

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

FERNANDA CORRÊA LEAL PENIDO

**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
2013**

FERNANDA CORRÊA LEAL PENIDO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR
DA MICROBIOTA PREDOMINANTE NA
FERMENTAÇÃO NATURAL DE MANDIOCA:
SELEÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS PARA
PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM
ESCALA PILOTO**

Dissertação 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 Mestre em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda

Coorientador: Prof. Dr. Gecernir Colen

**Belo Horizonte
2013**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha irmã e ao Renato, que estiveram comigo durante todo este trabalho, dividindo os momentos de conquistas e sacrifícios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar coragem, paciência e sabedoria para vencer mais esta etapa em minha vida.

À Professora Doutora Inayara Cristina Alves Lacerda, pela orientação deste trabalho, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, confiança e amizade durante o trabalho desenvolvido. Você, mais do que ninguém, sabe como este período não foi fácil para nós, mas certamente sairemos vitoriosas.

Ao Professor Doutor Gecernir Colen, pela coorientação deste trabalho e pelos valiosos ensinamentos que colaboraram para a qualidade dos resultados obtidos.

Ao Professor Doutor Carlos Augusto Rosa por toda a contribuição e ideias que foram essenciais para o engrandecimento deste trabalho.

À Professora Doutora Evelyn de Souza Oliveira Lopes por atuar como colaboradora.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Regina Maria Nardi Drummond e Profa. Dra. Roseane Batitucci Passos de Oliveira, pelo privilégio de tê-los contribuindo para o aprimoramento deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela contribuição em minha formação científica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG) pela oportunidade de realizar este mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Secretaria do PPGCA pela assistência e resolução de questões administrativas.

À funcionária Elaine, por estar sempre disponível para me ajudar no que quer que fosse e por ser tornar uma grande amiga.

Ao amigo Cosme, por me fazer rir mesmo nos momentos tristes.

À amiga Denise, por disponibilizar seu tempo para a redação dos inúmeros projetos.

À aluna de iniciação científica Letícia, por toda dedicação, paciência e amizade durante este ano de parceria.

À Luciana Faleiro, por tão gentilmente me ceder seus materiais e seu tempo e pela valiosa ajuda nas análises estatísticas.

Aos demais amigos dos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB) do Departamento de Alimentos da FAFAR/UFMG, por serem como uma família para mim durante todo o período do mestrado. Às funcionárias, Ana Diolina e Raimunda, às monitoras, Bárbara e Patrícia, aos alunos, Beatriz, Carla, Flávia, Letícia, Michely e Roberta.

Ao Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG por disponibilizar os materiais e equipamentos necessários à realização dos experimentos práticos para a elaboração da presente dissertação.

À amiga Fernanda Piló, pela dedicação, paciência, comprometimento e companheirismo sem a qual este trabalho não seria possível.

Aos demais integrantes do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos pela cooperação e momentos compartilhados.

Aos funcionários da polvilharia em Formiga, Minas Gerais (MG), Marco Antônio, Paulo, Leonardo, Júnio e Geraldo, por me receberem com tanto carinho e por me darem todo o suporte necessário para a realização das coletas.

Aos meus pais e irmã, pelo amor e carinho incondicionais, apoio e dedicação. Em especial, ao meu pai, por participar tão ativamente da parte experimental do meu mestrado. Eu não tenho palavras para agradecer todo o tempo dedicado à minha formação. Aos demais familiares, pela força e atenção.

Ao meu namorado Renato, meu companheiro e *coach*, por me impulsionar a ser uma pessoa e profissional cada vez melhor.

À minha amiga Penha, por ser minha inspiração e por me guiar durante a formação acadêmica sempre com bons conselhos.

À minha amiga Marina (Chica), por ser mais que uma amiga, quase uma irmã, e por toda a colaboração para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

O polvilho azedo é obtido a partir da fermentação natural de mandioca, em um processo espontâneo conduzido por micro-organismos presentes na matéria-prima e nos tanques de fermentação. O produtor avalia o final da fermentação de forma empírica, tornando o processo sem padronização e levando a obtenção de produtos de qualidade inferior. Este produto é utilizado principalmente para fabricação de biscoitos e pães de queijo, se destacando por representar uma alternativa ao glúten, que deve ser evitado na doença celíaca. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar molecularmente a microbiota predominante na fermentação de mandioca, com o intuito de selecionar cepas microbianas para serem usadas como culturas iniciadoras para a produção de polvilho azedo em escala piloto. As amostras foram coletadas em uma polvilharia localizada em Formiga (MG) durante 40 dias de fermentação. As bactérias do ácido láctico (BAL) predominaram durante todo o processo e as leveduras apareceram em proporções significativas desde o início até o 26º dia de fermentação. As BAL predominantes representaram principalmente o gênero *Lactobacillus*, sendo *Lactobacillus brevis* o isolado mais freqüente. A levedura predominante foi *Pichia scutulata*. Do 19º ao último dia de fermentação, os valores de pH do tanque da polvilharia decresceram, com conseqüente aumento dos valores de acidez total titulável (ATT). Quanto aos testes para a seleção das culturas iniciadoras, *P. scutulata* apresentou o maior número de isolados com atividade amilolítica e *Lb. brevis* produziu valores maiores de ATT no teste de acidificação, *Lactobacillus plantarum* também apresentou valores significativos. Foram selecionadas as espécies *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* e *P. scutulata* para serem testadas como culturas iniciadoras puras e mistas em escala piloto. A fermentação foi conduzida por 28 dias e foi verificado que o pico de acidez e o menor valor de pH se deram no 7º dia de fermentação. As BAL se mantiveram viáveis durante todo processo, enquanto as leveduras permaneceram por 7 a 14 dias. *Lb. plantarum* apresentou melhor desempenho como cultura iniciadora e os resultados sugerem que esta BAL apresenta potencial para ser usada como cultura iniciadora pura ou mista para a produção de polvilho azedo.

Palavras-chave: Polvilho azedo; bactérias do ácido láctico; leveduras; culturas iniciadoras.

ABSTRACT

Sour cassava starch is obtained from the natural fermentation of cassava in a spontaneous process conducted by microorganisms present in raw materials and fermentation tanks. The producer evaluates the end of the fermentation empirically, which leads to a process without any standardization and to the achievement of inferior quality products. This product is used primarily in the baking industry for the manufacture of biscuits and Brazilian cheese breads. It represents an alternative to gluten, which should be avoided by people with celiac disease. The objective of this work was to isolate and identify molecularly the predominant microbiota of cassava fermentation, in order to select microbial strains to be used as starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot study. The samples were collected in a cassava flour manufacturer in Formiga (MG) during 40 days of fermentation. Lactic acid bacteria (LAB) were prevalent throughout the whole process and yeasts appeared in significant proportions since the beginning of the process remaining until the 26th day of fermentation. The predominant BAL represented mainly the genus *Lactobacillus* and *Lactobacillus brevis* was the most frequent isolated. *Pichia scutulata* was the predominant yeast. From the 19th to the last day of fermentation, the pH of the fermentation tank decreased and consequently the values of total titratable acidity (TTA) increased. Regarding the tests for selection of starter cultures, *P. scutulata* had the largest number of isolates with amylolytic activity and *Lb. brevis* produced higher values of TTA in the acidification test, *Lactobacillus plantarum* also showed significant values. The species *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* and *P. scutulata* were selected to be tested as pure and mixed starter cultures in a pilot study. The fermentation was conducted during 28 days and it was verified that the peak of acidity and the lower pH value happened on the 7th day of fermentation. The BAL remained viable throughout the whole pilot study fermentation, while the yeasts remained for 7 to 14 days. *Lb. plantarum* showed better performance as starter culture and the results suggest this BAL presents the potential to be used in a pure or mixed starter culture for the production of sour cassava starch.

Key words: Sour cassava starch; lactic acid bacteria; yeasts; starter culture.

LISTA DE TABELAS

1	Espécies de bactérias do ácido láctico (BAL) identificadas nos diversos produtos fermentados de mandioca.....	36
2	Varição de pH na superfície e meio do tanque durante a fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG).....	69
3	Varição na acidez total titulável (ATT) na superfície e meio do tanque durante a fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG)	70
4	Acidez total titulável (ATT) após 24 e 48 horas de fermentação produzida pelas espécies de bactérias do ácido láctico (BAL) encontradas no tanque de fermentação na polvilharia em Formiga (MG)	73
5	Acidez total titulável (ATT) após 24 e 48 horas de fermentação produzida pelas espécies de leveduras encontradas nos tanques de fermentação na polvilharia em Formiga (MG).....	74
6	Acidez total titulável (ATT), pH e índice de expansão para os polvilhos azedos obtidos em escala piloto em comparação ao polvilho azedo comercial.....	84

LISTA DE FIGURAS

1	Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> CRANTZ).....	25
2	Fluxograma do processamento de raízes de mandioca para a produção de polvilho doce.....	28
3	Fluxograma do processamento de raízes de mandioca para a produção de polvilho azedo.....	31
4	Tanque de fermentação de mandioca do qual foram realizadas as coletas na polvilharia em Formiga (MG).....	45
5	Biorreator (bacia de plástico) no qual foram realizadas as fermentações em escala piloto.....	55
6	Contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras em log ₁₀ UFC/g da superfície e meio do tanque durante a fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG).....	59
7	Perfil de digestão de BAL isoladas da fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG). Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de <i>Weissella cibaria</i> (<i>Mspl</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinI</i>); 5-7: perfil de <i>Lactobacillus brevis</i> (<i>Mspl</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinI</i>); 8-10: perfil de <i>Enterococcus faecium</i> (<i>Mspl</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinI</i>); 11-13: perfil de <i>Lactobacillus casei/Lb. paracasei</i> (<i>Mspl</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinI</i>).....	60
8	Perfil de digestão de BAL isoladas da fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG). Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de <i>Lactobacillus plantarum</i> (<i>Mspl</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinI</i>); 5-7: perfil de <i>Lactobacillus plantarum</i> (<i>Mspl</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinI</i>); 8-10: perfil de <i>Lactobacillus fermentum</i> (<i>Mspl</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinI</i>); 11-13: perfil de <i>Lactobacillus fermentum</i> (<i>Mspl</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinI</i>).....	61
9	Porcentagem de bactérias do ácido láctico (BAL) isoladas da fermentação de mandioca em Formiga (MG).....	62
10	Contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) em log ₁₀ UFC/g em relação ao tempo de fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG).....	64
11	Perfil de PCR <i>fingerprinting</i> de leveduras isoladas da fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG). Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2, 5-7: perfis de <i>Kazachstania exigua</i> ; 3, 4 e 8: perfis de <i>Candida humilis</i> ; 9 e 10: perfis de <i>Pichia scutulata</i>	66
12	Porcentagem de leveduras isoladas da fermentação de mandioca em Formiga (MG).....	67
13	Contagem de leveduras em log ₁₀ UFC/g em relação ao tempo de fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG).....	67

14	Placa de petri com meio YM contendo 2 % de amido revelado com lugol. A: <i>Candida humilis</i> ; B: <i>Pichia scutulata</i> ; C: <i>Candida ethanolica</i> ; D: <i>Cryptococcus magnus</i> (controle positivo); E: <i>Cryptococcus adaliensis</i> (controle positivo); F: <i>Kazachstania exigua</i> ; G: <i>Geotrichum fragans</i>	72
15	Fermentação de mandioca produzida em escala piloto em biorreatores (bacias de plásticos) inoculados com as culturas iniciadoras. Da esquerda para a direita: A: <i>Lb. brevis</i> ; C: <i>Lb. plantarum</i> ; B+E: <i>Lb. brevis</i> + <i>P. scutulata</i> ; D+F: <i>Lb. plantarum</i> + <i>P. scutulata</i>	76
16	Variação da ATT (%) ao longo do tempo em dias para o acompanhamento da fermentação de mandioca em escala piloto com as culturas selecionadas. A: <i>Lb. brevis</i> ; C: <i>Lb. plantarum</i> ; B+E: <i>Lb. brevis</i> + <i>P. scutulata</i> ; D+F: <i>Lb. plantarum</i> + <i>P. scutulata</i>	77
17	Variação do pH ao longo do tempo em dias para o acompanhamento da fermentação de mandioca em escala piloto com as culturas selecionadas. A: <i>Lb. brevis</i> ; C: <i>Lb. plantarum</i> ; B+E: <i>Lb. brevis</i> + <i>P. scutulata</i> ; D+F: <i>Lb. plantarum</i> + <i>P. scutulata</i>	78
18	Contagem das culturas iniciadoras selecionadas em log ₁₀ UFC/g durante a fermentação de mandioca em escala piloto. A: <i>Lb. brevis</i> ; C: <i>Lb. plantarum</i> ; B+E: <i>Lb. brevis</i> + <i>P. scutulata</i> ; D+F: <i>Lb. plantarum</i> + <i>P. scutulata</i>	80
19	Perfil de digestão de BAL isoladas da fermentação de mandioca em escala piloto. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de <i>Lactobacillus brevis</i> (<i>MspI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i>); 5: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 6-8: perfil de <i>Lactobacillus plantarum</i> (<i>MspI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i>).....	81
20	Perfil de PCR <i>fingerprinting</i> de leveduras isoladas da fermentação de mandioca em escala piloto. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-7: perfis de <i>Pichia scutulata</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAM	Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca
ACELBRA	Associação dos Celíacos do Brasil
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATT	Acidez total titulável
BAL	Bactéria do ácido láctico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CERAT	Centro de Raízes Tropicais
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ESALQ	Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”
ESPM	Estudos de Mercado
FAFAR	Faculdade de Farmácia
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i>
LAMIB	Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise
MG	Minas Gerais
MRS	de Man, Rogosa e Sharpe
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

pH	Potencial hidrogeniônico
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PPGCA	Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
RAPD	DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
RFLP	Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
TBE	Tris-Borato-EDTA
TTA	<i>Total titratable acidity</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
YM	Extrato de malte - extrato de levedura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 MANDIOCA.....	24
3.2 PRODUÇÃO DE MANDIOCA E SEUS DERIVADOS.....	26
3.3 POLVILHO DOCE E POLVILHO AZEDO.....	26
3.4 PROCESSO FERMENTATIVO DO POLVILHO.....	27
3.4.1 Processo Fermentativo do Polvilho Doce.....	27
3.4.2 Processo Fermentativo do Polvilho Azedo.....	28
3.5 IMPORTÂNCIA DO POLVILHO AZEDO.....	31
3.6 MICROBIOTA PRESENTE NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA.....	33
3.7 BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO.....	34
3.8 LEVEDURAS.....	37
3.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO E LEVEDURAS.....	37
3.10 CULTURAS INICIADORAS.....	39
3.11 TÉCNICAS MOLECULARES PARA MONITORAMENTO DE CULTURAS INICIADORAS.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	44
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO.....	45
4.2.1 Isolamento das bactérias do ácido láctico.....	45
4.2.2 Identificação molecular das bactérias do ácido láctico.....	46
4.2.2.1 Extração de DNA.....	46
4.2.2.2 Amplificação por PCR da região 16S do gene do rRNA.....	47

4.2.2.3 Agrupamento pela análise dos perfis moleculares obtidos por RFLP.....	47
4.2.2.4 Amplificação da região 16S do gene do rRNA para a reação de sequenciamento.....	48
4.2.2.5 Purificação dos amplicons.....	48
4.2.2.6 Reação de sequenciamento.....	49
4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS.....	49
4.3.1 Isolamento das leveduras.....	49
4.3.2 Identificação molecular das leveduras.....	50
4.3.2.1 Extração de DNA.....	50
4.3.2.2 Agrupamentos por PCR <i>fingerprinting</i>	50
4.3.2.3 Amplificação do domínio D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA para reação de sequenciamento.....	51
4.3.2.4 Purificação dos amplicons.....	52
4.3.2.5 Reação de sequenciamento.....	52
4.4 AVALIAÇÃO DA ACIDEZ E PH DAS AMOSTRAS OBTIDAS DURANTE A FERMENTAÇÃO NA POLVILHARIA.....	52
4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO OBTIDO NA POLVILHARIA.....	52
4.6 SELEÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS.....	53
4.7 PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA PILOTO.....	54
4.8 AVALIAÇÃO DA ACIDEZ, PH E EXPANSÃO DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO.....	56
4.9 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO.....	56
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS.....	58
5.1.1 Isolamento e identificação molecular das bactérias do ácido láctico	60
5.1.2 Isolamento e identificação molecular das leveduras.....	65
5.2 AVALIAÇÃO DA ACIDEZ E PH DURANTE A FERMENTAÇÃO NA POLVILHARIA.....	68
5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO OBTIDO NA POLVILHARIA.....	71
5.4 SELEÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS.....	71

5.5 PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA PILOTO.....	75
5.5.1 Monitoramento das culturas iniciadoras em escala piloto.....	79
5.5.2 Avaliação da acidez, pH e expansão do polvilho obtido em escala piloto.....	83
5.5.3 Análise microbiológica do polvilho obtido em escala piloto.....	84
6 CONCLUSÕES.....	86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
APÊNDICE A.....	99
APÊNDICE B.....	100
APÊNDICE C.....	101

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ) é uma importante fonte de carboidratos e um alimento altamente energético rico em amido. Industrialmente, é usada como matéria-prima para a extração de amido, produção de álcool, incorporação na fabricação de pão e como material seco para alimentação animal (MLINGI, 1995). Apesar de amplamente consumida, apresenta limitações pela perecibilidade, baixo conteúdo protéico e toxicidade (COOKE & COURSEY, 1981). As raízes de mandioca são processadas de várias maneiras objetivando evitar a sua deterioração pós-colheita, reduzir sua toxicidade, melhorar a palatabilidade de seus produtos derivados e aumentar o valor comercial da mandioca (PADANOU et al., 2010).

A fermentação natural do amido úmido extraído da raiz da mandioca é uma tecnologia tradicional amplamente usada na América Latina, especialmente na Colômbia e no Brasil. Após secagem ao sol, é obtido o produto fermentado da mandioca conhecido como polvilho azedo, que pode ser proveniente da fermentação de polvilho doce, da fécula depositada ou do líquido de prensagem da massa ralada. O polvilho doce e o azedo passam pelo mesmo processo de extração da fécula, mas diferem no tempo de fermentação, que confere teores de acidez diferentes. O produto fermentado é retirado, espalhado em jiraus de bambu e seco ao sol. A maioria dos produtores inicia o processamento pela raiz da mandioca, embora haja alguns que fermentem o polvilho doce extraído e armazenado durante a safra de mandioca (LACERDA, 2006).

A produção mundial de raiz, farinha e fécula de mandioca, em 2009, foi de 242 milhões de toneladas (t), sendo os principais produtores Nigéria, Tailândia e Brasil (ABAM, 2010). Neste mesmo ano, a produção brasileira de fécula de mandioca foi de cerca de 580 mil t, sendo o Paraná o maior estado produtor (ABAM, 2009). Em 2006, do volume total de fécula de mandioca produzida no Brasil, o polvilho azedo representou 3 % e o polvilho doce 2 % (ESPM/SEBRAE, 2008).

O polvilho azedo é um produto típico brasileiro de grande consumo, principalmente, nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, sendo geralmente produzido em indústrias rurais de pequeno e médio porte (ABAM,

2009). Seu maior emprego ocorre na fabricação de biscoitos e pães de queijo. Em se tratando de um produto artesanal, mesmo quando produzido em polvilharias modernas, apresenta qualidade heterogênea.

As alterações que ocorrem na fécula de mandioca, durante a fermentação, são atribuídas ao desenvolvimento de uma microbiota variada proveniente da matéria-prima, da água e dos tanques de fermentação (CEREDA & GRAJ-LEVRA, 1987). Fermentações tipicamente espontâneas resultam de uma atividade competitiva de vários micro-organismos, sendo que aqueles que se adaptam melhor às condições do processo poderão predominar na fermentação. Esses processos ocorrem lentamente e, quando falham, possibilitam contaminações e mesmo a sobrevivência de patógenos (SANNI et al., 1998; HOLZAPFEL, 2002). A sucessão de micro-organismos ocorre naturalmente durante o processo de produção de polvilho e resulta em uma microbiota com a prevalência de bactérias do ácido láctico (BAL) (STREINKRAUS et al., 1983; HOUNHOUIGAN et al., 1993; JOHANSSON et al., 1995), amplamente presentes em alimentos fermentados. Os principais micro-organismos envolvidos na fermentação de mandioca são as BAL, com prevalência do gênero *Lactobacillus*, seguido por leveduras, como *Issatchenkia* spp. e *Galactomyces geothricum* (LACERDA et al., 2005).

Estudos relatam que a associação de BAL e leveduras pode contribuir para a melhoria das características organolépticas de produtos obtidos em processos fermentativos, além de degradar fatores anti-nutricionais. Assim, a incorporação destes micro-organismos como culturas iniciadoras pode servir para aumentar o valor nutricional de alimentos. Além disso, culturas selecionadas servem para aumentar os benefícios gerais de fermentação espontânea e contribuir para o enriquecimento biológico (HOLZAPFEL, 2002).

A grande variação e complexidade da microbiota da fermentação espontânea de mandioca são os principais fatores responsáveis pela pouca homogeneidade e baixa qualidade dos produtos comercializados, sendo a utilização de linhagens selecionadas uma importante alternativa, pois apresenta menor variação no conteúdo de compostos químicos, menor tempo de fermentação, maior rendimento e qualidade (CAPLICE & FITZGERALD, 1999; AIDOO et al., 2006). As BAL são usadas como iniciadoras naturais ou selecionadas em alimentos fermentados. Estas bactérias fermentadoras acidificam o meio, devido à produção de ácido acético e láctico, melhorando o aroma dos alimentos. Além disso, podem protegê-los do

desenvolvimento de micro-organismos patogênicos em decorrência da formação de compostos antimicrobianos (ATRIH et al., 2001; MESSENS & DE VUYST, 2002; NARDI et al., 2005).

O apropriado conhecimento da ecologia de micro-organismos em alimentos fermentados pode contribuir para a melhoria do processo, como, por exemplo, a definição de uma cultura iniciadora que permita a padronização de processos fermentativos (SANNI, 1993). De acordo com SANNI (1993) e KIMARYO et al. (2000), em estudos desenvolvidos na África, o uso de culturas iniciadoras pode ser apropriado para o controle e otimização do processo de fermentação, ao diminuir os problemas de variações das características organoléptica de alimentos fermentados. Antes de introduzir culturas iniciadoras em uma fermentação de pequena escala, é necessário avaliar suas contribuições significativas para a qualidade do produto final e para as propriedades sensoriais do alimento fermentado.

Assim, a posição de destaque da mandioca na dieta mundial, a importância deste alimento para a economia brasileira, as vantagens de sua fermentação para a produção de polvilho azedo, e a falta de padronização neste processamento, associadas à inexistência de trabalhos que proponham uma cultura iniciadora para a produção de polvilho azedo, justificam o desenvolvimento do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, caracterizar e identificar a microbiota predominante na fermentação natural de mandioca, com o intuito de selecionar culturas iniciadoras com características adequadas para a produção de polvilho azedo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras predominantes em diferentes períodos de fermentação de mandioca;
- Identificar os micro-organismos isolados utilizando técnicas de biologia molecular;
- Testar os isolados de BAL e leveduras quanto à produção de ácidos totais e capacidade de degradação do amido;
- Produzir polvilho azedo em escala piloto utilizando culturas puras das linhagens selecionadas de BAL e culturas mistas;
- Avaliar algumas características físico-químicas, tais como acidez e expansão, e microbiológicas do polvilho produzido na polvilharia e a partir das linhagens selecionadas em escala piloto.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ) (Figura 1) constitui-se numa importante fonte de carboidratos e em um alimento altamente energético por apresentar 85 % de amido na matéria seca (CHUZEL,1991). Industrialmente, a mandioca crua é usada como matéria-prima para a extração de fécula e produção de farinha, seus dois principais produtos; e também para produção de álcool; e incorporação na fabricação de pão. Além disso, seu resíduo é utilizado para alimentação animal (ESPM/SEBRAE, 2008). Cultivada em mais de 90 países, a mandioca é classificada como a sexta fonte de energia mais importante na dieta humana mundial (MONTAGNAC et al., 2009). Entretanto, é limitada pela perecibilidade, baixo conteúdo protéico e toxicidade (COOKE & COURSEY, 1981).

Apesar de ser amplamente consumida, a mandioca contém glicosídeos cianogênicos, como a linamarina e lotaustralina, compostos secundários armazenados nas raízes que funcionam como substâncias de defesa contra doenças e predadores. Quando a raiz sofre injúria, ocorre a ruptura de sua estrutura celular e as enzimas presentes degradam estes compostos, liberando o ácido cianídrico (HCN), que é responsável pela toxicidade da mandioca. Em relação ao teor de HCN na raiz fresca sem casca, as variedades com concentrações menores que 50 mg HCN/kg são denominadas “mansas”; entre 50 e 100 mg HCN/kg, moderadamente “venenosas”; e superiores a 100 mg HCN/kg, “bravas” ou “venenosas”. O consumo de 50 a 100 mg de cianeto está associado a intoxicação aguda, sendo que considera-se como dose letal aproximadamente 10 mg de HCN/kg de peso do indivíduo. Contudo, casos de toxicidade aguda são raros e geralmente estão associados a circunstâncias acidentais. A ingestão crônica de pequenas quantidades de cianeto também pode causar graves problemas de saúde (CHISTÉ et al., 2005; MONTAGNAC et al., 2009; UYOH et al., 2009). Para tornar as raízes de mandioca próprias para o consumo humano, estas são submetidas a diferentes métodos de processamento, que variam de local para local. Tais métodos

geralmente visam reduzir a toxicidade, melhorando a palatabilidade de seus produtos derivados e convertendo a raiz fresca perecível em produtos estáveis e com maior valor agregado (UYOH et al., 2009; PADANOU et al., 2010).

Borges & Fukuda (1989) verificaram que a cocção e a fritura proporcionaram redução substancial do conteúdo de cianeto da polpa, sendo este conteúdo reduzido pela cocção entre 56 e 80 % e, pela fritura, entre 70 e 82 %. A rápida deterioração pós-colheita que se manifesta com a perda da qualidade e quantidade de raízes, é resultante de danos mecânicos, fisiológicos e microbiológicos. Os danos fisiológicos, considerados primários, iniciam-se durante as primeiras 24 a 72 horas após a colheita, e são determinados por um processo oxidativo, atribuído aos compostos fenólicos, enquanto que os danos microbiológicos, considerados secundários, ocorrem do quinto ao sétimo dia após a colheita (JANSEN & WHEATLEY, 1985; WHEATLEY, 1987).

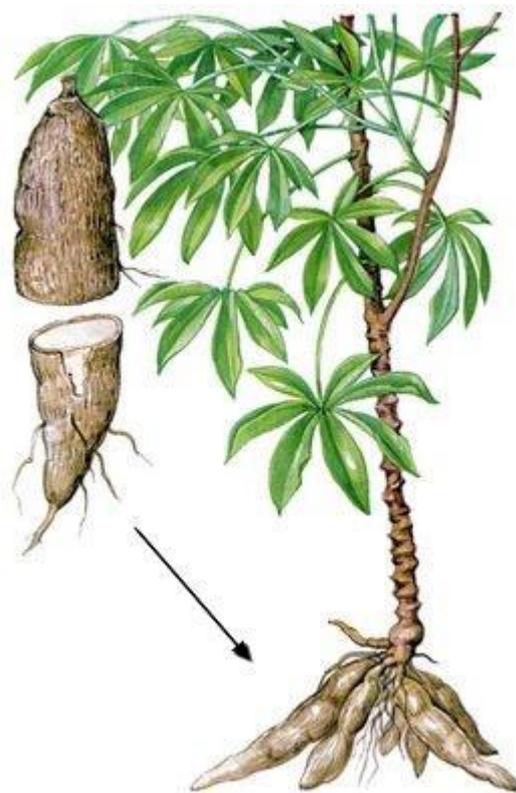


Figura 1 Mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ)

3.2 PRODUÇÃO DE MANDIOCA E SEUS DERIVADOS

A produção mundial de raiz, farinha e fécula de mandioca alcançou, em 2009, 242 milhões de toneladas. Os principais produtores foram Nigéria, que produziu 45 milhões de toneladas (t); Tailândia responsável por 30,1 milhões de t e o Brasil com 26,6 milhões de t (ABAM, 2010). Neste mesmo ano, a produção brasileira de fécula de mandioca foi de cerca de 580 mil t, sendo que a produção do estado do Paraná representou 71 % deste total (ABAM, 2009). A fécula de mandioca apresenta versatilidade de aplicações industriais, sendo que, em 2007, do volume total produzido no Brasil, a fécula nativa representou 61 %, o amido modificado 31 %, o polvilho azedo 5 % e o polvilho doce 3 % (CEPEA/ESALQ-USP, 2007). O polvilho azedo é um produto típico brasileiro de grande consumo, principalmente nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, sendo geralmente produzido em indústrias rurais de pequeno e médio porte. Sua maior utilização se dá na fabricação de biscoitos e pães de queijo, os quais apresentam sabores característicos (LACERDA, 2006).

3.3 POLVILHO DOCE E POLVILHO AZEDO

O polvilho doce e a fécula são produtos similares. No comércio, a denominação de polvilho doce é comumente utilizada para o produto obtido por um curto período de fermentação e seco ao sol, processado em pequenas e médias instalações rurais. 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. O polvilho doce e o azedo passam pelo mesmo processo de extração da fécula, mas diferem no tempo de fermentação, o que confere teores de acidez diferentes. O polvilho azedo é submetido a uma fermentação mais prolongada, após a etapa de decantação da fécula e ambos são secos ao sol (LACERDA, 2006).

A Legislação Brasileira regulamentada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (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 (BRASIL, 1978b). A diferença entre os dois produtos está nos índices de pH, acidez titulável e aspectos gerais como cor, granulação e aroma. As resoluções 12 da CNNPA (BRASIL, 1978a) e 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 (0,50 %).

3.4 PROCESSO FERMENTATIVO DO POLVILHO

3.4.1 Processo Fermentativo do Polvilho Doce

Nas polvilharias de pequeno porte, as etapas para a produção de polvilho doce são realizadas manualmente (Figura 2). As raízes são lavadas em tanques e, em seguida, raladas à mão. A massa é, então, lavada em peneiras até que a água não esteja mais leitosa. No caso de polvilharias de médio porte, após a etapa de ralação, o material é centrifugado. Essa água é recolhida e decantada em cochos de madeira até que a fase sobrenadante se apresente límpida. Remove-se o líquido sobrenadante e as impurezas superficiais. O amido decantado e fermentado por um período de dois a sete dias é submetido a sucessivas lavagens para retirada das demais impurezas e, posteriormente, é seco ao sol e moído (COHEN, 2007).



Figura 2 Fluxograma do processamento de raízes de mandioca para a produção de polvilho doce

3.4.2 Processo Fermentativo do Polvilho Azedo

A fermentação natural do amido úmido extraído da raiz da mandioca é uma tecnologia tradicional largamente usada na América Latina, especialmente na Colômbia e no Brasil. O produto fermentado obtido da mandioca, após secagem ao sol, é conhecido como polvilho azedo no Brasil ou *almidon agrio* na Colômbia (NAKAMURA & PARK, 1975; CÁRDENAS & BUCKLE, 1980). A fermentação, feita tradicionalmente em muitas cidades africanas e na América Latina, visa aperfeiçoar as características de textura, sabor e aroma dos produtos fermentados de mandioca. Os padeiros brasileiros e colombianos geralmente consideram que somente o amido

da mandioca fermentado e seco ao sol pode ser usado para a fabricação de produtos de boa qualidade (MESTRES & ROUAU, 1997).

A temperatura e as condições de secagem exercem grande influência sobre as características do polvilho azedo seco. Aviara et al. (2010) avaliaram o efeito da temperatura de secagem sobre as propriedades físico-químicas da fécula de mandioca. O padrão de cristalinidade do amido não foi afetado por temperaturas de secagem entre 40 e 60 °C em uma estufa, porém o grau de cristalinidade do amido diminuiu com o aumento da temperatura de secagem na faixa mencionada. A capacidade de ligação com a água e a clareza da massa aumentaram, enquanto o poder de inchaço e solubilidade, a viscosidade de pico, a viscosidade de quebra, a viscosidade de reversão e o tempo de pico diminuíram significativamente com o aumento da temperatura de secagem. A viscosidade final aumentou significativamente com o aumento da temperatura de secagem, até certo ponto, e a tendência se inverteu quando a temperatura de secagem aumentou ainda mais.

Vatanasuchart et al. (2005) estudaram as propriedades moleculares do polvilho modificado submetido a diferentes radiações ultravioleta (UV). Para isso modificaram um polvilho comercial com 1 % de ácido láctico por 15 minutos e o expuseram à radiação UVA, UVB e UVC. Os polvilhos irradiados com UVB e UVC por sete e nove horas durante a secagem apresentaram volumes específicos maiores que o polvilho seco em forno de ar quente a 40 °C pelo mesmo tempo, o que indica a formação de uma estrutura de rede estável adequada para a expansão. Isso ocorreu porque as moléculas de amido nas regiões amorfas foram despolimerizadas parcialmente pela hidrólise ácida e pela radiação UV, fornecendo pequenas moléculas lineares que facilitam a formação de uma matriz amorfa de massa de amido quando o polvilho é assado, gerando uma boa expansão. Diniz (2006), ao realizar a caracterização tecnológica do polvilho azedo produzido em diferentes regiões do estado de Minas Gerais, obteve um resultado contrário ao estudo anterior. O autor evidenciou que fatores ambientais, tais como a temperatura média ambiente e a radiação ultravioleta, não parecem contribuir significativamente para a definição das características do polvilho azedo. Contudo, a etapa de secagem é citada entre as mais críticas para as características do produto final.

O que define o polvilho azedo como um produto de características especiais é o modo como é produzido, embora as informações sobre a fabricação sejam bastante contraditórias. O polvilho azedo é obtido pela fermentação do polvilho doce,

podendo também ser produzido a partir da fécula depositada e do líquido de prensagem da massa ralada, um subproduto da fabricação da farinha de mandioca. O processo pode ser considerado como um misto de fermentação submersa e semi-sólida. Isso porque o amido já separado das fibras é, primeiramente, diluído em água e colocado em tanques abertos de fermentação, com perda de água constante até formação de blocos compactos, normalmente cobertos por uma lâmina de água de 10 a 20 cm. Os tanques de fermentação usados podem variar de um rudimentar cocho de madeira até tanques de alvenaria revestidos de cerâmica ou azulejos. Após o término da fermentação, deixa-se secar a superfície do meio até alcançar 30 a 50 % de umidade. Tradicionalmente, o produto fermentado é retirado e espalhado em jiraus de bambu trançado para secar ao sol. A maioria dos produtores inicia o processamento com o emprego direto da raiz da mandioca (Figura 3), embora haja alguns que fermentem o polvilho doce, extraído e estocado previamente durante a safra de mandioca (LACERDA, 2006; COHEN, 2007).

O polvilho azedo é ainda um produto artesanal, mesmo quando fabricado em fecularias modernas, apresentando grande heterogeneidade de qualidade. Apesar de amplamente consumido, é comum a falta de uniformidade entre polvilhos azedos de diferentes marcas comerciais, pois a fermentação geralmente ocorre em indústrias rurais de pequeno e médio porte, podendo durar tradicionalmente de 20 a 70 dias para ser finalizada. Além disso, os produtores também têm seu próprio critério para definir o ponto final do processo fermentativo. Essa avaliação torna o procedimento empírico e sem padronizações, como a verificação visual da superfície da massa fermentada no tanque, a acidez verificada no paladar ou a partir de testes de panificação, os quais medem o poder de expansão dos biscoitos confeccionados. Tendo em vista a falta de padronização e o desconhecimento do processo fermentativo, é comum ocorrer variações na qualidade do produto de uma mesma região, inclusive entre os diferentes lotes obtidos de um mesmo produtor. Isto é preocupante, considerando a grande demanda do polvilho para a produção de pão de queijo de boa qualidade (LACERDA, 2006).



Figura 3 Fluxograma do processamento de raízes de mandioca para a produção de polvilho azedo

3.5 IMPORTÂNCIA DO POLVILHO AZEDO

Há uma grande demanda de polvilho azedo por parte do consumidor, principalmente para ser utilizado em produtos de confeitaria na forma de biscoitos, sequilhos, pão de queijo, bolos, entre outros. Além desses produtos, o polvilho azedo é também muito utilizado como revestimento em ovinhos de amendoim e amendoim japonês. É insubstituível no preparo de biscoito salgado, que se caracteriza por ser um produto muito leve e volumoso, resultado da expansão do

polvilho azedo ao forno (ABAM, 2004). O polvilho azedo é o amido modificado para alimentos mais consumido no Brasil. O aumento de seu consumo por todo país se deve a uma de suas principais aplicações, a elaboração do pão de queijo, que obteve grande introdução no segmento de *fast food* e vem conquistando espaços em mercados internacionais (FANI, 2010).

Produtos feitos a partir de trigo, centeio, cevada e aveia devem ser retirados da dieta de uma quantidade crescente de pessoas que sofrem com a doença celíaca, uma intolerância permanente ao glúten cujo tratamento consiste em excluir esta proteína da dieta (SDEPANIAN et al., 2001). Assim, há um mercado para novos produtos de padaria produzidos a partir de cereais alternativos, como arroz e milho, pseudocereais, como quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), e até mesmo raízes amiláceas, como a mandioca. O polvilho azedo, obtido a partir da fermentação de mandioca, se destaca para a elaboração de produtos de panificação por sua propriedade de expansão peculiar, sem adição de fermento e ausência de glúten. Além disso, há o maior conhecimento por parte dos consumidores sobre a doença celíaca e também sobre os alimentos que podem ser incluídos na dieta em substituição aos que contêm glúten. Os mesmos autores avaliaram a obediência à dieta isenta de glúten e o conhecimento teórico acerca da doença celíaca e seu tratamento por 584 pacientes cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil (ACELBRA) por meio da aplicação de um questionário. Quando questionados sobre quais os produtos que substituem o glúten e que podem ser utilizados no preparo de alimentos dos portadores da doença celíaca, 98,9 % dos pacientes assinalaram a fécula de mandioca; 98,3 %, o polvilho; 97,9 %, a farinha de milho e 97,5 %, a farinha de arroz, sendo que este item teve proporção de acertos superior a 80 %.

Por outro lado, o uso de tais farinhas alternativas é restrito devido à sua baixa qualidade de cozimento, bem como a qualidade sensorial dos produtos assados. A fermentação dessas farinhas alternativas pode melhorar tanto as qualidades sensoriais quanto as de panificação. Contudo, maiores conhecimentos sobre a adaptação e competição de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras na fermentação de massas feitas a partir de cereais alternativos, pseudocereais ou mandioca são necessários (VOGELMANN et al., 2009). Neste contexto, os produtos feitos a partir de polvilho azedo, como biscoitos e pães de queijo, apresentam potencial para fazerem parte da dieta de celíacos.

3.6 MICROBIOTA PRESENTE NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA

Os micro-organismos envolvidos neste tipo de fermentação, em sua maioria são BAL, seguidas de leveduras, as quais se desenvolvem a partir dos metabólitos amilolíticos das primeiras (GIRAUD et al., 1991; 1994; OLASUPO et al., 1996). Vários estudos relatam a possível associação de bactérias e leveduras, podendo estas contribuir para a melhoria das características organolépticas do polvilho azedo. Assim, torna-se imprescindível o estudo sobre a microbiota predominante no polvilho azedo, visando selecionar linhagens iniciadoras puras ou mistas que poderão acelerar o processo fermentativo gerando um produto final com maior qualidade e reprodutibilidade.

As diversas alterações que ocorrem na fécula da mandioca durante a fermentação são atribuídas ao desenvolvimento de uma microbiota variada proveniente da matéria-prima, água e meio ambiente, uma vez que o único substrato empregado restringe-se a uma suspensão de amido granular em água (CEREDA & GRAJ-LEVRA, 1987). Fermentações tipicamente espontâneas resultam de uma atividade competitiva de uma variedade de micro-organismos autóctones e contaminantes. Aqueles que se adaptam melhor às condições dos processos fermentativos poderão eventualmente dominar e serem responsáveis pela fermentação. O processo espontâneo inicia lentamente e pode correr um grande risco em falhar, proporcionando condições para o aparecimento de contaminações e facilitando sobrevivência de patógenos (HOLZAPFEL, 2002; SANNI et al., 1998). A fermentação natural é feita por uma microbiota mista, que aumenta a acidez titulável durante o processo. A sucessão de micro-organismos ocorre naturalmente durante o processo e resulta em uma microbiota com a prevalência de BAL (STREINKRAUS et al., 1983; HOUNHOUIGAN et al., 1993; JOHANSSON et al., 1995). Os principais micro-organismos envolvidos na fermentação de mandioca são as BAL, com prevalência do gênero *Lactobacillus*, seguido por leveduras, como *Issatchenkia* spp., atualmente denominada *Pichia* spp., e *Galactomyces geothricum* (LACERDA et al., 2005).

3.7 BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO

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). Duas principais vias de fermentação de açúcar podem ser distinguidas entre as BAL. A via glicolítica (via Embden-Meyerhof-Parnas) resulta em ácido láctico como produto final, e o metabolismo é denominado fermentação homoláctica. Na fermentação heteroláctica ocorre a via 6-fosfogluconato/fosfoquetolase, que resulta em quantidades significativas de outros produtos finais, como o etanol, acetato, e CO₂ em adição ao ácido láctico produzido. As bactérias lácticas são pertencentes aos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (FRANK et al., 2002). Na indústria de alimentos, 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 chega a cair 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 (REDDY et al., 2008). São largamente utilizadas para a preparação de alimentos fermentados baseados em amido (mandioca, milho, arroz), que são de grande importância nas cidades do sudeste, nordeste e norte do Brasil.

As BAL são as principais responsáveis pelo processo fermentativo da mandioca. CARVALHO et al. (1999) isolaram durante o processo fermentativo para a produção de polvilho azedo, gêneros representativos de cocos homofermentativos, incluindo *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*, sendo que os dois últimos estiveram presentes em menor proporção. Os gêneros *Leuconostoc* e *Enterococcus* predominaram na fase de sedimentação, sendo substituídos por *Lactobacillus* na fase de fermentação. Em todas as etapas do processo foram isoladas espécies de *Lactobacillus*, alcançando 66,7 % do total de isolamentos feitos das amostras coletadas, depois de 36 dias de fermentação. Portanto, pode-se considerar que *Lactobacillus* foi o principal gênero presente no processo, seguido por *Leuconostoc* e outras BAL que têm sido encontradas como micro-organismos

prevalentes associadas à fermentação de mandioca. De acordo com FIGUEROA et al. (1995), a fermentação tradicional de mandioca apresenta uma sucessão de populações microbianas, sendo dominada pelas BAL heterofermentativas, principalmente espécies de *Leuconostoc* iniciando a acidificação, seguido por *Lactobacillus plantarum* que prevalece no processo.

A fermentação de mandioca envolve uma sucessão das populações microbianas, e esta é determinada pela resistência ou sensibilidade dos micro-organismos às condições ácidas desenvolvidas durante o processo (FIGUEROA et al., 1995; AMPE et al. 2001). LACERDA et al. (2005) sugerem que as espécies predominantes são, aparentemente, resistentes às condições ácidas por apresentarem contagens altas durante o processo e, principalmente, no final da fermentação, quando as condições são restritivas para micro-organismos sensíveis a alta acidez presente nesta etapa do processo.

Entre as espécies de BAL frequentemente encontradas nas fermentações tradicionais de mandioca, muitos autores relatam a presença de *Lb. plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus brevis* entre as predominantes (Tabela 1). Estas espécies de BAL, além de predominarem em fermentações de mandioca, já tiveram sua habilidade de degradar glicosídeos cianogênicos descrita (OBILIE et al., 2004; LEI et al., 1999), característica importante durante o processamento para a redução da toxicidade da mandioca.

Tabela 1 Espécies de bactérias do ácido láctico (BAL) identificadas nos diversos produtos fermentados de mandioca

Espécie de bactéria identificada	Produto fermentado de mandioca	Referências
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>akyeke</i>	Obilie et al., 2003, 2004
	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
	<i>gari</i>	Kostinek et al., 2007
	<i>kivunde</i>	Kimaryo et al., 2000
	<i>lafun</i>	Padanou et al., 2009
	polvilho azedo	Omar et al., 2000; Lacerda et al. 2005, 2011
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>akyeke</i>	Obilie et al., 2003, 2004
	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
	<i>gari</i>	Kostinek et al., 2007; Oguntoyinbo & Dodd, 2010
	<i>lafun</i>	Padanou et al., 2009
	polvilho azedo	Omar et al., 2000; Lacerda et al., 2005
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>akyeke</i>	Obilie et al., 2003, 2004
	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
	<i>gari</i>	Kostinek et al., 2007
	polvilho azedo	Lacerda et al., 2011
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>akyeke</i>	Obilie et al., 2003, 2004
	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
	polvilho azedo	Lacerda et al., 2005
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
	polvilho azedo	Omar et al., 2000
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>gari</i>	Oguntoyinbo & Dodd, 2010
	polvilho azedo	Omar et al., 2000
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>akyeke</i>	Obilie et al., 2003, 2004
	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
	polvilho azedo	Lacerda et al., 2011
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>gari</i>	Oguntoyinbo & Dodd, 2010
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
<i>Lactobacillus bifermantans</i>	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
<i>Lactobacillus confusus</i>	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>polvilho azedo</i>	Omar et al., 2000
<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>attiéké</i>	Coulin et al., 2006
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>polvilho azedo</i>	Lacerda et al., 2011
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>gari</i>	Kostinek et al., 2007; Oguntoyinbo & Dodd, 2010
<i>Lactobacillus perolens</i>	<i>polvilho azedo</i>	Lacerda et al., 2005
<i>Leuconostoc fallax</i>	<i>gari</i>	Kostinek et al., 2007
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<i>polvilho azedo</i>	Lacerda et al., 2011
<i>Weissella cibaria</i>	<i>gari</i>	Kostinek et al., 2007
<i>Weissella confusa</i>	<i>lafun</i>	Padanou et al., 2009
<i>Weissella paramesenteroides</i>	<i>gari</i>	Kostinek et al., 2007

3.8 LEVEDURAS

Além das BAL, muitas leveduras foram encontradas nas fermentações tradicionais dos produtos de mandioca, geralmente associadas às BAL, que predominam neste tipo de fermentação. Existem muitos relatos da presença de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação de mandioca (OYEWOLE, 2001; COULIN et al., 2006; SCHWAN et al., 2007; PADANOU et al., 2009). Estudos mostram que esta levedura tem papel importante nesta fermentação, contribuindo para o amolecimento da mandioca e enriquecimento nutricional do produto fermentado (BOONNOP et al., 2004; PADANOU et al., 2010).

Vários estudos revelam a presença do gênero *Candida* na fermentação de mandioca para obtenção de diferentes produtos. A espécie *Candida tropicalis* é umas das predominantes e já foi encontrada na fermentação para produção de *fufu*, polvilho azedo, *attiéké* e *lafun* (OYEWOLE, 2001; LACERDA et al., 2005; COULIN et al., 2006; PADANOU et al., 2009). A levedura *Candida krusei* também é frequentemente isolada e já foi identificada na fermentação de *fufu*, *attiéké* e *gari* (OYEWOLE, 2001; COULIN et al., 2006; OGUNTOYINBO, 2008). Outras espécies do gênero *Candida* foram isoladas da fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo, *Candida rugosa*, *Candida humilis* e *Candida ethanolica* (LACERDA et al., 2005), e de *gari*, *Candida guilliermondii*, *Candida maris* e *Candida glabrata* (OGUNTOYINBO, 2008). Esta última também foi isolada do *lafun*, juntamente com *Pichia scutulata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia kudriavzevii* e *Trichosporon asahii* (PADANOU et al., 2009).

3.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO E LEVEDURAS

Estudos relatam que a associação entre BAL e leveduras pode contribuir para a melhoria das características organolépticas do polvilho azedo (OYEWOLE & ODUNFA, 1990; AMOA-AWUA et al., 1996; HANSEN & HANSEN, 1996). As BAL produzem uma condição ácida que, apesar de inibir o crescimento de alguns microorganismos, favorece o crescimento de leveduras. Por outro lado, as leveduras

fornece fatores de crescimento para as BAL. Além disso, algumas BAL são produtoras de α -amilase que, ao hidrolizarem a molécula de amido, formam derivados utilizáveis pelas leveduras. Algumas BAL e leveduras associadas em alimentos fermentados são capazes de degradar fatores antinutricionais, como ácido fítico 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 digestibilidade de proteínas e a biodisponibilidade de nutrientes, e contribuem mais especificamente para o enriquecimento biológico através da biossíntese de vitaminas e aminoácidos essenciais (HOLZAPFEL, 2002).

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, usaram BAL e leveduras como culturas puras e também em associação. Todas 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 abaixaram levemente o pH e aumentaram a acidez do meio em 24 horas. Em associação com as BAL, tiveram um efeito modesto na acidez final. Os autores concluíram que todas as BAL poderiam ser usadas como culturas puras para a produção de *togwa*, mas que seu uso em associação com uma levedura aumentou a produção de compostos voláteis responsáveis pelo sabor do produto. O aumento da produção de metabólitos pela cultura mista pode ser um indicativo da interação entre BAL e leveduras.

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, sendo a utilização de linhagens selecionadas uma importante alternativa para estes processos fermentativos. A fermentação conduzida por linhagens iniciadoras apresenta menor variação no conteúdo de compostos químicos, menor tempo de fermentação e, por consequência, maior rendimento e qualidade (CAPLICE & FITZGERALD, 1999; AIDOO et al., 2006).

3.10 CULTURAS INICIADORAS

O melhor conhecimento da ecologia de micro-organismos em alimentos fermentados pode ter consequências diretamente aplicáveis no aprimoramento do processo fermentativo. Uma destas consequências seria a caracterização de uma cultura iniciadora microbiana para a padronização dos processos fermentativos para a fabricação de diferentes produtos (SANNI, 1993). De acordo com SANNI (1993) e KIMARYO et al. (2000), o uso de culturas iniciadoras pode ser apropriado para o controle e otimização do processo de fermentação, para diminuir os problemas de variações das características sensoriais de alimentos fermentados. O desenvolvimento de culturas iniciadoras tem sido sugerido como um dos pré-requisitos para o estabelecimento de produção industrial de pequena escala de alimentos fermentados na África e Ásia (SANNI, 1993; AIDOO et al., 2006). Antes de introduzir culturas iniciadoras em uma fermentação de pequena escala, deve-se avaliar se estas contribuem significativamente para uma melhoria no processo e qualidade do produto, principalmente em relação a uma acidificação rápida ou acelerada, fermentação mais uniforme, atributos sensoriais desejáveis, riscos higiênicos reduzidos e alimentos seguros (HOLZAPFEL, 1997). A predominância de culturas iniciadoras é baseada, principalmente, no sucesso competitivo da iniciadora em relação à microbiota natural, resultando em uma boa padronização das propriedades sensoriais do alimento fermentado (GARDNER et al., 2001).

As BAL são usadas como iniciadoras naturais ou selecionadas em alimentos fermentados. Estas bactérias acidificam o meio, devido à produção de ácido acético e láctico, e são responsáveis pela produção de aroma. Também podem proteger o alimento da contaminação por micro-organismos patogênicos em decorrência da produção de ácidos orgânicos; peróxido de hidrogênio; diacetil, composto com anel aromático (fenilalanina) ligado *in tandem* a resíduos ($n = 1$ a 6) de m/z 192, provavelmente heptose; e bacteriocinas (ATRIH et al., 2001; MESSENS & DE VUYST, 2002; NARDI et al., 2005; GÁLVEZ et al., 2007).

Estudos sobre a caracterização da microbiota de produtos tradicionais de mandioca fermentada revelaram uma grande diversidade de BAL e leveduras envolvidas na fermentação. As espécies mais competitivas relatadas na literatura são *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *S. cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis*

(VOGELMANN et al., 2009). Estes autores investigaram a adaptação e competitividade destas BAL e leveduras como culturas iniciadoras. Para a fermentação da massa de mandioca, foram inoculados 1 % de *S. cerevisiae* e 10 % de uma mistura de culturas iniciadoras consistindo de BAL (*Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* e *Lactobacillus casei* em menor proporção) e leveduras (*Issatchenkia orientalis*, *Torulaspota* sp. e outras leveduras desconhecidas). No final da fermentação, a maioria das cepas das culturas iniciadoras fez parte da microbiota dominante, sendo que *Lb. plantarum* foi a espécie predominante na massa fermentada de mandioca.

Kostinek et al. (2007) selecionaram *Lb. plantarum* como cultura iniciadora. Huch (*née* Kostinek) et al. (2008) testaram esta BAL e *Lb. fermentum* como culturas iniciadoras em um estudo piloto no Quênia para determinar seu potencial para predominar durante a fermentação de mandioca. A utilização destas cepas em números elevados resultou claramente em uma contagem um a dois logaritmos mais elevada de BAL durante toda fermentação quando comparada com o controle não inoculado. O monitoramento molecular indicou que *Lb. plantarum* foi bem sucedido em afirmar-se como uma cepa predominante, o que não aconteceu com *Lb. fermentum*. O sucesso das linhagens de *Lb. plantarum* para predominar na fermentação de mandioca demonstra sua capacidade 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 BAL como culturas iniciadoras também para a produção de *gari* e os resultados indicaram que *Lb. plantarum* poderia ser produzido como cultura iniciadora a baixo custo.

3.11 TÉCNICAS MOLECULARES PARA MONITORAMENTO DE CULTURAS INICIADORAS

A fermentação espontânea de substratos de cereais e da mandioca é utilizada em todo o mundo, resultando em uma enorme variedade de produtos tradicionais, como *agbelima* e *fufu*, produtos africanos produzidos a partir da massa de mandioca fermentada. Estudos sobre a caracterização da microbiota de tais produtos tradicionais revelaram uma grande diversidade de BAL e leveduras

envolvidas na fermentação. A microbiota de tais fermentações tradicionais tem sido muito estudada, mas não de forma sistemática. Faltam informações sobre as condições de fermentação e a identificação das espécies é muitas vezes baseada apenas em critérios fisiológicos, conhecidos por serem insuficientes para a identificação de BAL (VOGELMANN et al., 2009).

OMAR et al. (2000) estudaram a diversidade molecular de BAL isoladas da fermentação de mandioca para a produção de polvilho azedo. As técnicas de monitoramento aplicadas neste estudo foram DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD), hibridização usando sondas filogenéticas de RNA e sequenciamento parcial da subunidade 16S do RNA. Os resultados revelaram uma alta riqueza de espécies, incluindo *Lactobacillus manihotivorans*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchneri*, *Lb. fermentum*, *Ln. mesenteroides* e o gênero *Pediococcus*. As espécies predominantes foram *Lb. plantarum* e *Lb. manihotivorans*.

Um total de 375 BAL foi isolado a partir da fermentação de mandioca para a produção de *gari* na África do Sul, Benim, Quênia e Alemanha, e caracterizado por testes fenotípicos e genotípicos. Os grupos isolados em ordem decrescente de predominância foram: bastonetes heterofermentativos facultativos, principalmente cepas do grupo *Lb. plantarum* (54,4 %); bastonetes heterofermentativos obrigatórios, pertencentes ao gênero *Lactobacillus* ou *Weissella* (14,1 %); cocos heterofermentativos, pertencentes aos gêneros *Weissella* ou *Leuconostoc* (13,9 %); cocos homofermentativos (13,3 %) e bastonetes homofermentativos obrigatórios. Propriedades bioquímicas, como a produção de enzimas e compostos antimicrobianos, rápida acidificação do meio e fermentação de açúcares, foram avaliadas para a seleção de culturas iniciadoras. Um total de 32 linhagens com propriedades bioquímicas desejáveis foram pré-selecionadas e identificadas utilizando *rep-PCR fingerprinting* em combinação com sequenciamento da região 16S do gene do rRNA. Nenhuma das linhagens selecionadas era produtora de α -amilase, o que é surpreendente, já que a mandioca contém 85 % dos seus carboidratos na forma de amido. Dessas cepas, 18 foram identificadas como *Lb. plantarum*, quatro como *Lb. pentosus*, duas de cada como *Ln. fallax*, *W. paramesenteroides* e *Lb. fermentum*, uma de cada como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Weissella cibaria*, enquanto duas permaneceram não identificadas. Essas cepas foram investigadas, utilizando RAPD-PCR, e, após a análise das relações clonais, 16 cepas foram finalmente

selecionadas para o desenvolvimento de culturas iniciadoras para a produção de *gari* (KOSTINEK et al., 2007).

Técnicas rápidas como Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) e Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) têm sido úteis para revelar a diversidade microbiana em alimentos (MEROTH et al., 2003). A DGGE de fragmentos do gene rRNA gerados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi demonstrada como uma ferramenta útil para a caracterização rápida das espécies pertencentes à microbiota dominante da fermentação. PCR-DGGE foi utilizado com sucesso não só para caracterizar a microbiota, mas também para monitorar o desenvolvimento de sua composição durante a fermentação em longo prazo (VOGELMANN, et al., 2009). AMPE et al. (2001), em um estudo molecular utilizando técnica independente de cultivo, DGGE, feito durante a fermentação tradicional de amido azedo de mandioca, confirmaram que este processo é dominado pelas BAL, como previamente sugeriram muitos autores (FIGUEROA et al., 1995; OMAR et al., 2000).

A adaptabilidade de BAL e leveduras em massa azeda preparada a partir de cereais, pseudocereais e mandioca foi investigada por VOGELMANN et al. (2009) usando as técnicas de PCR-DGGE e cultura bacteriológica combinados com RAPD-PCR e sequenciamento do gene do rRNA. As fermentações foram inoculadas com uma mistura de culturas iniciadoras, isoladas previamente a partir de fermentações tradicionais, e continuamente propagadas até que uma microbiota estável fosse estabelecida. Para a fermentação da massa azeda de mandioca foram inoculados 1 % de fermento de padaria e 10 % de culturas iniciadoras, consistindo de $2,0 \times 10^6$ BAL (45 % de *Lb. fermentum*, 45 % de *Lb. plantarum* e 10 % de bactérias do grupo *Lb. casei*) e $5,3 \times 10^5$ leveduras (70 % de *I. orientalis*, 20 % de *Torulaspota* spp. e 10% de leveduras desconhecidas). Ao final da fermentação da massa azeda de mandioca, as espécies presentes eram *S. cerevisiae*, *Lb. fermentum*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lb. plantarum* (espécie dominante) e *Lactobacillus spicheri*. Por comparação dos padrões de RAPD dos isolados obtidos da fermentação foi possível rastrear a origem das BAL e leveduras predominantes na microbiota.

Rodtong & Tannock (1993) sugeriram que a análise de RFLP da região 16S do gene do rRNA foi o método aceitável para a tipagem de linhagens de espécies de *Lactobacillus*. Sato et al. (2000) estudaram a identificação de BAL isoladas do vinho tinto também pela técnica da análise de RFLP da região 16S do gene do rRNA e

concluíram esta análise foi útil na identificação de linhagens de *Oenococcus oeni*, que exibiram padrões únicos com a digestão pela enzima *HaeIII*. Guyot et al. (2003) foram bem sucedidos em seus estudos, ao caracterizar e diferenciar linhagens de *Lb. manihotivorans* isoladas de polvilho azedo usando esta mesma técnica.

Em relação à identificação de leveduras, a técnica de PCR-*fingerprinting* tem se mostrado uma alternativa eficiente. Silva-Filho et al. (2005) avaliaram a dinâmica da população de leveduras no processo de fermentação do etanol combustível e usaram PCR-*fingerprinting* com o iniciador microsátelite (GTG)₅ para discriminação das leveduras isoladas da fermentação em destilarias. Os isolados de leveduras produziram um padrão básico de bandas que possibilitou identificá-los como *S. cerevisiae*. Além disso, espécies semelhantes morfológicamente, tais como *Saccharomyces paradoxus* apresentaram um padrão de amplificação completamente diferente, o que provou a eficiência do método.

O processo fermentativo para a produção de polvilho azedo ainda é pouco estudado, embora o produto seja muito consumido na América Latina, principalmente no Brasil, e esteja ganhando destaque na elaboração de produtos de panificação com reduzido teor ou ausência de glúten. Desta forma, a análise da microbiota predominante na fermentação de mandioca, bem como o isolamento e a pesquisa de culturas iniciadoras contribuem significativamente para o conhecimento e otimização do processo de produção de polvilho azedo. Isso porque podem levar à redução do tempo de fermentação, à obtenção de um polvilho padronizado e de maior qualidade, facilitar a determinação do ponto final da fermentação, além de aumentar a lucratividade do produtor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas em uma polvilharia localizada em Formiga (Minas Gerais, Brasil) (Figura 4) durante o processo fermentativo de mandioca que teve duração total de 56 dias, no período de 18 de maio a 27 de junho de 2012. As amostras, de aproximadamente 100 g, foram coletadas no início do processo, nos tempos zero (na saída da centrífuga com destino ao tanque de fermentação) e cinco dias, no meio da fermentação, nos tempos 12, 19 e 26 dias, e no final, com 33 e 40 dias. Foram utilizados dois frascos previamente esterilizados para coletar uma amostra da superfície e outra do meio do tanque. As 14 amostras coletadas foram transportadas em caixas de isopor contendo gelo para o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG, sendo processadas em no máximo 24 horas após a coleta. Além disso, foi coletada uma amostra do produto final, polvilho azedo, seco e embalado após os 56 dias de fermentação.



Figura 4 Tanque de fermentação de mandioca do qual foram realizadas as coletas na polvilharia em Formiga (MG)

Vinte cinco gramas de cada amostra foram diluídas em 225 mL de água peptonada a 0,1 % esterilizada e alíquotas de 0,1 mL das diluições decimais foram inoculadas em meios de cultura específicos para a multiplicação dos microorganismos de interesse (SILVA et al., 2010).

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO

4.2.1 Isolamento das bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico (BAL) foram isoladas a partir do plaqueamento em superfície das amostras em ágar MRS (de Man, Rogosa e Sharpe, Himedia) acrescido de 0,01 % de ciclohexamida. As placas foram incubadas em jarras de

anaerobiose de 2,5 L (Permutation) por 48 horas a 37 °C (SIQUEIRA, 1995). Decorrido este período, foram feitas as contagens e descrições dos diferentes morfotipos e a subsequente purificação em ágar MRS. A contagem dos isolados foi expressa em UFC/g. Os micro-organismos predominantes foram contados e três representantes de cada morfotipo foram purificados e crescidos em caldo MRS a 37 °C por 48 horas, em anaerobiose, e então congelados em criotubos esterelizados em freezer a - 86 °C, após a adição de 10 % de glicerol esterilizado, para posterior identificação.

A partir das culturas puras foram realizados os testes preliminares de coloração de Gram e a reação de catalase (NORRIS et al., 1981). Os isolados com perfis morfológicos semelhantes foram agrupados por meio da técnica de digestão do DNA total com enzimas de restrição, para posterior identificação utilizando o sequenciamento parcial da região 16S do gene do rRNA.

4.2.2 Identificação molecular das bactérias do ácido láctico

4.2.2.1 Extração de DNA

O DNA total das BAL foi extraído a partir de uma adaptação do método descrito por Hoffman & Winston (1987). As colônias previamente crescidas em ágar MRS foram ressuspendidas em 100 µL de Tris-EDTA (TE). A seguir, foi adicionado 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) e 0,3 g de pérolas de vidro à suspensão. Os tubos contendo essa mistura foram então levados ao Vortex (QL-901, Biomixer) por três a quatro minutos e centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos (MiniSpin[®] Eppendorf). Decorrido o tempo, retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para outro tubo. Então, adicionou-se ao tubo um volume de etanol a 96 % correspondente ao volume de sobrenadante recuperado. Os tubos foram então homogeneizados por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por dois minutos (MiniSpin[®] Eppendorf). A fase líquida foi descartada, os tubos foram secos *overnight* e o DNA ressuspendido em 50 µL de TE. A dosagem de DNA foi realizada em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

4.2.2.2 Amplificação por PCR da região 16S do gene do rRNA

O DNA das BAL foi submetido à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região 16S do gene do rRNA, utilizando-se os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') conforme Lane (1991). Os ensaios foram realizados utilizando-se 5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 3 µL de MgCl₂ 1,5 mM (MBI Fermentas), 1 µL do iniciador 27F 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 1 µL do iniciador 1492R 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 0,25 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 50 µL. A reação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Mastercycler® pro) e apresentou as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, trinta ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por um minuto e meio, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1 % em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 % a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

4.2.2.3 Agrupamento pela análise dos perfis moleculares obtidos por RFLP

As BAL foram agrupadas por análise dos perfis moleculares obtidos por polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) por meio da digestão com as três enzimas de restrição, *MspI*, *HaeIII* e *HinfI*, capazes de diferenciar as espécies de BAL, seguindo a metodologia de Brightwell et al. (2006) modificada. Para a reação de digestão, foram adicionados a cada tubo 2 µL de tampão 10X, 2 µL de albumina de soro bovino (BSA) apenas para a enzima *MspI*, 1 µL de enzima, DNA ≤ 1500 ng/µL e água q.s.p. 20 µL. Os tubos foram incubados a 37 °C por três horas.

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

4.2.2.4 Amplificação da região 16S do gene do rRNA para a reação de sequenciamento

Um isolado de cada perfil molecular diferenciado pela técnica de digestão com enzimas de restrição (RFLP) foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região 16S do gene do rRNA. Para a reação foram utilizados os iniciadores 27F e 1492R, conforme citado anteriormente no item 4.2.2.2 (LANE, 1991). Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1 % em tampão TBE 0,5 % a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

4.2.2.5 Purificação dos amplicons

Os amplicons (produtos de PCR) obtidos foram purificados mediante técnica com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e etanol absoluto (APPLIED BIOSYSTEMS, 2002). Inicialmente foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto a 45 µL dos produtos de PCR. Os tubos foram homogeneizados e, então, centrifugados a 13.000 rpm por 25 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi retirado. Imediatamente depois adicionou-se 120 µL de etanol 70 % gelado aos tubos, os quais foram homogeneizados e centrifugados a 13.000 rpm por dez minutos (MiniSpin® Eppendorf). O etanol foi removido e os tubos foram secos *overnight*. Decorrida essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 10 µL de água deionizada, os

tubos levados ao Vortex (QL – 901, Biomixer) por 15 segundos e incubados em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. A dosagem de DNA foi realizada em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

4.2.2.6 Reação de sequenciamento

As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1, do serviço da Myleus Biotecnologia, do Laboratório de Genética Animal, na Escola de Veterinária da UFMG. Para a análise das sequências, foi utilizado o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão 2.215 do BLAST 2.0 disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), para a comparação com as sequências já depositadas no GenBank.

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS

4.3.1 Isolamento das leveduras

As leveduras foram isoladas em ágar extrato de malte - extrato de levedura – YM (extrato de malte 0,3 %, extrato de levedura 0,3 %, peptona 0,5 %, glicose 1,0 %, ágar 2,0 %), contendo 0,02 % de cloranfenicol. As placas foram incubadas aerobicamente por 48 horas a 25 °C (ROSSITA & FLEET, 1996). Os diferentes morfotipos de leveduras foram descritos e quantificados, sendo a contagem dos isolados expressa em UFC/g. Os micro-organismos predominantes foram contados e três representantes de cada morfotipo foram purificados e cultivados em caldo GYMP (glicose 2,0 %, extrato de levedura 0,5 %, extrato de malte 1 % e fosfato de sódio monobásico 0,2 %) a 25 °C por 48 horas e então congeladas em criotubos esterilizados em freezer a - 86 °C, após a adição de 20 % de glicerol esterilizado, para posterior identificação.

4.3.2 Identificação molecular das leveduras

4.3.2.1 Extração de DNA

O DNA total de cada isolado das leveduras foi extraído utilizando a metodologia de Silva-Filho et al. (2005) modificada. As leveduras, depois de serem crescidas em ágar YM, foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise (Tris-HCL – trishidroximetilaminometano – 0,05 M, EDTA 0,05 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato – 1%). Os tubos, contendo essa suspensão, foram incubados em banho-maria a 65 °C por 35 minutos. Decorrido esse tempo foi adicionado 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) aos tubos e esses levados ao Vortex (QL – 901, Biomixer) por três minutos e centrifugados por 15 minutos (MiniSpin® Eppendorf). O sobrenadante foi então retirado e transferido para outro tubo, onde foi adicionado 100 µL de etanol 70 % gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por três minutos (MiniSpin® Eppendorf). O etanol foi removido e os tubos foram secos *overnight*. Concluída essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 100 µL de TE, e armazenado em freezer a - 20 °C.

4.3.2.2 Agrupamentos por PCR *fingerprinting*

As leveduras foram agrupadas por análise dos perfis moleculares obtidos por PCR *fingerprinting* utilizando o iniciador microsatélite (GTG)₅, seguindo a metodologia de Lieckfeldt et al. (1993). Para a reação, foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,1 mM (Invitrogen, EUA), 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 mM (MBI Fermentas), 2 µL do iniciador (GTG)₅ 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 25 µL. A PCR foi realizada em um termociclador Eppendorf (Mastercycler® pro) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por

45 segundos, anelamento a 50 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minuto, seguidos de extensão final a 72 °C por seis minutos.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1 % em tampão TBE 0,5 % (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 80 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

4.3.2.3 Amplificação do domínio D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA para reação de sequenciamento

Um isolado de cada perfil molecular obtido foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA conforme descrito por Lachance et al. (1999). Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Os ensaios foram realizados utilizando-se 5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 3 µL de MgCl₂ 1,5 mM (MBI Fermentas), 1 µL do iniciador NL1 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 1 µL do iniciador NL4 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA) 0,2 µL de taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 50 µL. A reação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Mastercycler® pro) e apresentou as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por dois minutos, trinta e cinco ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 25 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1 % em tampão TBE 0,5 % a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

4.3.2.4 Purificação dos amplicons

A purificação dos amplicons foi realizada como no item 4.2.2.5.

4.3.2.5 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada como no item 4.2.2.6.

4.4 AVALIAÇÃO DA ACIDEZ E PH DAS AMOSTRAS OBTIDAS DURANTE A FERMENTAÇÃO NA POLVILHARIA

As 14 amostras coletadas dos tanques de fermentação de mandioca e a amostra de polvilho azedo seco foram avaliadas quanto às seguintes características físico-químicas: acidez total titulável (ATT) e pH. A ATT foi determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M utilizando solução de fenolftaleína como indicador e foi expressa em mililitros de NaOH por 100 g de matéria seca (IAL, 2008). Nos resultados, estes dados foram expressos em porcentagem de volume por massa. A determinação do pH foi feita por leitura direta do líquido sobrenadante em potenciômetro, após mistura de 10 g da amostra em 100 mL de água destilada (IAL, 2008).

4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO OBTIDO NA POLVILHARIA

A amostra do produto final obtido da polvilharia, polvilho azedo, seco após 56 dias de fermentação, foi avaliada quanto aos parâmetros microbiológicos para amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados, contidos na Resolução RDC 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001). Foram realizadas

análises microbiológicas de *Bacillus cereus*, Coliformes a 45 °C e *Salmonella* spp. (BENNETT & BELAY, 2001). Além disso, foi feito o plaqueamento em superfície em ágar MRS contendo 0,01 % de ciclohexamida para o isolamento de BAL e o plaqueamento em superfície em ágar YM contendo 0,02 % de cloranfenicol para o isolamento de leveduras.

4.6 SELEÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS

As BAL predominantes previamente selecionadas e identificadas foram testadas quanto à degradação do amido em ágar MRS contendo 2 % de amido solúvel (SANNI et al., 2002) e as leveduras predominantes previamente selecionadas foram testadas quanto à degradação do amido em ágar YM contendo 2 % de amido solúvel (KURTZMAN & FELL, 1998, LALUCE et al., 1988; YARROW, 1998). Após o crescimento, a revelação foi realizada com solução de lugol-iodo para visualização da hidrólise do amido. Como controles positivos, foram utilizadas linhagens amilolíticas das leveduras *Cryptococcus magnus* e *Cryptococcus adaliensis*, obtidas da coleção de cultura de leveduras do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do Departamento de Microbiologia do ICB da UFMG.

Além disso, também foi avaliada a produção de ácidos totais pelo inóculo das culturas em 100 mL de caldo contendo 2 % de fécula de mandioca (amido não fermentado), 1 % de glicose e 0,5 % de extrato de carne (LACERDA, 2006), sendo o processo fermentativo mantido por 24 a 48 horas. Em seguida, alíquotas de 10 mL do caldo foram retiradas e utilizadas para a dosagem de acidez total por titulometria com hidróxido de sódio 0,1 M, segundo IAL (2008). Os isolados de BAL e leveduras predominantes que apresentaram maiores valores de acidez e halos de degradação de amido foram posteriormente testados como iniciadores para a produção de polvilho azedo em escala piloto.

4.7 PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA PILOTO

Culturas puras das linhagens de BAL selecionadas e culturas mistas das mesmas em associação com a levedura selecionada 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 e incubadas a temperatura ambiente por 24 a 48 horas (LACERDA, 2006). Em seguida, todo o cultivo foi empregado para inocular 500 mL do mesmo meio de cultivo, mantido em condições de temperatura ambiente, por um período de aproximadamente 24 a 48 horas. O cultivo resultante foi usado para inocular 5 L de um meio contendo água destilada e 10 % de fécula de mandioca, a temperatura ambiente por aproximadamente 30 dias. As contagens do inóculo final foram de cerca de 8 log UFC/mL para as BAL selecionadas e de 6 log UFC/mL para as leveduras. Foi empregado como biorreator uma bacia de plástico com características que se assemelham o máximo possível às condições de fermentação empregadas na indústria (polvilharia), como formato e dimensões. Assim, a fermentação foi realizada em uma bacia retangular com 39,4 cm de comprimento, 31,9 cm de largura, 15,4 cm de profundidade e com um volume total de 11,7 L (Figura 5). As bacias foram cobertas com um tecido reticulado de algodão em formato retangular para evitar a entrada de insetos. Todos os ensaios foram realizados sem aeração (agitação).



Figura 5 Biorreator (bacia de plástico) no qual foram realizadas as fermentações em escala piloto

Foram coletadas amostras de 10 mL de vários pontos do biorreator, 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, por leitura direta do líquido sobrenadante (IAL, 2008), e ATT, por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M utilizando solução de fenolftaleína como indicador (IAL, 2008), além da verificação da viabilidade das culturas iniciadoras.

O monitoramento das culturas iniciadoras durante o período de fermentação, isto é, a verificação da permanência da(s) linhagem(s) iniciadora(s), foi realizado utilizando a metodologia molecular mencionada anteriormente. Para as BAL, essa metodologia foi realizada até a etapa da digestão (BRIGHTWELL et al., 2006) descrita no item 4.2.2.3. Já no caso das leveduras, a metodologia foi realizada até a etapa de PCR *fingerprinting* (LIECKFELDT et al., 1993) descrita no item 4.3.2.2. E os perfis de bandas obtidos foram comparados aos perfis já conhecidos das culturas iniciadoras utilizadas.

Após o final da fermentação, o material foi seco a temperatura ambiente por cinco dias no laboratório. Em seguida, foi acondicionado em frascos estéreis e armazenado sob temperatura de refrigeração até a realização dos testes.

4.8 AVALIAÇÃO DA ACIDEZ, PH E EXPANSÃO DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO

Algumas características físico-químicas dos diferentes polvilhos produzidos em escala piloto, ATT (IAL, 2008), pH (IAL, 2008) e a análise de expansão da massa, foram utilizadas como critérios para avaliar as culturas iniciadoras testadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A análise de expansão da massa foi realizada conforme procedimento proposto pelo Centro de Raízes Tropicais – CERAT (MAEDA & CEREDA, 2001). Foram pesados 50 g do polvilho, aos quais foram adicionados cerca de 40 mL de água destilada fervente. Cada massa foi modelada para a confecção de biscoitos redondos de aproximadamente 10 g cada. Os diâmetros dos biscoitos foram medidos com um paquímetro universal (Série 530, Mitutoyo) antes e depois de levá-los ao forno por um período de 20 minutos a 220 °C. O índice de expansão foi calculado pela relação entre diâmetro médio final (após assado) e o diâmetro médio inicial (antes de assado). A amostra do produto final, polvilho azedo, seco após 56 dias de fermentação também foi submetida à análise de expansão para comparação dos resultados com as amostras de polvilhos produzidos em escala piloto.

4.9 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO

Os diferentes polvilhos produzidos em escala piloto foram avaliados quanto aos parâmetros microbiológicos para amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados, contidos na Resolução RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001). Foram realizadas análises microbiológicas de *Bacillus cereus*, Coliformes a 45 °C e *Salmonella* spp. (BENNETT & BELAY, 2001).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância em blocos casualizados com parcelas subdivididas e as diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo Teste de Tukey com nível de significância de 0,05. Os parâmetros avaliados para os polvilhos obtidos a partir da fermentação com diferentes culturas iniciadoras em comparação com o polvilho azedo comercial produzido pela polvilharia de Formiga (MG) 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 COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

A figura 6 apresenta os dados das contagens de micro-organismos obtidas nas 14 amostras analisadas. As bactérias do ácido láctico (BAL) estiveram presentes da primeira à última coleta tanto na superfície quanto no meio do tanque com contagens maiores que as obtidas para as leveduras, variando da ordem de 5,84 a 7,88 \log_{10} UFC/g. As leveduras estiveram presentes desde o início até o 19º dia de fermentação, no meio e na superfície do tanque, e a partir do 26º dia apareceram em contagens baixas apenas na superfície, sendo que suas contagens durante a fermentação variaram da ordem de 1,67 a 7,79 \log_{10} UFC/g. As contagens de BAL e leveduras diferiram entre si ($p < 0,001$). Contudo, as contagens de superfície e meio não diferiram entre si para o mesmo tipo de micro-organismo.

As contagens de BAL, ligeiramente superiores às contagens de leveduras em todas as amostras analisadas, são indício da importância que as bactérias têm na fermentação de mandioca. Na amostra de polvilho azedo seco, não foi encontrada nenhuma levedura ou BAL.

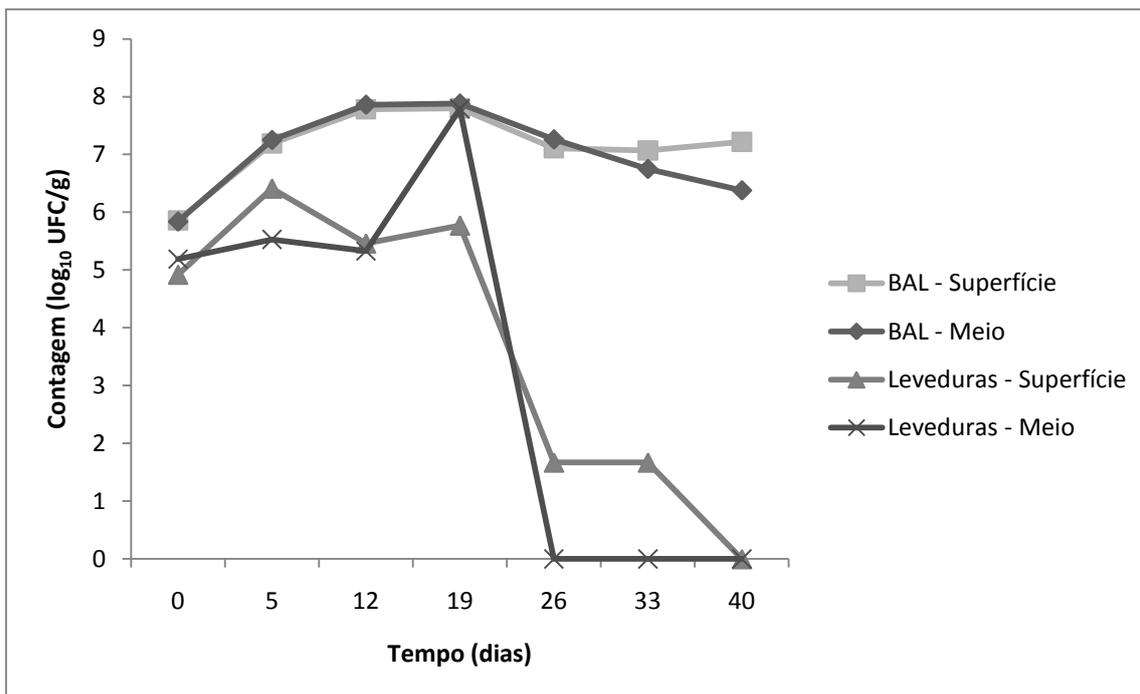


Figura 6 Contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras em \log_{10} UFC/g da superfície e meio do tanque durante a fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG)

Muitos autores relatam a presença de BAL como predominantes em fermentações de mandioca (OBILIE et al., 2004; LACERDA et al. 2005; COULIN et al., 2006; KOSTINEK et al., 2007; HUCH (*née* KOSTINEK) et al., 2008; PADANOU et al., 2009; OGUNTOYINBO & DODD, 2010; LACERDA et al., 2011). Coulin et al. (2006) caracterizaram a microbiota do *attiéké*, um produto africano fermentado de mandioca, durante preparação tradicional em pequena escala. As BAL foram os micro-organismos predominantes durante toda a fermentação com contagens de $1,2 \times 10^9$ UFC/g (que equivale a $9,08 \log_{10}$ UFC/g), contagens superiores que as encontradas no presente trabalho. Padanou et al. (2009) ao estudar a fermentação do *lafun*, outro produto africano obtido a partir da fermentação de mandioca, também encontraram contagens de BAL superiores às contagens de leveduras. Durante a fermentação do *lafun*, as contagens de BAL aumentaram de 4,3 a $5,0 \log_{10}$ UFC/g para 8,7 a $8,9 \log_{10}$ UFC/g, enquanto que as contagens de leveduras aumentaram de $2,7 \log_{10}$ UFC/g no início da fermentação para 5,1 a $5,9 \log_{10}$ UFC/g no final da fermentação.

5.1.1 Isolamento e identificação molecular das bactérias do ácido láctico

As bactérias isoladas foram classificadas como bastonetes (83 %) ou cocos (17 %) Gram-positivos e catalase negativos, características sugestivas de BAL. A partir das 15 amostras analisadas, foram obtidos 92 isolados de bactérias. No entanto, 10 isolados não sobreviveram às condições de preservação e morreram. Os 82 isolados restantes foram agrupados e caracterizados molecularmente por análise do perfil obtido por RFLP por meio da digestão com as enzimas *MspI*, *HaeIII* e *HinfI* (BRIGHTWELL et al., 2006). Alguns exemplares de perfis moleculares obtidos estão representados nas figuras 7 e 8.

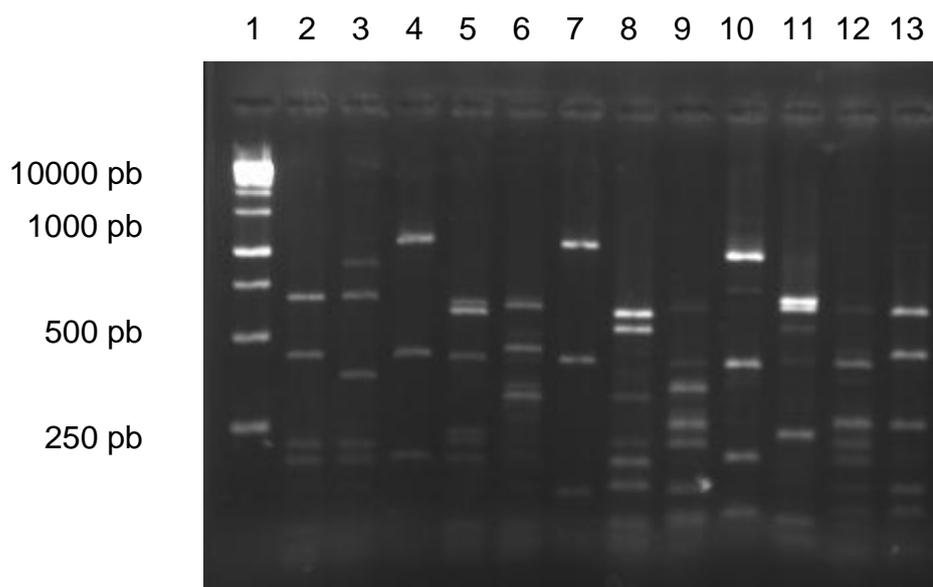


Figura 7 Perfil de digestão de BAL isoladas da fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG). Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de *Weissella cibaria* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*); 5-7: perfil de *Lactobacillus brevis* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*); 8-10: perfil de *Enterococcus faecium* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*); 11-13: perfil de *Lactobacillus casei*/*Lb. paracasei* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*)

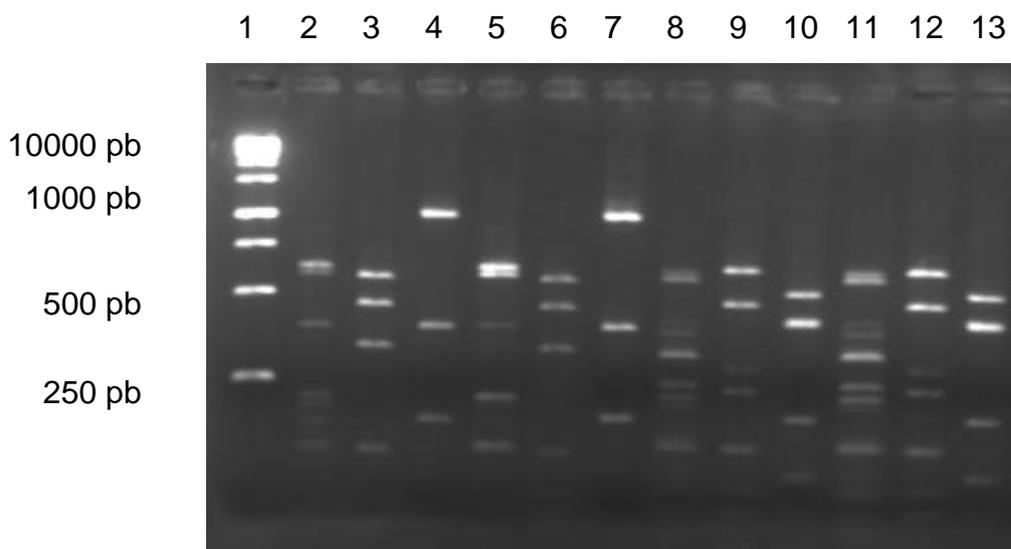


Figura 8 Perfil de digestão de BAL isoladas da fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG). Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de *Lactobacillus plantarum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinI*); 5-7: perfil de *Lactobacillus plantarum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinI*); 8-10: perfil de *Lactobacillus fermentum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinI*); 11-13: perfil de *Lactobacillus fermentum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinI*)

Após a identificação, foram obtidas 13 espécies de bactérias, uma espécie não pertencia ao grupo das BAL, *Staphylococcus epidermidis* (3 amostras). As outras 12 eram BAL, pertencentes principalmente aos gêneros *Lactobacillus* (7) e *Lactococcus* (2). As espécies mais comuns encontradas foram *Lactobacillus brevis* (17 amostras), *Enterococcus faecium* (13), *Lactobacillus fermentum* (12), *Lactobacillus plantarum* (11), *Lactobacillus casei/Lb. paracasei* (7), *Lactobacillus harbinensis* (5), *Lactobacillus parabuchneri* (4), *Weissella cibaria* (3), *Lactococcus garvieae* (3) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (2). As espécies *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus ghanensis* foram encontradas em somente uma amostra.

Lb. brevis representou o maior número de isolados (21,52 %), seguido por *E. faecium* (16,46 %), *Lb. fermentum* (15,19 %) e *Lb. plantarum* (13,92 %). Em menores porcentagens, foram identificadas as espécies *Lb. casei/Lb. paracasei* (8,86 %), *Lb. harbinensis* (6,33 %), *Lb. parabuchneri* (5,06 %), *W. cibaria* (3,80 %), *Lc. garvieae* (3,80 %), *Lc. lactis* subsp. *lactis* (2,53 %), *Ln. mesenteroides* (1,27 %) e *Lb. ghanensis* (1,27 %) (Figura 9).

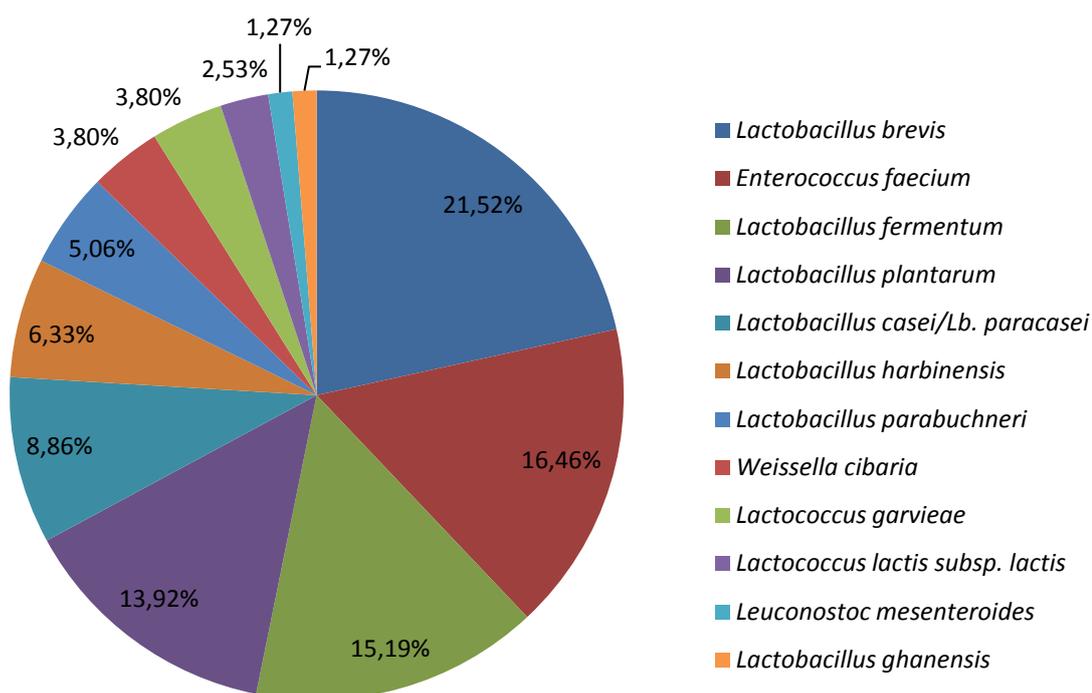


Figura 9 Porcentagem de bactérias do ácido láctico (BAL) isoladas da fermentação de mandioca em Formiga (MG)

Muitos trabalhos têm mostrado a ocorrência e a predominância de BAL nas fermentações de mandioca, principalmente, em fermentações tradicionais africanas para a produção de *attiéké*, *akyeke*, *gari*, *lafun*, *fufu*, entre outros. Obilie et al. (2004) ao investigar os micro-organismos envolvidos no processamento do *akyeke*, um alimento defumado de mandioca fermentada, também encontraram espécies de *Lb. plantarum* e *Lb. brevis*, mas ao contrário do que aconteceu no presente trabalho, *Lb. plantarum* representou maior porcentagem de isolados (59,3 %) quando comparado a *Lb. brevis* (23,3 %). Os autores também identificaram *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* que correspondeu a 14,5 % dos isolados. Coulin et al. (2006) caracterizaram a microbiota do *attiéké* e também identificaram nesta fermentação as bactérias *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Lb. fermentum*. Kostinek et al. (2007) isolaram 375 BAL a partir da fermentação de mandioca na África do Sul para a produção de *gari* e observaram que *Lb. plantarum* foi a bactéria predominante, correspondendo a 54,4 % das cepas isoladas. Entre as cepas identificadas, também encontraram *Lb. fermentum*, *Ln. mesenteroides* subsp.

mesenteroides e *W. cibaria*. Os autores consideraram as espécies encontradas como representantes das BAL predominantes associadas com a fermentação de mandioca. Ao estudar as bactérias predominantes na fermentação de *gari*, Oguntoyinbo & Dodd (2010) identificaram *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lb. casei*. Assim como no presente trabalho, Padanou et al. (2009), ao estudar as BAL predominantes no *lafun*, identificaram *Lb. fermentum* (42 % dos isolados de BAL) em porcentagens maiores que *Lb. plantarum* (30 %), além de identificarem *W. confusa*, que correspondeu a 18 % dos isolados.

No presente trabalho, em relação ao tempo de fermentação, *Lb. brevis* foi isolado em seis das sete coletas, apresentando contagens que variaram de 5,81 a 7,51 \log_{10} UFC/g; *Lb. plantarum* foi isolado em cinco coletas, apresentando contagens que variaram de 5,36 a 6,40 \log_{10} UFC/g; *E. faecium* foi isolado também em cinco coletas, porém não esteve presente no início da fermentação; *Lb. fermentum* e *Lb. casei* foram encontrados em quatro coletas. *Ln. mesenteroides*, *W. cibaria*, *Lc. garvieae* e *Lc. lactis* subsp. *lactis* só foram isolados em uma coleta no início da fermentação. *Lb. parabuchneri* e *Lb. harbinensis* foram isolados apenas em duas coletas do meio e final da fermentação e *Lb. ghanensis* só foi isolado na última coleta (Figura 10).

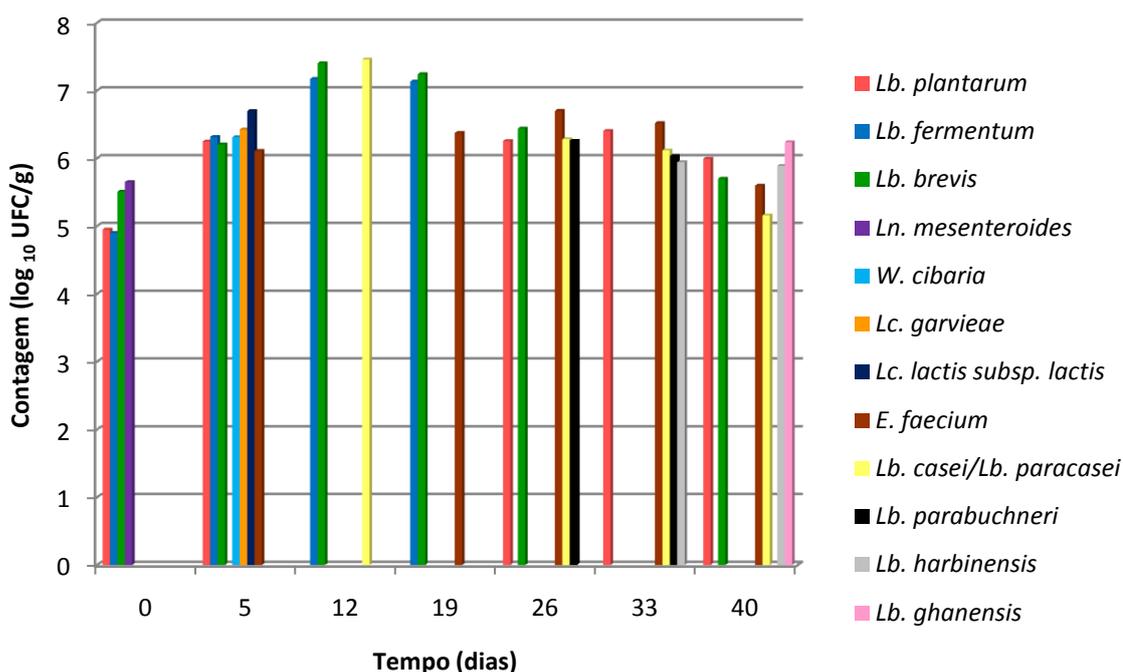


Figura 10 Contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) em \log_{10} UFC/g em relação ao tempo de fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG)

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores em relação à comunidade bacteriana responsável pela fermentação tradicional de mandioca para a produção de polvilho azedo. Lacerda et al. (2005) encontraram *Lb. plantarum* e *Lb. fermentum* como as BAL predominantes no polvilho azedo isolado de duas polvilharias em Conceição dos Ouros (MG). As contagens destas bactérias variaram entre 6,0 e 9,0 \log_{10} UFC/g e estão bem próximas às encontradas no presente trabalho, que para os mesmos micro-organismos variaram entre 4,9 e 7,2 \log_{10} UFC/g. Além disso, os autores também isolaram *Lb. brevis* em menores proporções. Em 2011, Lacerda et al. por meio de técnicas moleculares identificaram as seguintes espécies, após cinco dias de fermentação para a produção de polvilho azedo, *Ln. mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc citreum* e *Enterobacter sp.*

A microbiota presente na fermentação de mandioca pode ser proveniente de diversos lugares, como matéria-prima, utensílios e equipamentos utilizados na produção. Além disso, pode ser carregada por insetos ou manipuladores. Algumas BAL isoladas da fermentação de mandioca, no presente estudo, fazem parte da microbiota humana, como *Lb. casei/Lb. paracasei* (BURITI & SAAD, 2007) e *S.*

epidermidis, que reside comumente na pele, mas pode atuar como patógeno oportunista (MICHELIM et al., 2005).

Obadina et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de cepas de *Lb. plantarum* em *fufu* pelo método de difusão em ágar e mostraram que esta bactéria inibiu os patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi*. Na fermentação de mandioca, a população de patógenos cresceu nas primeiras 36 horas e foi extinta com 96 horas de fermentação. Os autores concluíram que a produção de metabólitos antimicrobianos por *Lb. plantarum* associada a uma fermentação realizada com procedimentos de higienização adequados pode fornecer um controle dos micro-organismos patogênicos.

Além disso, as BAL são responsáveis por iniciar a fermentação, reduzindo o pH abaixo de 4,0 e aumentando a acidez do meio (OGUNTOYINBO & DODD, 2010). Obilie et al. (2004) verificaram que a fermentação do *akyeke* por BAL levou a uma redução de 98 % nos compostos cianogênicos totais nas raízes de mandioca durante o processamento. Estudos mostram que a propriedade de expansão do polvilho azedo também se deve às BAL, que produzem exopolissacarídeos formando uma estrutura viscoelástica, a qual permite a retenção de gás e a consequente expansão da massa durante o aquecimento (MAEDA & CEREDA, 2001).

5.1.2 Isolamento e identificação molecular das leveduras

A partir das 15 amostras analisadas, foram obtidos 33 isolados de leveduras. No entanto, 10 isolados não sobreviveram às condições de preservação e morreram. Os 23 isolados restantes foram agrupados por análise dos perfis moleculares obtidos por PCR *fingerprinting* (LIECKFELDT et al., 1993). Alguns exemplares de perfis moleculares obtidos estão representados na figura 11.

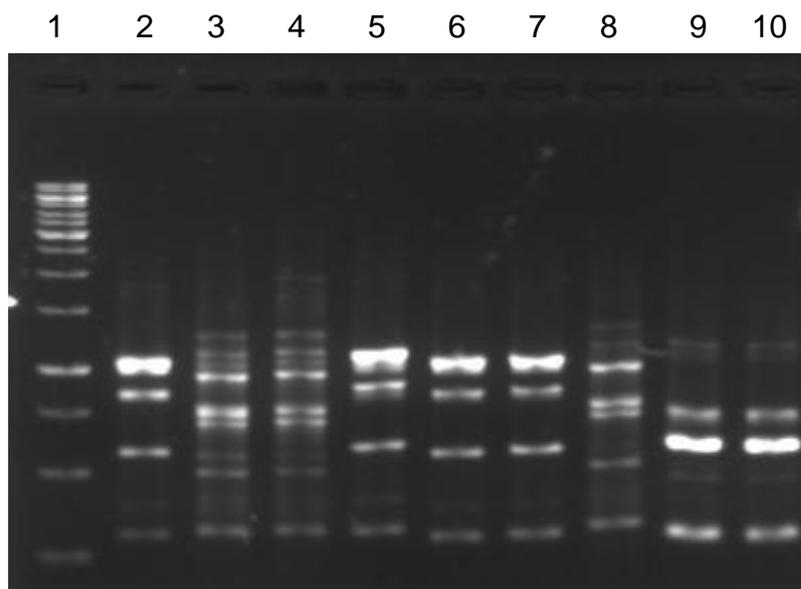


Figura 11 Perfil de PCR *fingerprinting* de leveduras isoladas da fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG). Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2, 5-7: perfis de *Kazachstania exigua*; 3, 4 e 8: perfis de *Candida humilis*; 9 e 10: perfis de *Pichia scutulata*

Após a identificação, foram obtidas cinco espécies de leveduras: *Candida ethanolica*, *Candida humilis*, *Geotrichum fragans*, *Kazachstania exigua* e *Pichia scutulata* (anteriormente conhecida como *Issatchenkia scutulata*). A espécie *P. scutulata* representou o maior número de isolados (52,17 %), apresentando contagem máxima de $1,67 \times 10^5$ UFC/g de amostra, seguida por *K. exigua* (17,39 %). *C. humilis* e *G. fragans* apareceram na mesma proporção (13,04 %). Em menores porcentagens, foi identificada a espécie *C. ethanolica* (4,35 %) (Figura 12). As leveduras predominantes foram encontradas apenas até o 19º dia de fermentação, sendo que *K. exigua*, *C. humilis* e *P. scutulata* estão presentes do início ao 12º dia de fermentação e *C. ethanolica* e *G. fragans* só aparecem no final (Figura 13).

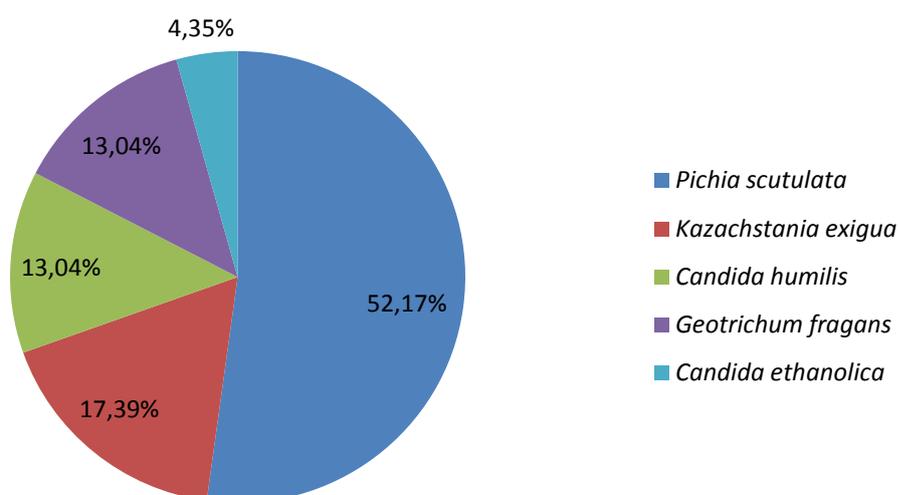


Figura 12 Porcentagem de leveduras isoladas da fermentação de mandioca em Formiga (MG)

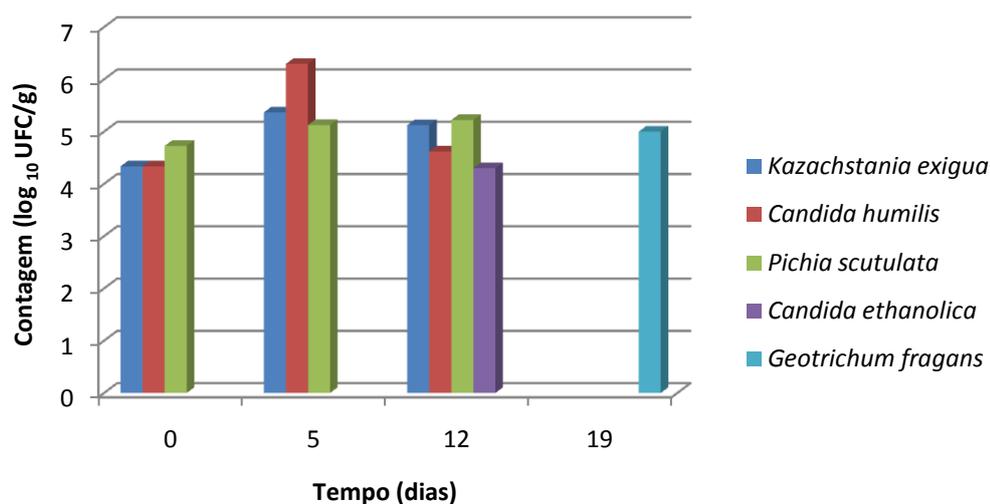


Figura 13 Contagem de leveduras em \log_{10} UFC/g em relação ao tempo de fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG)

Lacerda (2002), ao caracterizar a microbiota associada ao processo fermentativo da mandioca para a produção do polvilho azedo, encontrou leveduras em números representativos durante o processo, sendo que entre as espécies mais encontradas estava *Issatchenkia scutulata* var. *exigua-similar*, atualmente conhecida como *Pichia scutulata*. Padanou et al. (2009), usando metodologia semelhante à empregada neste trabalho para a identificação de leveduras, amplificação do

domínio D1/D2 da subunidade maior do rDNA com os iniciadores NL1 e NL4, verificaram a prevalência de *Saccharomyces cerevisiae* (22 % dos isolados de levedura) e *P. scutulata* (20 % dos isolados) na fermentação de *lafun*. Padanou et al. (2010) sugerem *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. No entanto, eles também sugerem a associação desta levedura com BAL, pois estas últimas podem garantir um pH mais baixo, além de melhorar a qualidade do alimento.

Vários estudos revelam a presença do gênero *Candida* na fermentação de mandioca para obtenção de diferentes produtos (OYEWOLE, 2001; LACERDA et al., 2005; COULIN et al., 2006; OGUNTOYINBO, 2008; PADANOU et al., 2009). No presente trabalho, uma espécie de *P. scutulata* e duas espécies do gênero *Candida* foram isoladas, mostrando que espécies destes gêneros conseguem crescer nas condições ácidas encontradas nos tanques de fermentação de polvilho azedo.

A proliferação de leveduras em alimentos é favorecida pelo ambiente ácido criado pelas BAL. Simultaneamente, o crescimento das bactérias é estimulado pela presença de leveduras, as quais fornecem fatores de crescimento, tais como, vitaminas e compostos nitrogenados (NOUT, 1991). A associação de BAL e leveduras, durante a fermentação, tem um impacto significativo em parâmetros de qualidade dos alimentos como textura, odor e valores nutricionais (BOONNOP et al. 2009). Estes autores investigaram o enriquecimento nutricional da mandioca fermentada por *S. cerevisiae* e concluíram que a fermentação por leveduras pode ser usada para melhorar o valor nutritivo da polpa de mandioca, em especial no conteúdo protéico e mineral.

5.2 AVALIAÇÃO DA ACIDEZ E PH DURANTE A FERMENTAÇÃO NA POLVILHARIA

Durante a fermentação de mandioca, os parâmetros físico-químicos, acidez total titulável (ATT) e pH, foram acompanhados a partir do 19º dia, quando foram percebidos indícios visíveis do início da fermentação, tais como a formação de

bolhas na superfície do tanque. Os valores de pH da superfície e do meio do tanque de fermentação não diferiram entre si ($p > 0,05$), enquanto que os valores de pH nos diferentes tempos diferiram entre si ($p < 0,001$) decrescendo ao longo dos dias (Tabela 2). O maior valor de pH encontrado foi de 4,01 na amostra com 19 dias de fermentação do meio do tanque e o menor valor de 3,46 na amostra com 40 dias de fermentação também do meio do tanque. Os valores de ATT da superfície e do meio do tanque de fermentação não diferiram entre si ($p > 0,05$), enquanto que os valores de ATT nos diferentes tempos diferiram entre si ($p < 0,001$) aumentando ao longo dos dias (Tabela 3). O menor valor encontrado foi de 3,17 % na amostra com 19 dias de fermentação da superfície do tanque e o maior valor de 9,77 % na amostra com 40 dias de fermentação do meio do tanque.

Tabela 2 Variação de pH na superfície e meio do tanque durante a fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG)

Tempo (dias)	pH			
	Superfície		Meio	
19	3,94 ± 0,02	ax	4,01 ± 0,01	ax
26	3,71 ± 0,02	bcx	3,75 ± 0,02	bx
33	3,65 ± 0,04	cx	3,53 ± 0,07	cdx
40	3,49 ± 0,01	dx	3,46 ± 0,02	dx

Valores médios ± desvio-padrão na mesma linha seguidos pela mesma letra sobrescrita (x) não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) em relação à posição da coleta.

Valores médios ± desvio-padrão na mesma coluna seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b, c) são significativamente diferentes ($p < 0,001$) em relação ao tempo.

Os valores encontrados para pH na fermentação de mandioca na polvilharia em Formiga (MG) são inferiores aos determinados por Coulin et al. (2006) no *attiéké*. O pH médio encontrado pelos autores foi de 5,0 durante a fermentação tradicional em pequena escala.

Tabela 3 Variação na acidez total titulável (ATT) na superfície e meio do tanque durante a fermentação de mandioca em uma polvilharia em Formiga (MG)

Tempo (dias)	ATT (%)			
	Superfície		Meio	
19	3,17 ± 0,12	cx	3,31 ± 0,17	cx
26	7,91 ± 0,41	bx	6,83 ± 0,25	bx
33	9,06 ± 0,07	ax	9,36 ± 0,20	ax
40	8,77 ± 0,24	ax	9,77 ± 0,23	ax

Valores médios ± desvio-padrão na mesma linha seguidos pela mesma letra sobrescrita (x) não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) em relação à posição da coleta.

Valores médios ± desvio-padrão na mesma coluna seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b, c) são significativamente diferentes ($p < 0,001$) em relação ao tempo.

A formação de bolhas na superfície do tanque, indício visual da ocorrência da fermentação, ocorreu a partir do 19º dia, período a partir do qual as leveduras predominantes não foram mais isoladas. Como houve um aumento significativo da ATT e redução do pH a partir deste dia até o final da fermentação, pode-se dizer que as leveduras não contribuem ou contribuem muito pouco para a acidificação do meio. Os valores de pH do tanque de fermentação estudado na polvilharia decresceram durante a fermentação com conseqüente aumento dos valores de ATT. Estes resultados eram esperados, uma vez que com o decorrer da fermentação, ocorre a síntese de ácidos orgânicos, levando à acidificação do meio.

Tanto para pH (Tabela 2), quanto para ATT (Tabela 3) e contagem (Figura 6), os valores encontrados para superfície e meio não diferiram. A ausência de uma diferença significativa fez com que o tanque de fermentação fosse considerado como homogêneo. Inclusive, os micro-organismos isolados nesta fermentação, estavam presentes simultaneamente no meio e na superfície do tanque. As exceções foram *Lb. ghanensis* e *G. fragans* que só foram isolados na superfície e *Lb. parabuchneri* e *C. ethanolica* que só foram isolados no meio do tanque.

5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO POLVILHO OBTIDO NA POLVILHARIA

A amostra do produto final, polvilho azedo, seco após 56 dias de fermentação, foi avaliada quanto aos parâmetros microbiológicos contidos na Resolução RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001). A contagem de colônias sugestivas de *Bacillus cereus* encontrada na amostra foi de $9,33 \times 10^2$ UFC/g, inferior a tolerância permitida pela legislação que é de $3,00 \times 10^3$ UFC/g do alimento. *B. cereus* também foi encontrado em baixos números no polvilho azedo produzido por duas fábricas em Minas Gerais na pesquisa feita por Lacerda et al. (2005). Os outros resultados encontrados foram ausência de Coliformes a 45 °C e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g do polvilho. Desta forma, o polvilho azedo proveniente do tanque de fermentação analisado, produzido nesta polvilharia em Formiga (MG), estaria apropriado ao consumo humano, segundo aos padrões microbiológicos preconizados na RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001). Além disso, foi feita a pesquisa de BAL e leveduras e não houve crescimento.

Apesar da fermentação para produção de polvilho azedo ser espontânea e sem padronização, os resultados da análise microbiológica mostram que não foram encontrados patógenos durante a fermentação, com exceção de contagens baixas de *B. cereus*. No entanto, sugere-se que as BAL predominantes nesta fermentação possivelmente foram capazes de inibir o crescimento destes micro-organismos patogênicos encontrados, não deixando os mesmos proliferarem durante o processo fermentativo. Isso se deve principalmente ao poder de acidificação das BAL, que diminuem bastante o pH do meio, sendo a acidificação conhecidamente eficaz em controlar o crescimento de micro-organismos em alimentos (BEALES, 2004).

5.4 SELEÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS

As 12 BAL identificadas foram testadas quanto à degradação do amido e todas apresentaram resultado negativo. As cinco leveduras identificadas também foram testadas quanto à degradação do amido. O resultado foi negativo para *K. exigua* e *G. fragans*. Contudo, *P. scutulata*, *C. humilis* e *C. ethanolica* apresentaram

halos de degradação do amido. Na figura 14, estão representados os halos de hidrólise das cinco espécies de leveduras em comparação aos halos dos controles positivos, linhagens amilolíticas de *Cryptococcus magnus* e *Cryptococcus adaliensis*.

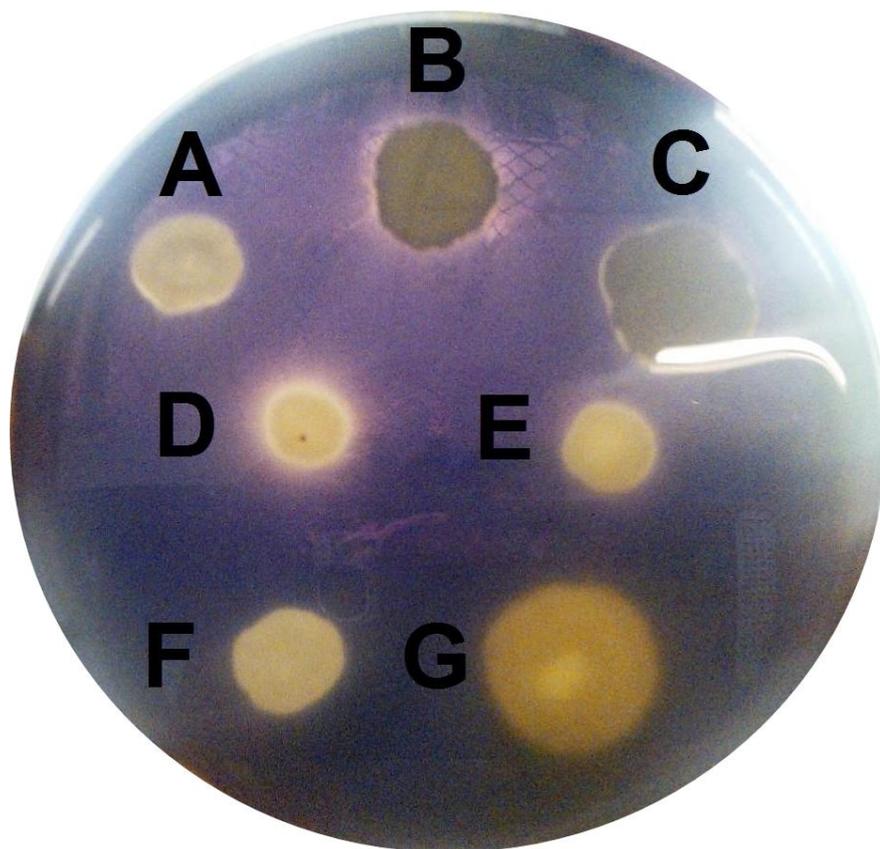


Figura 14 Placa de petri com meio YM contendo 2 % de amido revelado com lugol. A: *Candida humilis*; B: *Pichia scutulata*; C: *Candida ethanolica*; D: *Cryptococcus magnus* (controle positivo); E: *Cryptococcus adaliensis* (controle positivo); F: *Kazachstania exigua*; G: *Geotrichum fragans*

Todas as cinco espécies de leveduras identificadas cresceram em meio contendo amido, sendo que três delas (*P. scutulata*, *C. humilis* e *C. ethanolica*) degradaram o amido presente, possibilitando a visualização de um halo de hidrólise. Destas, somente *P. scutulata* e *C. humilis* estiveram presentes desde o tempo zero da fermentação. Sugere-se que as leveduras possivelmente têm um papel

importante no início da fermentação de mandioca, degradando o amido presente e disponibilizando açúcares para o crescimento das BAL.

Além disso, também foi avaliada a produção de ácidos totais pelas BAL e leveduras. Os valores de ATT diferiram entre si nos diferentes tempos ($p < 0,001$), sendo maiores com 48 horas do que com 24 horas, para todas as bactérias, com exceção de *Lb. harbinensis*, para a qual não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$). No tempo de 24 horas, os valores de ATT encontrados para as diferentes bactérias não diferiram entre si. Entretanto, no tempo de 48 horas, os valores de ATT diferiram entre si ($p < 0,001$), sendo que as bactérias que obtiveram maiores valores de acidez foram *Lb. brevis* e *L. garvieae*. O menor valor de ATT com 48h foi encontrado para *Lb. casei/Lb. paracasei* (Tabela 4).

Tabela 4 Acidez total titulável (ATT) após 24 e 48 horas de fermentação produzida pelas espécies de bactérias do ácido láctico (BAL) encontradas no tanque de fermentação na polvilharia em Formiga (MG)

Espécies	ATT (%)	
	24 horas	48 horas
<i>Lb. brevis</i>	3,47 ± 0,06 ay	5,28 ± 0,07 ax
<i>Lc. garvieae</i>	3,37 ± 0,20 ay	5,28 ± 0,14 ax
<i>Lb. plantarum</i>	2,96 ± 0,08 ay	4,97 ± 0,19 abx
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1,63 ± 0,09 ay	4,47 ± 0,24 abx
<i>E. faecium</i>	2,79 ± 0,15 ay	4,35 ± 0,10 abx
<i>Ln. mesenteroides</i>	2,74 ± 0,44 ay	3,77 ± 0,03 abx
<i>Lb. parabuchneri</i>	2,07 ± 0,08 ay	3,51 ± 0,10 abx
<i>Lb. fermentum</i>	2,57 ± 0,09 ay	3,50 ± 0,03 abx
<i>W. cibaria</i>	0,97 ± 0,16 ay	3,11 ± 0,05 abx
<i>Lb. ghanensis</i>	0,62 ± 0,13 ay	2,68 ± 0,14 abx
<i>Lb. harbinensis</i>	2,59 ± 0,04 ax	2,55 ± 0,10 abx
<i>Lb. casei/Lb. paracasei</i>	1,26 ± 0,04 ay	2,33 ± 0,20 bx

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

Valores médios ± desvio-padrão na mesma coluna seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b) são significativamente diferentes ($p < 0,001$) em relação às espécies.

Edward et al. (2011) investigaram o uso de cepas liofilizadas de *Lb. plantarum*, *Lb. 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.

No caso das leveduras, os valores de ATT não diferiram em um mesmo tempo para as diferentes espécies ($p > 0,05$). De 24 para 48 horas de fermentação, os valores de ATT aumentam para as leveduras *G. fragans* e *P. scutulata*, não diferiram para *C. ethanolica*. A acidez diminuiu para *C. humilis* e *K. exigua* (Tabela 5). Estes resultados já eram esperados, pois as principais responsáveis pela acidificação do meio na fermentação de mandioca são as BAL, 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 um efeito modesto na acidez final.

Tabela 5 Acidez total titulável (ATT) após 24 e 48 horas de fermentação produzida pelas espécies de leveduras encontradas nos tanques de fermentação na polvilharia em Formiga (MG)

Espécies	ATT (%)	
	24 horas	48 horas
<i>Geotrichum fragans</i>	1,27 ± 0,00 ^{ay}	1,60 ± 0,10 ^{ax}
<i>Pichia scutulata</i>	0,48 ± 0,10 ^{ay}	0,78 ± 0,05 ^{ax}
<i>Candida ethanolica</i>	0,39 ± 0,05 ^{ax}	0,45 ± 0,00 ^{ax}
<i>Candida humilis</i>	1,03 ± 0,14 ^{ax}	0,81 ± 0,00 ^{ay}
<i>Kazachstania exigua</i>	1,18 ± 0,09 ^{ax}	0,94 ± 0,05 ^{ay}

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

Valores médios ± desvio-padrão na mesma coluna seguidos pela mesma letra sobrescrita (a) não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) em relação às espécies.

Para a produção de polvilho azedo em escala piloto foram selecionadas duas bactérias entre as predominantes na fermentação de mandioca na polvilharia em Formiga (MG), são elas: *Lb. brevis* e *Lb. plantarum*, que também estavam entre as

bactérias que apresentaram maiores valores de acidez. *E. faecium*, apesar de ser utilizada como bactéria probiótica para alimentação animal (SIMON, 2005), não foi considerada como possível cultura iniciadora devido ao fato de que em algumas circunstâncias pode apresentar patogenicidade (GIRAFFA, 2002). *Lb. fermentum*, que também apareceu entre as predominantes, não foi considerada como possível cultura iniciadora, pois foi isolada apenas em quatro das sete coletas na polvilharia em Formiga (MG), não sendo mais isolada a partir do 26º dia de fermentação. Além disso, *Lc. garvieae*, que atingiu ATT igual a *Lb. brevis* em 48 horas, não foi considerada como possível cultura iniciadora devido a sua baixa prevalência. Desta forma, as bactérias *Lb. brevis* e *Lb. plantarum* foram selecionadas para serem testadas como culturas iniciadoras puras e mistas em associação com uma levedura. A levedura escolhida foi *P. scutulata*. Isso porque esta levedura, além de ser a predominante, apresentou um maior número de isolados com atividade amilolítica.

Kostinek et al. (2007) e Huch (*née* Kostinek) et al. (2008) testaram *Lb. plantarum* como cultura iniciadora e concluíram que o sucesso das linhagens de *Lb. 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 BAL como culturas iniciadoras também para a produção de *gari* e os resultados indicaram que *Lb. plantarum* poderia ser produzido como cultura iniciadora a baixo custo.

5.5 PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA PILOTO

Para a produção de polvilho azedo em escala piloto foram testadas quatro culturas iniciadoras (Figura 15). Com *Lb. brevis* (A e B), *Lb. plantarum* (C e D) e *P. scutulata* (E e F) foram formadas duas culturas puras e duas culturas mistas:

- **A:** *Lb. brevis*;
- **C:** *Lb. plantarum*;
- **B + E:** *Lb. brevis* + *P. scutulata*;
- **D + F:** *Lb. plantarum* + *P. scutulata*.

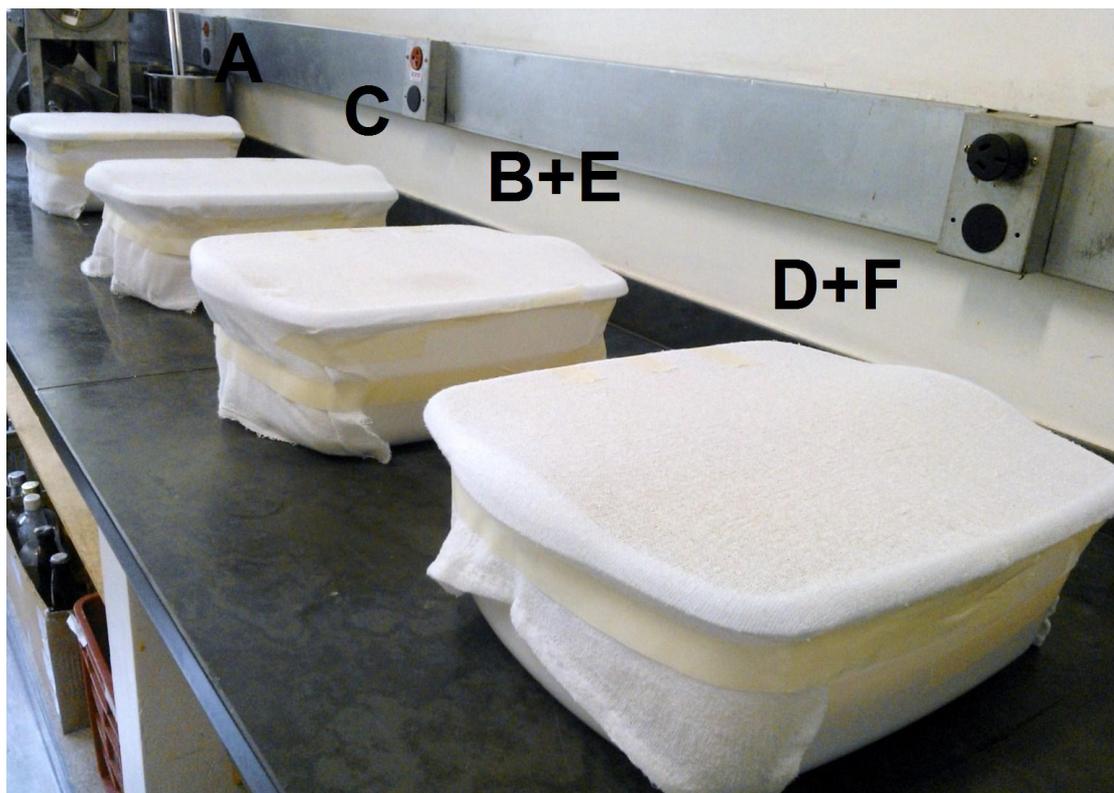


Figura 15 Fermentação de mandioca produzida em escala piloto em biorreatores (bacias de plásticos) inoculados com as culturas iniciadoras. Da esquerda para a direita: A: *Lb. brevis*; C: *Lb. plantarum*; B+E: *Lb. brevis* + *P. scutulata*; D+F: *Lb. plantarum* + *P. scutulata*

A fermentação foi acompanhada por 28 dias e, em seguida, o material obtido foi seco a temperatura ambiente por cinco dias. Os resultados das análises semanais de ATT e pH são mostrados em apêndice. Para ATT, durante os 28 dias de fermentação, as diferentes culturas iniciadoras não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Apêndice A). Entretanto, ao longo do tempo, os valores de acidez diferiram ($p < 0,001$) e podem ser melhor visualizados na figura 16. No gráfico, é possível visualizar que o pico de acidez acontece após o 7º dia de fermentação. Contudo, o valor de ATT encontrado no teste da escala piloto estava bem abaixo do valor encontrado na polvilharia em Formiga (MG).

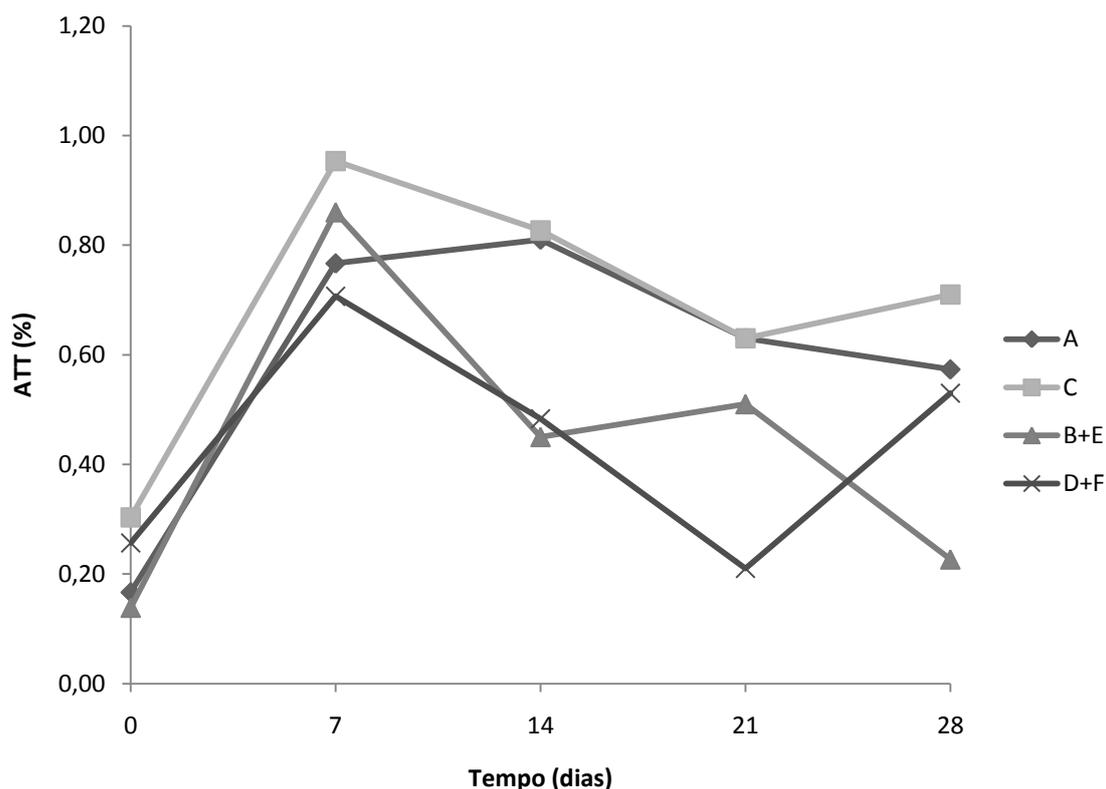


Figura 16 Variação da ATT (%) ao longo do tempo em dias para o acompanhamento da fermentação de mandioca em escala piloto com as culturas selecionadas. A: *Lb. brevis*; C: *Lb. plantarum*; B+E: *Lb. brevis* + *P. scutulata*; D+F: *Lb. plantarum* + *P. scutulata*

Os valores encontrados no presente trabalho são um pouco maiores que os determinados por Vogelmann et al. (2009) ao estudarem uma massa de mandioca fermentada por uma associação de BAL e leveduras utilizadas como culturas iniciadoras. Os valores encontrados pelos autores variaram de 10,3 a 11,5 °SH (Soxhlet-Henkel Degrees), que correspondem a 0,23 % a 0,26 % de ATT, durante os 12 dias de fermentação.

Em relação ao pH, durante os 28 dias de fermentação, as diferentes culturas iniciadoras não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Apêndice B). Entretanto, ao longo do tempo, os valores de pH diferiram ($p < 0,001$) e podem ser melhor visualizados na figura 17. No gráfico, é possível visualizar que os menores valores de pH ocorrem no 7º dia de fermentação.

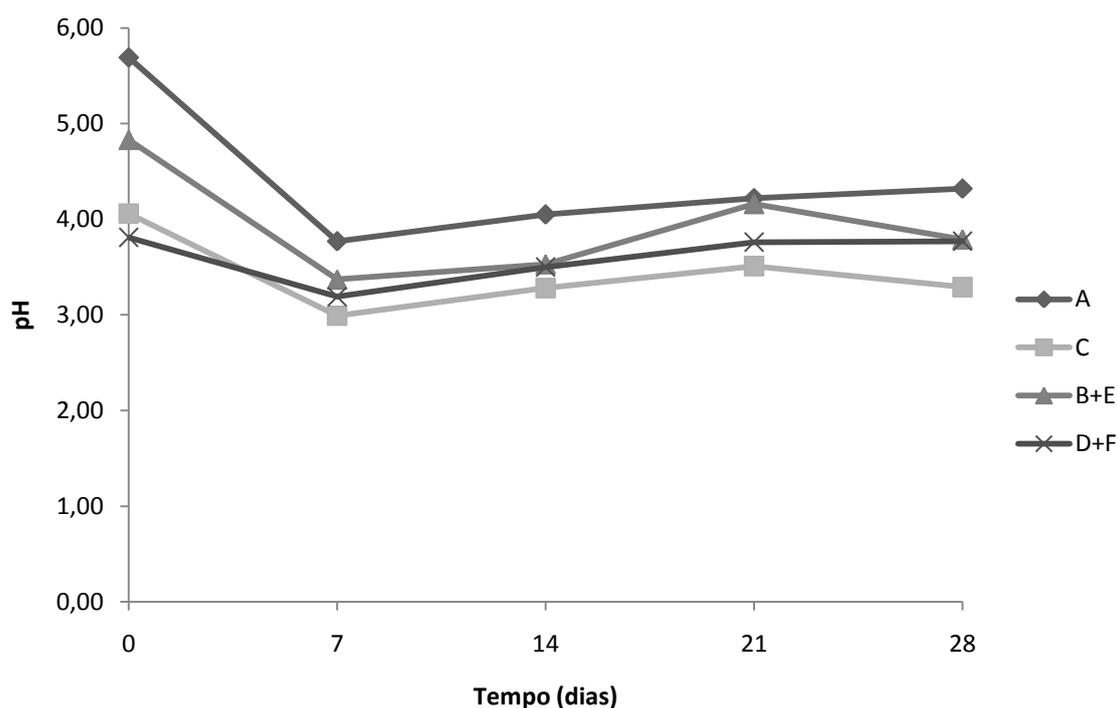


Figura 17 Variação do pH ao longo do tempo em dias para o acompanhamento da fermentação de mandioca em escala piloto com as culturas selecionadas. A: *Lb. brevis*; C: *Lb. plantarum*; B+E: *Lb. brevis* + *P. scutulata*; D+F: *Lb. plantarum* + *P. scutulata*

Os valores de pH encontrados no presente trabalho são similares aos determinados por Vogelmann et al. (2009) para massa de mandioca fermentada produzida por uma associação de BAL e leveduras utilizadas como culturas iniciadoras. Os valores encontrados pelos autores variaram de 4,1 a 4,2 durante 12 dias de fermentação.

O acompanhamento do pH e da ATT na fermentação de mandioca realizada em escala piloto revelou que o pico de acidez e o menor valor de pH se deram no 7º dia de fermentação para todas as culturas iniciadoras testadas, sugerindo que os polvilhos obtidos em escala piloto sejam avaliados com um tempo de fermentação inferior a 28 dias em estudos posteriores. Edward et al. (2011) investigaram o uso de cepas liofilizadas de *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Weissella paramesenteroides* e *Ln. mesenteroides* como culturas iniciadoras para a produção de *gari* e concluíram que o benefício de incluí-las foi a redução do pH do produto muito mais rápido e para níveis mais baixos do que na fermentação controle não inoculada.

5.5.1 Monitoramento das culturas iniciadoras em escala piloto

As BAL e leveduras utilizadas como culturas iniciadoras no processo de produção de polvilho azedo, realizada em escala piloto foram acompanhadas durante os 28 dias de fermentação. As contagens dos diferentes micro-organismos utilizados como culturas iniciadoras diferiram entre si ($p < 0,001$), sendo que as maiores contagens foram obtidas para *Lb. brevis* (A) e *Lb. plantarum* (C) no tempo de 7 dias. A levedura *P. scutulata* (E e F) apresentou contagens mais baixas que as BAL e não apareceu na fermentação a partir dos 21 dias (Apêndice C e Figura 18). *Lb. brevis* (A) e *Lb. plantarum* (C) apresentaram contagens elevadas como culturas puras até o final da fermentação. Quando estas bactérias estavam em cultura mista (B e D) com a levedura *P. scutulata*, foi possível observar uma redução na contagem após 21 dias de fermentação, mesmo assim, *Lb. plantarum* esteve presente até o final da fermentação mesmo que com contagens baixas. As leveduras (E e F) não foram isoladas ao final da fermentação.

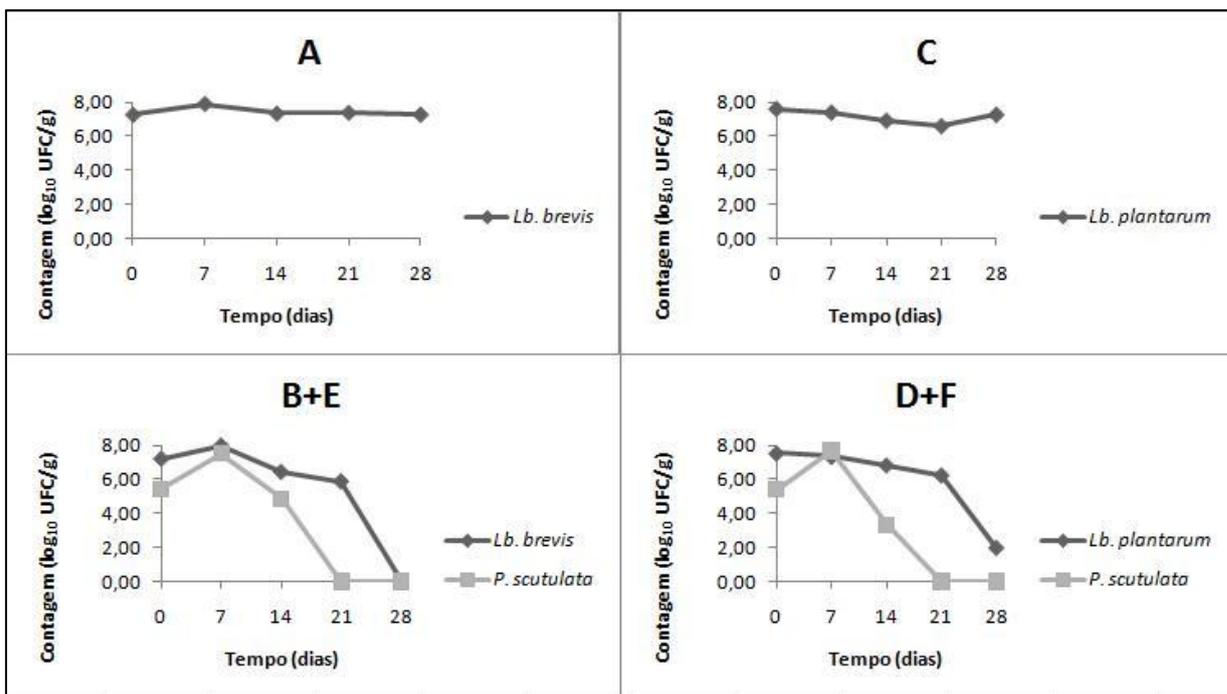


Figura 18 Contagem das culturas iniciadoras selecionadas em log₁₀ UFC/g durante a fermentação de mandioca em escala piloto. A: *Lb. brevis*; C: *Lb. plantarum*; B+E: *Lb. brevis* + *P. scutulata*; D+F: *Lb. plantarum* + *P. scutulata*

Huch (*née* Kostinek) et al. (2008) testaram BAL como culturas iniciadoras em fermentação de mandioca, entre elas *Lb. plantarum*, em um estudo piloto no Quênia para determinar seu potencial como predominante durante a produção de *gari*. A utilização das culturas em números elevados resultou claramente em uma contagem um a dois logaritmos mais elevada de BAL, durante toda fermentação, quando comparada com o controle não inoculado. Edward et al. (2011) investigaram o uso de cepas liofilizadas, entre elas *Lb. plantarum*, também como culturas iniciadoras para a produção de *gari*. As contagens das BAL após 48 horas de fermentação foram maiores que as do presente estudo e variaram entre 9,1 e 10,6 log₁₀ UFC/g para as fermentações inoculadas com as culturas iniciadoras.

No presente estudo, as amostras foram retiradas semanalmente com 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação de cada biorreator e processadas. Foram isolados três representantes de cada micro-organismo utilizado como cultura iniciadora (A, B, C, D, E e F) da fermentação em escala piloto, para o monitoramento das mesmas por meio da identificação molecular. Das 48 BAL isoladas, 23 apresentaram perfil molecular semelhante a *Lb. brevis*, 19 apresentaram perfis semelhantes a *Lb.*

plantarum e apenas seis apresentaram perfis que não coincidiam com nenhum perfil das 12 BAL identificadas anteriormente (Figura 19). Das nove leveduras isoladas (seis no 7^o dia dos biorreatores B+E e D+F e três no 14^o dia apenas do biorreator B+E), oito apresentaram perfil molecular semelhante a *P. scutulata* e uma levedura apresentou perfil desconhecido (Figura 20). Isso comprova a permanência destes micro-organismos inoculados como culturas iniciadoras na fermentação em escala piloto e reforça seu potencial de uso com esta finalidade.

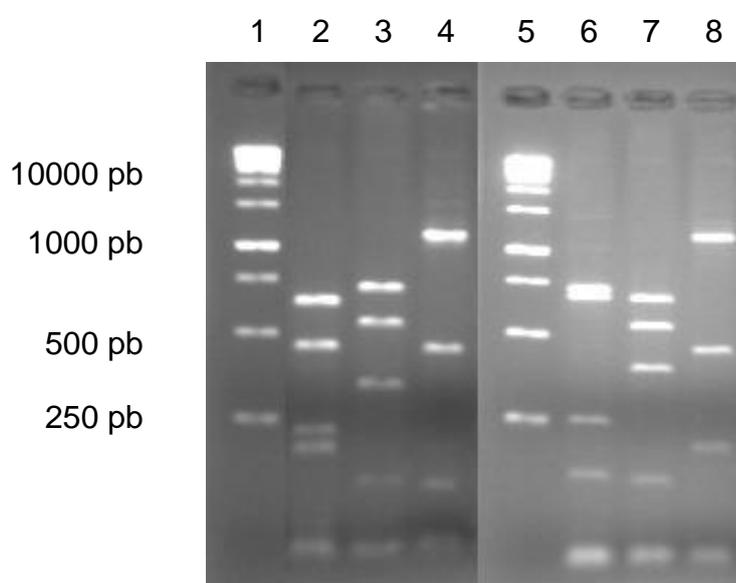


Figura 19 Perfil de digestão de BAL isoladas da fermentação de mandioca em escala piloto. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de *Lactobacillus brevis* (*MspI*, *HaeIII*, *HinFI*); 5: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 6-8: perfil de *Lactobacillus plantarum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinFI*)

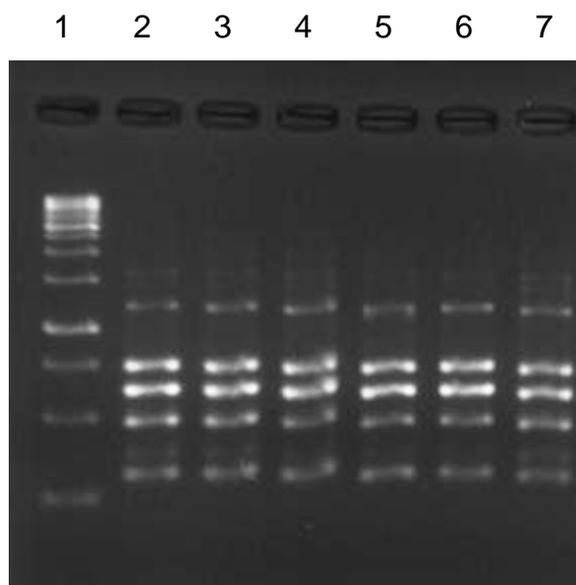


Figura 20 Perfil de PCR *fingerprinting* de leveduras isoladas da fermentação de mandioca em escala piloto. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-7: perfis de *Pichia scutulata*

Além disso, do 7^o ao 28^o dia de fermentação, observou-se o crescimento de colônias com morfologia semelhante à *Lb. plantarum* nos biorreatores em que foram inoculados a cultura pura *Lb. brevis* (A) e a cultura mista *Lb. brevis* em associação com *P. scutulata* (B+E). Alguns representantes destas colônias foram isolados e identificados molecularmente por sequenciamento como *Lb. plantarum*. Como o perfil de digestão destes isolados não correspondeu ao perfil de digestão de *Lb. plantarum* usado como cultura iniciadora, acredita-se se tratar de outra linhagem que apareceu na fermentação de forma espontânea. As contagens destes microorganismos variaram entre 7,22 e 7,46 log₁₀ UFC/g no biorreator com a cultura de *Lb. brevis* pura (A) e 5,63 a 8,17 log₁₀ UFC/g no biorreator com *Lb. brevis* em associação com *P. scutulata* (B+E). Isso reforça a predominância de *Lb. plantarum* em fermentações de mandioca.

Huch (*née* Kostinek) et al. (2008) testaram *Lb. plantarum* e *Lb. fermentum* como culturas iniciadoras para a produção de *gari*. O monitoramento molecular por RAPD-PCR e técnicas de tipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) indicou que *Lb. plantarum* foi bem sucedido em afirmar-se como uma cepa predominante, o que não aconteceu com *Lb. fermentum*. Vogelmann et al. (2009) investigaram a adaptação e competitividade de BAL e leveduras como culturas iniciadoras em fermentações tradicionais de mandioca. Foram inoculados neste tipo

de fermentação, 1 % de *S. cerevisiae* e 10 % de uma mistura de culturas iniciadoras consistindo de 6,30 log₁₀ UFC/g de BAL (*Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* e *Lb. casei* em menor proporção) e 5,72 log₁₀ UFC/g de leveduras (*Issatchenkia orientalis*, *Torulaspota* sp. e outras leveduras desconhecidas). Durante os 12 dias de fermentação, encontraram contagens de BAL que variaram entre 8,41 e 9,15 log₁₀ UFC/g e contagens de leveduras entre 6,30 e 7,15 log₁₀ UFC/g. No final da fermentação, a maioria das cepas das culturas iniciadoras fazia parte da microbiota dominante, sendo que *Lb. plantarum* foi a espécie predominante na massa fermentada de mandioca.

5.5.2 Avaliação da acidez, pH e expansão do polvilho obtido em escala piloto

As características físico-químicas dos diferentes polvilhos produzidos em escala piloto, como ATT, pH e a análise de expansão da massa foram utilizadas como critérios para avaliar as culturas iniciadoras testadas, em comparação ao polvilho azedo comercial obtido a partir do tanque proveniente da polvilharia, cuja fermentação foi acompanhada neste trabalho (Tabela 6). Em relação à ATT, os polvilhos obtidos com as culturas iniciadoras diferiram entre si e entre o polvilho comercial ($p < 0,001$), sendo que o polvilho obtido do biorreator que utilizava *Lb. plantarum* (C) como cultura iniciadora pura apresentou o maior valor de ATT entre as outras amostras. Entretanto, este valor que não se aproximou ao do polvilho comercial, ficou dentro do estabelecido pela legislação, que determina acidez máxima de 1,0 % para o polvilho doce e máxima de 5,0 % para o polvilho azedo (BRASIL, 1978b). Assim, o produto obtido após fermentação no biorreator com a cultura pura *L. plantarum* (C) pode ser denominado de polvilho azedo. O produto obtido após a fermentação com as demais culturas iniciadoras foi denominado polvilho doce. Os valores de pH dos polvilhos obtidos com as culturas iniciadoras também diferiram entre si ($p < 0,001$), sendo que o pH do polvilho obtido no biorreator com a cultura pura *Lb. plantarum* (C) foi o único que não diferiu do pH do polvilho comercial, representando, portanto, a cultura iniciadora cujo pH do polvilho mais se aproximou do polvilho comercial. Os índices de expansão para os polvilhos

obtidos com as culturas iniciadoras e para o polvilho comercial não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Tabela 6 Acidez total titulável (ATT), pH e índice de expansão para os polvilhos azedos obtidos em escala piloto em comparação ao polvilho azedo comercial

Polvilho	Código	ATT (%)	pH	Índice de expansão
<i>L. brevis</i>	A	0,57 ± 0,06 ^{cd}	6,07 ± 0,04 ^a	1,04 ± 0,00 ^a
<i>L. plantarum</i>	C	1,41 ± 0,00 ^b	3,64 ± 0,03 ^d	0,98 ± 0,04 ^a
<i>L. brevis</i> + <i>P. scutulata</i>	B+E	0,71 ± 0,10 ^c	4,34 ± 0,06 ^c	1,10 ± 0,08 ^a
<i>L. plantarum</i> + <i>P. scutulata</i>	D+F	0,40 ± 0,00 ^d	4,84 ± 0,02 ^b	1,05 ± 0,02 ^a
Polvilho comercial	PC	6,75 ± 0,20 ^a	3,62 ± 0,04 ^d	1,06 ± 0,05 ^a

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

5.5.3 Análise microbiológica do polvilho obtido em escala piloto

Os diferentes polvilhos produzidos em escala piloto foram avaliados quanto aos parâmetros microbiológicos contidos na Resolução RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001). A contagem de colônias sugestivas de *B. cereus* encontrada na amostra retirada do biorreator inoculado com cultura mista de *Lb. brevis* + *P. scutulata* (B+E) foi de $3,33 \times 10^1$ UFC/g e na amostra retirada do biorreator que utilizava a cultura mista *Lb. plantarum* + *P. scutulata* (D+F) foi de $1,00 \times 10^2$ UFC/g, valores inferiores a tolerância permitida pela legislação que é de $3,00 \times 10^3$ UFC/g do alimento. Nas outras amostras não foi verificado o crescimento de colônias sugestivas de *B. cereus*. A verificação da presença de *B. cereus* no polvilho azedo é importante porque esta bactéria tem preferência por alimentos ricos em amido e produz toxinas, podendo causar intoxicação alimentar quando consumida em contagens superiores a 10^5 UFC/g (GRANUM & LUND, 1997).

Para a análise de coliformes fecais ou termotolerantes, apenas a amostra proveniente do biorreator, contendo *Lb. brevis* em associação com *P. scutulata*

(B+E) foi positiva e a contagem foi de 4 NMP/g. Estes valores estão abaixo do limite estabelecido pela legislação que é de 10^2 /g. Os outros resultados encontrados foram ausência de Coliformes a 45 °C para as demais amostras e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de todas as amostras. Desta forma, todos os polvilhos produzidos em escala piloto estariam apropriados ao consumo humano.

A presença de micro-organismos patogênicos, mesmo em baixas contagens, se deve possivelmente a umidade um pouco mais elevada do polvilho produzido em escala piloto. Isso porque, devido a questões técnicas, o polvilho produzido no presente estudo, não foi seco ao sol, sendo a secagem feita apenas à temperatura ambiente. Além disso, as baixas contagens de colônias sugestivas de *B. cereus*, encontradas tanto no polvilho comercial quanto em polvilhos produzidos em escala piloto com culturas mistas, podem ser justificadas pelo fato de que *B. cereus* é endofítico da mandioca (TEIXEIRA et al., 2007) e resistente, formando esporos em condições adversas.

Marcon et al. (2007) ao estudarem o efeito que melhorias na fermentação tinham sobre propriedades físico-químicas e sensoriais do polvilho azedo, também concluíram que as condições de secagem ao sol das amostras de polvilho produzidas em laboratório resultaram em um alto conteúdo de água quando comparadas ao polvilho comercial, apenas 6,92 % das amostras analisadas apresentaram valores de umidade de acordo com o estabelecido pela legislação, que é de 14 % de umidade (BRASIL, 1978a).

6 CONCLUSÕES

- As bactérias do ácido láctico (BAL) estiveram presentes durante todo processo de fermentação de mandioca acompanhado na polvilharia, tanto na superfície quanto no meio do tanque, com contagens superiores às contagens de leveduras, indicando a importância e predominância que estas bactérias têm neste tipo de fermentação. *Lb. brevis* foi a espécie mais frequente, seguida por *E. faecium*, *Lb. fermentum* e *Lb. plantarum*.

- As leveduras estiveram presentes desde o início até a metade da fermentação, sendo encontradas em contagens significativas, o que sugere que também desempenham papel importante durante o processo de fermentação de mandioca. *P. scutulata* representou o maior número de isolados, seguida por *K. exigua*.

- Os valores de ATT avaliados para a microbiota predominante aumentaram para as BAL e foram superiores aos obtidos pelas leveduras, o que indica que estas bactérias são as principais responsáveis pela acidificação do meio durante a fermentação de mandioca.

- As BAL utilizadas como culturas iniciadoras puras se mantiveram na fermentação em escala piloto durante os 28 dias do processo. Enquanto que a levedura *P. scutulata* permaneceu por sete dias quando em associação com *Lb. plantarum* e por 14 dias quando em associação com *Lb. brevis*. Sugere-se uma intensa associação de BAL e leveduras no início do processo, sendo que as BAL apresentam um papel importante do início ao fim da fermentação, principalmente no que diz respeito à qualidade e segurança do produto final.

- O polvilho obtido por meio da fermentação realizada em escala piloto e inoculada com *Lb. plantarum* como cultura iniciadora apresentou valor de ATT entre 1,0 e 5,0 % e pode, portanto, ser denominado polvilho azedo de acordo com a legislação. O produto obtido com as demais culturas iniciadoras foi classificado como polvilho doce, por apresentar ATT inferior a 1,0 %.

- *Lb. plantarum* apresentou melhor desempenho como cultura iniciadora para a produção de polvilho azedo obtido pela fermentação em escala piloto. Isto é, maior valor de ATT entre os polvilhos obtidos com as demais culturas iniciadoras; pH e índice de expansão que não diferiram dos valores obtidos para o polvilho comercial; e ausência dos micro-organismos patogênicos pesquisados. Sugere-se, portanto, que sejam feitos mais estudos para que uma cultura iniciadora seja estabelecida, podendo contribuir com a padronização das condições de fermentação de mandioca, visando garantir produtos de maior qualidade e aceitabilidade, e conseqüentemente gerar mais lucro ao produtor.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM (Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca). Riquezas naturais do amido. Disponível em: <<http://www.abam.com.br>> Agosto 2004. Acesso em: 22 set. 2011.

ABAM (Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca). Produção brasileira de amido de mandioca 1990 a 2009. Disponível em: <<http://www.abam.com.br>> Acesso em: 22 set. 2011.

ABAM (Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca). Produção mundial de mandioca alcança 242 milhões de toneladas. Disponível em: <<http://www.abam.com.br>>. Julho 2010. Acesso em: 22 set. 2011.

AIDOO, K. E.; NOUT, M. J. R.; SARKAR, K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 30-39, 2006.

AMOA-AWUA, W. K. A.; APPOAH, F.; JAKOBSEN, M. Lactic acid fermentation of cassava into “agbelima”. *International Journal of Food Microbiology*, v. 31, p. 87-98, 1996.

AMPE, F.; SIRVENT, A.; ZAKHIA, N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, v. 65, p. 45-54, 2001.

APPLIED BIOSYSTEMS. BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit – Protocol. Rev. A. USA, 2002. 72 p.

ATRIH, A.; REKHIF, N.; MOIR, A. J.; LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology*, v. 15, p. 93-104, 2001.

AVIARA, N. A.; IGBEKA, J. C.; NWOKOCHA, L. M. Effect of drying temperature on physicochemical properties of cassava starch. *International Agrophysics*, v. 24, p. 219-225, 2010.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 3, p. 1-20, 2004.

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, 2001. p. 311-316.

BOONNOP, K.; WANAPAT, M.; NONTASO, N.; WANAPAT, S. Enriching nutritive value of cassava root by yeast fermentation. *Scientia Agricola*, v. 66, n. 5, p. 629-633, 2009.

BORGES, M. F.; FUKUDA, W. M. G. Teor de cianeto em raízes frescas e processadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de mesa. *Revista Brasileira de Mandioca*, v. 8, p. 71-76, 1989.

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, 24 jul. 1978a, p. 11499-11528.

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 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília, 10 jan. 2001. Seção I.

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.

BRIGHTWELL, G.; BOEREMA, J.; MILLS, J.; E.; PULFORD, D. 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.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade com probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Lationamericanos de Nutrición*, v. 57, p. 373-379, 2007.

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

CÁRDENAS, O. S.; BUCKLE, T. S. Source of cassava starch production: A preliminary study. *Journal of Food Science*, v. 45, p. 1509-1512, 1980.

CARVALHO, E. P.; CANHOS, V. P.; ASQUIERI, E. R.; VILELA, E. R.; CARVALHO, H. P. Determinación de la flora microbiana de la fécula de yuca fermentada (Polvilho Azedo) durante las diferentes etapas de procesamiento. *Alimentaria*, v. 8, p. 97-103, 1999.

CEPEA/ESALQ-USP (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada/Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo). Produção de fécula diminui em 2007, mas receita aumenta. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 31 maio 2013.

CEREDA, M. P.; GRAJ-LEVRA, L. A. Constatação de bactérias não-simbiótica fixadoras de nitrogênio em fermentação de fécula de mandioca. *Revista Brasileira de Mandioca*, v. 6, p. 29-33, 1987.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. Determinação de cianeto durante as etapas de processamento da farinha de mandioca do grupo seca. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA, III, E SEMINÁRIO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, IX, 2005, Belém.

CHUZEL, G. Almidón de yuca, uso actual y potencial. *Yuca Boletín Informativo*, v. 15, p. 9-11, 1991.

COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S.; CHISTÉ, R. C. *Quantificação de teores de compostos cianogênicos totais em produtos elaborados com raízes de mandioca*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. 23 p.

COOKE, R. D.; COURSEY, D. G. Cassava: a major cyanide containing food crop. In: VENNESLAND, B. (Ed.), CONN, E. E., KNOWLES, C. J., WESTLEY, J.; WISSING, F. *Cyanide in Biology*. London: Academic Press, 1981, p. 93-114.

COULIN, P.; FARAH, Z.; ASSANVO, J.; SPILLMANN, H.; PUHAN Z. Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 106, p. 131-136, 2006.

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. 2006. 116 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

EDWARD, V. A.; HUCH, M.; DORTU, C.; THONART, P.; EGOUNLETY, M.; VAN ZYL, P. J.; SINGH, S.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P. Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. *Food Control*, v. 22, p. 389-395, 2011.

ESPM/SEBRAE (Estudos de Mercado/Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). Estudo de Mercado sobre a Mandioca: Farinha e Fécula. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/>>. Janeiro de 2008. Acesso em: 22 set. 2011.

FANI, M. (Ed.) O polvilho azedo. *Aditivos & Ingredientes*, v. 72, p. 44-50, 2010.

FIGUEROA, C.; DAVILA, A. M.; POURQUIÉ, J. Lactic acid bacteria of the sour cassava starch fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, v. 21, p. 126-130, 1995.

FRANK, J.C.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 24, p. 281-370, 2002.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 120, p. 51-70, 2007.

GARDNER, N. J.; SAVARD, T.; OBERMEIER, P.; CALDWELL, G.; CHAMPAGNE, C.P. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, p. 261-275, 2001.

GIRAFFA, G. *Enterococci* from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, p. 163-171, 2002.

GIRAUD, E., CHAMPAILLER, A., RAIMBAULT, M. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 4319-4323, 1994.

GIRAUD, E.; BRAUMAN, A.; KELELE, S.; LELONG, B.; RAIMBAULT, M. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 36, p. 379-383, 1991.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, v. 157, p. 223-228, 1997.

GUYOT, J. P.; BRIZUELA, M. A.; SANOJA, R. R.; MORLON-GUYOT, J. Characterization and differentiation of *Lactobacillus manihotivorans* strains isolated from cassava sour starch. *Journal of Food Microbiology*, v. 87, p. 187-192, 2003.

HANSEN, A.; HANSEN, B. Flavour of sourdough wheat crumb. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, v. 202, p. 244-249, 1996.

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. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, v. 75, p. 197-212, 2002.

HOLZAPFEL, W. Use of Starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control.*, v. 8, p. 241-258, 1997

HOUNHOUIGAN, D. J.; NOUT, M. J. R.; NAGO, C. M.; HOUBEN, J. H.; ROMBOUS, F. M. Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawè, a fermented maize dough from Benin. *International Journal of Food Microbiology*, v. 25, p. 159-168, 1993.

HUCH (née KOSTINEK), M.; HANAK, A.; SPECHT, I.; DORTU, C. M.; THONART, P.; MBUGA, S.; HOLZAPFEL, W. H.; HERTEL, C.; FRANZ, C. M. A. P. Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentations for Gari production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 128, p. 258-267, 2008.

IAL (Instituto Adolfo Lutz). *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 1. ed. São Paulo, 2008. 1020 p. Versão eletrônica.

JANSEN, W., WHEATLEY, C. C. Urban cassava markets. The impact of fresh root storage. *Food Policy*, v. 10, p. 265-277, 1985

JOHANSSON, M. L., SANNI, A.; LONNER, C.; MOLLIN, G. Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *International Journal of Food Microbiology*, v. 25, p. 149-168, 1995.

KIMARYO, V. M.; MASSAWE, G. A.; OLASUPO, N. A.; HOLZAPFEL, W. H. The use of starter culture in the fermentation of cassava for the production of "Kivunde", a traditional Tanzanian food product. *International Journal of Food Microbiology*, v. 56, p. 179-190, 2000.

KOSTINEK, M.; SPETCH, I.; EDWARD, V. A.; PINTO, C.; EGOUNLETY, M.; SOSSA, C.; MBUGUA, S.; DORTU, C.; THONART, P.; TALJAARD, L.; MENGU, M.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, v. 114, p. 342-351, 2007.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeast - A taxonomic study. 4 ed. *Elsevier*, 1998. 1076 p.

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.; MIRANDA, R.L.; BORELLI, B.M.; NUNES, A.C.; NARDI, R.M.D.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. 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.

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.; GOMES, F. C. O.; BORELLI, B. M.; FARIA JR., C. L. L.; FRANCO, G. R.; MOURÃO, M. M.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A. 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.

LACHANCE, M. A., BOWLES, J.M., STARMER, W. T., BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 45, p.172-177, 1999.

LALUCE, C.; BERTOLINI, M. C.; HERNÁNDEZ, J. R.; MARTÍN, A. V.; MARTÍN, A. New amylolytic yeast strains for starch and dextrin fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, p. 2447-2451, 1988.

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.

LEI, V.; AMOA-AWUA, W. K. A.; BRIMER, L. Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 53, p. 169-184, 1999.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, v. 33, p. 413-426, 1993.

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.

MARCON, M. J. A.; VIEIRA, G. C. N.; SIMAS, K. N. de; SANTOS, K.; VIEIRA, M. A.; AMBONI, R. D. de M. C.; AMANTE, E. R. Effect of the improved fermentation on physicochemical properties and sensorial acceptability of sour cassava starch. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, n. 6, p.1073-1081, 2007.

MEROTH, C. B.; WALTER, J.; HERTEL, C.; BRANDT, M. J.; HAMMES, W. P. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 475-482, 2003.

MESSENS, W.; De VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs – a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 72, p. 31-43, 2002.

MESTRES, C.; ROUAU, X. Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 74, p.147-155, 1997.

MICHELIM, L.; LAHUDE, M.; ARAÚJO, P. R.; GIOVANAZ, D. S. H.; MÜLLER, G.; DELAMARE, A. P. L.; COSTA, S. O. P. da; ECHEVERRIGARAY, S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 17-23, 2005.

MLINGI, N. L. V. *Cassava processing and dietary cyanide exposure in Tanzania*. Sweden: Uppsala University. 1995. 69 p. (Tese, Doutorado).

MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Processing techniques to reduce toxicity and antinutrients of cassava for use as a staple food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 8, p. 17-27, 2009.

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

NAKAMURA, I. N.; PARK, Y. K. Some physico-chemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo) *Die Starche*, v. 27, p. 295-297, 1975.

NARDI, R. M. D.; SANTORO, M. M.; OLIVEIRA, J. S.; PIMENTA, A. M.; FERRAZ, V. P.; BENCHETRIT, L. C.; NICOLI, J. R. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, p. 649-656, 2005.

NORRIS, J. R. , BERKELEY, R. C. W., LOGAN, N. A., O'DONNELL, A. G. The genus *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: STARR, M. P., STOLP, H., TRUPER, H. G., BALOWS, A., SCHLEGEL, H. G. (Ed.), *the prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. New York: Springer, 1981. v. 2, p. 1711-1742.

NOUT, M. J. R. Ecology of accelerated natural lactic acid fermentation of sorgum-based infant food formulas. *International Journal of Food Microbiology*, v. 12, p. 217-224, 1991.

OBADINA, A. O.; OYEWOLE, O. B., SANNI, L. O.; TOMLINS, K. I. Bio-preservative activities of *Lactobacillus plantarum* strains in fermenting Cassava 'fufu'. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 8, p. 620-623, 2006.

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

OBILIE, E.; TANO-DEBRAHA, K.; AMOA-AWUA, W. K. Souring and breakdown of cyanogenic glucosides during the processing of cassava into akyeke. *International Journal of Food Microbiology*, v. 93, p. 115-121, 2004.

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

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

OLASUPO N. A.; OLUKOYA D. K.; ODUNFA S. A. Studies on local strains of amylolytic *Lactobacillus* from Nigerian fermented foods. *Nahrung*, v. 40, p. 45-46, 1996.

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.

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

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

PADANOU, 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.

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.

REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 22-34, 2008.

RODTONG, S.; TANNOCK, G. W. Differentiation of *Lactobacillus* strains by robotyping. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 3480-3484, 1993.

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.

SANNI, A. I. The need for process optimization of African fermented foods and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 18, p. 85-95, 1993.

SANNI, A. I., ONILUDE, A. A., OGUNTOYINBO, F. A. Optimization of process conditions for owoh, a fermented cotton seed condiment. *Advances in Food Science*, v. 20, p. 163-167, 1998.

SANNI, A. I.; MORLON-GUYOT, J.; GUYOT, J. P. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 72, p. 53-62, 2002.

SATO, H.; YANAGIDA, F.; SHINOHARA, T.; YOKOTSUKA, K. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, p. 335-337, 2000.

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.

SDEPANIAN, V. L.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Doença Celíaca: avaliação da obediência à dieta isenta de glúten e do conhecimento da doença pelos pacientes cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil (ACELBRA). *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 38, n. 4, p. 232-239, 2001.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA-FILHO, E. A. da; SANTOS, S. K. B. dos; RESENDE, A. do M.; MORAIS, J. O. F. de; MORAIS JUNIOR, M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 88, p. 13-23, 2005.

SIMON, O. Micro-organisms as feed additives – probiotics. *Advances in Pork Production*, v. 16, p. 161-167, 2005.

STREINKRAUS, K. H.; CULLEN, R. E.; PEDERSON, C. S.; NELLIS, L. F.; GAVITT, B. K. In: DEKKER, M. (Ed.) *Handbook of indigenous fermented foods*. New York, 1983. p. 189-238.

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

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. de; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, p. 43-49, 2007.

UYOH, E. A.; NTUI, V. O.; UDOMA, N. N. Effect of local cassava fermentation methods on some physiochemical and sensory properties of fufu. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 8, p. 1123-1125, 2009.

VATANASUCHART, N.; NAIVIKUL, O.; CHAROENREIN, S., SRIROTH, K. Molecular properties of cassava starch modified with different UV irradiations to enhance baking expansion. *Carbohydrate Polymers*, v. 61, p. 80-87, 2005.

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.

WHEATLEY, C. C. *Conservación de raíces de yuca en bolsas de polietileno*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1987, 33 p.

YAROOW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. (Ed.) *The Yeast: a Taxonomic Study*. 4 ed. Amsterdam: Elsevier Publs. 1998. p. 77-100.

APÊNDICE A

Tabela A 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	
A	0,17 ± 0,02	cx	0,77 ± 0,05	ax	0,81 ± 0,00	ax	0,63 ± 0,09	bx	0,57 ± 0,03	bx
C	0,30 ± 0,03	dx	0,95 ± 0,05	ax	0,83 ± 0,03	bx	0,63 ± 0,09	cx	0,71 ± 0,05	cx
B+E	0,14 ± 0,00	cx	0,86 ± 0,05	ax	0,45 ± 0,00	bx	0,51 ± 0,05	bx	0,23 ± 0,05	cx
D+F	0,26 ± 0,92	cx	0,71 ± 0,02	ax	0,48 ± 0,03	bx	0,21 ± 0,05	cx	0,53 ± 0,05	bx

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

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.

A: *Lb. brevis*; C: *Lb. plantarum*; B+E: *Lb. brevis* + *P. scutulata*; D+F: *Lb. plantarum* + *P. scutulata*

APÊNDICE B

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

	pH				
	0	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
A	5,69 ± 0,03 ^{ax}	3,77 ± 0,08 ^{dx}	4,05 ± 0,05 ^{cx}	4,22 ± 0,06 ^{bcx}	4,32 ± 0,09 ^{bx}
C	4,06 ± 0,16 ^{ax}	2,99 ± 0,02 ^{cx}	3,28 ± 0,04 ^{bx}	3,51 ± 0,04 ^{bx}	3,29 ± 0,04 ^{bx}
B+E	4,83 ± 0,18 ^{ax}	3,37 ± 0,02 ^{dx}	3,53 ± 0,01 ^{dx}	4,16 ± 0,10 ^{bx}	3,79 ± 0,44 ^{cx}
D+F	3,81 ± 0,02 ^{ax}	3,19 ± 0,01 ^{cx}	3,50 ± 0,02 ^{bx}	3,76 ± 0,06 ^{ax}	3,77 ± 0,02 ^{ax}

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

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.

A: *Lb. brevis*; C: *Lb. plantarum*; B+E: *Lb. brevis* + *P. scutulata*; D+F: *Lb. plantarum* + *P. scutulata*

APÊNDICE C

Tabela C Acompanhamento da contagem das culturas iniciadoras selecionadas durante a fermentação de mandioca em escala piloto

	Contagem (\log_{10} UFC/g)														
	0		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias						
A	7,27	$\pm 0,07$	aw	7,91	$\pm 0,02$	aw	7,34	$\pm 0,02$	aw	7,39	$\pm 0,00$	aw	7,28	$\pm 0,03$	aw
C	7,61	$\pm 0,03$	aw	7,41	$\pm 0,00$	aw	6,94	$\pm 0,03$	abw	6,63	$\pm 0,04$	abw	7,28	$\pm 0,07$	aw
B	7,18	$\pm 0,01$	awx	7,95	$\pm 0,04$	aw	6,42	$\pm 0,10$	abwx	5,86	3,00	abx	0,00	$\pm 0,00$	by
E	5,44	$\pm 0,07$	ax	7,50	$\pm 0,05$	aw	4,87	$\pm 0,23$	abx	0,00	$\pm 0,00$	bcy	0,00	$\pm 0,00$	by
D	7,54	$\pm 0,03$	aw	7,34	$\pm 0,19$	aw	6,84	$\pm 0,10$	abw	6,25	$\pm 0,13$	abw	1,97	$\pm 3,41$	bx
F	5,40	$\pm 0,08$	ax	7,66	$\pm 0,23$	aw	3,33	$\pm 2,89$	by	0,00	$\pm 0,00$	cz	0,00	$\pm 0,00$	bz

Valores médios \pm desvio-padrão na mesma linha seguidos pela mesma letra sobrescrita (w, x, y, z) são significativamente diferentes ($p < 0,001$) em relação ao tempo.

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

A: *Lb. brevis*; C: *Lb. plantarum*; B+E: *Lb. brevis* + *P. scutulata*; D+F: *Lb. plantarum* + *P. scutulata*