ, T.; CODON, A. C. Genetic Diversity of Yeasts in Wine Production. *Applied Mycology and Biotechnology*, v. 2, p. 19–44, 2002.
- BENNETT, R. W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: DOWNES, F. P; ITO, K. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: Apha, p. 311-316, 2001.
- BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2008
- BERNARDI, T. L. Técnicas moleculares para a caracterização de *Saccharomyces cerevisiae* associadas à produção de cachaça. Dissertação (Mestrado). Lavras: UFLA, 38 p. 2007.
- BLANCO, P., et al. Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *Antonie van Leeuwenhoek*, v.89, p.351-357, 2006.
- BLANSHARD, A.F., et al. Fermentation of cassava into fofofo. Effect of lime and temperature on processing and storage quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66, 485–492. 1994.
- BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C.W. The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v. 77, n. 2, p. 157-172, 2013.
- BOONNOP, K., et al. Enriching nutritive value of cassava root by yeast fermentation. *Scientia Agricola*, v.66, p. 629-633, 2009.
- BRASIL. Decreto n. 12.486, de 20 de outubro de 1978. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, 21 out. 1978b.
- BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº 263, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 23 set. 2005. Seção I, p.368-369.

BRASIL. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução de 12 de março de 1978. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. Diário Oficial, Brasília, p. 11499-11528, 24jul. 1978a.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, Seção I, 10 jan. 2001.

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, p. 47-53, 2006.

CADENA, M. P., et al Evaluacion de la agroindustria del almidon agrio de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) em Cordoba y Sucre. Temas Agrarios, v. 11, n. 1, p. 43-53, 2006.

CANONICO, L., et al. Dominance and influence of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains on the analytical profile of craft beer refermentation. Journal of the Institute of Brewing, London, v. 120, n. 3, p. 262-267, 2014.

CAPELLARI, J. *Biossíntese de Ácido Láctico por Lactobacillus Amylovorus a Partir de Resíduos Agroindustriais. 2010. 67p* (Doctoral dissertation, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)–Universidade da Região de Joinville–UNIVILLE, Joinville). 2010.

CARVALHO, A.V. et al. Caracterização tecnológica de extrusado de terceira geração à base de farinhas de mandioca e pupunha. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.34, n.4, p.995-1003, 2010.

CEREDA, M. P., et al. Metodologia de determinação de amido por digestão ácida em microondas. Rev. ABAM – Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca, v. 8, n. 2, p. 1-29. 2004.

CEREDA, M.P., et al. Tecnologia da produção de polvilho azedo. Botucatu. Centro de Raízes Tropicais (CERAT). Universidade Estadual Paulista. 1995.

CEREDA, M.P., VILPOUX, O. Polvilho azedo, critérios de qualidade para uso em produtos alimentícios. São Paulo: Fundação Cargil, p.333-354. 2002.

CHELULE PK, et al. Lactic acid fermentation improves the quality of amahewu, a traditional South African maize-based porridge. *Food Chemistry*.;122(3):656-661. 2010.

COCOLIN, L.; et al. G. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 83-91, 2004.

COHEN, K. O.; et al. Quantificação de teores de compostos cianogênicos totais em produtos elaborados com raízes de mandioca. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 23 p. 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Conjuntura mensal. Mandioca. Período de 01/03 a 31/03/2016. Brasília – DF. p.1—10.

CORRÊA, Maria Ivaneide Coutinho. Avaliação de bactérias do ácido láctico, endógenas da mandioca, nas características do polvilho azedo. 2010. 97f. Teses. Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2010.

COSER, T. B., et al. Evaluation of minimum detection limit to hepatitis virus (HBV) PCR “nested”. *HCPA*, v. 28, n. 1, p. 5-9, 2008

COULIN P., et al. Characterization of the microflora of attieke, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *Int J Food Microbiol* 106:131–136. 2006.

COULIN, P., et al. Characterisation of the microflora of attieke, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 131–136, 2006.

DAVIDSON, B. E., et al. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *Int. Dairy. J.* 5:763-84.1995.

DEMIATE, I. M. et al. Organic acid profile of commercial sour cassava starch. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 1, p. 131-135, 1999.

DINIZ, I. P. Caracterização tecnológica do polvilho azedo produzido em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. Viçosa: Departamento de

- Tecnologia de Alimentos da UFV. Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). 116 p. 2006.
- DJENI, N. T., et al. Biochemical and microbial characterization of cassava inocula from the three main attiéke production zones in Côte d'Ivoire. *Food Control*, 50, 133–140. 2015.
- EDWARD, V. A., et al. Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. *Food Control* 22, no. 3. 389-395.2011.
- ERCOLINI, D., et al. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.* 42:199-202. 2001.
- FAGBEMI, A. O.; IJAH, U. J. J. Microbial population and biochemical changes during production of protein-enriched fufu. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v. 22, n. 6, p. 635-640, June 2006.
- FALADE, K.O; AKINGBALA, J.O., Utilization of cassava for food. *Food Reviews International*, 27(1), pp.51-83, 2011.
- FAO/WHO 1991. Joined FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission, XII, supplement 4. FAO/WHO, Rome, Italy.
- FELLOWS, P. J. *Tecnologia do Processamento de Alimentos*. 2nd Ed. Editora Artmed, 2006.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1998.
- FREIRE, A. L. Diversidade de bactérias lácticas e leveduras e caracterização físico-química da bebida fermentada yakupa produzida pelo Povo Juruna (Yudjá), Mato Grosso, Brasil. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras. 72 p., 2013.
- FREIRE, A. L., et al. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. *Food Research International*, 76, 787-795. 2015.

FREIRE, A. L., et al. Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of yakupa, an indigenous beverage produced by Brazilian Amerindians. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 567–577. 2014.

GOMES, A. M. M. et al. Effects of annealing on the physicochemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo). *Carbohydr. Polym.*, Nigéria, v. 60, n. 1, p. 1-6, 2005.

GOMES, F.C.O., et al. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2438–244, 2007.

GOMES, F.S. Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica. 2009. 171 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Sorocaba, 2009.

GUNAWAN S., et al. Effect of fermenting cassava with *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Rhizopus oryzae* on the chemical composition of their flour. *International Food Research Journal*, v.22, p.1280-1287, 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, p. 267-272, 1987.

HOLZAPFEL, W. H., P. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:365S-73S. 2001.

HUCH, M., et al. Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentations for gari production. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 258e267. 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Agrícola. Janeiro de 2016

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA). Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro v.30 n.3 p.1-83 março.2017

JAY, J. M. Fermentation and fermented dairy products. Modern food microbiology. 6th edition. Gaithersburg, USA: An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc.113-30. 2000.

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, 342-351, 2007.

KURTZMAN, C. P., et al. *The Yeasts, A Taxonomic Study* 5th. ed. Elsevier, Amsterdam, 2354p. 2011.

KURTZMAN, C. P., ROBNETT, C. J. Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Research*, 13 (1), 23-33. 2013.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Ed.). *The yeast: a taxonomic study*. 4. ed. Amsterdam: Elsevier. p. 79. 1998.

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. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2006. 150 p. (Tese, Doutorado em Microbiologia).

LACERDA, I. C. A. Microbiota envolvida na fermentação da mandioca para a produção de polvilho azedo, na região de Conceição dos Ouros - MG. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2002. 65 p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia).

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, p. 650-657, 2011.

LACERDA, I.C.A.; et al. Lactic acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 105, p. 213-219, 2005.

LADEIRA, T. M. S.; PENA, R. S. Propriedades físico-químicas e tecnológicas dos polvilhos azedos de três cultivares de mandioca. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 631-640, 2011.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LENTZ, M.; et al. Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v. 120, n. 4, p. 559-564, 2014.

LEONEL, M. et al. Aproveitamento do resíduo da produção de etanol a partir de farelo de mandioca, como fonte de fibras dietéticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.19, n.2, p.241-245, 1998.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, United Kingdom, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LIMA, R. M. F.; et al. Produção de polvilho a partir do amido de mandioca: busca de alternativas para otimização do processo de produção em indústrias polvilheiras do município de Conceição dos Ouros, Minas Gerais, Brasil. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 10, p. 178-185, 2012.

LOPEZ V, et al. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int J Food Microbiol* 68: 75–81. 2001.

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, p. 1031–1048, 2014.

MACHADO, A.V. et al. Efeito do escaldamento nas propriedades microscópicas e cristalinidade do polvilho azedo. *Revista verde*, Mossoró, v.5, n.2, p.169-174, 2010.

MACHADO, V.S. et al. Estudo do efeito da secagem por radiação ultravioleta nas propriedades tecnológicas da fécula de mandioca fermentada. *e-xacta*, 5(1). 2012.

MAEDA, K. C.; CEREDA, M. P. Avaliação de duas metodologias de expansão ao forno do polvilho azedo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, p. 139-143, 2001.

MANTE, E.S.; et al.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.

MARCON, M. J. A. et al. Expansion properties of 28. sour cassava starch (polvilho azedo): variables related to its practical application in bakery. *Starch-Stärke*, Weinheim, v. 61, n. 12, p. 716-726, 2009.

MARCON, M. J. A. Proposal for the expansion mechanism of polvilho azedo based on its physicochemical characteristics.. Thesis (Doctor's Degree in Food Science) - Post-Graduation program in Food Science at UFSC - Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. 2009.

MARCON, M.J.A. Avaliação do processo produtivo para melhoria da qualidade do polvilho azedo. 2004. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004

MARINI, M. M., et al. The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cachaça: a comparative study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 2, p. 235-242, 2008.

MARONGIU, A., et al. Novel starters for old processes: use of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from artisanal sourdough for craft beer production at a brewery scale. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 42, n. 1, p. 85-92, 2015.

MAYORAL, M.B.; et al. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. *International Journal of Food Microbiology*, v.105, p.27-34, 2005.

- MIAMBI, E.; et al. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Microbiology*, v.82, n.2 , p.111-120. 2003.
- MIGUEL, M. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International*, Barking, v. 43, n. 5, p. 1523-1528, June 2010.
- MIGUEL, MGCP. et al. Physico chemical and microbiological characterization of corn and rice "calugi" produced by Brazilian Amerindian people. *Food Res Int* 49:524-532. 2012.
- MUGULA, J. K.; et al. 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, p. 307-318, 2003.
- NIELSEN, D. S.; et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International of Food Microbiology*, 114, 168-186, 2007.
- Nwokocha, L. M., et al. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 362–367. 2009.
- OBILIE, E. M.; et al. Microbial modification of the texture of grated cassava during fermentation into akyeke. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 275-280, Dec. 2003.
- OBOH, G. e AKINDAHUNSI, A.A. Biochemical changes in cassava products (flour and gari) subjected to *Saccharomyces cerevisiae* solid media fermentation. *Food Chemistry* 82: 599-602. 2003.
- OBOH, G. e AKINDAHUNSI, A.A. Nutritional and toxicological evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* fermented cassava flour. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 731-738. 2005.
- OBOH, G. et al. Nutrient and Antinutrient content of *Aspergillus niger* fermented cassava product (flour and gari). *Journal of Food Composition and Analysis* 15: 617-622. 2002.

OBOH, G.; AKINDAHUNS, A. A. Nutritional and toxicological evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* fermented cassava flour. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.18.n.7, p. 731-738, 2004.

OGUNTOYINBO, F. A. Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale gari production in Nigeria. *Food Control*, Guildford, v. 19, n. 5, p. 465-469, May 2008.

OGUNTOYINBO, F. A.; DODD, C. E. R. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in gari production. *Food Control*, Guildford, v. 21, n. 3, p. 306-312, Mar. 2010.

OJO, O.; DEANE, R. Effects of cassava processing methods on antinutritional components and health status of children. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 82, n. 3, p. 252-257, Feb. 2002.

OMAR, N. B.; AMPE, F.; RAIMBAULT, M.; GUYOT, J.-P.; TAILLIEZ, P. Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). *Systematic and Applied Microbiology*, v. 23, p. 285-291, 2000.

OSUNDAHUNSI, O.F.; MUELLER R. Functional and dynamic rheological properties of acetylated starches from two cultivars of cassava. *Starch - Stärke*, 63:03-10. 2011.

OYEWOLE, O. B. Characteristics and significance of yeasts' involvement in cassava fermentation for 'fufu' production. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 213-218, May 2001.

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

PADONOU, S. W.; NIELSEN, D. S.; AKISSOE, N. H.; HOUNHOUIGAN, J. D.; NAGO, M. C.; JAKOBSEN, M. Development of starter culture for improved processing of Lafun, an African fermented cassava food product. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p. 1402-1410, 2010.

PADONOU, S. W.; NIELSEN, D. S.; HOUNHOUIGAN, J. D.; THORSEN, L.; NAGO, M. C.; JAKOBSEN, M. The microbiota of Lafun, an African traditional

cassava food product. *International Journal of Food Microbiology*, v. 133, p. 22-30, 2009.

PANTAROTO, S. CEREDA, M.P., MANFIO, G.P., CEZAR, V.R.S., LEONEL, M., URBANO, L.H. Destoxificação microbiana de manipueira (líquido residual da prensa de mandioca) etapa inicial. SIMPÓSIO EM ENERGIA NA AGRICULTURA, II, 2000, Botucatu. Anais... Botucatu:UNESP, 2000, p.631-34.

PARAMITHIOTIS, S. et al. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 12, p. 2429–2433, 2006.

PENA, 2016. Caracterização físico-química de farinhas de tapioca produzidas e comercializadas em diferentes localidades no estado do Pará. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

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. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 101 p. 2013 (Dissertação, Mestrado em Ciências dos Alimentos).

PEREIRA, J., C, et al. Função dos ingredientes na consistência da massa e nas características do pão de queijo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(4), pp.494-500, 2004.

PEREIRA, B.B.; LEONEL, M. Caracterização química de polvilhos doces e produtos derivados da mandioca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13., 2009, Botucatu. Anais... Botucatu: CERAT/UNESP, p.1216, 2009.

QUEROL, A.; BARRIO, E. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*. v. 18, p. 1657, 1990.

QUEROL, A.; BARRIO, E; RAMON, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, v.15, p. 439-446, 1992.

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*, Amsterdam, 2010.

RAMOS, C. L. et al. Diversity of bacteria and yeast in the naturally fermented cotton seed and rice beverage produced by Brazilian Amerindians. *Food Microbiology*, London, v. 28, p. 1380-1386, June 2011.

RANTSIOU, K.; et al. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1977-1986, 2005.

RAY RC, SIVAKUMAR PS. Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops: review. *International journal of food science & technology*. 2009 Jun 1;44(6):1073-87. 2009.

RAY, B. *Fundamental Food Microbiol.* CRC Press, p. 173-181, 2004.

REBOUÇAS, K.H. Estudos das características microbiológicas e físico-químicas durante a fermentação da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) visando às aplicações tecnológicas. Tese (doutorado) – UFRJ. Instituto de Química. Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos. Rio de Janeiro: UFRJ. 148p. 2015.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 3, p. 620-628, 2008.

REDDY G., et al. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation—a review. *Biotechnol Adv.* 26:22–34. 2008.

RODAS, A. M.; et al. 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Systematic and Applied Microbiology*, v.26, p.412-422, 2003.

RODRIGUES, Janaina Pereira de Macedo. Characterization and sensory analysis of biscuits fortified flour with cassava meal. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias - Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para

estudar diversidade microbiana. In: MELO, I. S. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramentos. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2002. p. 97-128.

ROSSITA, R.; FLEET, G. H. The occurrence and growth of yeast in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, v. 28, p. 393-404, 1996.

SANT'ANNA, F. M. Bactérias do ácido láctico de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes: isolamento, identificação molecular, avaliações in vitro e in vivo do potencial probiótico, 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2015.

SANTOS BVH, CEREDA MP. Método para determinação de volume específico como padrão de qualidade do polvilho azedo e sucedâneos/Method for the determination of specific volume as a quality standard for fermented cassava starch and substitutes. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2015 Jan 1;18(1):14.

SANTOS, A.A.O., CRISTINA, I.V., DOS SANTOS, J.P.A., SANTANA, D.G., ALMEIDA, M.L., MARCELLINI, P.S. Elaboração de biscoitos de chocolate com substituição parcial da farinha de trigo por polvilho azedo e farinha de albedo de laranja. *Ciência Rural*, 41(3), pp.531-536, 2011.

SANTOS, C. C. A. d. A. Identificação da microbiota e caracterização físico-química da bebida fermentada caxiri produzida pelo povo Juruna (Yudjá), Mato Grosso, Brasil. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavra. UFLA, 95 p., 2010.

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

SANZ, A.; et al. Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packer ham. *Meat Science*, v.71, p.230-237, 2005.

SCHEIDT, G. N. *et al.* Efeito da Adição de Culturas Iniciadoras Sobre Características Físico-Químicas e Microbiológicas de Salame Tipo Italiano

Durante os Períodos de Maturação e Armazenamento. Universidade Federal de Tocantins. Revista Ciências Exatas de Naturais, Vol 11, nº 1, Jan/Jun, 2009.

SCHULLER D, et al. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. FEMS Microbiol Lett 231: 19–26. 2004.

SCHWAN, R. F.; ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A. G.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. FEMS Yeast Research, v. 7, p. 966-972, 2007.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e pequenas Empresas. Estudo de mercado sobre a mandioca (farinha e fécula). Estudos de mercado – ESPM/SEBRAE. Relatório completo. Janeiro de 2008 p.1-81. 2008.

SILVA, P. A. Estudo do processamento e da qualidade física, físico-química e sensorial da farinha de tapioca. 2011. 91 f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Pará. Belém, 2011.

SILVA, A.C.M.S. ESTUDO PROSPECTIVO DOS RESIDUOS GERADOS NO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA. *Cadernos de Prospecção*, 8(2), p.266, 2015.

SILVA, Augusto Cezar Martins Souza da. Estudo prospectivo dos resíduos gerados no processamento da mandioca. Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, BA, Brasil. *Cad. Prospec.*, Salvador, v. 8, n. 2, p. 265-271, abr./jun. 2015.

SILVA, Tatiane S. Avaliação dos parâmetros físico-químicos de amido de mandioca fermentado seco ao sol e em estufa. 2014. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2014.

SIQUEIRA, R. S. Manual de microbiologia de alimentos. EMBRAPA, 1995.

STILES, M. E. and W. H. HOLZAPFEL. Review article: lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol.* 36:1-29. 1997.

SYBESMA W, et al. J. Increased Production of Folate by Metabolic Engineering of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 69(6):3069-3076. 2006.

TEIXEIRA, E.H., 2014. Produção de mandioca para consumo e geração de renda das famílias do Assentamento Areias–Nioaque/MS. Universidade de Brasília Faculdade UNB Planaltina Licenciatura em educação do campo. 34p.

THEUNISSEN, J.; et al. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 11-21, 2005.

TIVANA, L. 2012. Cassava Processing: Safety and Protein Fortification. Department of Food Technology, Engineering and Nutrition. Faculty of Engineering, LTH Lund University, Sweden. Doctoral Thesis.

TORRIANI, S.; et al. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Env. Microb.*, v. 67, n. 8, p. 3450-3454, 2001.

VALERO E, et al. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three-year study. *FEMS Yeast Res* 5: 959–969. 2005.

VARGAS-AGUILAR P. Obtención de almidón fermentado a partir de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) variedad valencia, factibilidad de uso en productos de panadería. *Tecnol Marcha* 23(3):15–23. 2010.

VILELA, D. M.; et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27, 1128-1135, 2010.

VILPOUX, O. F., CEREDA, M. P. Processamento de raízes e tubérculos para uso culinário minimamente processadas, pré-cozidas, congeladas e fritas (french-fries). In: CEREDA, M. P., VILPOUX, O. F. (Coord.). *Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino-americanas*. São Paulo: Fundação Cargill - Série culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas, v 3. p. 81-131, 2003.

VODNAR, D.C., et al. HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(2), p.109. 2010.

VOGELMANN, S. A.; SEITTER, M.; SINGER, U.; BRANDT, M. J.; HERTEL, C. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *International Journal of Food Microbiology*, v. 130, p. 205-212, 2009.

WATSON, J.D.; et al. *O DNA recombinante*. 2. ed. 646p. 1997.

WOOD, B.J., HOLZAPFEL, W.H. *The genera of lactic acid bacteria*. Glasgow: Blackie academic & Professional. 6-15, 1995.

## APÊNDICE A

**Tabela 1** Acompanhamento do pH durante a fermentação em escala piloto com as culturas iniciadoras selecionadas

		pH														
		0			7 dias			14 dias			21 dias			28 dias		
<b>A</b>		3,36	±0,3	ax	4,13	±0,2	ax	2,89	±0,1	ax	2,92	±0,1	ax	2,88	±0,3	ax
<b>B</b>		4,10	±0,1	ax	3,50	±0,5	ax	2,76	±0,2	ax	2,77	±0,3	bx	3,06	±0,5	ax
<b>C</b>		3,33	±0,3	bx	3,95	±0,4	ax	4,23	±0,7	bx	3,78	±0,5	bcx	3,72	±0,8	ax
<b>D</b>		4,09	±0,1	bx	3,89	±0,2	bcx	4,41	±0,2	bx	4,55	±0,1	bcx	4,13	±0,7	bx

Os valores médios ± desvio-padrão na mesma linha seguidos pela mesma letra sobrescrita (a, b, c) são significativamente iguais ( $p < 0,001$ ) em relação ao tempo.

Os valores médios ± desvio-padrão na mesma coluna seguidos pela mesma letra sobrescrita (x) não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) em relação às culturas iniciadoras.

Tratamentos: A: *L. plantarum*; B: *L. brevis*; C: *L. plantarum* + *S. cerevisiae*; D: *L. brevis* + *S. cerevisiae*.

## APÊNDICE B

**Tabela 2** Acompanhamento da acidez total titulável (ATT) durante a fermentação em escala piloto com as culturas iniciadoras selecionadas

		ATT (%)				
		0	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
<b>A</b>	0,68 ±0,09 ax	1,2 ±0,09 ax	1,44 ±0,23 ax	0,9 ±0,7 ax	0,41 ±0,9 ax	
<b>B</b>	0,35 ±0,05 ax	0,7 ±0,14 bx	1,31 ±0,23 ax	1,5 ±0,3 ax	2,11 ±0,5 abx	
<b>C</b>	0,63 ±0,12 bx	0,2 ±0,18 bx	0,17 ±0,26 bx	0,4 ±0,2 bx	0,38 ±0,4 abx	
<b>D</b>	0,26 ±0,09 bx	0,4 ±0,04 bx	0,23 ±0,10 bx	0,4 ±0,05 bx	0,43 ±0,1 bx	

Os valores médios ± desvio-padrão na mesma linha seguidos pela mesma letra sobrescrita (a, b, c, d) são significativamente iguais ( $p < 0,001$ ) em relação ao tempo.

Os valores médios ± desvio-padrão na mesma coluna seguidos pela mesma letra sobrescrita (x) não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) em relação às culturas iniciadoras.

Tratamentos: A: *L. plantarum*; B: *L. brevis*; C: *L. plantarum* + *S. cerevisiae*; D: *L. brevis* + *S. cerevisiae*.

## APÊNDICE C

**Tabela 3** Acompanhamento da contagem dos micro-organismos durante a fermentação em escala piloto com as culturas iniciadoras selecionadas

Cultura Iniciadora	Contagem (log <sub>10</sub> UFC/g)											
	0		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias			
<i>L. plantarum</i>	7,83	±0,5 <sup>xa</sup>	7,61	±0,30 <sup>xa</sup>	7,62	±0,60 <sup>xa</sup>	7,07	±0,21 <sup>xa</sup>	4,64	±0,61 <sup>xa</sup>		
<i>L. brevis</i>	7,84	±0,05 <sup>xa</sup>	6,95	±0,20 <sup>xa</sup>	6,47	±0,88 <sup>xa</sup>	0,00	0,00 <sup>xa</sup>	0,00	0,00 <sup>xab</sup>		
<i>L. plantarum</i>	7,74	±0,09 <sup>xa</sup>	7,28	±0,26 <sup>xab</sup>	7,41	±0,77 <sup>xa</sup>	7,41	±0,25 <sup>xa</sup>	6,62	±0,89 <sup>xab</sup>		
<i>S.cerevisiae</i>	6,82	±0,05 <sup>xa</sup>	7,3	±0,31 <sup>xbc</sup>	6,7	±0,71 <sup>xa</sup>	6,07	±0,47 <sup>xa</sup>	5,85	±0,24 <sup>xbc</sup>		
<i>L. brevis</i>	7,81	±0,10 <sup>xa</sup>	7,27	±0,69 <sup>xbc</sup>	7,06	±1,21 <sup>xa</sup>	7,02	±0,38 <sup>ybc</sup>	4,8	±0,63 <sup>xab</sup>		
<i>S.cerevisiae</i>	6,94	±0,11 <sup>xa</sup>	7,09	±0,16 <sup>xbc</sup>	6,73	±0,89 <sup>xb</sup>	6,57	±0,22 <sup>zb</sup>	6,09	±0,56 <sup>y</sup>		

Os valores médios ± desvio-padrão na mesma linha seguidos pela mesma letra sobrescrita (x, y,z) não são significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ) em relação ao tempo.

Os valores médios ± desvio-padrão na mesma coluna seguidos pela mesma letra sobrescrita (a, b, c) não são significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ) em relação às culturas iniciadoras.