



**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E  
DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS  
ENVOLVIDAS NA FERMENTAÇÃO  
NATURAL DO POLVILHO AZEDO**

**IVANA APARECIDA DA SILVEIRA**

**2001**

52598

MFN 37233

**IVANA APARECIDA DA SILVEIRA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DE  
BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA FERMENTAÇÃO NATURAL DO  
POLVILHO AZEDO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de “Doutor”.

**Orientadora**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho**

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Silveira, Ivana Aparecida da**

**Isolamento, caracterização e diversidade de bactérias envolvidas na  
fermentação natural do polvilho azedo / Ivana Aparecida da Silveira. -- Lavras :  
UFLA, 2001.**

**132 p. : il.**

**Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho.**

**Tese (Doutorado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. Polvilho azedo. 2. Microbiologia. 3. Bacteria ácido lactica. 4. Lactobacilo. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-576.163**

**-664.23**

**IVANA APARECIDA DE SILVEIRA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DE  
BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA FERMENTAÇÃO NATURAL  
DO POLVILHO AZEDO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de “Doutor”.

**APROVADA em 06 de setembro de 2001**

**Prof. Dr.ª. Dulcinéia de Carvalho**

**UFLA**

**Prof. Dr.ª. Rosane Freitas Schwan**

**UFLA**

**Prof. Dr.ª. Roberta H. Piccoli do Valle**

**UFLA**

**Prof. Dr. Evódio Ribeiro Vilela**

**UFLA**

  
**Eliana Pinheiro de Carvalho**

**UFLA**

**(Orientadora)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

Aos meus pais, Tarcílio e Rosa,

Pela oportunidade da vida, pelo amor, dedicação e incentivo à carreira;

Aos meus irmãos,

Pelo apoio e amor;

## **OFEREÇO**

A Deus, por me ajudar a transpor os obstáculos desta caminhada;

Ao amigo e companheiro de alegrias e tristezas, meu marido Wagner, e ao meu pequeno grande filho, Luiz Augusto pela compreensão, amor e apoio durante o desenrolar deste curso, desculpando-me se fui um pouco ausente. Nossos esforços não foram em vão. Amo vocês!

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela convivência.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos para a realização deste projeto.

Aos professores do Departamento de Ciências dos Alimentos, que de maneira direta e indireta, contribuíram para a realização deste curso. Em especial, à Professora Eliana Pinheiro de Carvalho, pela orientação e amizade. Sem seu voto de confiança, não chegaria onde estou agora...

Às professoras Dulcinéia de Carvalho (DCF) e Rosane de Freitas Schwan (DBI), pela amizade, apoio e disponibilidade constante.

Às professoras Roberta e Joelma, pela amizade e atenção.

Aos professores Evódio, Luiz Ronaldo e Luiz Carlos de Oliveira Lima pela amizade, apoio e incentivo.

À fecularia Tup-Guar Indústria e Comércio Limitada, pela confiança, acompanhamento e doações de amostras do processo fermentativo.

Ao senhor João Costa, Sra Auxiliadora e Clarice (Polvilho Maniouro), pelo carinho, atenção e amostragem do processo fermentativo em sua fecularia.

Aos meus “quase irmãos”, Ivani e Beto, companheiros inseparáveis de uma longa jornada. Com vocês aprendi a ser eu, aprendi a confiar e a compartilhar. Vocês são inesquecíveis!

À minha amiga e “filha emprestada”, a miss Polvilho, Lucimeire Pilon. Obrigado pela ajuda que foi imprescindível na estruturação deste trabalho.

À Flávia, amiga presente nos momentos de aflição. Sua ajuda foi muito importante, afinal, você é a miss RAPD.

Aos amigos e colegas de mestrado e doutorado do Departamento de Ciência dos Alimentos, em especial Sandra Maria, Odívia Rosa, Emília Cristina, Marlúcia, Cristiane Gattini, Alexandre Tourino e Daniela Hirsh (a loira).

Aos funcionários Eliane, Cipriano (Pianinho), Tina, Cleuza e Gicelda. Agradeço pela amizade e atenção.

Aos meus irmãos, em especial Glória, Rosana, Alessandra e Jorge, pelo incentivo e confiança. Sem vocês seria muito difícil. E aos meus cunhados, em especial Lúcio (Fú) por toda a ajuda prestada.

À família Lopes Cordeiro, em especial à Sra. Zirza Lopes Cordeiro, pela fé, carinho e presença, e aos meus cunhados Dôra Brito (José Brito), Ivan (Noilce), Luiz Gonzaga (Heloísa), pela aceitação e carinho.

A toda família do Centro Universitário de Lavras, em especial à Flávia Hermeto, Rogéria, Christiane, Argenta, Claret, Johann, Disney Ribeiro e Cássio Pereira pela oportunidade, confiança e amizade. Aos funcionários, Maria, Luíza, Claudinha, Jaqueline, Fernanda e Luciano, por estarem sempre me ajudando.

Aos acadêmicos Simone (Biologia-Unilavras), Márcio de Abreu (Química-Unilavras) e aos alunos do curso de Nutrição (Unilavras), pela convivência, aprendizado e carinho.

Aos amigos Marcial e Lenice, pelo apoio, viagens, amizade e excelente convívio.

Ao amigo “quase cunhado”, Paulo de Tarso, pelas idas e vindas, paciência e boa vontade.

Aos amigos Vanessa e Heverson, pela amizade, carinho, atenção e paciência.

Aos irmãos adotivos, Geisa e Klaus, pela amizade, carinho e convivência.

A todos os amigos e companheiros não citados, porém inesquecíveis, muito obrigado.

Quando não há saúde,  
A sabedoria não se revela  
A arte não se manifesta  
A força não pode combater  
A fortuna se torna inútil  
A inteligência não pode ser utilizada.

(Herophilus)



...Conta a lenda que, em uma certa tribo indígena, a filha do cacique ficou grávida. Quando o cacique soube deste fato ficou muito triste, pois sonhava que a sua filha se casasse com um forte e ilustre guerreiro, no entanto, ela estava esperando um filho de um desconhecido. À noite, o cacique sonhou que um homem branco aparecia em sua frente e dizia para que ele não ficasse triste, pois sua filha não o enganara, ela continuava sendo pura. A partir deste dia o cacique voltou a ser alegre e a tratar bem sua filha.

Algumas luas se passaram e a índia deu à luz uma linda menina, de pele branca e delicada, que recebeu o nome de MANI. Mani era uma criança muito inteligente e alegre, sendo muito querida por todos da tribo. Um dia, em uma manhã ensolarada, Mani não acordou cedo como de costume. Sua mãe foi acordá-la e a encontrou morta. A índia, desesperada, resolveu enterrá-la dentro da oca. Todos os dias a cova de Mani era regada pelas lágrimas saudosas de sua mãe.

Um dia, quando a mãe de Mani foi até a cova para regá-la novamente com suas lágrimas, percebeu que uma bela planta havia nascido naquele local. Era uma planta totalmente diferente das demais e desconhecida de todos os índios da floresta. A mãe de Mani começou a cuidar desta plantinha com todo carinho, até que um dia percebeu que a terra à sua volta apresentava rachaduras. A índia imaginou que sua filha estava voltando à vida e, cheia de esperanças, começou a cavar a terra. Em lugar de sua querida filhinha encontrou raízes muito grossas, brancas como o leite, que vieram a tornar-se o alimento principal de todas as tribos indígenas. Em sua homenagem deram o nome de MANIOCA, que quer dizer Casa de Mani.

A planta, que hoje é o principal alimento dos índios, começou a ser chamada de mandioca, até chegar a MANDIOCA.

## Sumário

	Página
CAPÍTULO 1: Fermentação natural do polvilho azedo.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
1 Introdução Geral.....	4
2 Referencial Teórico.....	6
2.1 Polvilho azedo.....	6
2.1.1 Aspectos gerais.....	6
2.1.2 Processo de fabricação.....	7
2.1.3 Composição química.....	9
2.1.4 Transformações físicas e reológicas da fécula durante o processo fermentativo.....	10
2.1.5 Transformações microbiológicas.....	13
2.2 Sistemática de microrganismos.....	20
2.2.1 Caracterização molecular.....	26
2.2.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	27
2.2.3 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	28
3 Referências Bibliográficas.....	32
CAPÍTULO 2: Isolamento e caracterização da microbiota envolvida na fermentação natural do polvilho azedo.....	46
Resumo.....	47
Abstract.....	49
1 Introdução.....	51
2 Material e Métodos.....	56
2.1 produção do polvilho azedo e coleta das amostras.....	56
2.2 Amostragem.....	57
2.3 Análises físico-químicas.....	57
2.3.1 pH, temperatura e acidez titulável.....	57
2.3.2 Amido e açúcares redutores.....	58
2.4 Análises microbiológicas.....	58
2.4.1 Preparo e diluições das amostras.....	58
2.4.2 Plaqueamento e contagem.....	58
2.4.3 Caracterização dos isolados.....	59
2.4.4 Identificação dos microrganismos.....	59
2.4.5 Verificação qualitativa das atividades amilolíticas.....	64
3 Resultados e Discussões.....	66
3.1 Análises físico-químicas.....	66
3.1.1 pH e temperatura.....	66
3.1.2 Acidez titulável, açúcares redutores se amido.....	69

3.2 Microbiota predominante.....	71
3.2.1 Total de microrganismos aeróbios mesófilos.....	71
3.2.2 Isolamento e caracterização dos grupos microbianos.....	72
3.2.3 Identificação dos grupos bacterianos.....	73
3.2.4 Distribuição da microbiota nas fecularias 1 e 2 durante o período de amostragem.....	86
3.2.5 Verificação qualitativa das atividades amilolíticas.....	87
4 Conclusões.....	90
5 Referências bibliográficas.....	92
CAPÍTULO 3: Estudo da diversidade fenotípica e genética de lactobacilos isolados da fermentação natural do polvilho azedo.....	98
Resumo.....	99
Abstract.....	100
1 Introdução.....	101
2 Material e Métodos.....	105
2.1 Obtenção dos isolados.....	105
2.2 Caracterização fenotípica.....	105
2.3 Caracterização genotípica.....	106
2.3.1 Extração do DNA.....	106
2.3.2 Geração dos perfis RAPD.....	107
2.3.3 Diversidade e distância genética – análise dos dados RAPD.....	107
3 Resultados e Discussões.....	109
3.1 Caracterização fenotípica.....	109
3.2 Caracterização genotípica.....	113
4 Conclusões.....	120
5 Referências bibliográficas.....	121
Anexos.....	127

# **CAPÍTULO 1**

## **Fermentação natural do polvilho azedo**

## Resumo

SILVEIRA, Ivana Aparecida da. **Isolamento, caracterização e diversidade de bactérias envolvidas na fermentação natural do polvilho azedo**. Lavras: UFLA, 2001. 132p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos)

\* / A mandioca, uma planta tipicamente americana, é amplamente utilizada para consumo humano, constituindo-se num alimento altamente energético. Nas etapas de processamento para obtenção do polvilho azedo, uma seqüência de reações bioquímicas realizadas por grupos específicos de microrganismos, resulta um produto de acidez variável devido ao teor e natureza dos ácidos formados. O estudo da diversidade dos microrganismos envolvidos neste processamento pode proporcionar um melhor controle da fermentação natural, conduzindo para a produção de um produto padronizado e, por conseguinte oferecendo melhor conhecimento da natureza e função da microbiota. Face ao exposto a presente pesquisa objetivou o isolamento, caracterização e estudo da diversidade de bactérias envolvidas na fermentação natural do polvilho azedo. Para tal propósito, foram isoladas 873 bactérias nas diferentes etapas do processamento do polvilho azedo utilizando-se os meios Plate Count Agar (PCA) e Man Rogosa e Sharpe Agar (MRSA) em condições de aerobiose. O gênero *Lactobacillus* caracterizou o processo fermentativo e mostrou-se dominante com 435 isolados (49,8%), seguidos pelos gêneros, *Streptococcus* (22,1%), *Enterococcus* (9,6%), *Leuconostoc* (4,3%), *Pediococcus* (2,3%) e *Lactococcus* (0,9%). As linhagens de *Lactobacillus* foram classificadas em dois grupos, de acordo com o tipo fermentativo. Adicionalmente foi realizado o estudo fenotípico e genotípico das espécies de *Lactobacillus* isolados da fermentação natural da fécula de mandioca para obtenção do polvilho azedo. 48 isolados de *Lactobacillus*, escolhidas aleatoriamente, foram identificadas bioquimicamente pelo sistema API e submetidos à extração do DNA para identificação molecular pela técnica de RAPD. Os resultados das análises dos perfis RAPD mostraram a existência de subtipos nas espécies de *Lactobacillus* estudadas, o que pode ter acentuado o polimorfismo detectado nos grupos homofermentativos e heterofermentativos.

---

\* Comitê Orientador: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Orientador),  
Dulcinéia de Carvalho - UFLA; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

## Abstract

SILVEIRA, Ivana Aparecida da. **Isolation, characterization and diversity of bacterias involved in the natural fermentation in the sour cassava flour** \*. Lavras: UFLA, 2001. 132p. (Thesis - Doctorate in Food Science)

Cassava, a typically American plant is widely used for human consumption, constituting into a highly energetic food. In the processing steps to obtain the sour cassava flour, a sequence of biochemical reactions performed by specific groups of microorganisms results into a product of variable acidity due to the content and nature of the acids formed. The study of the diversity of the microorganisms involved in this processing may provide a better control of the natural fermentation, leading to the production of a standardized product and hence providing improved knowledge of the nature and function of the microbiota. In view of the exposed, the present research work aimed at the isolation, characterization and study of the diversity of bacteria involved in the natural fermentation of sour cassava flour. For such a proposal, 873 bacteria were isolated in the different steps of the processing of sour cassava flour by utilizing the Plate Count Agar (PCA) and Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA) media under aerobiosis conditions. The genus *Lactobacillus* characterized the fermentative process and proved to be dominant with 453 isolates (49.8%) followed by the genera *Strptococcus* (22.15), *Enterococcus* (9.6%), *Leuconostoc* (4.35), *Pediococcus* (2.3%) and *Lactococcus* (0.9%). The strains of *Lactabacillus* were classified into two groups according to the fermentative type. In addition. The phenotypic and genotypic study of the species of *Lactobacillus* isolated from the natural fermentation of cassava fecula for obtaining sour cassava flour was performed .48 isolates of *Lactobacillus*, chosen randomly, were identified biochemically by the API system and submitted to DNA extraction for molecular identification by the RAPD technique. The results of the analyses of the RAPD profiles showed the existence of subtypes in the species of *Lactobacillus* investigated, which may have stressed the polymorphism detected in the homofermentative and heterofermentative groups.

---

\* Guidance Committee: Eliana Pinheiro de Carvalho (Major Professor), Dulcinéia de Carvalho - UFLA; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

## 1 Introdução Geral

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é uma planta da família Euforbiaceae, tipicamente americana. É amplamente utilizada para consumo humano, constituindo-se num alimento altamente energético por apresentar cerca de 85% de amido na matéria seca (Chuzel, 1991). Foi levada pelos indígenas a toda área brasileira, à América Central e ao México. Para as Filipinas e o Continente Africano, foi levada pelos chineses e portugueses. Assim, temos hoje estabelecidas culturas de mandioca em todas as regiões de clima tropical e subtropical, principalmente em Java, Filipinas, Ceilão, Tailândia, Madagascar, Indonésia e Federação da Malásia (Pereira e Carvalho, 1979).

Segundo Scholtz e Catão (1967), em certas regiões do Brasil como Norte e Nordeste, a variedade doce ou mansa é chamada aipim, ipi ou macaxeira, e o nome mandioca é dado para a variedade amarga ou brava.

O processamento deste tubérculo visa, além da eliminação da toxidez e preservação, a modificação de suas características reológicas e sensoriais (Nakamura e Park, 1975; Oyewole, 1991), obtendo-se no Brasil produtos como rasas, farinhas, polvilho doce e azedo, entre outros (Figueroa, 1991).

O processo para obtenção do polvilho azedo envolve fermentação natural, usualmente sem inoculação e sem suplemento nutricional, em que o único substrato empregado para o desenvolvimento da acidificação é a fécula doce. Cereda (1973) verificou que esta fermentação se realizava em 3 fases, durante as quais se sucediam grupos de microrganismos, do que resultava um produto de acidez variável devido ao teor e natureza dos ácidos formados.

De acordo com Cereda e Giaj-Levra (1987) e Figueroa e Chuzel (1991), as condições encontradas durante a fermentação natural da fécula de mandioca

apresentam características muito especiais, com um substrato composto unicamente de amido granular como fonte de carbono para os microrganismos e um meio sólido, limitando a transferência de massa, onde muito rapidamente (3 a 5 dias) se estabelece uma anaerobiose estrita.

A inoculação da fécula com uma ou mais espécies selecionadas poderia proporcionar um melhor controle da fermentação natural, orientar para a produção de um produto padronizado e, por conseguinte, oferecer melhor conhecimento da natureza e função da microbiota.

Futuras melhorias no processo de fermentação da mandioca poderão seguramente incluir o uso de enzimas exógenas, cultivos *starters*, fermentos melhorados, melhoria das plantas processadoras e agentes enriquecedores de proteína. Oyewole (1991) investigou o possível papel da microbiota natural e que tipo de contribuição cada grupo microbiano poderia dar ao processo, que inclui hidrólise do amido, acidificação, detoxificação e desenvolvimento do sabor. Segundo o autor, existe a necessidade de se desenvolver fermentos *starters*, que não somente ajudarão na detoxificação, mas também melhorarão outras características desejáveis em produtos de mandioca. De acordo com Figueroa (1991), para se conseguir parâmetros de qualidade constante no produto final, deve-se buscar estabilizar o processo no nível de desenvolvimento microbiano usando cepas acidogênicas, amilolíticas e heteroláticas, condições pré-estabelecidas de baixo pH, temperatura e oxigênio.

A necessidade de se otimizar o processo industrial e garantir a obtenção de um produto com qualidade que possa ser mantida justificam a execução de um trabalho onde se objetiva conhecer a distribuição da microbiota existente na fermentação da fécula doce.



## 2 Referencial Teórico

### 2.1 Polvilho azedo

#### 2.1.1 Aspectos gerais

O amido ou fécula é um carboidrato de estrutura complexa, sendo formado de duas frações de polissacarídeos, a amilose e a amilopectina, e que pode ser encontrado em várias partes das plantas como reserva nutritiva, em forma de partículas insolúveis (Bobbio e Bobbio, 1992; Lehninger, Nelsson e Cox, 1995).

A amilose e amilopectina são cadeias formadas de glicoses polimerizadas através de ligações glicosídicas  $\alpha$ , 1-4 e  $\alpha$  1-6. Essas ligações glicosídicas podem ser rompidas pela ação de ácido ou enzimas amilolíticas. Os grânulos de amido têm tamanho e forma característicos de acordo com a espécie botânica da qual são extraídos. Suas propriedades físico-químicas podem variar muito de uma variedade para outra e com o grau de maturidade da planta (Bobbio e Bobbio, 1995).

A fécula da mandioca ou amido de mandioca, quando extraída em pequenas indústrias para fins culinários, é também conhecida como polvilho doce e polvilho azedo, de acordo com seu teor de acidez. O máximo de acidez permitido é de 1 mL de solução de NaOH 1N por 100g de amostra para o polvilho doce e 5 mL para o polvilho azedo (Nakamura, 1975).

O polvilho azedo é bem aceito pelo consumidor brasileiro, sendo empregado na alimentação e em aplicações nas quais não pode ser substituído pelo polvilho doce. A fécula é usada na indústria de alimentos e também para outros fins industriais como a engomagem de fios e tecidos (Camargo et al., 1988; Arias, 2000).

∕ O polvilho azedo não é um produto amplamente comercializado no âmbito internacional, trata-se de um produto típico brasileiro, de grande consumo, principalmente nos estados de Minas Gerais, Paraná e São Paulo. Apesar de ser um produto aberto às exportações, segundo os importadores, apresentam grandes problemas, sendo o principal deles a falta de uniformidade no produto durante o ano, do ponto de vista de qualidade e de quantidade (Asquieri, 1990). |

### 2.1.2 Processo de fabricação

// (2)  
De acordo com as análises realizadas por Cereda (1973), a maioria do polvilho doce produzido em escala industrial encontra-se dentro das especificações legais, porém o polvilho azedo apresenta grandes oscilações nas suas características físico-químicas (composição e teor de ácidos orgânicos, cor, viscosidade, etc.). Isto parece ocorrer porque a acidificação do produto tem sido feita através de fermentação natural, de uma maneira empírica, sem técnica definida e sem controle de qualidade. )

O esquema de obtenção do polvilho azedo consiste inicialmente em: colheita ou recebimento das raízes, lavagem e descascamento, ralação e peneiragem da massa sobre água corrente. Nessa última parte o bagaço acumulado é eliminado e a fécula é arrastada pela água, sendo, depois, separada por decantação em tanques, planos inclinados ou por centrifugação (Cereda, 1987). A fermentação da fécula pode ser feita em qualquer recipiente, desde o popular coço de madeira a tanques de alvenaria revestidos ou não de azulejos, em recintos abertos ou fechados, para proteger contra alterações ambientais ou materiais estranhos (Cereda, 1988).

Se essa fécula é imediatamente submetida à secagem após a decantação, o produto final é o polvilho doce, mas passando por uma fermentação adequada

antes da secagem, o produto final é o polvilho azedo. Durante a fabricação de raspas ou farinha de mandioca, obtém-se um líquido de prensagem da massa sempre muito rico em fécula. Muitas fábricas deixam essa fécula residual acumular e, através de fermentação, utilizam-na para produzir polvilho azedo como subproduto. //

A fermentação é natural, sendo a fécula mantida em maceração com 10 a 15 cm de água sobrenadante por 20 dias ou mais (Westby e Cereda, 1994). No tocante ao tempo necessário para a fermentação, a literatura é bastante contraditória (Albuquerque, 1969), sendo que há os que opinam que 3 dias são suficientes. Este intervalo de tempo é determinado pelo grau de acidificação desejado e pelas condições climáticas, por sua vez, o grau de acidificação parece depender da aplicação a que esse polvilho é destinado (Nakamura, 1975).

Um outro ponto muito discutido por muitos autores diz respeito à água de maceração (Nakamura, 1975). Enquanto alguns recomendam a renovação da água periodicamente durante a fermentação, outros não se referem ao assunto e há aqueles que são contra a renovação. Em nossa pesquisa não observamos alterações do processo fermentativo em decorrência da troca da água de maceração.

\* (O processo é considerado terminado empiricamente, com o aparecimento de espuma na superfície e bolhas persistentes de gás que se formam no interior da massa, com desprendimento de odor forte característico. Não foram encontrados na literatura esclarecimentos para a natureza dessa fermentação. Encontramos apenas suposições de alguns autores de que talvez seja fermentação acética, butírica ou láctica, ou ainda combinação delas, provocada pelo desenvolvimento de microbiotas naturais. A secagem é feita ao sol e vento, sendo a massa colocada em jiraus de bambu (Cadenas e Buckle, 1980; Plata-Oviedo, 1998).

\* Grande impulso ao estudo do polvilho foi dado por Cereda (1973), que analisou uma grande quantidade de polvilhos comerciais, em vários ensaios de fermentação, caracterizando alguns microrganismos participantes e efetuando o reconhecimento dos ácidos orgânicos formados. \

### 2.1.3 Composição química

\* O polvilho azedo comercial apresenta-se como um produto com parâmetros de qualidade ainda não bem definidos, embora a legislação brasileira o diferencie do polvilho doce somente pela acidez do produto (Brasil, 1978; Brasil, 1993). O polvilho doce é qualificado por apresentar uma acidez máxima de 1,0 mL de NaOH N/100 g de matéria seca e o polvilho azedo, uma acidez de 5,0 mL de NaOH N/100 g de matéria seca.

(Cereda (1973) comprovou que este parâmetro é inadequado para avaliar a qualidade do polvilho azedo visando sua utilização em processamento de alimentos. A autora analisou 25 amostras de polvilho azedo comercial originário de diversas regiões do Brasil e obteve a seguinte composição média: umidade 14%; amido 84%; proteína 1,2%; cinzas 0,31%; fibra 0,50%; matéria graxa 0,004%; pH 3,87 e acidez titulável 5,25 mL de NaOH N/100 g. Frequentemente estas amostras mostraram valores fora dos limites estabelecidos pela legislação. Cereda (1973) e Asquiere (1990) citaram que a fermentação aumenta o teor de proteína na fécula doce provavelmente devido à presença de material orgânico proveniente dos microrganismos da fermentação ou de seus metabólitos que permaneceram no material. Os autores também concordaram que a variação do teor de cinzas e fibra provavelmente se deve à falta de cuidado durante o processo onde facilmente se contamina com diversos tipos de detritos (areia, pedaços de madeira, insetos, etc.) /

## 2.1.4 Transformações físicas e reológicas da fécula durante o processo fermentativo

4 Cereda (1973) comprovou que durante a fermentação da fécula de mandioca os grânulos de amido são degradados por amilases originadas por *Bacillus* sp, principalmente de *Bacillus subtilis*, cuja produção de enzimas amilolíticas é bastante conhecida. O efeito dessas amilases pode ser observado no aspecto alterado da superfície dos grânulos de amido após a fermentação, com pontuações e rugosidades características. /

/ A ação de amilases sobre os grânulos de amido de mandioca também foi observada por Cadenas e Buckle (1980). Os grânulos de amido fermentado apresentaram, sob luz polarizada, perda parcial da birrefringência e tendência marcante para formar agregados. Para os autores o fato comprova que além da ação dos ácidos há evidências de ataque enzimático caracterizado pelas perfurações semelhantes aos descritos por Cereda (1973).

5 / A literatura referente às modificações do amido de mandioca durante o processo fermentativo na produção de polvilho azedo é ainda bastante escassa. Asquieri (1990) demonstrou que os grânulos de amido de mandioca são danificados através da fermentação natural, encontrando valores de 2,90% de amido danificado no polvilho azedo da indústria, 2,75% na fécula fermentada no laboratório e de 1,4% na fécula doce.

/ O processo fermentativo altera o grânulo da fécula de tal modo que o polvilho azedo apresenta características peculiares (Demiate et al., 2000). / As modificações que ocorrem durante a fermentação alteram sua reologia / de modo que os amilogramas característicos se apresentam com viscosidade máxima menor do que a fécula doce; e o início de gomificação é detectado a temperaturas inferiores à do polvilho doce nas mesmas concentrações, sem tendência a gelificação durante o resfriamento até 50°C, com viscosidade muito baixa e mais ou menos constante (Ascheri, 1992).

Cereda (1985) estudando 12 amostras de fécula fermentada comercial observou que as pastas com 8% de concentração tiveram diferenças significativas nas características viscográficas, possibilitando separá-las em 3 grupos (A, B e C). As féculas fermentadas do grupo A apresentaram picos de viscosidade baixa, não ultrapassando as 500 U.B. com pastas pouco estáveis; as do grupo B apresentaram valores de pico máximo entre 500 e 800 U.B., com características semelhantes e o grupo C caracterizou-se mais pela alta estabilidade da pasta do que por pico de viscosidade máxima elevada, embora apenas uma amostra mostrasse pico inferior a 800 U.B.

6 Nakamura, Morais e Martucci (1976), em estudo comparativo entre o polvilho azedo e o doce, também chegaram à conclusão de que a fermentação, além de conferir ao produto sabor e odor característicos, causa alterações em suas propriedades físico-químicas.

\* As diversas alterações que ocorrem na fécula durante a fermentação são atribuídas ao desenvolvimento de uma variada microbiota proveniente da matéria-prima, da água e do meio ambiente, sendo que o substrato empregado restringe-se a uma suspensão de amido granular em água (Cereda e Giaj-Levra, 1987).

Segundo Cereda et al (1985), Cereda e Lima (1985), Cereda e Bonassi (1985), o início do processo fermentativo é acompanhado por rápida queda na concentração do oxigênio dissolvido, ocasionada por bactérias amilolíticas aeróbias capazes de consumir oxigênio e produzir gases como dióxido de carbono e hidrogênio, além de ácidos orgânicos como o lático, butírico, acético e outros. A baixa disponibilidade de oxigênio e os produtos oriundos da hidrólise do amido também induzem o processo a vias fermentativas acidogênicas, com aumento na produção destes ácidos e oscilações nas concentrações de açúcares (Figuerola, 1991; Cereda e Lima, 1985b).

Verificando a atuação da enzima alfa-amilase, Cereda e Lima (1985b) observaram um aumento no teor de açúcares redutores na fase inicial de fermentações realizadas em laboratório, com um decréscimo no final do período fermentativo, o qual foi atribuído aos microrganismos consumidores destes carboidratos e às condições desfavoráveis para atuação da enzima. Em estudos com féculas fermentadas por 40 dias, Cereda et al (1985) não detectaram açúcares redutores no líquido sobrenadante.

↙ A fermentação é realizada em ambientes abertos, assim sendo, a microbiota presente depende das interações ecológicas do meio e de fatores ambientais (Zapata, Martinez e Parada, 1991; Mestres e Rouau, 1997). No entanto, as análises do líquido sobrenadante de diversas fermentações demonstram invariavelmente, reduções nos valores de pH e aumento nos teores de acidez titulável (Cereda et al, 1985; Cereda e Gaj-Levra, 1987). A acidificação natural da fécula foi constatada em ensaios de laboratório dentro de 24 horas, quando o pH inicial de 6,0 estabilizou-se no segundo ou terceiro dia ao redor de 3,0 (Cereda e Lima, 1981); os autores observaram que embora o pH permanecesse estacionário, os valores de acidez oscilaram até o final do processo. Observações semelhantes foram feitas na Colômbia, com valor inicial de pH igual a 6,5 e decréscimo deste valor, após dois a três dias, para 3,5 (Cárdenas e Buckle, 1980).

↙ Durante a secagem do polvilho azedo ocorre a volatilização de ácidos e compostos aromáticos, com conseqüentes oscilações nos valores de pH e acidez titulável. Análises destes parâmetros realizadas por Cereda, Lima e Brasil (1981) em amostras de 25 marcas do produto comercial resultaram em valores de 3,0 a 4,5 para pH e de 3,0 a 8,94 para acidez titulável (mL de NaOH N/100 g.).

Durante o processo fermentativo ocorre danificação da fécula, principalmente pelo ataque de  $\alpha$ -amilases provenientes de bacilos como *Bacillus subtilis* (Cereda, 1975). Estudos sobre o teor de amido danificado na fécula

fermentada são escassos. Moorthy e Ramanujam (1986) encontraram valores de 0,07% a 1,37% em amidos de mandioca de diferentes variedades e épocas de colheita. Asquieri (1990) estudando polvilho azedo industrial, fécula fermentada em laboratório e polvilho doce, obteve valores de 2,90%, 2,75% e 1,56%, respectivamente. Teores de 0,23% a 2,58% foram obtidos por Ascheri (1992) em três diferentes meios, observando que a fermentação industrial proporcionou um aumento inicial mais elevado deste parâmetro em relação aos experimentos em laboratório e tanque experimental; o aumento foi atribuído à carga microbiana inicialmente presente no tanque industrial. /

Amidos nativos apresentam-se insolúveis em água em temperaturas inferiores à de gelatinização. A gelatinização é caracterizada pela fusão das áreas cristalinas do grânulo além da perda de birrefringência, com hidratação e expansão irreversíveis (Greenwood, 1964; French, 1984). Segundo Cádenas e Buckle (1980) a fermentação provoca uma ligeira redução na temperatura de gelatinização do polvilho; os autores obtiveram valores de 61°C para polvilho doce e 60,5°C para polvilho azedo. //

### **2.1.5 Transformações microbiológicas**

A natureza do processo fermentativo utilizado comercialmente é ainda pouco conhecida, e se caracteriza por ser um processo rudimentar e empírico, em que a maioria dos produtores não utiliza inóculo para garantir ou apressar a fermentação (Meuser e Solnik, 1978; Moorthy, Mathew e Padmaja, 1993). Alguns poucos produtores costumam usar como inóculo o polvilho azedo da safra anterior, úmido ou seco, ou deixar no fundo do tanque um pouco da fécula fermentada. Outros tipos de inóculos ou fontes de microrganismos às vezes empregados são grãos de milho ou mistura de fubá e suco de limão que, envoltos em sacos, são colocados no fundo do tanque. Enquanto o primeiro tipo de



inóculo é vantajoso, a acidificação artificial é temporária e não produz polvilho azedo de boa qualidade. Quer tenha início na microbiota do inóculo, meio ambiente ou matéria-prima, a fermentação sempre apresenta sinais visíveis após poucos dias, com formação de bolhas e espuma na superfície, o que segundo Cereda (1981) é considerado por alguns autores o final do processo fermentativo.

O principal problema enfrentado pela agroindústria do amido é a variação da qualidade final, sendo impossível obter um produto com as mesmas características, mesmo tendo a mesma origem (Figueroa, 1991).

Segundo Figueroa e Chuzel (1991) as condições encontradas durante a fermentação natural do amido de mandioca apresentam características muito especiais: a) um substrato composto unicamente de amido como fonte de carbono para os microrganismos e b) um meio sólido, limitando a transferência de massa e onde muito rapidamente (3 a 5 dias) se estabelece condições de anaerobiose estrita. A fermentação caracteriza-se pelo abaixamento do valor do pH, com produção concomitante de ácidos orgânicos e compostos aromáticos.

Figueroa (1991) cita que muitos organismos que obtêm energia por fermentação são anaeróbios estritos. Outros, entretanto, são anaeróbios facultativos capazes de crescer tanto em presença, como em ausência de oxigênio. Em geral, os organismos fermentativos que são anaeróbios facultativos mudam seu metabolismo produtor de energia ao serem expostos ao ar: a presença de oxigênio molecular induz à mudança metabólica da fermentação à respiração. Bactérias do grupo ácido-láticas, entretanto, são exceções notáveis a esta regra, visto que o oxigênio não modifica seu metabolismo produtor de energia e a fermentação prossegue quando crescem em presença de oxigênio.

De acordo com Zapata, Martinez e Parada (1991) a fermentação natural é feita por uma microbiota mista, que produz um aumento na acidez titulável durante o processo. A acidez total expressa como ácido lático alcança valores de

0,40-0,53g%. O ácido láctico constitui 60% da acidez total. Cardenas e Buckle (1980) encontraram 66-82% de ácido láctico no total do ácido produzido, confirmando assim o papel da bactéria ácido-láctica no processo. Os autores verificaram ainda a presença de outros ácidos, tais como acético e uma mistura de acético e butírico.

Cereda e Lima (1981) estabeleceram uma técnica de fermentação de laboratório que permitiu acompanhar o processo através de determinações de pH, acidez titulável, açúcares, ácidos orgânicos, além da enumeração, isolamento e identificação da microbiota ocorrente. “É difícil explicar uma fermentação tão exuberante a partir de um meio de cultivo tão pobre”. No processo de purificação da fécula perdem-se os compostos solúveis constituintes da raiz, contendo os compostos nitrogenados e vitaminas. O substrato fica então restrito a uma suspensão granular, em água. Entretanto, Cereda (1973) identificou uma abundante microbiota no material em fermentação e subdividiu-a em três grupos pela ordem de ocorrência, embora as fases não sejam obrigatoriamente distintas. Esses agentes podem ter origem na própria matéria-prima, nos tanques que não são lavados após a descarga ou no próprio meio ambiente. Ensaio em laboratório, realizados em condições estéreis, comprovaram que o polvilho doce seco contém microrganismos suficientes para que sejam usados como inóculo. A fécula doce comercial apresentou em média  $2,3 \times 10^4$  microrganismos aeróbios;  $7,5 \times 10^3$  microrganismos anaeróbios e  $4,1 \times 10^5$  esporos de microrganismos aeróbios mesófilos por 100 gramas de matéria seca (Cereda, 1981).

Cereda, Lima e Brasil (1985) verificaram que ocorre uma queda da tensão de oxigênio na água sobrenadante da fermentação, proporcionando condições para que, nos primeiros dias, o ambiente torne-se microaeróbio. Considerando-se o teor inicial de  $O_2$ , a concentração apresentou decréscimo acentuado entre o primeiro e o terceiro dia, elevando-se após, para se manter

próximo ao equilíbrio com o oxigênio do ar pelo restante do período de fermentação. O final da fase de maior depressão no teor de oxigênio coincidiu com o início da fase mais tumultuosa da fermentação da fécula, quando as bolhas são formadas no interior da massa de polvilho depositada e migram para a superfície, formando uma camada fina.

Segundo Cereda (1973) a presença de microrganismos da primeira fase poderia estar associada à rápida queda de concentração de  $O_2$  dissolvido. Entre estes, citam-se os gêneros *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* e *Pseudomonas*, capazes de consumir oxigênio, produzir gases ( $CO_2$  e  $H_2$ ) e ácidos orgânicos. Ainda nesta fase, foi detectado *Bacillus*, predominando o *B.subtilis*, cuja produção de enzima amilolítica é bastante conhecida. Provavelmente nesta fase tem início o ataque de enzimas ao amido granular, propiciando uma fonte de carbono para o metabolismo dos agentes de fermentação. O efeito dessas amilases pode ser notado no aspecto alterado dos grânulos de amido de mandioca, após a fermentação. Comprova-se essa hipótese através da identificação cromatográfica dos açúcares presentes no líquido sobrenadante, ao longo da fermentação. Cereda et al (1982) detectaram glicose ( $G_1$ ) apenas nos primeiros dias de fermentação e maltotretoses ( $G_3$ ) nos demais, até o 30º dia, indicando que os açúcares produzidos vão sendo rapidamente consumidos.

Martinez (1981), citado por Figueroa (1991), realizou na Colômbia o isolamento e caracterização da microbiota presente na fécula de mandioca. Encontrou que as bactérias amilolíticas microaeróbias são as iniciadoras do processo, proporcionando condições através de produtos metabólicos, para o desenvolvimento dos outros microrganismos. O autor observou os grânulos de amido fermentado ao microscópio eletrônico e constatou a alteração e redução do tamanho dos mesmos, sendo que no final do processo, encontrou grânulos sem nenhuma modificação.

Zapata e Parada (1988) encontraram grande variedade no número e tipo de microrganismos durante a fermentação. Por microscopia, observaram a aderência dos microrganismos à superfície dos grânulos e pequenas alterações do mesmo, como consequência da ação enzimática e da acidez do meio. Os bacilos esporulados Gram-positivos apresentaram maior atividade amilolítica que os estreptococos e leveduras. A concentração de açúcares redutores foi muito baixa, possivelmente devido ao rápido consumo destes metabólitos. A viscosidade do polvilho azedo foi menor que a do polvilho doce, e não foi observada diferença significativa entre as amostras das primeiras etapas de fermentação e as finais.

Quanto à fonte de nitrogênio, Cereda et al (1985), em experimentos de laboratório, determinaram a composição dos gases, revelando a presença de hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, argônio e gás carbônico. No início a composição percentual dos gases mostrou-se bastante próxima da composição do ar e o hidrogênio não chegou a ser detectado. A partir do início da fermentação, ocorreu aumento gradativo no teor de hidrogênio e gás carbônico e houve redução no teor de nitrogênio. Entre o segundo e quarto dia, correspondendo ao aumento de produção de gases, houve aumento de CO<sub>2</sub>, consumo de nitrogênio e de oxigênio. Assim, o nitrogênio necessário à formação da biomassa nos primeiros estágios da fermentação seria originário da atmosfera, já que o teor protéico disponível da fécula doce é muito baixo (cerca de 0,15%).

Para explicar o fato, Cereda (1973) instalou experimentos de fermentação, os quais foram acompanhados de contagens de microrganismos que cresceram em meio isento de fonte de nitrogênio. Foi então comprovada a existência de microrganismos não-simbióticos fixadores de nitrogênio na fermentação da fécula. Estes ocorrem desde o primeiro dia, alcançando valores máximos entre o terceiro e o quarto dia de fermentação, decaindo após, já que as

condições começam a se tornar adversas. Em razão disto, ocorre uma curva ascendente de nitrogênio total na fermentação, atingindo o valor máximo no sétimo dia, tornando-se assintótica a partir desse ponto. Embora ainda não tivessem sido identificados, haveria a possibilidade de existirem bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, além de outras pertencentes ao gênero *Clostridium*. Buchaman e Gibbons (1974) citaram *C. butyricum* como fixadores de N<sub>2</sub> atmosférico e esse, segundo Cereda (1973), ocorreu em todas as fermentações de laboratório e em 37% das fermentações industriais analisadas.

O consumo de oxigênio propicia condições para o desenvolvimento dos microrganismos da segunda fase, microaerófilos, facultativos ou anaeróbios estritos. Nesta fase ocorrem microrganismos mais exigentes, produtores de ácido e gás. Foram identificados por Cereda (1987) grupos responsáveis por fermentações butírica, láctica, acética, propiônica, entre outras, isoladas ou concomitantemente.

De acordo com Cereda et al (1986) nas regiões frias a fermentação é lenta e predomina a microbiota láctica. Nas regiões quentes a fermentação é mais rápida e predomina a microbiota butírica. Os autores não encontraram nenhuma relação entre a acidez máxima e o estado de fermentação. Não existe um predomínio de certo tipo de ácido, visto que a microbiota presente depende de fatores ambientais e a acidez máxima não constitui um bom padrão para se determinar a qualidade do amido.

Finalmente, na terceira fase, aparecem leveduras de diversas espécies e outros microrganismos saprófitas. Além de consumir os ácidos orgânicos da superfície dos tanques, esses microrganismos podem ser responsáveis pela formação de compostos aromáticos que, em conjunto com os ácidos orgânicos, serão os responsáveis pelas características do polvilho azedo comercial. Os microrganismos saprófitas aparecem principalmente nos tanques de fermentação

cobertos visto que, nos tanques que recebem a luz solar, provavelmente por sua ação germicida, o crescimento não ocorre (Cereda, 1987).


De acordo com trabalho realizado por Okafor, Ijioma e Oyolu (1984) foram detectadas, no princípio da fermentação, bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Leuconostoc* e *Klebsiella*, que estavam presentes em grandes quantidades. *Klebsiella* e *Bacillus* desapareceram no terceiro dia. *Lactobacillus* e *Corynebacterium* aparecerem em grande quantidade no segundo dia e, junto com *Leuconostoc*, persistiram até o quinto dia de fermentação. Espécies de *Candida* desenvolveram-se ao redor do terceiro dia de fermentação e permaneceram presentes até o final.

A contagem total de bactérias microaerófilas, nas pesquisas de Cadenas e Buckle (1980) realizadas na Colômbia em fermentação de fécula de mandioca, variou de  $1,0 \times 10^7$  a  $3,0 \times 10^7$ /grama. Segundo os autores, o fungo *Geotrichum candida* encontrado por eles tanto poderia ser um contaminante, como poderia também ter um importante papel na ação amilolítica sobre o amido, fornecendo açúcares fermentáveis para atuação das bactérias lácticas durante a fermentação.

Zapata, Martinez e Parada (1991) observaram no polvilho azedo uma microbiota constituída por bactérias aeróbias e microaerófilas, leveduras e alguns fungos filamentosos. As leveduras encontradas foram do tipo *Saccharomyces* e os fungos *Penicillium* e *Aspergillus*. Também foram isolados cocos e bacilos Gram-positivos esporulados e não esporulados. Não foi detectada a presença de bactérias coliformes. Nas primeiras etapas da fermentação, houve um predomínio bacteriano, especialmente de cocos e de bacilos Gram-positivos, sobre as leveduras. Todas as leveduras isoladas tinham a capacidade de hidrolisar o amido. Os autores informaram também que o número de microrganismos tende a diminuir na etapa final do processo devido a injúrias ou lesões letais que o meio ácido causa.

Abe e Lindsay (1978) isolaram *Streptococcus faecium* como microrganismo predominante na fermentação da fécula de mandioca. Isolaram também *Corynebacterium manihot*, que não mostrou capacidade significativa na produção de ácido. Segundo os autores, *S. faecium*, através de suas características culturais, mostrou ser o microrganismo fermentador primário deste tipo de fermentação, melhor que *C. manihot*, anteriormente citado por outros autores (Collard e Levi, 1959) como principal responsável pela produção de ácidos. Os autores concluíram que *Corynebacterium* sp não é um bom fermentador de açúcares, e quando fazem, raramente produzem alta acidificação. Muitas espécies dentro deste gênero oxidam glicose a dióxido de carbono e água. O fato de *Corynebacterium* sp raramente produzir ácido, demonstra que o mesmo não é o responsável pelo abaixamento do pH em fermentação de mandioca. O isolamento desta bactéria por outros pesquisadores nos primeiros estágios da fermentação pode ser, segundo os autores, resultado de uma seleção inapropriada. *C. manihot* cresce facilmente em ágar nutriente, enquanto as bactérias ácido-láticas são nutricionalmente fastidiosas e são seletivamente excluídas das observações.

## 2.2 Sistemática de microrganismos



Novos desenvolvimentos nas metodologias para identificação de microrganismos estão contribuindo para uma expansão considerável no número de base de dados computadorizados em uso por microbiologistas de alimentos (Cole, 1991).

A classificação ou taxonomia é básica para outras ciências e, ao mesmo tempo, depende delas. A classificação dos microrganismos requer conhecimentos de suas características. Para procariotos, estes conhecimentos são adquiridos usando técnicas experimentais e de observações. Os resultados de

todas as características bioquímicas, químicas, moleculares, morfológicas e fisiológicas proporcionam uma perfeita taxonomia.

Os tipos de taxonomia são definidos em função dos critérios de classificação usados para os microrganismos em estudo. Uma das características principais é a morfologia da colônia. Entretanto, no caso das bactérias e leveduras, a diferenciação morfológica não é suficiente e outros critérios são necessários.

A sistemática bacteriana atualmente tem passado por grandes mudanças, com taxonomistas usando todas as vantagens dos desenvolvimentos em química, biologia molecular e bioinformática para melhorar o entendimento das relações entre os microrganismos e mecanismos genéticos em que eles estão baseados.

A taxonomia hoje pode ser dividida em taxonomia convencional ou determinativa; taxonomia numérica ou adansoniana e taxonomia molecular ou quimiotaqueonomia. A maioria dos grupos estudados quanto à sua classificação utiliza hoje os três tipos de taxonomia citados.

A taxonomia numérica ou classificação com auxílio de computadores e o agrupamento de unidades taxonômicas por métodos numéricos em taxa, baseado em caracteres comuns, foram primeiramente utilizados na classificação bacteriana por Sneath (1957a,b.). Estes dois primeiros trabalhos marcaram uma nova era na classificação bacteriana.

Segundo Gallo (1991), em relação ao número de caracteres é empírico afirmar que classificações numéricas tomam-se estáveis quando um número razoável (por exemplo: 60 características) é empregado. Kroova (1990), descreve o uso de uma técnica numérica para identificação de bactérias ácido-láticas, cuja matriz de identificação contém 70 testes, incluindo crescimento em várias temperaturas, resistência em pH ácido e alcalino; formação de dextrinas e diacetil; habilidade fermentativa de 49 açúcares diferentes e seus derivados, e tamanho e morfologia das colônias.



Na taxonomia convencional que emprega como critérios as características fenotípicas, os pesos são diferenciados, o que significa considerar alguns testes mais importantes que outros. Na taxonomia numérica cada caráter unitário é considerado de mesma importância ou peso na classificação.

Durante os últimos 20 anos, a aplicação de técnicas físicas e químicas para elucidar a composição química de células bacterianas inteiras, ou de parte delas, tem trazido informações de grande valor na classificação e identificação de bactérias. O desenvolvimento da biologia molecular possibilitou a aplicação de novas metodologias para a caracterização dos microrganismos (Goodfellow e Minnikin, 1985).

Em uma revisão sobre diferentes processos de identificação aplicáveis a bactérias, Dziezak (1987) sugeriu que os dois principais métodos biofísicos que poderiam ser usados para caracterizar espécies bacterianas são: cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) e a eletroforese em gel de poliacrilamida, (SDS-PAGE).

As aplicações iniciais da cromatografia gasosa na análise de componentes celulares com propósitos taxonômicos datam da década de 60 (Ballows et al., 1991; Pádua, 2001). O desenvolvimento tecnológico implicado na fabricação de cromatógrafos e de colunas capilares tem tornado possível aos microbiologistas o uso de cromatografia gasosa para a identificação de espécies microbianas. As técnicas utilizadas para este fim, cada vez mais aperfeiçoadas, na maioria das vezes com uso de computadores e dados armazenados, têm mostrado que a cromatografia gasosa de alta resolução é uma ferramenta muito importante atualmente, em microbiologia (Welch, 1991; Chou, 1996; Steinbrueckne, 1998).

Moore (1970) e Rizzo (1980) afirmaram que a cromatografia gasosa contribuía consideravelmente para a identificação de microrganismos, por ser a técnica correta para análise de metabólitos bacterianos. No caso de lactobacilos,

as análises de metabólitos mostraram um valor limitado, visto que muitas vezes é produzido somente ácido láctico.

A composição de ácidos graxos da célula inteira sob condições padronizadas deverá ser bastante estável, para permitir seu uso na quimiosistemática bacteriana. Segundo Pádua (2001) um problema fundamental associado com a caracterização de espécies bacterianas por cromatografia gasosa, tem sido a variabilidade dos ácidos graxos. Segundo Sinensky, citado por Decallone et al (1991), as células são capazes de alterar a composição de ácidos graxos de seus lipídeos para manter a fluidez da membrana, de acordo com as variações das condições ambientais. Do mesmo modo, fatores analíticos, tais como amostragem e condições de extração, têm sido considerados de maior importância e necessitam ser estritamente padronizados (Uchida, 1975).

Segundo Priest e Barbour (1985) apesar de se admitir o valor e a utilidade das técnicas numéricas, alguns grupos de bactérias foram ignorados. Os autores citam os lactobacilos como um típico exemplo, e consideram que estas bactérias, tidas como comuns, têm grande importância econômica e estão mundialmente distribuídas em vários produtos lácteos, bebidas fermentadas, em silagens, bem como em associações com homens, animais e plantas.

A bactéria ácido-láctica foi primeiramente caracterizada em 1971 (Veerkamp, 1971), porém a identificação de espécies atípicas por HRGC não foi concluída até 1984 (Dainty et al, 1984). Assim como para outros grupos bacterianos, quando HRGC é aplicado a análises de bactérias ácido-láticas, conhece-se a variabilidade da composição dos ácidos graxos destas bactérias (Rizzo et al, 1987). A padronização de cada estágio da análise é necessária, começando pelas condições de crescimento, o processo de extração dos ácidos graxos e finalmente as condições atuais de análises por cromatografia.

Também o uso de proporção de guanina e citosina (G + C), em conjunto com as propriedades fenotípicas usuais, tem ajudado os taxonomistas a definirem as espécies de bactérias ácido-láticas.

Segundo Pot et al (1993) a identificação de bactérias ácido-láticas (LAB) depende principalmente de características bioquímicas e fisiológicas. Estes processos não só consomem tempo, devido ao grande número de espécies LAB, como também são duvidosos. Sequenciamento de rRNA e hibridização DNA:DNA tem melhorado os conhecimentos taxonômicos nas relações genéricas e supragenéricas das LAB. Um exemplo disto foi citado por Kandler e Weiss (1986) com relação a dois microrganismos, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus gasseri*, que são encontrados em habitats similares e não podem ser distintos por simples critérios fenotípicos.

Miteva et al (1992) consideravam a identificação de novas espécies de *Lactobacillus* muitas vezes difícil e duvidosa por causa de requerimentos nutricionais e de crescimento similares. Os estudos enfatizaram que a classificação de *Lactobacillus* não era satisfatória e não refletia o real parentesco filogenético de diferentes linhagens e espécies.

Kaneuchi et al (1988) estudaram seis espécies móveis de *Lactobacillus* isoladas de melão de cana na Tailândia, que continham ácido mesodiaminopimérico (mDAP) em suas paredes celulares. Foram estudadas características morfológicas, bioquímicas e quimiotaxonômicas comparadas a mais três espécies de *Lactobacillus mali* e com uma espécie *Lactobacillus yamanashiensis*. Os autores concluíram que as espécies eram similares e os níveis de homologia de DNA revelaram que elas pertenciam a uma única espécie, *Lactobacillus mali*.

O gênero *Leuconostoc* é atualmente composto por 11 espécies: *Leuconostoc mesenteroides* (contendo três subespécies: *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*; *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *L. mesenteroides* subsp.

*cremoris*); *Leuconostoc pseudomesenteroides*; *Leuconostoc amelibiosum*, *L. argentinum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. fallax*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. kimchii*, e *L. lactis*. Esta classificação está baseada em características fenotípicas, incluindo requerimentos nutricionais (Garvie, 1960; Garvie, 1967), afinidade imunológica (Gasser e Hontebeyrie, 1977; Hontebeyrie e Gasser, 1975), e homologia de DNA (Garvie, 1976; Hontebeyrie e Gasser, 1977).

Shaw e Harding (1989) efetuaram um estudo taxonômico numérico em 52 cepas de *Leuconostoc* isolados de carne estocada a frio e observaram a formação de três grupos através das propriedades bioquímicas, análises de ácidos graxos e hibridização de DNA.

A utilização de técnicas de sequenciamento e hibridização de ácidos nucleicos tem fornecido novos conhecimentos sobre os *Streptococcus* e levado a importantes mudanças na taxonomia e nomenclatura.

Estas mudanças não se encontram ou se encontram parcialmente no segundo volume do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986). Entretanto, os estudos extensivos na área de hibridização DNA/rRNA têm demonstrado que estreptococos podem ser divididos em 3 grupos distintos. O primeiro seria representado pelo gênero *Streptococcus* "sensu stricto" (Schleifer e Kilpper-Bälz, citado por Schleifer 1987). O segundo grupo seria formado por *Enterococcus* típicos (Schleifer e Kilpper-Bälz, 1984). E ao terceiro grupo pertenceriam os estreptococos lácticos, que formam o gênero proposto por Schleifer et al (1985), que é o *Lactococcus*.

O gênero *Enterococcus* foi proposto por Kalina (1970) para inclusão das espécies *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*. Entretanto, esta proposta não foi aceita, e o gênero não foi incluído no Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed. (1974). Em estudos de hibridização DNA/DNA e DNA/rRNA, feitos por Schleifer e Kilpper-Bälz (1984), foi proposta a transferência das espécies anteriormente citadas para o gênero

*Enterococcus* (ex Thiercelin & Jouhand) Schleifer & Kilpper-Bälz. Hoje, em adição às duas espécies propostas, outras espécies já são consideradas pertencentes a este gênero e incluem: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* (Collins et al, 1984); *E. cecorum* (Devriese et al, 1983 e Williams et al 1989); *E. reffinosus*, *E. solitarius*, *E. pseudoavium* (Collins et al, 1989); *E. saccharolyticus* (Rodrigues e Collins, 1990); *E. columbae* (Devriese et al 1990); *E. dispar* (Collins et al, 1991); *E. sulfureus* (Martinez-Murci e Collins, 1991).

O gênero *Lactococcus*, proposto por Schleifer et al (1985), foi incluído na Lista de Nomes de Bactérias Aprovadas (Skerman et al. 1986) e mais espécies hoje já são validadas, como: *L. lactis* subsp. *Hordniae*, *L. piscium*. O gênero compreende bactérias não móveis, não hemolíticas, que usualmente crescem em 4% de NaCl (Williams et al, 1990; Ishizaki et al., 1990).

### 2.2.1 Caracterização molecular

Apesar da identificação dos microrganismos ser baseada em características morfofisiológicas, como citado anteriormente, é comum surgirem problemas técnicos que dificultam a interpretação dos resultados obtidos; por exemplo, quando o crescimento bacteriano não é suficiente para degradar o substrato que está sendo testado, dificultando assim a interpretação dos resultados. Além disso, algumas características são instáveis, apresentando variações decorrentes do meio de cultura utilizado. Assim, técnicas moleculares têm sido empregadas no estudo de *Lactobacillus*, com o objetivo de se obter uma classificação abrangente e uniforme (Le Jeune e Lonvaud-Funel, 1994).

Técnicas de biologia molecular tornaram-se um modo eficiente de caracterizar individualmente os diversos isolados pelas informações sobre a estrutura genética das populações microbianas. Contudo, são particularmente úteis os métodos que mostram especificidade para as espécies e, ao mesmo

tempo, produzem informações sobre a diversidade genética e o grau de relação genética em nível molecular (Harrinson et al., 1992).

### 2.2.2 Reação da Polimerase em cadeia (PCR)

A técnica de amplificação de uma seqüência específica do DNA tem sido usada para detecção e identificação de microrganismos em alimentos (Zapparoli e Torriani, 1997; Hamad et al, 1997; e vários outros). Esse método, referido como reação de polimerase em cadeia - PCR - “Polymerase Chain Reaction” - foi concebido por Kary Mullis em meados da década de 80 (Saiki et al, 1985; Saiki, Gefand e Stofell, 1988). Desde sua concepção, essa tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa, visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramento genético.

→ A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da reação de PCR, torna-a um poderoso instrumento para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A reação de PCR permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado um bilhão de vezes, desde que pelo menos parte de sua seqüência nucleotídica seja conhecida. Primeiro, a parte conhecida da seqüência é utilizada para projetar dois oligonucleotídeos de DNA sintéticos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), cada um complementar a uma das fitas da dupla-hélice de DNA e posicionado em lados opostos da região a ser amplificada. Esses oligonucleotídeos servem como iniciadores (“primers”) para a síntese de DNA *in vitro*, que é catalizada por uma DNA-polimerase, e determinam as extremidades do fragmento de DNA que é finalmente obtido (Alberts et al, 1997).

A DNA-polimerase, enzima responsável pela amplificação do DNA, é capaz de fazer reparos no DNA, assim como replicá-lo. Esta enzima pode alongar, *in vitro*, um pequeno oligonucleotídeo (“primer”), adicionando nucleotídeos em sua seqüência, desde que este esteja hibridizado a uma fita de DNA complementar, denominada “template” ou molde. Para isso é necessário um excesso de nucleotídeos na solução, que servem como unidades na montagem da fita complementar à do molde. Desse modo, caso a última base seja T, a enzima coloca um A, se for um C, ela adiciona um G, e assim por diante (Saiki, Gefand e Stofell, 1988).

Os mesmos autores citam que, se existirem dois oligonucleotídeos (“primer”) delimitando uma região do DNA, e se as fitas forem separadas pelo calor (95°C), a polimerase fará cópias complementares às duas fitas, em temperatura inferior, iniciando sempre pela região dos “primers”. Estas novas fitas hibridizam-se, formando uma molécula idêntica à anterior.

Segundo Brown (1994) o processo de amplificação envolve três passos:

- o DNA contendo a seqüência a ser amplificada é desnaturado pelo calor;
- o DNA desnaturado é anelado pelo excesso de oligonucleotídeos;
- a DNA-polimerase é usada para replicar o segmento de DNA, a partir das terminações livres 3'OH dos oligonucleotídeos (“primers”).

### **2.2.3 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, por Williams e colaboradores. Os autores descreveram um processo simples, também baseado na amplificação do DNA, mas utilizando um único oligonucleotídeo com seqüência nucleotídica arbitrária. Nesse estudo, foi

demonstrado que pequenos oligonucleotídeos (9 a 10 bases) com seqüência nucleotídica arbitrária podiam ser usados para amplificar segmentos de DNA de uma grande variedade de espécies, gerando polimorfismos entre os produtos de amplificação que, por sua vez, poderiam ser utilizados como marcadores genéticos. Neste caso, o polimorfismo era revelado através do acesso dos oligonucleotídeos ao DNA genômico. Esta técnica foi então denominada RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso).

O RAPD, portanto, é uma variação do PCR, que consiste na amplificação de seqüências de DNA usando-se “primers” escolhidos sem um prévio conhecimento das bases a serem copiadas. Assim, esse método não requer conhecimento prévio da biologia molecular dos organismos a serem estudados e pode, então, ser aplicado a qualquer espécie (Welsh e McClelland, 1990). Segundo os autores, a técnica de RAPD não requer determinado “primer” em particular, e pesquisadores de diferentes laboratórios podem escolher uma série padrão de “primers” e os resultados obtidos podem ser comparados entre diferentes laboratórios.

A técnica consiste no anelamento do “primer” com o DNA alvo em ciclos de amplificação a baixa estringência (especificidade), resultando em produtos de amplificação que são característicos de um genoma em particular e denominado “fingerprinting” (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al, 1990). Essa técnica evita muitos problemas encontrados por outras técnicas moleculares, porque é uma técnica rápida e simples de ser executada. Sua alta capacidade discriminatória é útil para estudos epidemiológicos, investigação de fontes de contaminação, relacionamento de isolados de origens diferentes e identificação de isolados diferentes de uma mesma origem (Barbut et al, 1993).

Porém, um alto nível de padronização e controle interno são necessários para se obter perfis reprodutíveis de DNA. Há muitos parâmetros nos quais pequenas mudanças alteram os perfis (Niederhauser et al, 1994). Apesar da



simplicidade do conceito da técnica, estes parâmetros devem estar dentro de limites ótimos para reprodutibilidade; isto é, concentrações adequadas de DNA, magnésio, “primer” e enzima, assim como o número de ciclos (Bassam, Caetano-Anollés e Gresshoff, 1992).

Aumentando-se a seqüência e o tamanho dos “primers” usados para RAPD, pode-se obter um número ilimitado de comparações possíveis entre os perfis, aumentando assim seu poder discriminatório (Sandery, Coble e McKersie-Donnolley, 1994).

Vários autores citam o RAPD como o ideal no estudo do polimorfismo genômico (Welsh e McClelland, 1990; William et al, 1990). O método tem sido usado para comparar diferenças intra e interespecíficas em bactérias (Welsh et al, 1992), podendo ser usado tanto em DNA purificado, como em extratos de células cultivadas em caldo ou em ágar.

Embora seja recente e apresente algumas limitações tais como, o baixo conteúdo de informações genéticas por loco, a não discriminação de genótipos heterozigotos dos homozigotos e a baixa reprodutibilidade entre laboratórios, a técnica de RAPD tem sido aplicada com resultados satisfatórios para vários microrganismos (Lehmann, Lin e Lasker, 1992; Myers e Martin, 1994; Miyata et al, 1995; Cocconcelli et al, 1995; Couto et al, 1996).

A biotecnologia industrial freqüentemente necessita identificar uma linhagem em particular e discriminá-la das outras. As linhagens utilizadas em processos de produção são muitas vezes protegidas por patentes. Para identificar uma linhagem em particular tem-se um problema de caracterização, e a técnica de RAPD fornece um “fingerprinting” da linhagem de interesse (Drake et al, 1996; Torriani et al, 1996; Duplessis e Dicks, 1995). A tabela 1 mostra alguns microrganismos que já foram caracterizados pela técnica RAPD.

TABELA 1 Alguns microrganismos analisados pela técnica de RAPD

Microrganismos	Referências
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Brousseau et al, 1993
<i>Bacillus sphaericus</i>	Woodburn, Yousten e Hilu. 1995
<i>Campylobacter</i>	Mazurier et al, 1992
<i>Clostridium difficile</i>	Barbut et al, 1993
<i>Legionella pneumophila</i>	Sandery, Coble e McKersie-Donnoley 1994
<i>Lactococcus lactis</i>	Cancilla et al, 1992
<i>Listeria monocytogenes</i>	Niederhauser et al, 1994
<i>Streptococcus uberis</i>	Cancilla et al, 1992
<i>Enterococcus sp</i>	Jayarão e Oliver, 1994
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Rasmussen, Olsen e Rasmussen, 1994

Vários estudos também têm sido feitos utilizando RAPD para a caracterização de espécies do gênero *Lactobacillus* (Johansson, et al, 1995; Cocconcelli et al, 1995; Hamad et al, 1997; Giraffa, DeVecchi e Reinheimer, 1997; Giraffa, De Vecchi e Rossetti, 1998; Tilsala-Timisjärvi e Alatossava, 1998; Cusick e O'Sullivan, 2000).

Johansson et al (1995) utilizaram a técnica RAPD na identificação de linhagens de *Lactobacillus plantarum* de diferentes origens. Como moldes de DNA, os autores usaram DNA purificado e DNA obtido de extratos de células, e concluíram que, com algumas exceções, os dois tipos de DNA seqüenciados apresentaram níveis de similaridade de 50% para gênero e espécie, sendo que 50% das cepas testadas puderam ser individualmente separadas de todas as outras cepas.

Cocconcelli et al (1997) utilizaram a técnica RAPD para identificar cepas envolvidas nas associações microbianas termofílicas presentes nos fermentos utilizados para fabricação de queijo tipo parmesão. As análises dos perfis RAPDs mostraram que as cepas predominantes pertenciam ao gênero *Lactobacillus*, sendo as espécies envolvidas, *L. helveticus* e *L. delbrueckii* e ainda *L. delbrueckii* subesp. *casei*. Segundo os autores, a técnica RAPD mostrou-se altamente eficiente na detecção de relacionamentos entre espécies.

### 3 Referências Bibliográficas

ABE, M.O.; LINDSAY, R.C. Evidence for a lactic streptococcal role in Nigerian acidic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) fermentations. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.41, n.10, p. 781-784, Oct. 1978.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294 p.

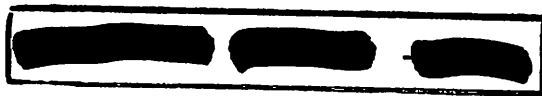
ARIAS, L.V.B. Fécula de mandioca e polvilho azedo para fabricação de pão de queijo. In: PIZZIMATTO, A.; ORMENESE, R. de C.S.C. **Seminário pão de queijo: ingredientes, formulação e processo**. Campinas: Governo do Estado de São Paulo, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolate, 2000. p. 1-14.

ASCHERI, D.P.R. **Acompanhamento do processo fermentativo através das características do polvilho e dos biscoitos elaborados**. Lavras: Esal, 1992. 92p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).

ASQUIERI, E.R. **Efeito da fermentação nas características da fécula de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) de três cultivares colhidas em diferentes épocas**. Lavras: Esal, 1990. 105p. (Dissertação- Mestrado em Ciência dos Alimentos).

BALOWS, A; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application**. 2.ed. New York: Springer-Verlang, 1991. v.1, cap.5, p. 126-144.

BARBUT, F.; MARIO, N.; DELMÉE, M.; GAZIAN, J.; PETIT, J. genomic fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates by using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 114, n. 1-3, p. 161-166. 1993.



BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting of bactéria. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 70-76. 1992.

BROWN, T.A. **DNA sequencing. The basics.** Oxford: IRL Press, 1994. 101p.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos.** 2.ed. São Paulo: Varela, 1995. 223p.

BRASIL. Decreto n.º12.486, 20 de outubro de 1978. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, SP, 21 out. 1978. p. 3-25.

BRASIL. Ministerio da Agricultura. Resolução n.º 66/71 do Conselho Nacional do Comércio Exterior. Normas de classificação dos produtos amiláceos exportáveis. In: MATTOS, M. da cC **Normas de padronização e classificação.** Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Adropecuária – Divisão de Produção Vegetal – Serviço de Padronização e Classificação Vegetal, p. 99-105, 1993.

BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 8.ed. Baltimore: The Willians & Wilkins, 1986. Vol. II.

BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** Baltimore: Willians & Wilkins, 1974.

CAMARGO, C.; COLONNA, P.; BULGON, A.; RICHARD-MOLAR, D. Functional properties of sour cassava (Manihot utilissima). Starch: Polvilho Azedo. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Osney Mead, v.45, n.3, p. 273-289, Mar. 1988.

CARDENAS, O.S.; BUCKLE, T.S. Sour cassava starch production: a preliminary study. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, n.6, p. 1509-1528, Nov./Dec. 1980.

X CEREDA, M.P. **Alguns aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca.** Botucatu: Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, 1973. 89p. (Dissertação- Mestrado em Ciências dos Alimentos).

- CEREDA, M.P. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca. II. Controle das fermentações realizadas em laboratório. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia**, Campinas, v.15, n.2, p. 107-122, abr./jun. 1981.
- CEREDA, M.P. Avaliação da qualidade da fécula fermentada comercial de mandioca (polvilho azedo). I. Características viscográficas e absorção de água. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.8, n.2, p. 7-13. fev. 1985.
- CEREDA, M.P. Estudos físico-químicos e microbianos da esterilização e da fermentação de fécula de mandioca. Botucatu: UNESP, 1981. 155p. (Tese de Doutorado em Ciências dos Alimentos).
- CEREDA, M.P. Microrganismos e ácidos orgânicos ocorrentes na fermentação da fécula de mandioca. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.47, p. 361-362, 1975.
- CEREDA, M.P. Tecnologia e qualidade do polvilho azedo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.145, p. 63-68, jan. 1987.
- CEREDA, M. P.; BONASSI, I.A. Avaliação da qualidade da fécula fermentada comercial (polvilho azedo). III. Ácidos orgânicos e absorção de água. **Revista Brasileira da Mandioca**, Cruz das Almas, v.3, n.2, p. 21-30, fev. 1985.
- CEREDA, M.P.; BONASSI, I.A.; BRASIL, O.G.; MATSUI, E. Ensaio de fermentação da fécula de mandioca em diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.3, n.2, p. 69-81, mar. 1985.
- CEREDA, M.P.; GIAJ-LEVRA, L.A. Constatação de bactérias não simbióticas fixadoras de nitrogênio em fermentação natural da fécula de mandioca. **Revista Brasileira da Mandioca**, Cruz das Almas, v.6, n.1, p. 29-33, jan. 1987.
- CEREDA, M.P.; LIMA, V. de A. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca. III. Determinação dos ácidos orgânicos. **Turrialba**, San José, v.35, n.1, p. 19-24, jan./mar. 1985a.

- CEREDA, M.P.; LIMA, V. de A. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca. IV. Aspectos gerais da fermentação. In: JORNADA CIENTÍFICA DA ASSOCIAÇÃO DOS DOCENTES DO "CAMPUS" DE BOTUCATU, p.10., 1981, Botucatu. Anais... Botucatu: UNESP, 1981.
- CEREDA, M.P.; LIMA, V. de A. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca. IV. Determinação dos açúcares redutores. *Revista da Agricultura*, Piracicaba, v.60, n.1, p. 23-34, jan. 1985b.
- CEREDA, M.P.; LIMA, V. de A.; BRASIL, M.A. Aspectos da fermentação da fécula de mandioca. I. Características do polvilho azedo comercial. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v.56, n.4, p. 230, dez. 1981.
- CEREDA, M.P.; LIMA, U.A.; BRASIL, M.A.M. Ensaio de fermentação de fécula da mandioca, utilizando substrato esterilizado com brometo de metila. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 5., 1982, Viçosa. Anais... Viçosa: Editora, 1982. p. 5.
- CEREDA, M.P.; PUPO, V.L.; LIMA, J. ; CATANEO, A.; NUNES, G.I.G. Caracterização de polvilho azedo de duas regiões produtoras de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 5., 1998, Fortaleza. *Resumo...* Fortaleza: Sociedade Brasileira de Mandioca, 1988. p. 14.
- CHOU, S.; CHEDORE, P.; HADDAD, A.; PAUL, N.R.; KASATIYA, S. Direct identification of mycobacterium species in bactec 7H12B medium by gas-liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.34, n.5, p. 1317-1320, May 1996.
- CHUZEL, G. Utilization- Almidón de yuca, uso actual y potencial. *Yuca Boletín Informativo*, Cali, v.15, n.1, p. 9-11, jan. 1991.
- COLE, M.B. Databases in modern food microbiology. *Trends in Food Science Technology*, Cambridge, v.2, n.9/11, p. 293-297, Nov. 1991.
- COLLARD, P.; LEVI, S. A two-stage fermentation of cassava. *Nature*, London, v.183, p. 620-621, 1959.

- COLLINS, M.D. et al. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v.34, n.2, p. 220-223, 1984.
- COLLINS, M.D. et al. *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.12, n.1, p. 95-98, 1991.
- COLLINS, M.D. et al. *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.57, n.3, p. 283-288, 1989.
- COLLINS, M.D. et al. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16SrRNA. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.77, p. 5-12, 1991.
- COCCONCELLI, P.S.; PORRO, D.; GALANDINI, S.; SENINI, L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic bacteria and enterococci. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 376-379. 1995.
- COUTO, M.M.B.; EUSMA, B.; HOFSTRA, H.; HUIS IN'T VELD, J.H.J.; VOSSSEN, J.M.B.M. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 1, p. 41-46. 1996.
- CUSICK, S.M.; O' SULLIVAN, D.J. Use of a single, triplicate arbitrarily primed-PCR producere for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.5, p. 2227-2231, 2000.
- DAINTY, R.; HIBARD, C.; EDWARDS, R. Cellular fatty acids of *Streptobacteria* isolated from vacuum packaged meats. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.5, p. 233-240. 1984.
- DECALLONE, J. et al. A rapid procedure for the identification of lactic acid bacteria based on the gas chromatografic analysis of the cellular fatty acids. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.54, n.3, p. 217-224, Mar. 1991.

- DEMIATE, I.M.; DUPUY, N.; HUVENNE, J.P.; CEREDA, M.P.; WOSIACKI, G. Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.42, p. 149-158, 2000.
- DEVRIESE, L.A. et al. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.71, n.3, p. 247-252, Mar. 1990.
- DEVRIESE, L.A. et al. *Streptococcus cecorum*, a new species isolated from chickens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.33, n.4, p. 772-776, 1983.
- DRAKE, M.A.; SMALL, C.L.; SPENCE, K.D.; SWANSON, B.G. Differentiation of *Lactobacillus helveticus* strains using molecular typing methods. **Food Research International**, Washington, v. 29, n. 5-6, p. 451-455. 1996.
- DUPLESSIS, M.A.; DICKS, L.M.T. Evaluation and random amplified polymorphic DNA (RAPD) – as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii*. **Current Microbiology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 114-118. 1995.
- DZIEZAK, J. Rapid methods for microbiological analysis of foods. **Food Technology**, Chicago, v.54, p. 56-73, 1987.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa, 1996. 220p.
- FIGUEROA, C. **Fermentacion del almidon de yuca**. Cali: Abril, 1991. 97p.
- FIGUEROA, C.; CHUZEL, G. Aislamiento y caracterizacion de cepas amilolíticas. In: TALLER AVANCES SOBRE ALMIDON DE YUCA, 1991, Cali. **Resumenes...** Cali: CIAT, 1991.
- FRENCH, D. Organization of starch granules. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. **Starch: chemistry and technology**. London: Academic Press, 1984. cap.7, p. 183-247.



- GALLO, C. **Determinação da micorbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** Campinas: UNICAMP. 1991. 338p. (Tese – Doutorado em Engenharia de Alimentos).
- GARVIE, E.I. The genus *Leuconostoc*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.A.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: The Williams & Wilkins, 1986. v.2, p. 1071-1075.
- GARVIE, E.I. The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.27, p. 283-292, 1960.
- GARVIE, E.I. Growth factor and aminoacid requirements of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. **Journal of General Microbiology**, London, v.48, p. 439-447, 1967.
- GASSER, F.; HONTEBEYRIE, M. Immunological relations of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Leuconostoc mesenteroides* NCDO768 (=ATCC 12291). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.27, p. 6-8, 1977.
- GIRAFFA, G.; DeVECCHI, P.; REINHEIMER, J. Population dynamics of thermophilic lactobacilli in mixed starter whey cultures. **Food Research International**, v.30, n.2, p.137-140. 1997.
- GIRAFFA, G.; DE VECCHIO, P.; ROSSETTI, L. Note: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85 p. 918-924, 1998.
- GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D.E. **Chemical methods in bacterial systematic.** London: Academic Press, 1985. 401p.
- GREENWOOD, C.T. Structure, properties and amylolytic degradation of starch. **Food Technology**, Chicago, v.18, n.5, p. 138-144, May 1964.
- HAMAD, S.H.; DIENG, M.C.; EHRMANN, M.A.; VOGEL, R.F. Characterization of the bacterial microbiota of Sudanese sorghum flour and

- sorghum sourdough. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, n.6, p.764 - 770. 1997.
- HARRISON, S.P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random oligonucleotides. **Canadian Journal of Microbiology**, Washington, v. 38, p. 1009-1015. 1992.
- HONTEBEYRIE, M.; GASSER, F. Comparative immunological relationships of two distinct sets of isofunctional dehydrogenases in the genus *Leuconostoc*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.25, p. 1-6, 1975.
- HONTEBEYRIE, M.; GASSER, F. Deoxyribonucleic acid homologies in the genus *Leuconostoc*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.27, p. 9-14, 1977.
- ISHIZAKI, A. et al. Biochemical characterization of *Lactococcus lactis* IO-1 whose optimal temperature is as high as 37°C. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.36, n.1, p. 1-6, 1990.
- JOHANSSON, M.L.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; UHLÉN, M.; AHRNÉ, S. Characterization and species recognition of *Lactobacillus plantarum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S rRNA gene. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79; n. 5; p.536-541, May. 1995.
- JOHANSSON, M.L.; QUEDNAU, M.; MOLIN, G.; AHRNÉ, S. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21; n. 3; p. 155-159, Sep. 1995.
- KALINA, A.P. The taxonomy and nomenclature of enterococci. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.20, n.3, p. 185-189, Mar. 1970.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. v.2, p. 209-1234.

- KANEUCHI, C.; MASAKO, S.; KOM AGATA, K. Taxonomic study of *Lactobacillus mali* Carr and Davis 1970 and related strains: Validation of *Lactobacillus mali* Carr and Davis 1970 over *Lactobacillus yamanashiensis* Nonomura 1983. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, n.3, p. 269-272, 1988.
- KROOVA, H. New methods of numerical processing of identification test results for lactic bacteria. **Food Science and Technology**, Washington, v. 23, n. 10, p. 142. 1990.
- Le JEUNE, C.; LONVAUD-FUNEL, A. *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus brevis* DNA analysis by restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Food Microbiology**, v.11, p.195-202. 1994.
- LEHMANN, P.F.; LIN, D.; LASKER, B.A. Genotypic identification and characterization of species and strains with the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 3249-3254. 1992.
- LEHNINGER, A. L.; NELSSON, D. L.; COX, C. M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- MARTINEZ-MURCIA, A.J.; COLLINS, M.D. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 69-74. 1991.
- 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**, London, v. 74, p. 147-155, 1997.
- MITEVA, V.I.; ABADJIEVA, A.N.; STEFANOVA, T.T. M13 DNA fingerprinting, a new tool for classification and identification of *Lactobacillus* spp. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, n.4, p. 349-354, 1992.
- MIYATA, M.; AOKI, T.; INGLIS, V.; YOSHIDA, T.; ENDO, M. RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 181-185, 1995.

- MOORE, W.E.C. Relationships of metabolic products to taxonomy of anaerobic bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.20, p. 535-538, 1970.
- MOORTHY, S.N.; RAMANUJAM, T. Variation in properties of starch in cassava varieties in relation to age of the crop. **Starch**, Weinheim, v.38, n.2, p. 58-61, Sept. 1986.
- MYERS, E.R.; MARTIN, S.E. Virulence of *Listeria monocytogenes* propagated in NaCl containing media at 4,25 and 37°C. **Journal of Food Protection**, Washington, v. 57, n.4, p. 475-478. 1994.
- NAKAMURA, I.M. **Contribuição ao estudo da fécula de mandioca fermentada**. Campinas: UNICAMP, 1975. 79p. (Dissertação - Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- NAKAMURA, I.M.; MORAIS, I.O.; MARTUCCI, E.T. Considerações sobre a tecnologia da fécula de mandioca fermentada: produção, propriedades físico-químicas e aplicação. **Científica**, Jaboticabal, v.4, n.2, p. 196-202, 1976.
- NAKAMURA, I.M.; PARK, Y.K. Some physico-chemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo). **Die Starke**: Weinheim, v.27, n.9, p. 295-297, Sept. 1975.
- NIEDERHAUSER, C.; HOFELIN, C.; ALLMANN, M.; BURKHALTER, P.; LUTHY, J.; CANDRIAN, U. Random amplification of polymorphic bacterial DNA: evaluation of 11 oligonucleotides and application to food contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, p.574-582. 1994.
- OKAFOR, A.O.; IJIOMA, B.; OYOLU, C. Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.56, n.1, p. 1-13, Jan. 1984.
- OYEWOLE, O.B. Fermentation of cassava for Lafun and Fufu production in Nigeria. **Food Laboratory News**, Uppsala, v.7, n.2, p. 29-31, Feb. 1991.

- PÀDUA, I.P.M. **Avaliação da presença de estafilococcus enterotoxigênicos em leite mastítico através de métodos convencionais e análise de ácidos graxos celulares por cromatografia gasosa.** Lavras: UFLA, 2001. 60p. (Dissertação - Mestrado em Ciência de Alimentos).
- PEREIRA, C.S.; CARVALHO, D.A. **Botânica da mandioca. (Manihot esculenta, Grants).** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.5, n.59/60, p. 31-37, jan. 1979.
- PLATA-OVIEDO, M.S.V. **Secagem do amido fermentado de mandioca: modificação química relacionada com a propriedade de expansão e características físico-químicas.** Campinas: UNICAMP, 1998. 114p. (Tese - Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- POT, B. et al. **Identification and classification of Lactobacillus acidophilus, L.gasseri and L. johnsonii strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization.** Journal of General Microbiology, London, v.139, n.2, p. 513-517, Feb. 1993.
- PRIEST, F.G.; BABOUR, E.A. **Numerical taxonomy of lactic acid bacteria and some related taxa.** In: GOODFELLOW et al. **Computer assisted.** Local: Editora, 1985. c.7, p. 137-163.
- RIZZO, A. F. **Rapid gas chromatographic method for identification of metabolic products of anaerobic bacteria.** Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.11, p. 418-421, 1980.
- RIZZO, A.F.; KORKEALA, H.; MONONEN, I. **Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in identification of Lactobacilli.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.53, n.12, p. 2883-2888, Dec. 1987.
- SAIKI, R.K.; GEFAND, H.; STOFELL, S. **Oligonucleotide direct enzymatic amplification of DNA polymerase.** Science, London, v. 239, p. 487-491. 1988.

- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, London, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- SCHLEIFER, K.H. Recent changes in the taxonomy of lactic bacteria. *FEMS Micorbiology Reviews*, Amsterdam, v.46, n.3, p. 201-203, 1987.
- SCHLEIFER, K.H.; KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.34, n.1, p. 31-34, 1984.
- SCHLEIFER, K.H. et al. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v.6, p. 183-195, 1985.
- SCHOLTZ, H.B.W.; CATÃO, D.D. *Mandioca, aspectos da cultura e da indústria*. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 1967. 289p.
- SHAW, B.G.; HARDING, C.D. *Leuconostoc gellidum* sp. Nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. Nov. from chill-stored meats. *International Journal os Systematic Bacteriology*, Washington, v. 66, n. 3, p. 217-223. 1989.
- SKERMAN, V.B.D., MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.30, p. 225-420, 1986.
- SNEATH, P.H.A. The application of computers to taxonomy. *Journal of General Microbiology*, London, v.17, p. 201-226, 1957a.
- SNEATH, P.H.A. Some thoughts on bacterial classification. *Journal of General Microbiology*, London, v.17, p. 184-200, 1957b.

- STEINBRUECKNER, B.; HAERTER, G.; PELZ, K.; BURNENS, A.; KIST, M. Discrimination of *Heliobacter pullorum* and *Campylobacter lari* by analysis of whole cell fatty acids extracts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.168, p. 209-212, Sept. 1998.
- TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; ALATOSSAVA, T. Strain-specific identification of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with randomly amplified polymorphic DNA-derived PCR primers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p. 4816-4819, 1998.
- TORRIANI, S.; VANREENEN, C.A.; KLEIN, G.; REUTER, G.; DELLAGLIO, F.; DICKS, L.M.T. *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. Nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov and *Lactobacillus sake* subsp. *sake* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *camosus* subsp. nov, new subspecies of *Lactobacillus curvatus* (Abdo-Elnaga and Kandler, 1965) and *Lactobacillus sake* (Katagiri, Kitahara and Fukami, 1934), respectively, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 1158-1163. 1996.
- UCHIDA, K. Effects of cultural conditions on the cellular fatty acids composition of *Lactobacillus heterohiochii*, an alcoholophilic bacterium. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v.39, p. 837-842, 1975.
- VEERKAMP, J. Fatty acids composition of *Bifidobacterium* and strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.108, p. 861-867, 1971.
- WELCH, D.F. Applications of cellular fatty acid analysis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 4, n.4, p.422-438, Oct/Dec. 1991.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, London, v. 18, n. 24, p. 7213-7218. 1990.
- WELSH, J.; PRETZMAN, C.; POSTIC, D. et al. Genomic fingerprinting by arbitrary primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 42, p. 370-377. 1992.

- WETSBY, A.; CEREDA, M.P. Production of fermented cassava starch (polvilho azedo) in Brazil. **Tropical Science**, London, v.34, p. 203-210, 1994.
- WILLIAMS, A.M., FARROW, J.A.E.; COLLINS, M.D. Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.8, n.3, p. 185-189, Mar. 1989.
- WILLIAMS, A.M., FRYER, J.L.; COLLINS, M.D. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.68, n.1-2, p. 109-114, Jan-Feb. 1990.
- ZAPPAROLI, G.; TORRIANI, S. Rapid identification and detection of *Lactobacillus sanfrancisco* in sourdough by species-specific PCR with 16S rRNA-targed primers. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 20, n. 4, p. 640-644. 1997.
- ZAPATA, L.E.; MARTINEZ, A.; PARADA, J.L. Aspectos microbiológicos del proceso fermentativo del almidón de yuca. In: TALLER AVANCES SOBRE ALMIDÓN DE YUCA, 1991, Cali. **Resúmens...** Cali: Ciat, 1991.
- ZAPATA, L.E.; PARADA, J.L. **Almidón agrio de yuca: aspectos tecnológicos e microbiológicos**. Bogotá:[s.n.], 1988. Páginas. (Doc. IIT).



## **CAPÍTULO 2**

### **Isolamento e caracterização da microbiota envolvida na fermentação natural do polvilho azedo**

## Resumo

SILVEIRA, Ivana Aparecida da. **Isolamento e caracterização da microbiota isolada da fermentação natural do polvilho azedo\***. Lavras: UFLA, 2001. 132p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).

Com o objetivo de caracterizar a microbiota presente em amostras de diferentes estágios do processo fermentativo para produção do polvilho azedo, utilizaram-se os meios Plate Count Agar (PCA) e Man Rogosa e Sharpe Agar (MRSA) em condições de aerobiose. O processo fermentativo foi acompanhado em duas fecularias diferentes, sendo que as contagens totais dos microrganismos aeróbios mesófilos permaneceram sem alterações significativas durante a fermentação da fécula, demonstrando que ocorreu uma mudança no tipo de microbiota, devido principalmente ao decréscimo dos valores de pH observados. Durante o processo fermentativo foram isoladas 873 bactérias, sendo que 25 (2,9%) corresponderam a bactérias Gram-negativas, 23 (2,6%) foram identificados como *Bacillus*, 15 (3,4%) como *Staphylococcus* e *Micrococcus*, 18 (2,1%) como *Corynebacterium* e 777 (89%) como bactérias ácido-láticas. O gênero *Lactobacillus* caracterizou o processo fermentativo e mostrou-se dominante com 435 isolados (49,8%), seguidos pelos gêneros *Streptococcus* (22,1%), *Enterococcus* (9,6%), *Leuconostoc* (4,3%), *Pediococcus* (2,3%) e *Lactococcus* (0,9%). As linhagens de *Lactobacillus* foram classificadas em dois grupos, de acordo com o tipo fermentativo. O primeiro grupo foi constituído pelas espécies homofermentativas identificadas como: *L. helveticus* (1,2%), *L. acidophilus* (10,6%), *L. delbruekii-lactis* (0,3%) e *L. delbruekii-delbruekii* (0,3%); e das linhagens heterofermentativas facultativas: *L. pentosus* (0,6%), *L. plantarum* (7,5%), *L. sake* (2,8%), *L. paracasei-paracasei* (20,3%), *L. acetotolerans* (0,9%), *L. curvatus* (3,4%), *L. rhamnosus* (2,5%), *Lactobacillus* sp (49,6%). No segundo grupo, formado pelos lactobacilos heterofermentativos obrigatórios, as espécies caracterizadas foram: *L. fermentum* (8,8%), *L. brevis* (87,8%) *L. cellobiosus* (1,7%). Entre as linhagens de cocos homofermentativos foram identificadas, no gênero *Streptococcus*: *S. bovis* (4,3%), *S. salivarius thermophilus* (4,9%), *S. equinus* (7,5%), *S. constellatus* (3,3%), *S. intermedius* (2,3%) e *Streptococcus* sp (40%); no gênero *Enterococcus*: *E. avium* (2,3%), *E. duram* (4,9%), *E. faecalis* (4,9%), *E. faecium* (5,2%), *Enterococcus* sp (11,1%); no gênero *Lactococcus*: *L. lactis lactis* (1,0%), *L. lactis cremoris* (1,6%); e no gênero *Pediococcus*: *P. acidilactici* (3,4%), *P. pentosaceus* (1,65%) e *Pediococcus* sp (1,65%). As linhagens cocobacilares heterofermentativas

---

\* Comitê Orientador: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Orientador),  
Dulcinéia de Carvalho - UFLA; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

obrigatórias foram identificadas como pertencentes ao gênero *Leuconostoc*, sendo: *L. mesenteroides mesenteroides* (54,1%), *L. mesenteroides dextranicum* (29,7%) e *Leuconostoc* sp (16,2%). A capacidade de hidrólise do amido foi verificada em *Bacillus* sp, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus equinus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus* sp, *Corynebacterium manihot*, e *Corynebacterium amylocatum*.

## Abstract

SILVEIRA, Ivana Aparecida da. **Isolation e characterization of microbiota isolated from natural fermentation of sour cassava flour** \*. Lavras: UFLA, 2001. 132p. (Thesis - Doctorate in Food Science)

With a view of characterizing the microbiota present in samples of different stages of the fermentative process for sour cassava starch production, the Plate Count Agar media (PCA) and Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA) under aerobic conditions. The fermentative process was accompanied in two different starch flour plants and, the total counts of the aerobic mesophilic microorganisms remained consistent throughout all the fermentation of the starch flour, showing that there was a change in the sort of microbiota due, mainly, to the decreased values of pH observed. During the process fermentative were isolated 873 bacterias the which, 25 (2,9%) corresponded to Gram-negatives bacterias, 23 (2,6%) were identified as *Bacillus*, 15 (3,4%) as *Staphylococcus* and *Micrococcus*, 18 (2,1%) as *Corynebacterium* and 777 (89%) as acid-lactic bacterias. The genus *Lactobacillus* characterized the fermentative process and it was shown dominant in the processes with 435 isolated (49,8%), followed of the genera, *Streptococcus* (22,1%), *Enterococcus* (9,6%), *Leuconostoc* (4,3%), *Pediococcus* (2,3%) and *Lactococcus* (0,9%). The strains of *Lactobacillus* were classified in two groups, according to the fermentative type. The first group formed of the species identified homofermentativas as: *L. helveticus* (1,2%), *L. acidophilus* (10,6%), *L. delbruekii-lactis* (0,3%) and *L. delbruekii-delbruekii* (0,3%); and of the strains facultative heterofermentativas: *L. pentosus* (0,6%), *L. plantarum* (7,5%), *L. sake* (2,8%), *L. paracasei-paracasei* (20,3%), *L. acetotolerans* (0,9%), *L. curvatus* (3,4%), *L. rhamnosus* (2,5%), *Lactobacillus* sp (49,6%). In the second group, formed by the obligates heterofermentativas lactobacilos, the species characterized were: *L. fermentum* (8,8%), *L. brevis* (87,8%) *L. cellobiosus* (1,7%). Among the strains of homofermentativos cocci, were identified, in the genus *Streptococcus*: *S. bovis* (4,3%), *S. salivarius thermophilus* (4,9%), *S. equinus* (7,5%), *S. constellatus* (3,3%), *S. intermedius* (2,3%) and *Streptococcus* sp (40%); in the genus *Enterococcus*: *E. avium* (2,3%), *E. lastis* (4,9%), *E. faecalis* (4,9%), *E. faecium* (5,2%), *Enterococcus* sp (11,1%); in the genus *Lactococcus*: *L. lactis lactis* (1,0%), *L. lactis cremoris* (1,6%); and in the genus *Pediococcus*: *P. acidilactici* (3,4%), *P. pentosaceus* (1,65%) and *Pediococcus* sp (1,65%). The obligate heterofermentative cocobacilar strains were identified as belonging to the genus

---

\* Guidance Committee: Eliana Pinheiro de Carvalho (Major Professor), Dulcinéia de Carvalho - UFLA \* ne Freitas Schwan - UFLA.

*Leuconostoc*, they being: *L. mesenteroides mesenteroides* (54,1%), *L. mesenteroides dextranicum* (29,7%) and *Leuconostoc* sp (16,2%). The hydrolysis capacity of starch was verified in *Bacillus* sp, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus equinus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus* sp, *Corynebacterium manihot*, and *Corynebacterium amylocatum*.

## 1 Introdução

A fécula de mandioca, pela legislação brasileira, recebe também a denominação de polvilho. O polvilho azedo é um tipo de amido modificado por processo de fermentação e secagem solar, apresentando por isso características bem diversas do polvilho doce (Maeda, 1999).

As condições em que se desenvolve a fermentação natural de polvilho azedo são muito especiais: substrato formado exclusivamente por amido granular como fonte de carbono para os microrganismos; meio quase sólido formado pela decantação da fécula no tanque e, conseqüentemente, condições anaeróbias no meio, que se estabelecem em um período de 3 a 5 dias (Chuzel, 1991; Figueiroa, 1991).

Tradicionalmente, o polvilho azedo é obtido pela fermentação do polvilho doce, podendo também ser produzido da fécula recuperada do líquido de prensagem da massa, como subproduto da fabricação da farinha de mandioca e de raspas (Cereda, 1987). Segundo a autora, a maioria dos produtores inicia o processamento pela raiz de mandioca, embora haja muitos que fermentem o polvilho doce extraído e armazenado durante a safra da mandioca.

O polvilho azedo é um produto tipicamente regional; no Brasil é produzido principalmente nos estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, sendo o processo realizado, muitas vezes, por um grande número de pequenas indústrias rurais (Pereira, 2001). Nas regiões produtoras tradicionais de Minas Gerais, o processo fermentativo leva de 30 a 40 dias, chegando a 60 dias no início da safra (Cereda, 1975; Ternes et al, 1978).

O processo de fermentação da fécula para obtenção do polvilho azedo é um processo natural espontâneo desenvolvido por diversos microrganismos naturalmente presentes na matéria-prima, na água e nos tanques de fermentação.

Essa característica explica a grande variação encontrada na qualidade do polvilho azedo proveniente dos diversos produtores e, ainda, entre partidas de um mesmo produtor (Rivera, 1997). No mesmo contexto, as diferentes condições climáticas brasileiras selecionam a microbiota predominante nos processos fermentativos, assim sendo, amostras de polvilho azedo provenientes de diferentes estados brasileiros apresentam diferenças no que se refere a acidez e composição de ácidos orgânicos. Segundo Cereda (1983), a temperatura de 30°C favorece o desenvolvimento de uma fermentação butírica, com predomínio de *Clostridium butyricum*; enquanto que temperaturas inferiores, entre 12 e 20°C (ou menos), favorecem a fermentação láctica, com um predomínio da microbiota láctica, representada principalmente por diferentes espécies de *Lactobacillus*, juntamente com bactérias esporuladas Gram-positivas e leveduras.

De acordo com Zapata, Martinez e Parada (1991), a fermentação natural é feita por uma microbiota mista, que produz um aumento na acidez titulável durante o processo, sendo 60% dessa acidez constituída por ácido láctico. Cardenas e Buckle (1980) encontraram 66-82% em ácido láctico no total de ácido produzido e, confirmaram assim, o papel das bactérias ácido-láticas no processo fermentativo para produção de polvilho azedo.

Cereda (1973) encontrou em fermentações de polvilho azedo, diversos gêneros de bactérias, variando em ordem de ocorrência, tais como *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, além de um grande predomínio de bactérias ácido-láticas.

Zapata et al. (1991) observaram no polvilho azedo uma microbiota constituída por bactérias aeróbias e microaeróbias, leveduras e fungos filamentosos. Também foram isolados cocos e bacilos Gram-positivos esporulados e não-esporulados. Não foi detectada a presença de bactérias coliformes. Nas primeiras etapas da fermentação houve um predomínio bacteriano, especialmente de cocos e bacilos Gram-positivos, sobre as leveduras.

Durante a fermentação do polvilho azedo, a contagem total de bactérias microaerófilas, realizada por Cárdenas e Buckler (1980) na Colômbia, variou de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g a  $3,0 \times 10^7$  UFC/g. Valores semelhantes foram encontrados por Carvalho (1994); a contagem total inicialmente apresentou resultados na ordem de  $10^5$  UFC/g, atingindo valores máximos na ordem de  $10^8$  UFC/g durante todo o período de fermentação.

Carvalho, Canhos e Vilela (1995) caracterizaram e identificaram a microbiota presente em processo fermentativo para produção de polvilho azedo. Segundo os autores, 3,1% dos isolados correspondiam a bactérias Gram negativas; 2,2% leveduras; 7,8% bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Corynebacterium*, 2,4% *Staphylococcus* e *Micrococcus* e 80,6% de bactérias ácido-láticas homo e heterofermentativas. Entre as bactérias ácido-láticas, o gênero *Lactobacillus* foi predominante, com 32% dos isolados. Neste grupo ácido-lático, também foram caracterizados *Leuconostoc* e os cocos homofermentativos *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*.

Zapata et al. (1991) encontraram leveduras do gênero *Saccharomyces* e fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Também foram isolados cocos e bacilos esporulados e não esporulados nas primeiras etapas da fermentação, havendo um predomínio bacteriano sobre as leveduras. Todas as leveduras isoladas apresentaram a capacidade de hidrolisar amido. Segundo os autores, o número de microrganismos viáveis tende a diminuir na etapa final do processo, devido ao meio ácido que causa injúria ou lesões letais aos mesmos.

Caracterizando a etapa final no processo fermentativo do polvilho azedo, na qual predominam microrganismos saprófitos e contaminantes, pode-se verificar a presença de leveduras de diversas espécies (Cereda, 1973). Segundo a autora, o papel das leveduras nas características sensoriais do polvilho azedo ainda não é bem determinado. Acredita-se que estes microrganismos possam



contribuir com substâncias orgânicas que fazem parte do aroma característico do polvilho azedo (Rivera, 1997).

O isolamento e caracterização da microbiota presente na fécula de mandioca, em estudos realizados na Colômbia demonstraram que as bactérias amilolíticas microaeróbias, são as iniciadoras do processo, propiciando condições, através de produtos metabólicos, para o desenvolvimento de outros microrganismos (Martinez et al., 1981, citado por Figueroa, 1991). Ao microscópio eletrônico, os autores observaram que os grânulos de amido fermentado apresentavam alterações e redução de tamanho, sendo que, ao final do processo, não foram encontradas tais modificações.

As enzimas que hidrolisam amido encontram-se amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo nas secreções digestivas e no interior das células da maioria dos animais e vegetais. As bactérias, fungos filamentosos e leveduras são formadores de amilase (Vijoyagopal e Balagopalan, 1989).

A atividade amilolítica de diversas espécies do gênero *Bacillus* é bem conhecida. Neste gênero, a espécie *B. subtilis* destaca-se pela produção dessas enzimas amilolíticas no início da fermentação (Cereda, 1973). Provavelmente, nesta fase, o ataque de enzimas aos grânulos de amido propicia fonte de carbono para o metabolismo dos agentes da fermentação.

Segundo Cereda (1982), em ensaios realizados em laboratório, este efeito pode ser comprovado através da identificação cromatográfica dos açúcares presentes no líquido sobrenadante ao longo da fermentação. Nestes ensaios foram detectados: glicose apenas nos primeiros dias de fermentação e maltodextranses nos demais, até o 30º dia, indicando que os açúcares produzidos iam sendo rapidamente consumidos e metabolizados principalmente na formação de ácidos orgânicos, em que predominam o láctico, acético e butírico.

Segundo Zapata et al. (1991), os bacilos Gram-positivos apresentam maior atividade amilolítica que os estreptococos e as leveduras. Giraud et al.

(1992) isolaram a partir da mandioca *Lactobacillus plantarum* com propriedades amilolíticas.

O desenvolvimento da indústria de polvilho azedo requer o estudo do processo fermentativo, objetivando conhecer a microbiota responsável pelas mudanças desejáveis nas propriedades funcionais do referido produto e, conseqüentemente, obter um produto uniforme e de qualidade adequada. Este trabalho teve como objetivo caracterizar fenotipicamente, através de testes bioquímicos e fisiológicos, a microbiota presente na fermentação natural do polvilho azedo, bem como verificar qualitativamente a atividade amilolítica das diferentes cepas isoladas.

## 2 Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, município de Lavras, Minas Gerais.

### 2.1 Produção do polvilho azedo e coleta das amostras

A fermentação da fécula de mandioca foi realizada por duas agroindústrias localizadas na região de Conceição dos Ouros, sul de Minas Gerais. A produção do polvilho azedo, nos dois locais, segue a mesma seqüência de etapas, bem como a retirada de amostras. A figura 1 mostra o esquema de produção do polvilho azedo e as fases de coleta das amostras.

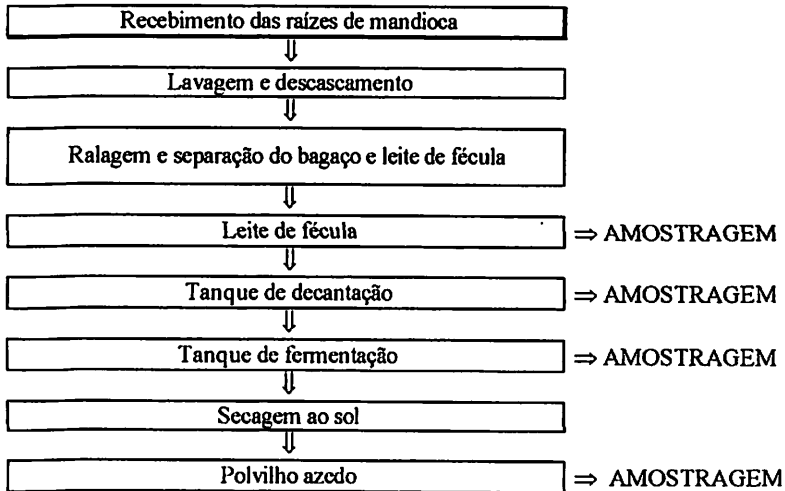


FIGURA 1 Esquema de produção e amostragem do processo de produção do polvilho azedo

## **2.2 Amostragem**

Foram coletadas uma amostra de leite de fécula e uma do tanque de decantação em cada uma das fecularias. Foram escolhidos dois tanques de fermentação por fecularia, sendo estes provenientes do mesmo tanque de decantação. As amostras dos tanques de fermentação, denominadas A e B para a fecularia 1 e C e D para a fecularia 2, foram coletadas em locais diferentes e sempre no mesmo tanque, em intervalos não regulares, de acordo com orientação do produtor (condições climáticas, chegada de matéria-prima, etc.), e conveniência do processo, ou seja, nos dias em poderiam ocorrer mudanças significativas no processo. O tempo de fermentação foi de 59 dias, iniciando em 04.05.1999 e terminando em 02.07.1999.

As amostras finais (polvilho azedo) foram coletadas após a secagem ao sol, em giraus de bambu.

Todas as amostras foram coletadas em frascos estéreis e transportadas ao laboratório de Microbiologia em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, para análises microbiológicas e físico-químicas.

Em todos os dias de coleta foram aferidos os valores de pH e de temperatura dos tanques de fermentação, com o auxílio de um pHmetro e termômetro que eram introduzidos à mesma profundidade em que eram coletadas as amostras.

## **2.3 Análises físico-químicas**

### **2.3.1 pH, Temperatura e Acidez titulável**

Os valores de pH e temperatura (nos tanques de fermentação) foram aferidos com o auxílio de um pHmetro portátil associado a termômetro (Hanna).

A acidez titulável seguiu metodologia proposta por Plata-Oviedo (1998). Foram pesados dez gramas da amostra em um béquer, e acrescentados 100 de água destilada. A mistura foi mantida sob agitação, sendo titulada com fenolftaleína até que o pH atingisse 8,3. O resultado foi expresso como miliequivalente da base por cem gramas da amostra em base seca.

### **2.3.2 Amido e açúcares redutores.**

A quantificação dos açúcares redutores e amido seguiram a metodologia descrita pela AOAC (1990).

## **2.4 Análises microbiológicas**

### **2.4.1 Preparo e diluições das amostras**

As amostras (50g) foram diluídas em 450 mL de água peptonada 0,1% , de onde foram feitas as diluições subseqüentes necessárias.

### **2.4.2 Plaqueamento e Contagem**

Foram feitas inoculações em PCA (Plate Count Agar - Merck) e MRSA (Rugosa, Man & Sharpe Agar – Merck) modificado (Nakamura e Crowell, 1979).

O plaqueamento foi feito em superfície, utilizando-se 0,1 mL das diluições e espalhando-se com alça de Drigalsk, sendo as placas inoculadas sempre em duplicata (Ducroq, 1990). Após a inoculação, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas, em condições de aerobiose. Após o período de incubação, realizaram-se as contagens e retirada de colônias.

As colônias foram retiradas sempre da placa com maior diluição, mantendo-se sempre a proporção de 10% do número total de colônias presentes por diluição. Estas colônias foram inoculadas em caldos de composição idêntica à do meio de origem e a incubação seguindo as mesmas condições de temperatura anteriormente utilizadas.

### **2.4.3 Caracterização dos isolados**

Todas as colônias foram purificadas em placas com ágar (PCA ou MRSA), sendo retiradas colônias isoladas de cada placa para posterior estudo. As características das colônias isoladas foram observadas em estereoscópio: forma, tipo de borda e superfície, pigmentação, opacidade e consistência (Krieg e Holt, 1984; Sneath et al., 1986; Holt et al., 1994).

As colônias isoladas foram transferidas, então, para tubos contendo ágar inclinado (PCA ou MRSA), para posterior caracterização.

Partindo do cultivo dos microrganismos isolados, foram feitas colorações de Gram, onde foram observados a morfologia e arranjo dos mesmos. Os isolados considerados puros (cepas) foram repicados para dois tubos contendo ágar inclinado (PCA ou MRSA), dos quais um foi usado para preservação das culturas sob óleo mineral esterilizado (Nujol). O outro tubo foi utilizado para realização de testes de motilidade, catalase, oxidase, fermentação de glicose com produção de ácido e gás, (Kandler e Weiss, 1986; Macfaddin, 1980), e novamente repicado e incubado, para manutenção do isolado e realização de demais testes bioquímicos de identificação.

### **2.4.4 Identificação dos microrganismos**

Partindo dos resultados obtidos na coloração de Gram, motilidade, catalase, oxidase e produção de ácido e gás a partir da glicose, os

microrganismos foram então separados em grupos, e submetidos a provas bioquímicas estabelecidas para cada grupo e utilizadas na identificação desses microrganismos. O esquema de agrupamento foi o mesmo utilizado por Carvalho (1994).

Os métodos utilizados para identificação, assim como as interpretações das provas bioquímicas seguiram instruções de Macfaddin (1980). As provas bioquímicas foram escolhidas de acordo com tabelas, variando de acordo com cada grupo estabelecido, sendo estas propostas por Macfaddin, 1980; Krieg e Holt, 1984; Kandler e Weiss., 1986; Holt et al., 1994.

A identificação foi realizada, sempre que possível, em nível de gêneros e espécies. A figura 2 mostra o esquema de agrupamento utilizado para a identificação das cepas isoladas.

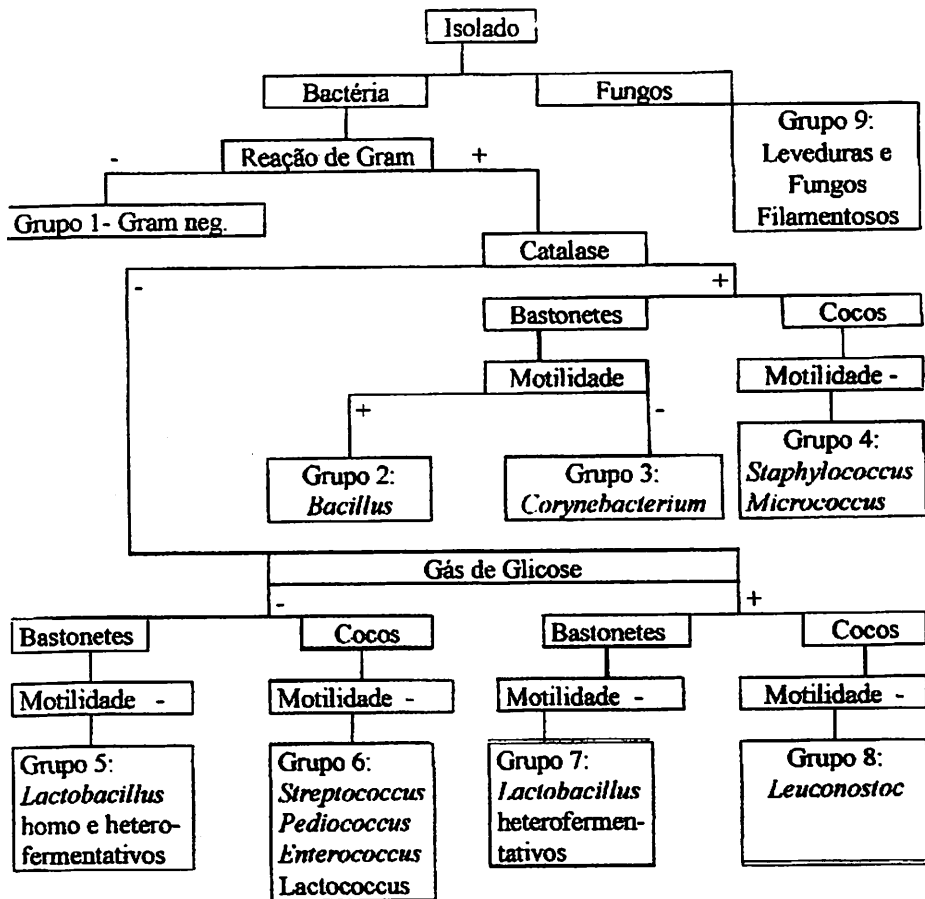


FIGURA 2 Esquema de agrupamento e classificação dos microrganismos.

#### 2.4.4.1 Grupo 1 - Bacilos Gram-negativos

Após classificação preliminar (oxidase e reação em TSI e LIA), culturas de 24 horas foram inoculadas em galerias dos sistemas API 20E e 20NE (Bio Merieux), para identificação.



#### **2.4.4.2 Grupo 2 - Bacilos Gram-positivos, catalase positiva, motilidade positiva**

Foram identificados, segundo tabelas e chaves diferenciais propostas por Slepecky e Hemphill (1991), sendo as principais provas diferenciais utilizadas: motilidade a 37°C, redução do nitrato, O-F glicose, Indol, Liquefação de gelatina a 22°C, citrato de Simmons, Voges-Proskauer (VP), uréia, fenilalanina desaminase, fermentação de carboidratos (glicose, manitol, arabinose e xilose), crescimento em NaCl 7,5% e hidrólise de amido. Também foi verificada a presença ou formação de esporos através da técnica de coloração de esporos (Ribeiro e Soares, 1993). A confirmação da identificação foi feita através do sistema API 50CH e provas complementares do API 20NE (Bio Mérieux).

#### **2.4.4.3 Grupo 3 - Bastonetes curtos (Cocobacilos) Gram-positivos, catalase positiva, motilidade negativa**

Após verificação da ausência de esporos, foram realizados testes propostos por Macfaddin (1980), seguidos de confirmação de identificação através do sistema API Coryne (Bio Mérieux), sendo os testes realizados: Redução do Nitrato, Produção de enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil arilamidase, fosfatase alcalina, beta-glucuronidase, beta-galactosidase, alfa-glucosidase, N-acetil-beta glucosaminidase), Esculina, Urease, Hidrólise de gelatina, Fermentação de açúcares (glicose, ribose, xilose, manitol, maltose, lactose, sacarose) e Catalase.

#### **2.4.4.4 Grupo 4 - Cocos Gram-positivos, catalase positiva, Motilidade negativa**

Para identificação dos microrganismos foram realizadas as provas: Oxidase, Redução do Nitrato, Motilidade, O-F glicose, Crescimento em NaCl

5%, 10% e 15%, Fermentação de glicose em aerobiose e anaerobiose, Fermentação de manitol em aerobiose e anaerobiose, Coagulase (em tubo), Liquefação de gelatina à 22°C, Arginina dehidrolase, H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>Voges-Proskauer e DNase.

#### **2.4.4.5 Grupo 5 - Bacilos Gram-positivos, catalase negativa, motilidade negativa, sem produção de gás a partir da glicose**

Os microrganismos deste grupo foram agrupados de acordo com características fisiológicas (homofermentativos ou heterofermentativos facultativos), segundo tabelas e chaves diferenciais propostas por Hammes, Weiss e Holzapfel (1991), sendo as principais provas utilizadas: Crescimento à 15°C, Produção de NH<sub>3</sub> a partir da arginina, Fermentação de carboidratos (amigdalina, celobiose, galactose, lactose, maltose, manitol, manose, melibiose, rafinose, salicina, sacarose, trealose, arabinose, esculina, melezitose, ribose, sorbitol e xilose). Uma vez agrupados, a identificação destes microrganismos foi realizada através do sistema API 50 CHL (Bio Mérieux).

#### **2.4.4.6 Grupo 6 - Cocos Gram-positivos, catalase negativa, motilidade negativa, sem produção de gás a partir da glicose**

Estes microrganismos foram classificados, agrupados e identificados em nível de gênero, de acordo com tabelas e chaves citadas por Holt et al. (1994), sendo os principais testes: Crescimento a 10°C e 45°C, crescimento em pH 9,5, crescimento em NaCl 6,5%, crescimento em bile 40%, Crescimento em Ágar KF e SF, verificação de hemólise em ágar sangue a 5%, Fermentação de carboidratos (lactose, sacarose, manitol, sorbitol e arabinose), Liquefação de gelatina a 22°C, Arginina dehidrolase e Redução de Nitrato. A identificação foi confirmada, incluindo espécies, através do sistema API STREP (Bio Mérieux).

#### **2.4.4.7 Grupo 7 - Bacilos Gram-positivos, catalase negativa, motilidade negativa, com produção de gás a partir da glicose**

Estes microrganismos foram agrupados de acordo com características fisiológicas (heterofermentativos obrigatórios), segundo tabelas e chaves diferenciais propostas por Hammes, Weiss e Holzapfel (1991), sendo as principais provas utilizadas: Crescimento a 15°C, Produção de NH<sub>3</sub> a partir da arginina, Fermentação de carboidratos (arabinose, celobiose, esculina, galactose, maltose, manose, melezitose, melibiose, rafinose, ribose, sacarose, trealose e xilose). Uma vez agrupados, a identificação destes microrganismos foi realizada através do sistema API 50 CHL (Bio Mérieux).

#### **2.4.4.8 Grupo 8 - Cocos (ou cocobacilos) Gram-positivos, catalase negativa, motilidade negativa, com produção de gás a partir da glicose**

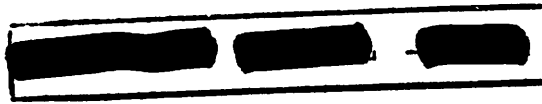
Estes microrganismos foram classificados e agrupados de acordo com tabelas e chaves citadas por Holt et al. (1994), sendo os principais testes: produção de ácido a partir dos carboidratos arabinose, frutose, maltose, melibiose, salicina, sacarose e trealose; Crescimento em pH 4,8; crescimento com 10% de etanol, crescimento a 37°C, Hidrólise de arginina, Indol e produção de ácido e gás a partir da glicose. Uma vez agrupados, a identificação destes microrganismos foi realizada através do sistema API 50 CHL (Bio Mérieux).

#### **2.4.5 Verificação qualitativa das atividades amilolíticas**

Para verificação da hidrólise do amido utilizou-se ágar amido (Merck). O meio foi preparado conforme especificação do fabricante e incorporado a placas de petri, sendo então as colônias puras estriadas na superfície. Após incubação a 37°C por 24 horas, adicionou-se 5 mL de solução de lugol para verificação da



hidrólise através da presença de zonas claras ao redor das estrias (Siqueira, 1995).

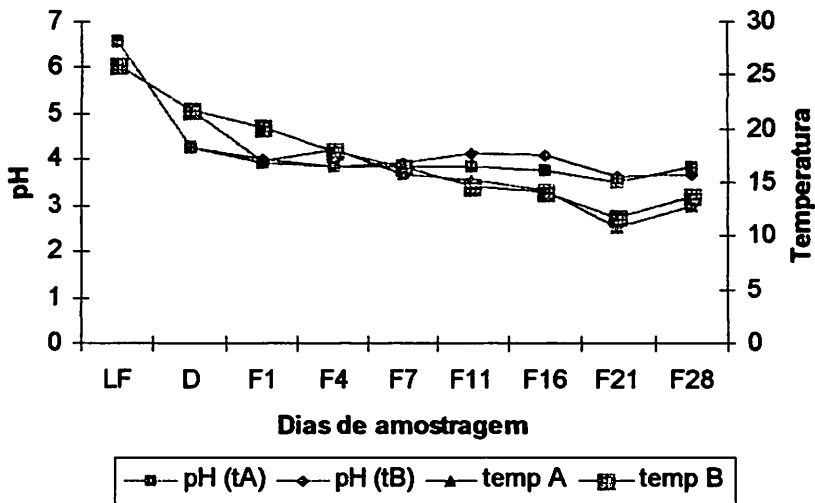


### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Análises físico-químicas

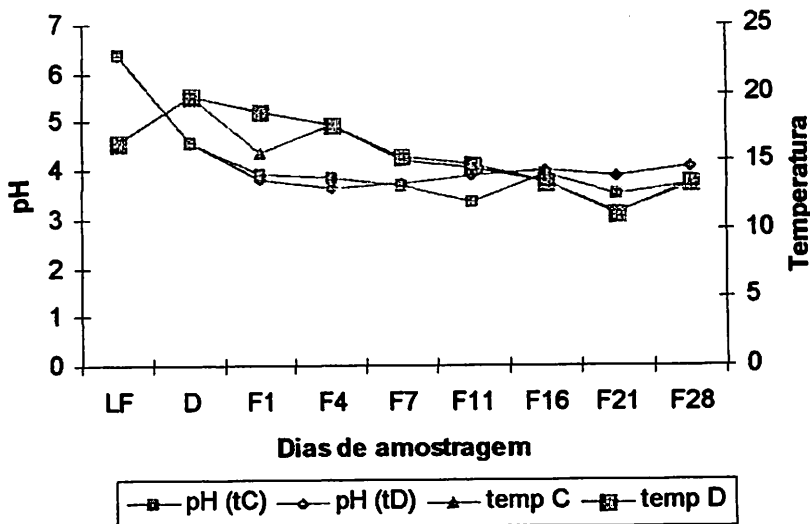
##### 3.1.1 pH e Temperatura

As figuras 3 e 4 mostram os valores de pH e temperatura aferidos diretamente nos quatro tanques de fermentação acompanhados neste experimento.



LF: leite de fécula; D: tanque de decantação; F1 a F28: tanque de fermentação com 1 dia, 4 dias, 7 dias, 11 dias, 16 dias, 21 dias e 28 dias respectivamente.

FIGURA 3 Valores de pH e temperatura das amostras em diferentes etapas da produção do polvilho azedo nos tanques A e B da fecularia 1.



LF: leite de fécula; D: tanque de decantação; F1 a F28: tanque de fermentação com 1 dia, 4 dias, 7 dias, 11 dias, 16 dias, 21 dias e 28 dias respectivamente.

FIGURA 4 Valores de pH e temperatura das amostras em diferentes etapas da produção do polvilho azedo nos tanques C e D da fecularia 2.

Observou-se uma variação de 10,8 a 26°C nos diferentes dias e locais de coleta da amostra. As baixas temperaturas observadas podem ter sido influenciadas pela estação do ano na qual foi realizado o experimento (04.05.1999 a 02.07.1999).

Segundo os produtores da região, o inverno é o melhor período para produção de polvilho azedo, tanto em rendimento quanto em qualidade do produto, visto que as baixas temperaturas favorecem uma melhor fermentação da fécula, sendo o produto obtido de cor mais clara e com odor característico e desejável pelos consumidores. Cereda et al. (1986) citam que nas regiões frias a fermentação é lenta e predomina a microbiota láctica (o que propicia o odor desejado citado pelos produtores). Este fato também foi comprovado por Cardenas e Buckler (1980), que constataram um predomínio de microbiota láctica

em temperaturas em torno de 15 e 25°C, sendo que o polvilho azedo obtido apresentava odor característico de ácido láctico. Segundo os autores, o odor característico é proveniente do predomínio de um ácido orgânico, que por sua vez está relacionado com o predomínio de uma microbiota, em função de fatores entre os quais as condições ambientais, principalmente temperatura da região produtora, têm grande influência.

Com relação à variação de pH, pode-se observar pelas figuras 3 e 4 uma queda destes valores no decorrer do processo fermentativo. Os tanques A e B apresentaram valores iniciais de 6,59 e valores finais de 3,86 e 3,69 aos 59 e 58 dias de fermentação, respectivamente. Os tanques C e D apresentaram valores iniciais de pH de 6,41 e valores finais de 3,73 e 4,08, aos 59 e 58 dias de fermentação, respectivamente. Os valores finais de pH encontrados neste experimento estão muito próximos aos encontrados na literatura. Plata Oviedo (1998) encontrou, em amostras de polvilho azedo comercial, um valor de pH médio de 3,81 e Pereira et al. (2001) encontraram para fécula fermentada de mandioca e polvilho azedo comercial valores médios de pH de 4,69 e 4,18, respectivamente.

Segundo Cereda (1987) o valor do pH da massa de polvilho em fermentação sofre um decréscimo para valores em torno de 3,0 a 3,5, chegando mesmo a 2,5. Cardenas e Buckle (1980) também observaram esta queda nos valores de pH após 2 a 3 dias de fermentação. Os autores observaram uma queda rápida destes valores de 6,5 para 3,5 e uma estabilidade destes valores baixos de pH até o final da fermentação.

As amostras dos tanques de decantação são consideradas pelos produtores como polvilho doce, no entanto pode-se observar que durante esta fase ocorreu um decréscimo no valor de pH (de 6,59 para 4,26 e de 6,41 para 4,58), o que demonstra que nesta fase já ocorrem alterações da fécula. Os baixos valores de pH encontrados no polvilho azedo são resultados de uma intensa

atividade microbiana durante o processo fermentativo pelas bactérias ácido-láticas próprias deste tipo de fermentação.

### 3.1.2 Determinação de acidez titulável, açúcares redutores e amido.

A tabela 1 mostra os resultados das análises de acidez titulável, açúcares redutores e amido nas amostras de polvilho azedo, seco ao sol, provenientes dos quatro tanques de fermentação em estudo.

TABELA 1 Valores médios de acidez titulável, açúcares redutores e amido nas amostras de polvilho azedo

Amostra	Acidez titulável (mEq/100g b.s.)	Açúcares redutores (g%)	Amido (g%)
A	6,35	0,0046	96,27
B	6,10	0,0085	87,27
C	6,55	0,0135	76,17
D	6,30	0,0080	91,64

Os valores de acidez titulável das amostras de polvilho azedo são inferiores aos encontrados por Pereira (2001), que obteve valores médios de 7,71 mEq/100g b.s para amostras de polvilho azedo; segundo a autora, os valores elevados de acidez titulável são justificados pelo aumento da atividade microbiana decorrente da fermentação do amido.

✱ Segundo Cereda e Lima (1981), o teor de acidez titulável caracteriza a fermentação natural utilizada para produção do polvilho azedo, sendo que os valores são muito variáveis, em decorrência do teor e natureza dos ácidos formados. Os autores analisaram 25 amostras de polvilho azedo comercial e encontraram variações na composição química das amostras, principalmente relacionadas à acidez titulável, que foram atribuídas pelos autores ao fato das fermentações não serem submetidas a análises de controle, sendo interrompidas em diferentes estágios de desenvolvimento e produção de ácidos.



A tabela I mostra valores muito baixos de açúcares redutores, indicando que estes foram todos consumidos durante o processo de fermentação. Os valores médios de amido encontram-se dentro dos padrões estabelecidos para o polvilho doce (mínimo de 80g%). Segundo Maeda (1999) e Pereira (2001), estes padrões são utilizados também para o polvilho azedo.

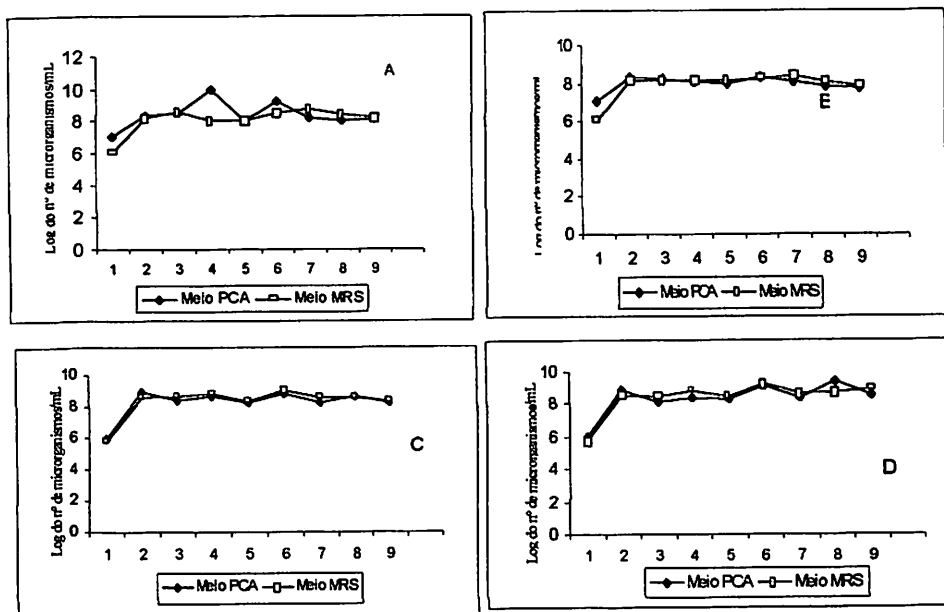
\* A literatura referente a explicações sobre as modificações do amido de mandioca durante o processo fermentativo na produção do polvilho azedo ainda é escassa. Ascheri (1992) cita que durante a fermentação da fécula de mandioca, os grânulos de amido são degradados por amilases produzidas pelos microrganismos presentes no meio. Segundo Cereda, Lima e Brasil (1982), a ação dos microrganismos sobre o amido gera açúcares mais simples. Através da identificação cromatográfica dos açúcares presentes no líquido sobrenadante ao longo da fermentação, os autores detectaram presença de glicose apenas nos primeiros dias de fermentação e maltodextroses nos demais, indicando que os açúcares produzidos vão sendo rapidamente consumidos e metabolizados principalmente na produção de ácidos orgânicos, em que predominam o láctico, butírico e acético.

\* De acordo Lehninger (1995) a fécula de mandioca possui grânulos de amido com 16 a 18% de amilose, sendo o restante constituído de amilopectina. Os estudos de Rivera (1997) mostraram que o conteúdo de amilose diminui nos primeiros doze dias de fermentação, indicando que o ataque por enzimas amilolíticas ao grânulo aconteceu neste período. Posteriormente, o grânulo de amido sofreu rearranjos, junto com possíveis ataques à amilopectina, o que elevou novamente o teor de amilose.

## 3.2 Microbiota predominante

### 3.2.1 Total de microrganismos aeróbios mesófilos

A figura 5 (A, B, C, D) mostra os resultados das contagens totais de microrganismos, realizados em meios PCA e MRS nos diferentes locais e etapas de amostragem do processo fermentativo.



<sup>1</sup> leite de fécula; <sup>2</sup> tanque de decantação; <sup>3 a 9</sup> tanques de fermentação com 1, 4, 7, 11, 16, 21 e 28 dias de fermentação.

FIGURA 5 Contagem total do número de microrganismos presentes nos tanques A e B da fecularia e C e D da fecularia 2 durante o processo fermentativo.

Como pode ser observado nas figuras acima apresentadas, não ocorreram grandes variações nas contagens totais dos microrganismos nas diferentes etapas

do processo fermentativo dos quatro tanques analisados. Os resultados das contagens iniciais (leite de fécula - LF) apresentaram-se na ordem de  $10^5$  UFC/g para os tanques A e B, e  $10^7$  UFC/g para os tanques C e D. Durante a fase de fermentação, todos os quatro tanques apresentaram contagens médias na ordem de  $10^8$  UFC/g, resultados semelhantes aos encontrados por Cardenas e Buckle (1980) e Carvalho (1994).

Mesmo com o decréscimo do pH característico da fermentação, não foi observada alteração acentuada no número de microrganismos totais durante a fase fermentativa, podendo-se atribuir à mudanças da microbiota existente. Este fato pode ser confirmado por experimentos realizados por Zapata e Parada (1988); os autores encontraram uma grande variedade no número e tipo de microrganismos durante a fermentação, e um decréscimo destes valores nas fases finais do processo.

As contagens finais realizadas nas féculas fermentadas após secagem apresentaram um decréscimo destes valores para a ordem de  $10^2$  a  $10^3$  UFC/g, para os meios PCA e MRS, respectivamente. Estes resultados finais são inferiores aos encontrados por Carvalho (1994). Segundo Zapata, Martinez e Parada (1991), o número de microrganismos tende a diminuir na etapa final do processo, devido a injúrias ou lesões letais causadas nos mesmos, pelo meio ácido. Também podemos associar a ação da luz solar na secagem da fécula fermentada, diminuindo assim o número de microrganismos por sua ação bactericida.

### **3.2.2 Isolamento e caracterização dos grupos microbianos**

Durante o processo fermentativo foram isolados 930 microrganismos, sendo 383 provenientes do meio PCA e 547 do meio MRS. Destes, 873 foram

caracterizados como sendo bactérias (93,9%) e 57 como leveduras e fungos filamentosos (6,1%).

Das 873 bactérias isoladas, 458 (52,5%) foram caracterizadas como bacilos Gram-positivos, 25 (2,9%) como bacilos Gram-negativos e 390 (44,6%) como cocos Gram-positivos. Segundo Brabet. (1994) o predomínio de bactérias Gram-positivas é característica deste tipo fermentação. Oyewole e Odunfa (1990) citam que a microbiota ácido-lática é tipicamente Gram-positiva e tende a predominar durante todo o processo fermentativo em função de sua resistência à acidez do meio.

### **3.2.3 Identificação dos grupos bacterianos**

As bactérias isoladas durante todo o processo fermentativo (nas duas fecularias) foram identificadas sempre que possível em nível de gênero e espécie. A figura 6 e a tabela 2 (Anexo A) mostram a quantidade e porcentagem dos diferentes grupos bacterianos caracterizados nas amostras coletadas nas diferentes etapas de produção do polvilho azedo.

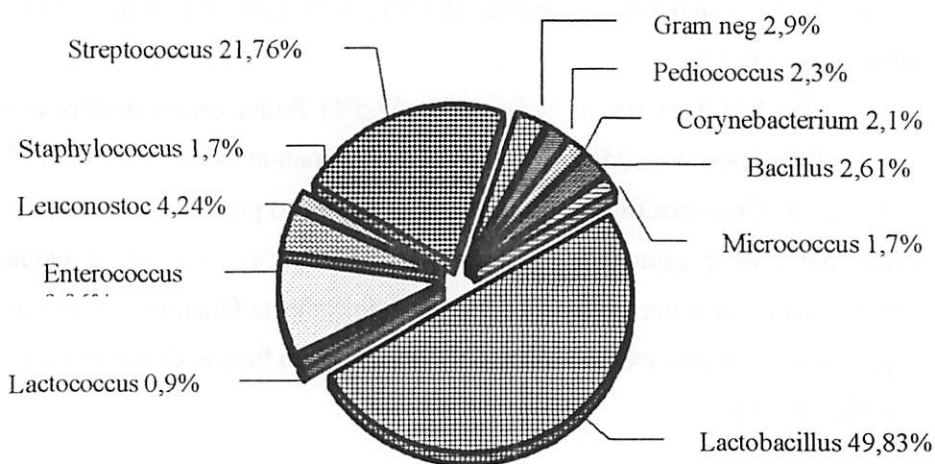


FIGURA 6 Grupos bacterianos isolados e caracterizados nas amostras das diferentes etapas da produção do polvilho azedo

### 3.2.3.1 Grupo 1 - Bacilos Gram-negativos

Foram isolados e caracterizados 25 bacilos Gram-negativos (2,9%) durante as diferentes etapas da fermentação, sendo *Pseudomonas*, o gênero predominante.

Foram identificadas 13 cepas de *Pseudomonas* (52%), 8 cepas de *Enterobacter* (32%) e 1 cepa de cada um dos gêneros *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Chromobacter* e *Citrobacter*, todas representando 4% (cada) dos isolados Gram-negativos. A tabela 3 mostra os diferentes gêneros e espécies identificadas das amostras das diferentes etapas da fermentação.

TABELA 3 Bactérias Gram-positivas isoladas e identificadas em amostras de diferentes etapas da produção de polvilho azedo

Microorganismo	Leite de fécula		Tanque de Decantação		Tanques e dias de fermentação					
	A - B	C - D	A - B	C - D	A		B		C	
					1d	4d	16d	6d	16d	11d
<i>Pasteurella haemolyticus</i>			1							
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1									
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	2				3					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1									
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>				2				1		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		2							2	
<i>Citrobacter freundii</i>										1
<i>Chromobacter violaceum</i>					1					
<i>Enterobacter cloacae</i>	3				2	1	2			

Estas bactérias Gram-negativas foram isoladas somente de cultivos em placas de PCA; a ausência deste grupo no cultivo com o meio MRS provavelmente está associada à seletividade do meio. A importância destes microrganismos neste tipo de fermentação poderia ser desprezada, devido a queda de pH que logo se instala no processo fermentativo, inibindo assim a atuação dos mesmos. Assim sendo, a presença destas bactérias nos estágios iniciais da fermentação pode ser considerada como contaminante do processo, visto que elas podem ter origem na água utilizada nos locais de fermentação. A presença destas bactérias nos tanques com 11 (tanques C e D) e 16 dias (tanques A e B) de fermentação pode estar associada com a troca da água de maceração realizada pelos produtores nos referidos dias.

Cereda (1973) cita a presença de *Escherichia*, *Alcaligenes* e *Pseudomonas*, como bactérias capazes de consumir oxigênio, produzindo gases e ácidos orgânicos. Segundo a autora, estas bactérias podem estar associadas à rápida queda da concentração de O<sub>2</sub> dissolvido na primeira fase da fermentação. O curto período de tempo no qual estas bactérias permanecem viáveis está talvez associado ao baixo valor de pH que rapidamente se instala a partir do tanque de

decantação. Alguns autores citam a presença de bactérias Gram-negativas dos gêneros *Klebsiella* (Okafor, Ijioma e Oyole, 1984) e *Alcaligenes* (Okafor, 1977), durante os primeiros estágios da fermentação de produtos de mandioca.

### 3.2.3.2 Grupo 2 - Bacilos Gram-positivos, catalase positiva, esporulados

Foram isoladas 23 cepas, representando 2,6% do total de isolados, todas caracterizadas e identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*. A tabela 4 mostra a quantidade e porcentagem das diferentes espécies de *Bacillus* isoladas e identificadas nas amostras coletadas durante o processo fermentativo.

TABELA 4 Espécies de *Bacillus* isoladas e identificadas nas amostras coletadas nas diferentes etapas de produção do polvilho azedo.

Espécie	Quantidade	Porcentagem (%)
<i>Bacillus liqueniformis</i>	1	4,4
<i>Bacillus coagulans</i>	2	8,7
<i>Bacillus thuringiensis</i>	2	8,7
<i>Bacillus</i> sp	2	8,7
<i>Bacillus pumilus</i>	3	13,0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3	13,0
<i>Bacillus megaterium</i>	3	13,0
<i>Bacillus subtilis</i>	7	30,5
Total	23	100

Os valores encontrados para os microrganismos deste grupo estão compatíveis com outros encontrados na literatura (Carvalho, 1994; Zapata e Parada, 1988; Zapata, Martinez e Parada, 1991).

Apesar de terem sido encontrados em pequena quantidade (2,6% do total de isolados), a presença do gênero *Bacillus* pode ser considerada de extrema importância nos processos fermentativos desta natureza, visto que estes microrganismos são capazes de produzir enzimas que atuam sobre os grânulos de amido; segundo Cereda (1973) este ataque ao grânulo de amido é provavelmente a origem da fonte de carbono para o metabolismo de outros

microrganismos que atuam como verdadeiros agentes da fermentação. Algumas espécies do gênero *Bacillus*, em especial *B. subtilis*, são bastante conhecidos com relação à capacidade de produção dessas enzimas amilolíticas (Cereda, 1973; Cereda, Lima e Brasil, 1982; Zapata e Parada, 1988; Figueroa, 1991; Carvalho, Canhos e Vilela, 1995).

### 3.2.3.3 Grupo 3 - Bacilos Gram-positivos, catalase positiva, não esporulados

Foram identificados 18 bacilos (2,1% do total de isolados) como pertencentes ao gênero *Corynebacterium*. As proporções obtidas são compatíveis com os resultados de Carvalho, Canhos e Vilela (1995) e Figueroa e Chuzel (1991), tanto em número quanto em importância da presença do referido gênero.

Na caracterização deste grupo bacteriano, observou-se que o gênero *Corynebacterium* somente foi isolado do meio de cultivo PCA, sendo este fato provavelmente associado à facilidade de crescimento em ágar nutriente apresentada por estas bactérias. A tabela 5 mostra as diferentes espécies de *Corynebacterium* isoladas nas diferentes etapas do processo.

TABELA 5 Espécies de *Corynebacterium* isoladas em PCA nas amostras obtidas das diferentes etapas do processo fermentativo para produção do polvilho azedo.

Espécie	Quantidade	Porcentagem (%)
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	3	16,7
<i>Corynebacterium manihot</i>	3	16,7
<i>Corynebacterium kutscher</i>	1	5,5
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	5	27,8
<i>Corynebacterium amylocatum</i>	2	11,1
<i>Corynebacterium</i> sp	4	22,2
Total	18	100

Apesar da pequena proporção encontrada, estes microrganismos, juntamente com algumas espécies de *Bacillus*, são considerados de grande



importância nos processos fermentativos de amido, sendo citados desde há muito tempo por alguns pesquisadores como os microrganismos responsáveis pela quebra do grânulo de amido (Collard e Levi, 1959; Collard, 1963).

Abe e Lindsay (1978) isolaram *Corynebacterium manihot* em processos de fermentação de fécula de mandioca, com baixíssima capacidade de produção de ácido, e concluíram que algumas espécies de *Corynebacterium* não são bons fermentadores de açúcares. Entretanto, quando esta fermentação ocorre, raramente produzem alta acidificação. Segundo os autores, muitas espécies dentro deste gênero oxidam a glicose completamente a dióxido de carbono e água.

#### **3.2.3.4- Grupo 4 - Cocos Gram-positivos, catalase positiva**

Os gêneros caracterizados neste grupo foram *Staphylococcus* sp (1,7%) e *Micrococcus* sp (1,7%). A literatura consultada não mostra grandes variações nestes percentuais. Segundo Carvalho (1994) este grupo de microrganismos não participa do processo fermentativo, estando presente como contaminantes do processo.

#### **3.2.3.5- Grupo 5 - Bacilos Gram-positivos, catalase negativa, não esporulados, produtores de ácido sem gás**

Das 873 cepas de bactérias isoladas, 435 foram caracterizados como sendo bacilos Gram-positivos catalase positiva. No grupo 5 foram caracterizados os lactobacilos homofermentativos e heterofermentativos facultativos, num total de 321 cepas (73,8% dos bacilos catalase negativa), sendo 218 (67,9%) provenientes do meio MRS e 103 (32,1%) do meio PCA. A seletividade do meio MRS justifica o predomínio destas espécies, mesmo com o meio PCA mostrando-se também favorável ao desenvolvimento de muitos lactobacilos.

Estes resultados podem ser comparados aos encontrados por Gallo (1990) que detectou um grande número de algumas espécies de lactobacilos somente em meio PCA.

A identificação em nível de espécie mostrou uma grande variedade destes lactobacilos; a tabela 6 mostra a quantidade e porcentagem das diferentes espécies de lactobacilos homofermentativos e heterofermentativos facultativos caracterizados das amostras coletadas nas diferentes etapas do processo fermentativo.

Um grande número de espécies homo e heterofermentativas facultativas também foram encontrados por Carvalho (1994); estas espécies foram isoladas em todas as etapas do processo fermentativo para produção do polvilho, sendo que, dos 189 isolados caracterizados como lactobacilos, 30 foram identificados como espécies homofermentativas, 136 como heterofermentativos e 23 como *Lactobacillus* sp, chegando a atingir 66,7% do total de isolados das amostras coletadas após 59 dias de fermentação.

TABELA 6 Espécies de lactobacilos homofermentativos e heterofermentativos facultativos isolados nas diferentes etapas da produção do polvilho azedo

Espécie	Meio MRS		Meio PCA	
	Nº	%	Nº	%
Homofermentativas				
<i>L. helveticus</i>	4	1,2	0	0
<i>L. acidophilus</i> I	1	0,3	0	0
<i>L. acidophilus</i> III	27	8,4	6	1,9
<i>L. delbruekii-lactis</i>	1	0,3	0	0
<i>L. delbruekii-delbru</i>	0	0	1	0,3
Heterofermentativas facultativas				
<i>L. pentosus</i>	2	0,6	0	0
<i>L. plantarum</i> I	17	5,3	6	1,9
<i>L. plantarum</i> II	1	0,3	0	0
<i>L. sake</i>	9	2,8	0	0
<i>L. para-paracasei</i> I	23	7,2	6	1,9
<i>L. para-paracasei</i> III	34	10,6	2	0,6
<i>L. acetotolerans</i>	3	0,9	0	0
<i>L. curvatus</i>	11	3,4	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	7	2,2	1	0,3
<i>Lactobacillus</i> sp	78	24,4	81	25,2
Total	218	67,9	103	32,1

Zapata e Parada (1988) também encontraram grande variedade de espécies durante a fermentação da fécula de mandioca; num mesmo contexto, Giraus, Cosselin e Raimbault (1992) isolaram, a partir de mandioca fermentada, várias espécies de lactobacilos, destacando a presença da espécie *L. plantarum*.

Hammes, Weiss e Holzapfel (1991) citam que, durante a fermentação da fécula de mandioca, sobre a influência de vários fatores tais como queda de pH e do potencial de oxi-redução, as bactérias lácticas, principalmente lactobacilos, passam a dominar o processo, sofrendo sucessivas modificações em nível de gênero e espécies.

As espécies caracterizadas como sp (24,4%) não apresentaram boa identificação, tendo sido consideradas como heterofermentativas facultativas, por fermentarem pentoses e não produzirem gás.

### 3.2.3.6 Grupo 6 - Cocos Gram-positivos, catalase negativa, produtores de ácido sem gás (homofermentativos)

Dentre os 305 cocos homofermentativos isolados, 190 foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptococcus*, 20 como *Pediococcus*, 87 como *Enterococcus* e 8 como *Lactococcus*. A tabela 7 mostra os resultados da identificação dos cocos homofermentativos isolados nas diferentes etapas do processo, bem como o total em número e porcentagem das diferentes espécies isoladas dos meios MRS e PCA.

TABELA 7 Gêneros e espécies de cocos homofermentativos isolados em PCA e MRS nas diferentes etapas da produção de polvilho azedo.

ISOLADOS	Meio MRS	Meio PCA	Total	%
<i>Streptococcus</i> sp	70	52	122	40,0
<i>Streptococcus bovis</i> I	6	4	10	3,3
<i>Streptococcus bovis</i> II	3	0	3	1,0
<i>Streptococcus salivarius termophilus</i>	6	9	15	4,9
<i>Streptococcus equinus</i>	17	6	23	7,5
<i>Streptococcus constellatus</i>	0	10	10	3,3
<i>Streptococcus intermedius</i>	0	7	7	2,3
<i>Enterococcus</i> sp	17	17	34	11,1
<i>Enterococcus avium</i>	7	0	7	2,3
<i>Enterococcus duram</i>	15	0	15	4,9
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	7	15	4,9
<i>Enterococcus faecium</i>	7	9	16	5,2
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	3	0	3	1,0
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	5	0	5	1,6
<i>Pediococcus</i> sp	3	2	5	1,65
<i>Pediococcus acidilactici</i>	6	4	10	3,4
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5	0	5	1,65
Total	178	127	305	100

Entre os cocos homofermentativos, o gênero *Streptococcus* foi o predominante com 62,3% dos isolados, seguido do gênero *Enterococcus* com 28,4%, *Pediococcus* com 6,7% e *Lactococcus* com 2,6%. Embora as porcentagens sejam superiores às encontradas na literatura, os gêneros são

sempre citados como participantes de processos fermentativos desta natureza. Segundo Rivera (1997) o processo de fermentação da fécula para se obter o polvilho azedo é natural, espontâneo, sendo desenvolvido por diversos microrganismos naturalmente presentes na matéria-prima, na água e nos tanques de fermentação.

Por outro lado, as diferentes condições climáticas do país selecionam a microbiota que predomina no processo fermentativo. Segundo Cereda (1983) a temperatura de 30°C favorece a fermentação butirica e temperaturas inferiores a 15°C favorecem a fermentação láctica. Cardenas e Buckler (1980) verificaram que em temperaturas mais baixas, entre 12 e 20°C, existe predomínio da microbiota ácido-láctica, principalmente constituída de lactobacilos homo e heterofermentativos, cocos homo e heterofermentativos, pertencentes aos gêneros *Streptococcus* e *Pediococcus*.

Okagbue (1990) cita a presença dos gêneros *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e algumas leveduras, num processo fermentativo de origem africana, para produção da chamada farinha “udaga”. Neste processo, a mandioca é descascada, fatiada e moída por abrasão, envolvida em panos ou sacolas e fermentada por 4 a 5 dias, sendo depois seca ao sol e moída.

Carvalho (1994) determinou a microbiota do polvilho azedo durante o processo fermentativo em nível industrial. Neste estudo encontrou-se que 80,6% dos isolados pertenciam ao grupo ácido-lático. Das bactérias ácido-láticas, o gênero *Lactobacillus* foi predominante no processo, com 32% dos isolados, seguido pelo gênero *Leuconostoc* com 21% e pelos cocos homofermentativos como *Lactococcus* com 12,6%, *Enterococcus* com 8,3%, *Pediococcus* com 5,9% e *Streptococcus* com 0,8%.

As espécies de *Enterococcus* isoladas em MRS foram identificadas como *E. avium*, *E. duram*, *E. faecalis* e *E. faecium*; quando o isolamento foi feito em PCA, foram identificados somente *E. faecium* e *E. faecalis*.

Abe e Lindsay (1978) isolaram *Streptococcus faecium* (atualmente classificado no gênero *Enterococcus*) como microrganismo predominante na fermentação da fécula de mandioca. Segundo os autores, este microrganismo, através de suas características culturais, mostrou ser o fermentador primário deste tipo de fermentação. Geldreich, Kenner e Kabler (1964) e Mundt (1973) citam que *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* podem estar associados à plantas e insetos, e que os mesmos digerem o amido mais ativamente que linhagens provenientes de mamíferos e pássaros.

Os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*, tipicamente cocos homofermentativos, ocorreram em níveis de 58,4% em MRS e 41,6% em PCA. Este fato pode ser atribuído às características nutricionais de cada gênero e às condições do meio em que se encontravam.

*Lactococcus* sp foi somente caracterizado partindo do cultivo em meio MRS, provavelmente por serem bactérias nutricionalmente fastidiosas, e segundo Anderson e Elliker (1953), requerem meios complexos para o seu desenvolvimento.

Segundo Facklan e Carey (1985) os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* são facultativos em relação ao oxigênio, sendo que muitas espécies crescem melhor anaerobicamente. A amostragem periódica realizada durante o processo fermentativo para produção do polvilho azedo mostrou uma distribuição heterogênea destes grupos durante o processo de fermentação.

Os gêneros *Lactococcus* e *Pediococcus* foram identificados em menores proporções que os gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*, porém estiveram presentes na maioria das etapas do processo. Etchells et al. (1975) também observaram em processos fermentativos de vegetais gêneros de bactérias ácido-láticas, ocorrendo na seguinte ordem: *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*.

Segundo Vaughn (1975) e Dellaglio e Torriani (1986) a presença do gênero *Pediococcus* é comum nos processos de fermentação de vegetais e, muitas vezes, multiplicam-se rapidamente, vindo a predominar entre a microbiota ácido-lática, principalmente nos primeiros estágios do processo.

### 3.2.3.7 Grupo 7 - Bacilos Gram-positivos, catalase negativa, não esporulados, produtores de ácido e gás (heterofermentativos obrigatórios)

Dos 435 microrganismos isolados e caracterizados como lactobacilos, 114 (26,2%) apresentaram características do grupo heterofermentativo obrigatório, ou seja, fermentação de pentoses e gluconato e produção de gás.

A tabela 8 mostra os números e porcentagens das diferentes espécies de lactobacilos heterofermentativos obrigatórios isolados e caracterizados nas amostras das diferentes etapas da fermentação do polvilho azedo.

TABELA 8 Espécies de lactobacilos heterofermentativos obrigatórios isolados nas diferentes etapas de produção do polvilho azedo.

Espécie	Meio MRS		Meio PCA	
	Nº	%	Nº	%
<i>Lactobacillus fermentum</i>	10	8,8	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> I	11	9,7	1	0,9
<i>Lactobacillus brevis</i> II	88	77,2	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> II	2	1,7	0	0
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	2	1,7	0	0
Total	113	99,1	1	0,9

A presença de espécies de lactobacilos heterofermentativos obrigatórios é citada por Oyewole e Odunfa (1990) na fermentação de mandioca para produção de fu-fu, sendo que, das 134 bactérias isoladas, 15% foram identificadas como sendo *L. cellobiosus* e 9% como *L. brevis*.

Segundo Carvalho (1994) dos 189 lactobacilos da fermentação de fécula de mandioca para produção de polvilho azedo, 136 foram identificados como

espécies heterofermentativos obrigatórios e/ou heterofermentativos facultativos. Holzapfel e Schillinger (1991) também citam a caracterização de uma grande variedade de espécies heterofermentativas e atribuem a este grupo um importante papel na fermentação de vegetais.

### **3.2.3.8 Grupo 8 - Cocos ou cocobacilos Gram-positivos, catalase negativa, produtores de ácido e gás (heterofermentativos)**

Das 873 bactérias isoladas, 37 (4,2%) foram caracterizadas como pertencentes ao gênero *Leuconostoc*, sendo que 26 (70,3%) foram isoladas do meio MRS e 11 (29,7%) do meio PCA. Carvalho (1994) encontrou proporções superiores deste gênero em estudo de processo fermentativo de mandioca para produção de polvilho azedo realizado em Macaia, região sul de Minas Gerais. De um total de 590 isolados, 124 (21%) foram caracterizados como *Leuconostoc* sp, sendo que 12,3% foram isolados do meio PCA e 29,2% do meio MRS. Gallo (1990) detectou a presença de bactérias do gênero *Leuconostoc* somente em ágar MRS, representando 29,2% dos isolados no referido meio.

Segundo Holzapfel e Schillinger (1992), os cocos heterofermentativos do gênero *Leuconostoc* representam um papel importante na fermentação de vegetais, sendo muito comum sua presença nos estágios iniciais dos processos de fermentação devido, principalmente a sensibilidade ao pH baixo, apresentado por este gênero.

Os resultados da identificação de *Leuconostoc* isolados nas diferentes etapas do processo fermentativo estão apresentados na tabela 9.



TABELA 9 Quantidade e porcentagem do gênero *Leuconostoc* isolados dos meios PCA e MRS nas diferentes etapas de produção do polvilho azedo.

Isolados	Meio MRS	Meio PCA	Total	%
<i>Leuconostoc mesenteróides mesenteroides</i>	12	8	20	54,1
<i>Leuconostoc mesenteroides dextranicum</i>	9	2	11	29,7
<i>Leuconostoc</i> sp	5	1	6	16,2
Total	26	11	37	100

A tabela 9 mostra o predomínio da espécie *L. mesenteroides mesenteroides*, em ambos os meios utilizados para isolamento. De acordo com Steinkraus (1983) esta espécie tem um importante papel na fermentação de vegetais, estando aparentemente melhor adaptada a vegetais e iniciando crescimento mais rápido que outras bactérias ácido-láticas, produzindo ácido e dióxido de carbono.

### 3.2.4 Distribuição da microbiota nas fecularias 1 e 2 durante o período de amostragem

A tabela 10 mostra a distribuição dos grupos microbianos nas duas fecularias utilizadas neste experimento.

TABELA 2.10 Distribuição da microbiota em relação as fecularias.

Grupo microbiano	Fecularia 1		Fecularia 2	
	Meio MRS	Meio PCA	Meio MRS	Meio PCA
<i>Lactobacillus</i> sp	142	42	189	62
<i>Streptococcus</i>	72	36	30	52
<i>Enterococcus</i>	34	19	20	14
<i>Leuconostoc</i>	14	8	12	3
<i>Lactococcus</i>	6	0	2	0
<i>Staphylococcus</i>	1	7	3	4
<i>Micrococcus</i>	0	10	0	5
<i>Pediococcus</i>	2	4	12	2
<i>Corynebacterium</i>	0	8	0	10
<i>Bacillus</i>	0	9	0	14
Gram-negativos	0	9	0	14
Total	271	162	268	172

Foram isolados 433 microrganismos na fecularia 1 e 440 na fecularia 2. As tabelas 11, 12, 13 e 14 (Anexo A) mostram a distribuição dos microrganismos isolados nos meios PCA e MRS, nas diferentes etapas de amostragem da produção do polvilho azedo em ambas fecularias.

A análise das tabelas 11 e 12 mostram que, na fecularia 1, a presença do gênero *Lactobacillus* foi constatada somente a partir dos estágios iniciais da fermentação, tanto no meio MRS quanto no meio PCA. No meio MRS não foi verificada a presença de microrganismos dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e pertencentes ao grupo Gram-negativo. O gênero *Lactobacillus* apresentou-se dominante em quase todas as etapas amostradas dos tanques de fermentação.

Na fecularia 2, as tabelas 13 e 14 mostram a presença de microrganismos do gênero *Lactobacillus* nas amostras coletadas a partir do tanque de decantação, sendo então dominantes em quase todas as amostras coletadas dos tanques de fermentação. Assim como na fecularia 1, no meio MRS não foi verificada a presença de microrganismos dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, bem como os microrganismos pertencentes ao grupo Gram-negativo.

Num contexto geral, o gênero *Lactobacillus* foi o predominante nas duas fecularias, tendo sido mais bem isolado no meio MRS ágar. As duas fecularias também apresentaram, em ordem de maior incidência, um grande número de espécies dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*.

### **3.2.5 Verificação qualitativa das atividades amilolíticas**

Todos os isolados caracterizados neste experimento foram avaliados quanto à capacidade de hidrolisarem o amido.

Entre as bactérias do gênero *Bacillus*, as espécies *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*. representando 43,5% deste grupo, hidrolisaram completamente o amido; 56,4% das espécies restantes hidrolisaram parcialmente. Segundo Zapata e Parada (1988), os bacilos esporulados apresentam maior atividade amilolítica do que a maioria das bactérias ácido-láticas. Segundo Cereda (1973) a atividade amilolítica de diversas espécies do gênero *Bacillus* é bastante conhecida, sendo a espécie *B. subtilis* citada como altamente amilolítica.

Entre os 435 *Lactobacillus* isolados, 88 caracterizados como *L. brevis* (20,2% das espécies caracterizadas), 23 como *L. plantarum* (5,3%) e 26 *Lactobacillus* sp (6,0%), hidrolisaram amido. *L. plantarum* é um microrganismo reconhecido como produtor de enzimas amilolíticas. Giraud et al. (1992) isolaram, a partir de mandioca, espécies de *Lactobacillus plantarum* com propriedades amilolíticas. Bactérias amilolíticas do gênero *Lactobacillus* também foram encontradas em polvilho azedo por Gomez et al. (1994).

Os 305 cocos homofermentativos isolados apresentaram propriedades amilolíticas em 19% de seus representantes, sendo 23 cepas caracterizadas como *Streptococcus equinus* (7,5%), 16 cepas como *Enterococcus faecium* (5,2%), 15 como *Enterococcus faecalis* (4,9%) e 4 como *Pediococcus* sp (1,3%). Zapata e Parada (1988) citam a capacidade de produção de enzimas amilolíticas em cocos homofermentativos, embora, e ainda segundo os autores, estas propriedades sejam menores do que as apresentadas por espécies de *Bacillus*.

No grupo coriniforme, a presença de atividade amilolítica foi verificada nas espécies *C. manihot* e *C. amylocatum*, representando 11,1%, respectivamente, dos microrganismos caracterizados neste grupo. *Corynebacterium* sp, apesar de terem sido encontrados em pequeno número em relação ao restante da microbiota isolada, são considerados de grande importância neste tipo de fermentação. De acordo com Collard e Levi (1959) e Collard (1963), o gênero *Corynebacterium* sp pode ser o microrganismo

responsável pela quebra do grânulo de amido. Contrariando o proposto, Abe e Lindsay (1978) isolaram cepas de *C. manihot* que não mostraram capacidade amilolítica significativa.

Entre as 37 espécies de *Leuconostoc*, apenas as 11 caracterizadas como *L. mesenteroides dextranicum* (29,7%) apresentaram atividades amilolíticas. Nwankwo, Anadu e Usoro (1989) encontraram um grande número de espécies microbianas capazes de degradar a fécula contida nos tubérculos de mandioca; entre os isolados, *Leuconostoc mesenteroides* apresentaram atividade amilolítica, bom crescimento em altas temperaturas e em pH 5,0 e 6,0.

Alta atividade amilolítica também foi verificada em todas as cepas de leveduras que não foram identificadas neste trabalho. Zapata, Martinez e Parada (1991) citaram a presença do gênero *Saccharomyces* em processos fermentativo para produção do polvilho azedo, como leveduras produtoras de enzimas amilolíticas.

Figueroa e Chuzel (1991) citam que o maior grupo de bactérias encontradas na fermentação da fécula corresponde ao gênero *Lactobacillus*, e que estes lactobacilos apresentam atividades amilolíticas maiores quando estão associados a leveduras.

## 4 Conclusão

Com base no exposto, pode-se concluir que:

- Ocorreram variações nos valores de pH, indicando que a fermentação da fécula de mandioca iniciou-se nas amostras dos tanques de decantação, devido ao abaixamento de pH.
- A ausência de açúcares redutores nas amostras de polvilho azedo seco indica que estes foram todos consumidos durante o processo fermentativo.
- As contagens totais de microrganismos aeróbios mesófilos realizadas nas duas fecularias não sofreram alterações significativas durante a fermentação da fécula, sendo somente verificado uma mudança da microbiota devido ao decréscimo do pH.
- Os meios PCA e MRS não apresentaram diferenças marcantes nas contagens totais realizadas nas duas fecularias.
- Dentre os 930 microrganismos isolados, 873 (93,9%) foram caracterizados como bactérias, sendo que 23 (2,6%) pertenciam ao gênero *Bacillus*, 15 (1,7%) pertenciam aos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*, 18 (2,1%) ao gênero *Corynebacterium*, 25 (2,9%) pertenciam ao grupo Gram-negativo e 777 (89%) como bactérias ácido-láticas.
- Ocorreu um predomínio da microbiota ácido-lática, sendo o gênero *Lactobacillus* predominante nas duas fecularias, seguido de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactococcus*.
- Em ambas fecularias a presença do gênero *Lactobacillus* não foi constatada nas amostras de leite de fécula e nos tanques de

decantação, tendo sido verificada nos tanques de fermentação a partir do primeiro dia até o final do processo fermentativo.

## 5 Referências Bibliográficas

- ABE, M.O.; LINDSAY, R.C. Evidence for a lactic streptococcal role in Nigerian acidic cassava (*Manihot esculenta Crantz*) fermentations. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.41, n.10, p. 781-784, Oct. 1978.
- ANDERSON, A.W.; ELLIKER, P.R. The nutritional requirements of lactic streptococci isolated from starter cultures. I. Growth in a synthetic medium. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.36, n.2, p. 161-167, Feb. 1953.
- ASCHERI, D.P.R. **Acompanhamento do processo fermentativo através das características do polvilho e dos biscoitos elaborados**. Lavras: Esal, 1992. 92p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemistry**. 15.ed. Washington: D.C.,1990. v.2.
- BRABET, C. Study of natural fermentation of cassava starch in Colômbia. I- Characterization of the microflora and fermentation parameters. In: INTERNATIONAL MEETING ON CASSAVA FLOUR & STARCH, proceedings Cali. Cali: CIAT, p.120. 1994.
- CARDENAS, O.S.; BUCKLE, T.S. Sour cassava starch production: a preliminary study. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, n.6, p. 1509-1528, Nov./Dec. 1980.
- CARVALHO, E.P. **Determinação da microbiota do polvilho azedo**. Campinas: Unicamp, 1994. 363p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).
- CARVALHO, E.P.; CANHOS, V.P.; VILELA, E.R. **Determinação da microbiota do polvilho azedo**. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.15, n.3, p. 239-245, dez. 1995.

- CEREDA, M.P. **Alguns aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca.** Botucatu: Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, 1973. 89p. (Dissertação - Mestrado em Ciências dos Alimentos).
- CEREDA, M.P. Avaliação da qualidade de duas amostras de fécula fermentada de mandioca (polvilho azedo). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.3, p. 305-320, mar. 1983.
- CEREDA, M.P. Microrganismos e ácidos orgânicos ocorrentes na fermentação da fécula de mandioca. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.47, p. 361-362, 1975.
- CEREDA, M.P. Tecnologia e qualidade do polvilho azedo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.145, p. 63-68, jan. 1987.
- CEREDA, M.P. et al. Tratamento anaeróbio endos fases de suspensiones amiláceas. I. Fase acidogénica. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v.26, n.1, p. 101-108, jan. 1986.
- CEREDA, M.P.; LIMA, V. de A. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca. IV. Aspectos gerais da fermentação. In: JORNADA CIENTÍFICA DA ASSOCIAÇÃO DOS DOCENTES DO "CAMPUS" DE BOTUCATU, 10., 1981, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 1981. Páginas.
- CEREDA, M.P.; LIMA, U.A.; BRASIL, M.A.M. Ensaio de fermentação de fécula da mandioca, utilizando substrato esterilizado com brometo de metila. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, Viçosa, 1982. **Anais...** Viçosa: UFV, 1982. p.5.
- CHUZEL, G. Utilization- Almidón de yuca, uso actual y potencial. **Yuca Boletín Informativo**, Cali, v.15, n.1, p. 9-11, jan. 1991.
- COLLARD, P. A species of *Corynebacterium* isolated from fermenting cassava roots. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.26, n.2, p. 115-116, Fev. 1963.



- COLLARD, P.; LEVI, S. A two-stage fermentation of cassava. *Nature*, London, v.183, p. 620-621, 1959.
- DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.60, p. 83-92, 1986.
- DUCROQ, S. *Etude de la fermentation lactique de l'amidon de manioc*. France: CEEMAT, 1990. 48p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- ETCHELLS, J.L.; FEMING, H.P.; BELL, T.A. Factors influencing the development of lactic acid bacteria during fermentation of brined cucumbers and olives. In: CARR, J.G.; CUTTING, V.C.; WHITING, G.C. (Eds.). *Lactic acid bacteria in beverages and food*. London: Academic Press, 1975. p. 281-305.
- FACKLAN, R.R.; CAREY, R.B. Streptococci and aerococci. In: LENNETTE, E.H. *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society Microbiology, 1985. cap. 16, p. 154-175.
- FIGUEROA, C. *Fermentacion del almidon de yuca*. Cali: Abril, 1991. 97p.
- FIGUEROA, C.; CHUZEL, G. Aislamiento y caracterizacion de cepas amilolíticas. In: TALLER AVANCES SOBRE ALMIDON DE YUCA, 1991, Cali. *Resumenes...* Cali: CIAT, 1991. p.5.
- GALLO, C. *Determinação da micorbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica*. Campinas: Unicamp, 1990. 388p. (Tese - Doutorado em Engenharia de Alimentos).
- GELDREICH, E.E.; KENNER, B.A.; KABLER, P.W. Occurrence of coliforms, fecal coliformis and streptococci in vegetation and insects. *Applied Microbiology*, Washington, v.12, n.2, p. 63-69, Fev. 1964.
- GIRAUD, E.; COSSELIN, L.; RAIMBULT, M. Degradation of cassava linamarin by lactic acid bacteria. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v.14, n.7, p. 593-598, Jul. 1992.

- GOMEZ, Y. et al. Study of natural fermentation of cassava starch in Colombia. II. Isolation of amylolytic lactic acid bacteria. In: INTERNATIONAL MEETING ON CASSAVA FLOUR & STARCH, 1994, Cali. **Annals...** Cali: CIAT, 1994.
- HAMMES, N.W.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS et al (eds.). **The Prokaryotes**. New York: Springer-Verlang, 1991. v.2, p.1535-1594.
- HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. The genus *Leuconostoc*. In: BALLOWS et al (Eds.) **The Prokaryotes**. New York: Springer-Verlang, 1991. v.2, p.1508-1534.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wikins, 1994. 787p.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p. 1209-1234.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wikins, 1984. 964p.
- LEHNINGER, A.L.; NELSSON, D.L.; COX, C.M.M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527p.
- MAEDA, K.L. **Proposta de classificação para o polvilho azedo**. Piracicaba: ESALQ, 1999. 95p. (Dissertação - Mestrado: Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- MUNDT, J.O. Litmus milk reaction as a distinguishing feature between *Streptococcus faecalis* of human and non-human origins. **Journal Milk and Food Technology**, Orange, v.36, n.3, p. 364-367, Mar. 1973.

- NAKAMURA, L.K.; CROWELL, C.D. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from swine waste-corn fermentation. **Developments in Industrial Microbiology**, Arlington, v.20, n.50, p. 531-540, Dec. 1979.
- NWANKWO, D.; ANADU, E.; USORO, R. Cassava-fermentation organisms. **Mircens Journal**, New York, v.99, p. 787-796. 1989.
- OKAFOR, A.O.; IJIOMA, B.; OYOLU, C. Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.56, n.1, p. 1-13, Jan. 1984.
- OKAFOR, N. Micro-organisms associated with cassava fermentation for gari production. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.42, n.2, p.279-284, Feb. 1977.
- OKAGBUE, R.N. Identification of yeast and aerobic spore forming bacteria from cassava flour. **Food Microbiology**, London, v.7, n.1, p. 27-32, Jan. 1990.
- OYEWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.68, n.2, p. 145-152, Feb. 1990.
- PEREIRA, J. **Caracterização química, física, estrutural e sensorial do pão de queijo**. Lavras: UFLA, 2001. 222p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).
- PLATA-OVIEDO, M.S.V. **Secagem do amido fermentado de mandioca: modificação química relacionada com a propriedade de expansão e características físico-químicas**. Campinas: UNICAMP, 1998. 114p. (Tese - Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática: roteiro e manual – bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 1993. 112p.

- RIVERA, H.H.P. **Fermentação de amido de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz): avaliação e caracterização do polvilho azedo.** Viçosa: UFV, 1997. 114p. (Tese - Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos.** Rio de Janeiro: Embrapa, 1995. 159p.
- SNEATH, P.H.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. 1599p.
- STEINKRAUS, K.H. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. **Journal of General Microbiology**, London, v.49, p. 337-348, 1983.
- TERNES, M.; MONDARDO, E.; VIZZOTO, V.J. **Variação no teor de amido na cultura de mandioca em Santa Catarina.** Florianópolis: Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, 1978. 22p.
- VAUGHN, R.H. Lactic acid fermentation of olives with special reference to California conditions. In: CARR, J.G. (Ed.). **Lactic acid bacteria in beverages and food.** London: Academic Press, 1975. p. 307-323.
- VIJOYAGOPAL, K.; BALAGOPALAN, C. Fermentation of cassava starch hydrolysate with immobilised cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Starch**, Weinheim, v.41, n.7, p. 271-275, 1989.
- ZAPATA, L.E.; MARTINEZ, A.; PARADA, J.L. Aspectos microbiológicos del proceso fermentativo del almidón de yuca. In: TALLER AVANCES SOBRE ALMIDÓN DE YUCA, 1991, Cali. **Resúmenes...** Cali: Ciat, 1991.
- ZAPATA, L.E.; PARADA, J.L. **Almidón agrio de yuca: aspectos tecnológicos e microbiológicos.** Bogotá: [s.n.], 1988. Páginas. (Doc IIT).

## **CAPÍTULO 3**

### **Estudo da diversidade fenotípica e genética de lactobacilos isolados da fermentação natural do polvilho azedo**



## Resumo

SILVEIRA, Ivana Aparecida. *Estudo da diversidade fenotípica e genética de Lactobacillus* isolados da fermentação natural do polvilho azedo. Lavras: UFLA. 2001. 132p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos) \*

O gênero *Lactobacillus*, compreendendo mais de 50 espécies, tem sua classificação ainda fundamentada em caracteres fenotípicos e fisiológicos, tais como o perfil de fermentação de carboidratos e crescimento a certas temperaturas. Sendo comum o surgimento de problemas técnicos, tais como crescimento insuficiente para degradar o substrato e instabilidade de certas características em decorrência do meio utilizado, tornando difícil a interpretação dos resultados, as técnicas moleculares têm sido empregadas no estudo de *Lactobacillus*. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade fenotípica e genotípica de espécies de *Lactobacillus* isolados da fermentação natural da fécula de mandioca para obtenção do polvilho azedo. Os 48 isolados de lactobacilos, escolhidos aleatoriamente, foram identificados bioquimicamente pelo sistema API, através de testes de fermentação de carboidratos, sendo então submetidos à extração do DNA para realização da técnica de RAPD para identificação molecular. As espécies de *Lactobacillus* foram agrupadas de acordo com o perfil de fermentação de carboidratos apresentado, sendo classificadas como homofermentativas: *L. acidophilus* III, *L. delbruekii delbruekii*, *L. delbruekii lactis*, *L. mali* e *Lactobacillus* sp; como heterofermentativas facultativas: *L. plantarum*, *L. paracasei tolerans*, *L. paracasei paracasei*, *L. pentosus*, *L. curvatus*; e como heterofermentativos obrigatórios: *L. brevis*, *Lactobacillus* sp. As espécies de *Lactobacillus* mostraram grandes semelhanças entre si, no que diz respeito ao perfil de fermentação de carboidratos, existindo uma estreita relação entre as espécies homofermentativas e heterofermentativas facultativas ou obrigatórias. Os resultados das análises dos perfis RAPD mostraram a existência de subtipos nas espécies de *Lactobacillus* estudadas, o que pode ter acentuado o polimorfismo detectado nos grupos homofermentativos e heterofermentativos.

---

\* Comitê Orientador: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Orientador),  
Dulcinéia de Carvalho - UFLA; Rosane Freitas Schwan - UFLA.



## Abstract

SILVEIRA, Ivana Aparecida. **Study of fenotypic and genetic diversity of *Lactobacillus* isolated from natural fermentation of sour cassava starch**  
Lavras: UFLA, 2001. 132p. (Thesis - Doctorate in Food Science)\*.

The genus *Lactobacillus*, which comprehends over 50 species, has its classification still based on phenotypic and physiological features such as profile of carbohydrate fermentation and growth at certain temperatures. Being common the appearance of technical problems such as insufficient growth to degrade the substrate and instability of some characteristics owing to the medium utilized, making the interpretation of the results difficult, the molecular techniques have been employed in the study of *Lactobacillus*. In this context, this work was intended to study the phenotypic and genotypic diversity of *Lactobacillus* species isolated from the natural fermentation of cassava flour for obtaining sour cassava starch. The 48 strains of *Lactobacillus*, chosen randomly, were identified biochemically by the API system through the carbohydrate fermentation test, they being submitted to DNA extraction for performing of the RAPD technique for molecular identification. The species of *Lactobacillus* were grouped according to the profile of carbohydrate fermentation presented, their being classified as homofermentative: *L. acidophylus* III, *L. delbruekii*, *L. delbrueki lactis*, *L. mali* and *lactobacillus* sp; as facultative heterofermentative: *L. plantarum*, *L. parcasei tolerans*, *L. paracasei paracasei*, *L. pentosus*, *L. curvatus* and as obligate heterofermentative: *L. brevis*, *Lactobacillus* sp. The species of *Lactobacillus* showed great similarities among them as far as the carbohydrate fermentation profile are concerned, existing a close relationship between the facultative or obligate homofermentative and heterofermentative species. The results of the RAPD profile analyses showed the existence of subtypes in the *Lactobacillus* species studied, which may have marked the polymorphism detected in the homofermentative and heterofermentative groups.

---

\* Guidance Committee: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Major Professor),  
Dulcinéia de Carvalho - UFLA; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

## 1 Introdução

As bactérias lácticas compreendem um grupo bastante heterogêneo de organismos que são distribuídos amplamente na natureza e que, há muito tempo, têm sido isoladas de várias fontes: seres humanos, animais, plantas, produtos a base de leite, vinhos e silagens. Entretanto, muitas espécies parecem ter se adaptado a condições ambientais específicas e, geralmente, não são encontradas fora deste habitat (Chassy e Murphy, 1993).

O metabolismo dessas bactérias explica essa seletividade natural. Bioquimicamente, não possuem o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória clássica, o que as limita a ambientes de baixa concentração de oxigênio (microaerofilia) ou mesmo ausência total (Bryan-Jones, 1975; Adam e Moss, 1997).

As bactérias lácticas são acidófilas, limitando-se a ambientes de pH relativamente baixos, crescendo numa faixa ótima de pH de 5,5 a 6,2, assim como em valores menores que 5,0. O fato desse grupo apresentar requerimentos nutricionais complexos restringe-os a ambientes ricos sob o ponto de vista nutricional. Dentre os nutrientes necessários para o crescimento estão aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sais, ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos e carboidratos fermentáveis. Por esta razão, os meios de cultivo para estes microrganismos são ricos e complexos, contendo extratos orgânicos, principalmente em vitaminas e peptídeos (Kandler e Weiss, 1986; Chassy e Murphy, 1993).

O gênero *Lactobacillus* é encontrado no trato intestinal de humanos e animais, como também em vegetais fermentados, produtos cárneos, vinhos e cervejas (Pelczar, Chan e Krieg, 1996). Por outro lado, é largamente utilizado na preparação de uma variedade de alimentos como cultura iniciadora em queijos e outros produtos de laticínios (Shinoda et al., 2001).



Segundo Kandler e Weiss (1986), uma grande diferenciação foi feita entre os lactobacilos baseada nas características clássicas de subgêneros de Orla-Jensen e três grupos foram definidos:

- Grupo I - lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos- que fermentam hexoses quase exclusivamente a ácido lático pela via Embden-Meyerhof, e não fermentam pentoses e gluconato.

- Grupo II - lactobacilos heterofermentativos facultativos - que fermentam as hexoses como o grupo I, com exceção de poucas espécies que produzem outros ácidos em condições limitadas de glicose; a pentose é fermentada, produzindo ácido acético e ácido lático via fosfoctolase induzível.

- Grupo III - lactobacilos heterofermentativos obrigatórios - que fermentam hexoses a ácido lático e acético (etanol) e CO<sub>2</sub>; a pentose também é fermentada a ácido lático e acético. Muitos carboidratos podem ser fermentados variando entre as espécies.

O gênero *Lactobacillus*, compreendendo mais de 50 espécies, tem sua classificação ainda fundamentada em caracteres fenotípicos e fisiológicos, tais como o perfil de fermentação de carboidratos e crescimento a certas temperaturas (Axelsson, 1993).

Os vários gêneros das bactérias do ácido-lático têm sido definidos com base em sua morfologia celular, composição de bases do DNA e tipo de metabolismo fermentativo. Membros dos gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* têm proporção de composição das bases do DNA razoavelmente similar; além disso, há pouca variação de espécie para espécie. O gênero *Lactobacillus* tem membros com grande diversidade na composição de DNA, não constituindo, portanto, um grupo homogêneo (Brock, Madigan e Martinko, 1994).

Apesar da identificação dos lactobacilos ser baseada em características morfofisiológicas, é comum surgirem problemas técnicos que dificultam a

interpretação dos resultados obtidos, como por exemplo, quando o crescimento bacteriano não é suficiente para degradar o substrato que está sendo testado. Além disso, algumas características são instáveis, apresentando variações decorrentes do meio de cultura utilizado. Neste contexto, as técnicas moleculares têm sido empregadas no estudo de *Lactobacillus* (Le Jeune e Lonvaud-Funel, 1994; Scheu, Berghof e Stahl, 1998; Moschetti et al. 1998; Tilsala-Timisjarvvi, 1998; Cisick e Sullivan, 2000; Moschetti et al., 2000).

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) tornou-se um poderoso instrumento para caracterizar genomas desconhecidos e determinar relações genéticas. A técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como iniciadores (“primers”), que delimitam a seqüência da fita dupla, alvo da amplificação (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Uma derivação da técnica de PCR é o RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma, utilizando “primers” de seqüências arbitrárias. O RAPD é uma técnica rápida, universalmente aplicável, não requer o desenvolvimento prévio de sondas específicas para o organismo em estudo. Um conjunto único de “primers” arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo. A quantidade de DNA necessária para a análise genotípica é mínima e, por isso, tem sido amplamente utilizado na tipagem de bactérias (Abed et al., 1995; Conconcelli et al., 1995a,b; Tilsala-Timisjarvi e Alatossava, 1998; Cusick e O’Sullivan, 2000; Moschetti et al., 2000).

A técnica de RAPD tem sido empregada com sucesso para diferenciar espécies de lactobacilos, permitindo estudos comparativos das diferenças intra e interespecíficas das diferentes espécies compreendidas pelo gênero (Johansson,

et al, 1995; Cocconcelli et al, 1995; Tailliez, Quénée e Chopin, 1996; Hamad et al, 1997; Giraffa, DeVecchi e Reinheimer, 1997; Andrighetto et al., 1998; MacCormick et al., 1998; Tilsala-Timisjarvi e Alatosava, 1998; Cusick e O'Sullivan, 2000; Moschetti et al., 2000).

A importância do gênero *Lactobacillus* na esfera industrial, humana e animal, justifica o desenvolvimento e aplicação de técnicas de caracterização de suas diferentes espécies. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo, estudar a diversidade fenotípica e genética de espécies de lactobacilos presentes na fermentação natural da fécula de mandioca para obtenção do polvilho azedo.

## **2 Material e Métodos**

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos, e de Melhoramento Genético do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras - Lavras, MG.

### **2.1 Obtenção dos isolados**

Foram selecionadas, aleatoriamente, 48 isolados de lactobacilos provenientes de tanques de fermentação de polvilho azedo. Os isolados foram reativados em caldo MRS (Merck) e incubados a 30°C por 24 a 48 horas, sendo a pureza checada por estrias de esgotamento em ágar (MRS e PCA) e coloração de Gram.

### **2.2 Caracterização fenotípica**

Os isolados, após reativação, foram crescidos em ágar MRS e PCA (meios estes iguais ao de sua origem) e incubados a 30°C por 24-48 horas, de onde foram retiradas colônias para identificação pelo sistema API. As galerias do sistema API 50 CHL foram incubadas segundo instruções do fabricante (BioMérieux). As colônias foram coletadas das placas com ágar e suspensas em 2 mL de solução salina 0,9% estéril, formando assim uma suspensão densa. Gotas desta suspensão densa foram transferidas para tubos contendo 5 mL de solução salina estéril, ajustando-se sua concentração visualmente para o número 2 da escala de McFarland. O dobro do número de gotas usadas para ajustar a concentração da solução salina foi adicionado ao diluente constante do kit, sendo o diluente assim inoculado, distribuído nas galerias de API. Após a inoculação

nas galerias, estas foram seladas com óleo mineral estéril (Nujol) e incubadas a 30°C até 48 horas. A fermentação dos carboidratos foi observada após 4, 24 e 48 horas de incubação, sendo os resultados anotados e analisados.

## 2.3 Caracterização genotípica

### 2.3.1 Extração do DNA

A extração do DNA seguiu a metodologia descrita por Coutinho (1995). Os isolados de *Lactobacillus* foram inoculados em caldo MRS para crescimento a 30°C por 24 horas. Estas culturas foram coletadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL, centrifugados em microcentrífuga por 5 minutos a 13.000g, e o sobrenadante foi descartado.

As células foram lavadas duas vezes com 1000 µl de tampão Tris-EDTA pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), e centrifugadas por 5 minutos a 13000g, sendo o sobrenadante descartado.

As células foram suspensas em 100 µl de uma solução de proteinase K (Sigma) na concentração de 100 ng/µl em Tris-HCl pH 8,0. A suspensão foi incubada em banho-Maria a 55°C por 15 minutos, seguida de outra incubação a 80°C por mais 15 minutos para a lise das células e inativação da proteinase.

Após a lise, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 13000g e o sobrenadante mantido a – 20°C para posterior análise.

A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a concentração através de fluorimetria (Fluorímetro Hoefer – DyNA Quant 200)

### 2.3.2 Geração de perfis RAPD

De acordo com Carvalho (1994), as reações RAPDs foram conduzidas em um volume de 13 µl, contendo 3 µl da amostra, 1,25 µl de tampão PCR, 0,5 µl de dNTP, 1,09 µl de diluente da enzima Taq e 0,142 µl da enzima *Taq polimerase*, sendo o volume completado com água ultrapura. Foram utilizados 1,25 µl de “primer” (Operon Technologies) escolhidos aleatoriamente. As amostras foram submetidas a um ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguidas de 50 ciclos de desnaturação de 45 seg. a 94°C, 1 min. e 30 seg. a 35°C e 2 minutos a 72°C, e um ciclo final de alongamento de 2 minutos a 72°C, em termociclador (Gene Amp PCR System 9700), para amplificação do DNA. Finalizada a amplificação, 3 µl de tampão de corrida foram adicionados em cada tubo e amostras de 10 µl foram depositadas em gel de agarose 1,0%. A eletroforese foi realizada a 70V durante aproximadamente 2 horas em tampão TBE 10X (Tris-base: 54g; Ácido bórico: 27,5g; EDTA 0,2M pH 8,0: 50 mL). Após a migração, seguiu-se a etapa de coloração em brometo de etídio e descoloração em água, sendo os géis fotografados em um transiluminador ultravioleta.

### 2.3.3 Diversidade e distância genética - análise dos dados RAPD

A presença ou ausência de bandas RAPD foram marcadas por meio de interpretações visuais dos géis fotografados. Os dados foram transformados em matriz de 1 (presença) e 0 (ausência) de todos os genótipos e posições dos fragmentos marcados. Para estimar a similaridade entre os isolados, utilizou-se o programa NTSYS 1,8 (Slice, Kim e Walker, 1994). Esta estimativa da similaridade genética ( $S_{gij}$ ) entre cada par de genótipos foi efetuada pelo coeficiente “Simple Matching”, dado pela seguinte expressão:

$$S_{gij} = \frac{m_{ij}}{n}, \text{ onde:}$$

$m = a + d$  (presença ou ausência de uma banda no par genótipo  $i$  e  $j$ )

$n = n^\circ$  total de bandas analisadas em  $i$  e  $j$

A representação simplificada das similaridades foi feita pela construção de um dendograma pelo método de agrupamento UPGMA (Rohlf, 1992).

Os valores de distância genética foram calculados baseados no coeficiente de Jaccard (Anderberg, 1973), utilizando-se a fórmula:

$$D_{ij} = 1 - \left( \frac{B_{ij}}{M_{ij}} \right), \text{ onde:}$$

$D_{ij}$  = distância entre os genótipos  $i$  e  $j$ .

$B_{ij}$  = número de bandas comuns  $i$  e  $j$  e

$M_{ij}$  =  $n^\circ$  total de bandas analisadas em  $i$  e  $j$ .

A representação simplificada das distâncias genéticas foi feita por dendogramas obtidos pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (Rohlf, 1992); para estes dados foi utilizado o programa STATISTIC 5,0 (Slice, Kim e Walker, 1994). Estas distâncias genéticas possibilitaram agrupar os isolados de *Lactobacillus* spp. com padrões de fermentação de carboidratos semelhantes.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Caracterização fenotípica

Baseando-se nos perfis de utilização de carboidratos, os isolados estudados foram subdivididos em grupos denominados A, B e C, de acordo com a capacidade apresentada em fermentar os carboidratos. A capacidade de fermentar carboidratos, visando a identificação de diferentes espécies associadas com fermentações naturais de alimentos amiláceos, assim como em produtos de laticínios, desde muito tempo, tem sido utilizada por vários autores (Steinkraus, 1983; Torriani et al., 1994; Johansson et al, 1995; Lillière, Abidi e Lefebvre, 1996; Lortal et al., 1997; Bohak et al., 1998; Nour, 1998; Moschetti et a., 1998; Hébert, DeGiori e Raya, 2000). A tabela I mostra a caracterização e identificação das 48 cepas de lactobacilos estudadas.

TABELA I Cepas selecionadas para identificação por RAPD

Nº	Identificação	Tipo fermentativo
1	Lactobacillus plantarum II	Heterofermentativo Facultativo
2	Lactobacillus plantarum II	Heterofermentativo Facultativo
3	Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans	Heterofermentativo Facultativo
4	L. paracasei-paracasei III	Heterofermentativo Facultativo
5	Lactobacillus paracasei-paracasei I	Heterofermentativo Facultativo
6	Lactobacillus paracasei-paracasei III	Heterofermentativo Facultativo
7	Lactobacillus paracasei subsp. tolerans	Heterofermentativo Facultativo
8	Lactobacillus acidophilus III	Homofermentativo
9	Lactobacillus paracasei -paracasei III	Heterofermentativo Facultativo
10	Lactobacillus paracasei- paracasei III	Heterofermentativo Facultativo
11	Lactobacillus paracasei-paracasei III	Heterofermentativo Facultativo
12	Lactobacillus paracasei-paracasei III	Heterofermentativo Facultativo
13	Lactobacillus pentosus	Heterofermentativo Facultativo
14	Lactobacillus brevis I	Heterofermentativo obrigatório
15	Lactobacillus brevis I	Heterofermentativo obrigatório
16	Lactobacillus brevis III	Heterofermentativo obrigatório
17	Lactobacillus brevis III	Heterofermentativo obrigatório
18	Lactobacillus paracasei subsp.tolerans	Heterofermentativo Facultativo
19	Lactobacillus brevis II	Heterofermentativo obrigatório
20	Lactobacillus brevis II	Heterofermentativo obrigatório

...continua...



Tabela 1...cont.

21	<i>Lactobacillus brevis</i> II	Heterofermentativo obrigatório
22	<i>Lactobacillus acidophilus</i> III	Heterofermentativo obrigatório
23	<i>Lactobacillus brevis</i> II	Heterofermentativo obrigatório
24	<i>Lactobacillus</i> sp	Heterofermentativo obrigatório
25	<i>Lactobacillus brevis</i> II	Heterofermentativo obrigatório
26	<i>Lactobacillus brevis</i> II	Heterofermentativo obrigatório
27	<i>Lactobacillus</i> sp	Heterofermentativo obrigatório
28	<i>Lactobacillus brevis</i> II	Heterofermentativo obrigatório
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> II	Heterofermentativo facultativo
30	<i>Lactobacillus paracasei-paracasei</i> III	Heterofermentativo facultativo
31	<i>Lactobacillus paracasei-paracasei</i> II	Heterofermentativo facultativo
32	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Heterofermentativo facultativo
33	<i>Lactobacillus plantarum</i> I	Heterofermentativo facultativo
34	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Heterofermentativo facultativo
35	<i>Lactobacillus plantarum</i> I	Heterofermentativo facultativo
36	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Heterofermentativo facultativo
37	<i>Lactobacillus paracasei-paracasei</i> II	Heterofermentativo facultativo
38	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Heterofermentativo facultativo
39	<i>Lactobacillus plantarum</i> I	Heterofermentativo facultativo
40	<i>Lactobacillus</i> sp	Homofermentativo
41	<i>Lactobacillus plantarum</i> I	Heterofermentativo facultativo
42	<i>Lactobacillus acidophilus</i> III	Homofermentativo
43	<i>Lactobacillus acidophilus</i> III	Homofermentativo
44	<i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>delbruekii</i>	Homofermentativo
45	<i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i>	Homofermentativo
46	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Heterofermentativo facultativo
47	<i>Lactobacillus mali</i>	Homofermentativo
48	<i>Lactobacillus</i> sp	Heterofermentativo obrigatório

O grupo A foi formado pelos lactobacilos homofermentativos, sendo identificados como pertencentes às espécies *L. acidophilus* III (isolados 43,42, 22 e 8), *Lactobacillus* sp (isolado 40), *L. mali* (isolado 47) e *L. delbruekii* subsp. *lactis* (isolado 45). Todas estas espécies utilizaram esculina, e não produziram ácidos a partir de arabinose, xilose e ribose, e não fermentaram e produziram ácido a partir de gluconato, adonitol, D-fucose, dulcitol, eritritol, glicogênio, L-xilose, beta-metil-xilose, inositol, inulina, xilitol e L-arabitol.

O grupo B foi formado pelos lactobacilos heterofermentativos facultativos, sendo subdividido em 5 subgrupos de acordo com o perfil de utilização de carboidratos apresentado; estes perfis foram comparados com a

descrição das espécies de Kandler e Weiss (1986), constantes do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986), e os açúcares que diferiram no perfil são apontados a seguir.

Assim sendo, o subgrupo B1 corresponde aos lactobacilos que fermentaram totalmente e produziram ácidos a partir de arabinose, xilose e ribose e não fermentaram gluconato; sendo as espécies *L.pentosus* (isolado 13), *L. plantarum I* (isolados 39 e 46), *L. plantarum II* (isolado 1 e 2) e *Lactobacillus* sp (isolado 48).

O subgrupo B2 foi formado pelos lactobacilos que fermentaram totalmente arabinose e ribose e não fermentaram gluconato; sendo as espécies representativas *L. plantarum* (isolado 33) e *L. paracasei-paracasei III* (isolado 31).

O subgrupo B3 foi formado pelos lactobacilos que fermentaram totalmente arabinose, ribose, xilose e gluconato, sendo as espécies representantes *L. curvatus* (isolado 34) e *L. plantarum I* (isolado 44).

O subgrupo B4 foi formado pelos lactobacilos que fermentaram totalmente arabinose ou ribose ou xilose, e não fermentaram gluconato; sendo as espécies representantes *L. paracasei* subsp. *tolerans* (isolados 7, 12, 11 e 30), *L. curvatus* (isolado 36), *L. paracasei-paracasei I* (isolado 324), *L. plantarum* (isolados 35 e 41), *L. paracasei-paracasei II* (solado37) e *L. pentosus* (isolado 32).

O subgrupo B5 foi formado pelos lactobacilos que fermentaram parcialmente arabinose ou ribose ou xilose e não fermentaram gluconato, sendo as espécies representantes *L. paracasei* subsp. *tolerans* (isolados 18, 7 e 3), *L. paracasei-paracasei III* (isolados 6, 9 e 10), *L. paracasei-paracasei I* (isolado 5), *L. plantarum II* (isolado 29), *L. curvatus* (isolado 38) e *Lactobacillus* sp (isolado 24 e 27).

Os testes de utilização de carboidratos, apesar de serem a base dos agrupamentos dos lactobacilos, não refletem diretamente a evolução destes organismos. Yang e Woese (1989) citam que os lactobacilos homofermentativos e heterofermentativos, principalmente os obrigatórios, não podem ser agrupados numa simples chave classificatória, visto que são encontrados em várias ramificações da cadeia evolutiva.

O terceiro grupo de lactobacilos, denominado pela letra C, foi caracterizado por espécies que fermentaram e produziram ácido a partir de arabinose, ribose, xilose e gluconato, e produziram gás a partir de glicose. As espécies representantes foram *L. brevis I* (isolados 14 e 15), *L. brevis II* (isolados 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26 e 28), *L. brevis III* (isolados 16, 17) e *Lactobacillus sp* (cepas 24, 27 e 48).

Gobbetti et al. (1994) descreveram várias linhagens de *L. brevis* classificadas e agrupadas como *L. fermentum*, devido a semelhanças no perfil de utilização de carboidratos. Segundo Kandler e Weiss (1986) estas espécies são estreitamente relacionadas, sendo dificilmente diferenciadas com base em caracteres fenotípicos. Os autores citam também várias semelhanças entre outras espécies heterofermentativas obrigatórias.

Os resultados obtidos nos testes de fermentação apresentaram algumas divergências em relação aos obtidos por Kandler e Weiss (1986) e Borch e Molin (1988), no que diz respeito à fermentação de determinados carboidratos; podendo o fato ser atribuído a fatores inerentes ao próprio microrganismo. Alguns autores citam terem encontrado algumas dificuldades na classificação do gênero *Lactobacillus*, principalmente no que se refere ao grande número de espécies apresentadas (cerca de 50), sendo algumas muito distantes geneticamente e outras, altamente relacionadas, variando apenas no índice de fermentação de alguns carboidratos (Torriani et al., 1994; Lortal et al., 1997).

Hammes, Weiss e Holzapfel (1991) relatam que, mesmo usando caracteres morfofisiológicos e bioquímicos na identificação das diferentes espécies de lactobacilos, os resultados podem sofrer uma variação entre laboratórios; além do que, algumas espécies exibem uma variabilidade expressiva entre cepas.

O sistema API utilizado mostrou-se satisfatório na identificação das diferentes espécies de lactobacilos, com resultados acima de 90% de probabilidade de acerto. Grant e Petterson (1991) utilizaram o mesmo sistema de identificação e relatam que os resultados dos perfis de fermentação de carboidratos obtidos são coerentes com os encontrados na literatura. De acordo com os autores, o uso de testes miniaturizados permitiu economia de tempo e espaço, apresentando reprodutibilidade entre os resultados.

### 3.2 Caracterização genotípica

Foram utilizados 20 “primers” diferentes para a detecção do polimorfismo entre as 48 cepas. Destes primers, 14 apresentaram melhores produtos de amplificação. A tabela 2 mostra os “primers” utilizados, suas seqüências de nucleotídeos e número de bandas polimórficas em cada um. A literatura consultada mostrou uma grande variação em relação ao número de primers a serem utilizados como iniciadores para gerar fragmentos de DNA. Variene (1996) utilizou 10 “primers” diferentes em *Lactobacillus plantarum*; Teixeira (1997) menciona a utilização de 22 “primers” do grupo V em *Lactobacillus acidophilus*; Tilsala-Timisjarvi e Alatossava (1998) citam a utilização de vários primers para *Lactobacillus rhamnosus*, porém seus resultados são referentes a apenas dois; Cusick e O’Sullivan (2000) citam o “primer” OP-P22 como o ideal para caracterização de bactérias ácido-láticas; Moschetti et al. (2000) trabalharam com 28 “primers” diferentes para

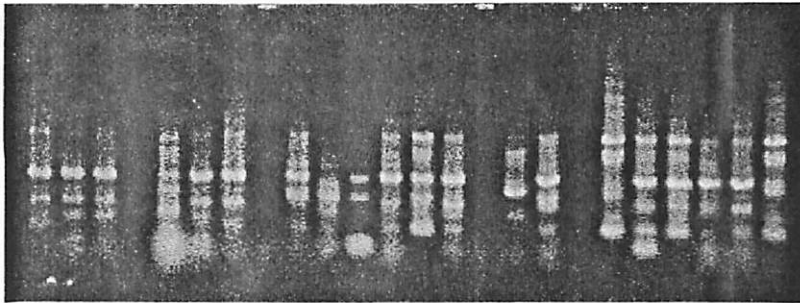


FIGURA 1 Fragmentos de DNA amplificados com o uso do primer OP-N9

Baseando-se nos dados de presença ou ausência de fragmentos amplificados, foi possível detectar a variação das distâncias genéticas entre as 48 cepas estudadas. A figura 2 mostra o dendograma construído agrupando os isolados de acordo com seu índice de similaridade.

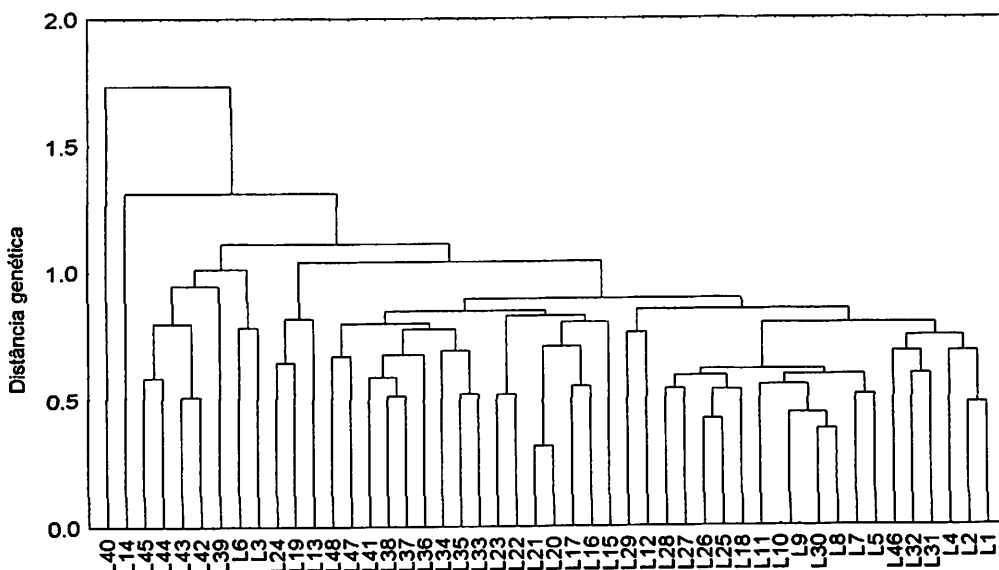


FIGURA 2 Dendrograma baseado nas análises dos perfis RAPD obtidos para as diferentes linhagens de *Lactobacillus* sp.

A análise do dendrograma construído permitiu a separação das cepas em estudo em 6 grupos, em níveis de similaridade de 100%. O grupo 1 é formado pela L40, que se mostrou a mais divergente geneticamente. O grupo 2 é formado pela espécie L14, também geneticamente divergente. O grupo 3 é formado pelas espécies L39, L42, L43, L44 e L45. O grupo 4 é formado pelas linhagens L3 e L6. O grupo 5 é formado pelas linhagens L13, L19 e L24. O grupo 6, mostrando-se o maior e mais heterogêneo, sendo subdividido em 2 grandes subgrupos, de acordo com os perfis de similaridade gerados.

O subgrupo 1 é novamente subdividido em dois que, por sua vez, também se agruparam, formando 3 ramificações; assim temos linhagens L47 e

L48 muito próximas geneticamente formando a ramificação com 70% de similaridade; a ramificação 2 abrangendo as linhagens L36, L37, L38 e L41 geneticamente semelhantes, em nível de aproximadamente 65% a 70%; e a ramificação 3 constituída das linhagens L33, L35 e L34 com semelhanças genéticas em torno de 55%. A segunda subdivisão do subgrupo 1 mostra 3 ramificações, sendo a primeira formada pelas linhagens L32 e L33, muito próximas geneticamente (em torno de 52%); a segunda formada pelas linhagens L20 e L21 com uma semelhança genética em torno de 30%; e as linhagens L16 e L17 em torno de 55%; a terceira ramificação formada pela linhagem L15.

O subgrupo 2 mostra uma nova divisão, formando 2 ramificações; a primeira ramificação é constituída pelas linhagens L12 e L29; a segunda ramificação forma outras duas sub-ramificações; a primeira relaciona as linhagens L27 com a L28; as linhagens L25 e L26 relacionam-se com L18; tem-se a linhagem L11 isolada, as L9 e L10 como pertencentes a uma mesma espécie, as linhagens L8 e L30 muito próximas (em torno de 40% de similaridade genética), e as linhagens L5 e L7 também próximas (52%). A terceira ramificação mostra a linhagem L46 isolada, as linhagens L31 e L32 muito próximas (62%), a linhagem L4 com alguma similaridade com as linhagens L1 e L2, que estão bem próximas (semelhantes a 50% de distância genética).

Através dos perfis obtidos, foi possível verificar diversidade entre os isolados e ainda observar a formação de grupos distintos que possuíam características de fermentação de carboidratos em comum. A formação de grupos distintos foi observada na análise de outros gêneros de microrganismos. Grandes polimorfismos também foram obtidos por Czajka et al. (1993), trabalhando com linhagens de *Listeria monocytogenes*, e Variane (1996), com linhagens de *Lactobacillus fermentum*.

De acordo com Farber e Addisin (1994a), quando os DNAs obtidos das 48 linhagens de *Lactobacillus* isolados da fermentação natural da fécula de mandioca para obtenção do polvilho azedo foram amplificados, produziram perfis reprodutíveis que revelaram polimorfismos nos perfis de RAPD, sugerindo grande diversidade entre os isolados. A detecção e análise de polimorfismos no DNA de uma determinada espécie têm sido amplamente utilizadas no campo da epidemiologia, genética de populações e taxonomia (Jayarão e Oliver, 1994).

A análise dos dados obtidos nos testes de fermentação de carboidratos, quando relacionada com a identificação fenotípica e genotípica dos isolados, mostrou muitas semelhanças nos perfis de fermentação. Segundo Kandler e Weiss (1986), as diferentes espécies de *Lactobacillus* são muito relacionadas entre si, principalmente no que se refere à utilização de carboidratos. Czajka et al. (1993) também encontraram grande diversidade entre linhagens muito relacionadas entre espécies diferentes de *Lactobacillus*; os autores observaram que essas linhagens apresentaram “fingerprintings” característicos e distintos um do outro.

A técnica de RAPD tem sido utilizada para discriminar linhagens de muitos tipos de organismos (Czajka e Batt, 1994); bem como para determinar a similaridade entre diferentes isolados da mesma espécie bacteriana. A diversidade observada neste experimento, através dos perfis de RAPD gerados, pode estar implicada em maiores variações genéticas dentro de uma mesma espécie. A mesma diversidade foi verificada por Farber e Addison (1994a). Segundo Jayarão e Oliver (1994), a determinação da relação entre diferentes isolados bacterianos de uma mesma espécie é extremamente importante, a fim de se localizar fontes de contaminantes e de se identificar reservatórios-problemas, tendo assim a oportunidade de monitoramento da ocorrência de um subtipo bacteriano em particular.



Outras técnicas moleculares têm sido empregadas para caracterizar linhagens de *Lactobacillus*, tais como Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), sequenciamento de 16S rRNA, entre outras (Giraffa et al. 2000). Entretanto, alguns destes métodos não são compatíveis com a rotina de muitos laboratórios, devido ao alto custo, complexidade e tempo de execução.

Segundo Chachaty et al. (1994), a técnica de RAPD é rápida, simples de ser executada, apresenta bons resultados, podendo ser aplicada para microrganismos associados a humanos, animais e plantas. Além disso, RAPD independe de variações associadas com condições de cultura ou caracterizações bioquímicas atípicas; o uso de um “primer” universal pode produzir perfis característicos para muitos gêneros e espécies bacterianos, permitindo a comparação entre laboratórios (Jayarão e Oliver, 1994).

## 4 Conclusão

Baseando-se nas condições em que se realizou o experimento e nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O Sistema API apresentou resultados considerados bons (com mais de 90% de probabilidade) na identificação das diferentes espécies de *Lactobacillus*, isolados da fermentação natural do polvilho azedo.
- As espécies de *Lactobacillus* mostraram grandes semelhanças entre si, no que diz respeito ao perfil de fermentação de carboidratos, existindo uma correlação acentuada nas espécies agrupadas como heterofermentativas facultativas e obrigatórias.
- O trabalho detectou relação entre os resultados obtidos nos agrupamentos dos isolados identificados pelo sistema API e pela técnica de RAPD.
- Os resultados das análises dos perfis RAPD mostraram a existência de subtipos nas espécies de *Lactobacillus* estudadas, o que pode ter acentuado a diversidade detectada nos grupos homofermentativos e heterofermentativos.

## 5 Referências bibliográficas

- ABED, Y.; DAVIN, A.; CHARREL, R.N.; BOLLET, C.; MICCO, P.D. Variation of RAPD-fingerprint patterns using different DNA-extraction methods with Gram-positive bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.11, n.2; p. 238-239, Feb. 1995.
- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Accribia, 1997. 464p.
- ANDERBERG, M.R. **Cluster analysis for applications**. New York: Academic Press, 1973. Páginas.
- ANDRIGHETTO, C.; DE DEA, P.; LOMBARDI, A.; NEVIANI, E.; ROSSETTI, L.; GIRAFFA, G. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. **Research Microbiology**, Paris, v. 149, n. 4; p. 631-643, Apr. 1998.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON VRIGHT, A. **Lactic Acid Bacteria**. London: Academi Press, 1993. p. 235-286.
- BOHAK, I.; BACK, W.; RICHTER, L.; EHRMANN, M.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. *Lactobacillus amylolyticus* sp. Nov., isolated from beer malt and beer wort. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v.21, n.5; p. 360-364, May 1998.
- BORCH, E.; MOLIN, G. Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.57, n.11, p. 3114-3120, Nov. 1988.
- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. **Biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall, 1994. 909p.

- BRYAN-JONES, G. Lactic acid bacteria in distillery. In: CARR, E.A. **Lactic acid bacteria in beverages and food**. London: Academic Press, 1975. v.2, p. 165-175.
- CARVALHO, A.F. de. **Sistématique des bactéries propioniques laitières: classification, nomenclature, nomenclature et identification**. Paris: Ensa de Rennes: [s.n.], 1994. 227p. (Tese- Doutorado Genética de microrganismos).
- CHASSY, B.M.; MURPHY, C.M. *Lactococcus* and *Lactobacillus*. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. **Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 65-82.
- CHACHATY, E.; SAULNIER, P.; MARTIN, A.; MARIO, N.; ANDREMONT, A. Comparison of ribotyping pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA for typing *Clostridium difficile* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.122, n.1, p. 61-68, Jan. 1994.
- COCCONCELLI, P.S.; PORRO, D.; GALANDINI, S.; SENINI, L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.21, n.7, p. 376-379, 1995.
- COUTINHO, H.L.C. Noções básicas de sistemática molecular. In: **FISIOLOGIA microbiana aplicada a processos biotecnológicos: trabalhos praticos**. [S.l.]: CARBIO/PROIMI/MIRCEN/UNESCO, 1995. v.1, p. 48-58.
- CUSICK, S.M.; O'SULLIVAN, D.J. Use of a single, triplicate Arbitrarily Primed-PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.5, p. 2227-2231, May 2000.
- CZAJKA, J.; BATT, C.A. Verification of casual relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.12, p. 1280-1287, Dec. 1994.

- CZAJKA, J.; BSAT, N.; PIANI, M.; RUSS, W.; SULTANA, K.; WIEDMANN, M.; WHITAKER, R.; BATT, C.A. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocuaby* 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymosphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.3, p. 304-308, Mar. 1993.
- FABER, J.M.; ADDISIN, C.J. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.77, n.2, p. 242-250, Feb. 1994.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa, 1996. 220p.
- GIRAFFA, G.; DeVECCHI, P.; REINHEIMER, J. Population dynamics of thermophilic lactobacilli in mixed starter whey cultures. **Food Research International**, Essex, v.30, n.2, p. 137-140, 1997.
- GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J.; ROSA, F.L.; VINCENZI, S. Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy. **Italian of Food Science**, Pinerolo, v.1, n.1, p. 85-94, Jan. 1994.
- GRANT, I.R.; PATTERSON, M.F. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria isolated from irradiated pork and chicken packaged under various gas atmospheres. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, p. 302-307, 1991.
- HAMAD, S.H.; DIENG, M.C.; EHRMANN, M.A.; VOGEL, R.F. Characterization of the bacterial microbiota od Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.83, n.6, p. 764 -770, 1997.
- HAMMES, W.P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS et al. (Eds.). **The Prokariotes**. New York: Springer-Verlag, 1991. v.2, p. 1535-1594.

- HÉBERT, E.M.; DE GIORI, G.S.; RAYA, R.R. Isolation and characterization of a slowly milk-coagulating variant of *Lactobacillus helveticus* deficient in puricne biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.4, p.1846-1850, Apr. 2000.
- JAYARAO, B.M.; OLIVER, S.P. Polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species isolated from bovine milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, p. 240-245, 1994.
- JOHANSSON, M.L.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; UHLÉN, M.; AHRNÉ, S. Characterization and species recognition of *Lactobacillus plantarum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S rRNA gene. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79; n.5; p.536-541, May 1995a.
- JOHANSSON, M.L.; QUEDNAU, M.; MOLIN, G.; AHRNÉ, S. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.21; n.3; p. 155-159, Sept. 1995b.
- KANDLER, O. ; WEISS, N. Genus *Lactobacillus* In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. v.2, p. 1209-1234.
- LE JEUNE, C.; LONVAUD-FUNEL, A. *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus brevis* DNA analysis by restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Food Microbiology**, London, v.11, p. 195-202, 1994.
- LORTAL, S.; VALENCE, F.; BIZET, C.; MAUBOIS, J.L. Eletrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identifications. **Research Microbiology**, Paris, n.148, p. 461-474, 1997.
- MACCORMICK, C.A.; GRIFFIN, H.G.; UNDERWOOD, H.M.; GASSON, M.J. Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, n.2, p. 969-980, Feb. 1998.

- MILLIÈRE J.B.; ABIDI, F.Z.; LEFEBVRE, G. Taxonomic characterization of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *Bulgaricus* isolates from a Camerooniana zebu's fermented raw milk. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.80; n.3; p. 583-588, Mar. 1996.
- MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; APONTE, M.; CATZEDD, P. VILLANI, F.; DEIANA, P.; COPPOLA, L. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.85; n.1; p. 25-36, Jan. 1998.
- MOSCHETTI, G.; BLAIOTA, G.; VILLANI, F.; COPPOLA, S. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* with DNA primers identified by Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.1, p. 422-424, Jan. 2000.
- NIEDERHAUSER, C.; HOFELIN, C.; ALLMANN, M.; BURKHALTER, P.; LUTHY, J.; CANDRIAN, U. Random amplification of polymorphic bacterial DNA: evaluation of 11 oligonucleotides and application to food contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.77, p. 574-582, 1994.
- NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. **Research Microbiology**, Elsevier, v.149, n.5, p. 433-448, May 1998
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996. v.2, 517p.
- ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 1.70**. New York: [s.n.], 1992. 470p.
- SHEU, P.M.; BERGHOF, K.; STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, London, v.15, n.1, p. 13-31, Jan. 1998.

- SHINODA, T.; KUSUDA, D.; ISHIDA, Y.; IKEDA, N.; KANKO, K.; MASUDA, O.; YANAMOTO, N. Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, n.2, p. 108-113, Feb, 2001.
- SLICE, D.E.; KIM, J.; WALKER, J. **Ntsys-numerical taxonomy and multivariate analysis system: versão 1.80**. [S.l.]: [s.n.], 1994. não paginado.
- STEINKRAUS, K.H. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetable, cereals and legumes. **Journal of General Microbiology**, London, v.49, p. 337-348, 1983.
- TAILLIEZ, P.; QUÉNÉE, P.; CHOPIN, A. Estimation de la diversité parmi les souches de la collection CNRS: application de la RAPD à un groupe de lactobacilles. **Latí, France**, v.76, p. 147- 158, 1996.
- TEIXEIRA, M.B. **Lactobacillus em culturas mistas para formulação de probiótico**. Viçosa: UFV, 1997. 43p. (Dissertação – Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- TILSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Strain-specific identification of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with randomly amplified polymorphic DNA- derived PCR primers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p. 4816-4819, Dec. 1998.
- TORRIANI, S.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. Overview on *Lactobacillus helveticus*. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v.44, p. 163-191, 1994.
- VARIANE, S.F. **Caracterização molecular de linhagens de Lactobacillus fermentum**. Campinas: Unicamp, 1996. 54p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- YANG, D.; WOESE, C. R. Phylogenetic structure of the leuconostocs: an interesting case of a rapidly evolving organism. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v.12, n.1, p. 145-149, Jan. 1989.



## **Anexos**

	<b>Página</b>
TABELA 2 Grupos bacterianos isolados e caracterizados nas amostras das diferentes etapas da produção do polvilho azedo.....	128
TABELA 11 Distribuição dos microrganismos isolados em ágar PCA na fecularia 1, nas diferentes etapas de amostragem.....	129
TABELA 12 Distribuição dos microrganismos isolados em ágar MRS na fecularia 1, nas diferentes etapas de amostragem.....	130
TABELA 13 Distribuição dos microrganismos isolados em ágar PCA na fecularia 2, nas diferentes etapas de amostragem.....	131
TABELA 14 Distribuição dos microrganismos isolados em ágar MRS na fecularia 2, nas diferentes etapas de amostragem.....	132

TABELA 2A Grupos bacterianos isolados e caracterizados nas amostras das diferentes etapas da produção do polvilho azedo

Grupos bacterianos	Quantidade	Porcentagem (%)
Bacillus	23	2,6
Lactobacillus	435	49,8
Staphylococcus	15	1,7
Micrococcus	15	1,7
Corynebacterium	18	2,1
Streptococcus	193	22,1
Enterococcus	84	9,6
Lactococcus	8	0,9
Pediococcus	20	2,3
Leuconostoc	37	4,3
Gram-negativos	25	2,9
Total	873	100

TABELA 11A Distribuição dos microrganismos isolados em ágar PCA na fecularia 1, nas diferentes etapas de amostragem.

Microrganismos	Etapas de amostragem															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Gram-negativos	3	4		6		1	1					2	2			
Bacillus	3				1		2		3							
Streptococcus		8	4	8	2		1			1		3	2	4		3
Leuconostoc		2	4							1		1				
Enterococcus		5	2	3	2	1	1	1		1		1	1			1
Corynebacterium		2		1					1	1						1
Lactobacillus			5	5		3	2	2	4	2	6	3	1	2	6	1
Staphylococcus				2		3			1					1		
Pediococcus					2	1	1									
Micrococcus					3	1				3		1				2
Leveduras		1					1	8		5	1					3

<sup>1</sup> leite de fécula; <sup>2</sup> tanque de decantação; <sup>3</sup> tanque de fermentação com 0 horas; <sup>4</sup> tanque de fermentação com 1 dia;

<sup>5</sup> tanque de fermentação com 3 dias; <sup>6</sup> tanque de fermentação com 4 dias; <sup>7</sup> tanque de fermentação com 6 dias;

<sup>8</sup> tanque de fermentação com 7 dias; <sup>9</sup> tanque de fermentação com 10 dias; <sup>10</sup> tanque de fermentação com 11 dias;

<sup>11</sup> tanque de fermentação com 15 dias; <sup>12</sup> tanque de fermentação com 16 dias; <sup>13</sup> tanque de fermentação com 20 dias;

<sup>14</sup> tanque de fermentação com 21 dias; <sup>15</sup> tanque de fermentação com 27 dias; <sup>16</sup> tanque de fermentação com 28 dias

TABELA 12A Distribuição dos microrganismos isolados em ágar MRS na fecularia 1, nas diferentes etapas de amostragem.

Microrganismos	Etapas de amostragem															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Gram-negativos																
Bacillus																
Streptococcus	6	9	6	12	5	8	4	8	3		3	2	3	1		2
Leuconostoc		3	1	4	1	1		1		2						
Enterococcus	5	4	4	8	4		4		2		2					
Corynebacterium																
Lactobacillus				20	13	9	13	8	9	8	7	10	8	9	10	14
Staphylococcus			1													
Pediococcus		1							1							
Micrococcus																
Lactococcus			1	1					3		1					
Leveduras		3														

1 leite de fécula; 2 tanque de decantação; 3 tanque de fermentação com 0 horas; 4 tanque de fermentação com 1 dia; 5 tanque de fermentação com 3 dias; 6 tanque de fermentação com 4 dias; 7 tanque de fermentação com 6 dias; 8 tanque de fermentação com 7 dias; 9 tanque de fermentação com 10 dias; 10 tanque de fermentação com 11 dias; 11 tanque de fermentação com 15 dias; 12 tanque de fermentação com 16 dias; 13 tanque de fermentação com 20 dias; 14 tanque de fermentação com 21 dias; 15 tanque de fermentação com 27 dias; 16 tanque de fermentação com 28 dias.

TABELA 13A Distribuição dos microrganismos isolados em ágar PCA na fecularia 2, nas diferentes etapas de amostragem

Microrganismos	Etapas de amostragem															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Gram-negativos	3	1	1							1						
Bacillus	6	2		2	1		1			1						
Streptococcus		16	5	10			3		2		2	6		3		5
Leuconostoc		3							1							
Enterococcus	2	2	2	4		1	2		1		2			1		1
Corynebacterium					1		1	1	1	1	1	1				2
Lactobacillus		11	2	3		1	3	8	5	2		4	8	3	4	2
Staphylococcus		1				1									2	
Pediococcus				1		1										
Micrococcus													2		1	1
Leveduras							3	3	3		10		5	1		

<sup>1</sup> leite de fécula; <sup>2</sup> tanque de decantação; <sup>3</sup> tanque de fermentação com 0 horas; <sup>4</sup> tanque de fermentação com 1 dia;

<sup>5</sup> tanque de fermentação com 3 dias; <sup>6</sup> tanque de fermentação com 4 dias; <sup>7</sup> tanque de fermentação com 6 dias;

<sup>8</sup> tanque de fermentação com 7 dias; <sup>9</sup> tanque de fermentação com 10 dias; <sup>10</sup> tanque de fermentação com 11 dias;

<sup>11</sup> tanque de fermentação com 15 dias; <sup>12</sup> tanque de fermentação com 16 dias; <sup>13</sup> tanque de fermentação com 20 dias;

<sup>14</sup> tanque de fermentação com 21 dias; <sup>15</sup> tanque de fermentação com 27 dias; <sup>16</sup> tanque de fermentação com 28 dias.

TABELA 14A Distribuição dos microrganismos isolados em ágar MRS na fecularia 2, nas diferentes etapas de amostragem

Microrganismos	Etapas de amostragem															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Gram-negativos																
Bacillus																
Streptococcus	5	4	3	7		2	3	1	2	3						
Leuconostoc		3	3	2				4				2				
Enterococcus			3	7	2		2	4	2	2						
Corynebacterium																
Lactobacillus		27	6	7	10	8	21	5	17	9	10	10	10	8	13	20
Staphylococcus		3														
Pediococcus			5				1	4	1		1					
Micrococcus																
Lactococcus											2					
Leveduras																

<sup>1</sup> leite de fécula; <sup>2</sup> tanque de decantação; <sup>3</sup> tanque de fermentação com 0 horas; <sup>4</sup> tanque de fermentação com 1 dia;  
<sup>5</sup> tanque de fermentação com 3 dias; <sup>6</sup> tanque de fermentação com 4 dias; <sup>7</sup> tanque de fermentação com 6 dias;  
<sup>8</sup> tanque de fermentação com 7 dias; <sup>9</sup> tanque de fermentação com 10 dias; <sup>10</sup> tanque de fermentação com 11 dias;  
<sup>11</sup> tanque de fermentação com 15 dias; <sup>12</sup> tanque de fermentação com 16 dias; <sup>13</sup> tanque de fermentação com 20 dias;  
<sup>14</sup> tanque de fermentação com 21 dias; <sup>15</sup> tanque de fermentação com 27 dias; <sup>16</sup> tanque de fermentação com 28 dias