

ESTHER DANTAS COSTA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
FERMENTATIVA DE BACTÉRIAS DETERIORADORAS
DE POLPA DE MANGA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

ESTHER DANTAS COSTA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
FERMENTATIVA DE BACTÉRIAS DETERIORADORAS
DE POLPA DE MANGA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de abril de 2006

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Conselheiro)

Prof. Frederico José Vieira Passos
(Conselheiro)

Prof. Antônio Galvão do Nascimento

Prof^ª. Míriam Terezinha dos Santos

Prof^ª. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

À Deus

Aos meus pais, Simião e Denise

Aos meus irmãos, Sílvia e Alexandre

Aos meus avós, Sebastião e Esther

Com carinho

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, me dando forças para vencer todos os obstáculos;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela excelente formação e pela oportunidade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos;

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti por todos os ensinamentos, dedicação, apoio, incentivo, pelos seis anos de orientação, amizade, confiança e exemplo de profissionalismo;

Ao Professor Hilário Cuquetto Mantovani pelas sugestões que muito ajudaram no decorrer dos experimentos, pelos ensinamentos, entusiasmo e disponibilidade;

Ao Professor Frederico José Vieira Passos, que é um exemplo de profissional, ao qual admiro desde a graduação, pelas sugestões que foram muito úteis para o trabalho;

Ao Professor Galvão pela participação na banca de defesa e ajuda com a câmara de anaerobiose;

À Professora Míriam Terezinha dos Santos pela participação na banca de defesa, pelo apoio, incentivo e pela amizade;

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia que de uma forma ou de outra contribuíram para conclusão deste trabalho e participaram da minha formação;

À Doutora Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG pelos 5 anos de ótima convivência, conselhos e amizade;

Ao Uelinton pela amizade, apoio, conselhos e pela grande ajuda durante as etapas que me levaram a alcançar o sonho do doutorado nos Estados Unidos;

A Ana Andréa pela constante ajuda e amizade;

Aos meus amigos Janaína, Bruno e Rafael, por me apresentarem o mundo “anaeróbio”, tendo uma grande participação no início do mestrado;

A todos os meus amigos de Laboratório, especialmente: Eliseth, José Carlos, Flávia, Bete, Ximena, Eliane, Maurílio, Rodrigo, Marcelinho, Aline, Marcelão, Fernanda, “Simones”, Renata, Marília, “Adrianas”, Andréa, Carol, André, Emilene, Isabela, Wanessa, dentre outros, pela ótima convivência, brincadeiras e amizade;

Aos meus amigos do Bioagro que estiveram sempre prontos a me ajudar, especialmente o pessoal do Laboratório de Microbiologia Industrial, Fisiologia e Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade;

A Nilcéa, Laura e Aparecida pelo auxílio constante;

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e do Bioagro, especialmente o José Carlos, Cesário, Sr. Paulo, Pablo, Evandro, Danilo e Custódio;

Aos meus pais, Simião e Denise, pelo amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos da minha vida, abdicando dos seus sonhos pelos meus e dos meus irmãos;

Aos meus avós, Sebastião e Esther, e aos meus irmãos, Silvia e Alexandre, pelo companheirismo, amor, dedicação e apoio;

Ao Cleiton pelo companheirismo, amor, paciência, amizade e dedicação;

Aos meus tios e primos pelos estímulos, ajuda e compreensão;

Aos meus sobrinhos Samuel, Ian, Ieray, Paulinha e Arthur por terem deixado a minha vida mais feliz, muitas vezes me fazendo esquecer as preocupações de ser adulta e voltando a ser criança;

A todas as minhas amigas que sempre estiveram ao meu lado;

A todas as pessoas que ajudaram na minha trajetória acadêmica e que sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim.

"A sorte favorece a mente bem preparada." (Louis Pasteur)

BIOGRAFIA

ESTHER DANTAS COSTA, filha de Simião Lopes Costa e Maria Denise Dantas Costa, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, em 29 de Janeiro de 1982.

Graduou-se em Engenharia de Alimentos em Janeiro de 2004 pela Universidade Federal de Viçosa.

Iniciou, em Março de 2004, o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

Foi aceita para realização do doutorado pleno na Universidade de Cornell (EUA) pelo programa Capes-Fulbright a iniciar-se em agosto de 2006.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Isolamento de bactérias deterioradoras de polpa de manga comercialmente estéril e estocada à temperatura ambiente	12
3.2. Identificação dos isolados.....	13
3.3. Crescimento dos isolados em diferentes valores de pH	15
3.4. Crescimento dos isolados em diferentes temperaturas.....	15
3.5. Preparo e caracterização da polpa de manga.....	16
3.5.1. Preparo.....	16
3.5.2. Atividade de água	16

3.5.3. Sólidos solúveis	16
3.5.4. pH	16
3.6. Acidez total da polpa de manga nos diferentes valores de pH	17
3.7. Atividade fermentativa das bactérias isoladas de polpa de manga deteriorada.	17
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	19
4.1. Isolamento de bactérias deterioradoras de polpa de manga	19
4.2. Identificação dos isolados.....	21
4.3. Crescimento dos isolados em diferentes valores de pH	22
4.4. Crescimento dos isolados em diferentes temperaturas.....	26
4.5. Caracterização da polpa de manga utilizada para determinação da atividade fermentativa.....	31
4.6. Atividade fermentativa dos isolados de <i>Clostridium tyrobutyricum</i> em polpa de manga	32
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
APÊNDICE.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de manga pelos principais países produtores em 2005	4
Tabela 2 – Composição da polpa de manga de acordo com o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade para polpa de manga, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).	5
Tabela 3 – Resultados dos testes bioquímicos realizados com os isolados LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 e o descrito pelo Manual de Bergey para <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	23
Tabela 4 – Velocidade específica de crescimento (μ), duração da fase lag (L) e densidade óptica máxima (DO_{max}) de <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 cultivados em caldo BHI com pH ajustado para valores entre 3,0 e 7,0 e incubados a 30 °C. Os valores representam a média de duas repetições.	25
Tabela 5 – Velocidade específica de crescimento (μ), duração da fase lag (L) e densidade óptica máxima (DO_{max}) de <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 cultivados em caldo BHI e incubados em temperaturas entre 10 °C a 50 °C. Os valores representam a média de três repetições... ..	28
Tabela 6 – Equações da Raiz Quadrada ajustadas para o crescimento de <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 cultivados em caldo BHI e o quadrado médio do resíduo da regressão	29

Tabela 7 – Equações de Arrhenius ajustadas para o crescimento de <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 cultivados em caldo BHI e o quadrado médio do resíduo da regressão.....	30
Tabela 8 – Acidez titulável da polpa de manga utilizada nos experimentos.....	30
Tabela 9 – Taxa de produção de gás (mL/h) por <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 em polpa de manga com valores de pH entre 3,0 e 5,0.	34
Tabela 10 – Rendimento em butirato (mM/mM), acetato (mM/mM) e gás (mL/mM) a partir da fermentação de polpa de manga com pH inicial de 4,0 e 4,5 por 312 horas por <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104..	40
Tabela 11 – Acidez titulável (expressa em g de ácido cítrico/100 g polpa de manga) e valores de pH ao longo da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH inicial de 4,0 e 4,5.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Colônias de bactérias anaeróbias deterioradoras de polpa de manga tratada termicamente em Ágar Padrão para Contagem, a 30 °C, por 48 horas. Destaque para as bolhas resultantes da intensa atividade fermentativa. 20
- Figura 2 – Características microscópica de isolado de polpa de manga: (A) bastonetes, Gram-positivos, arranjo paliçada e (B) presença de esporos (seta). Aumento: 2000 x..... 21
- Figura 3 – Crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 (D) a 30 °C, por 48 horas, em caldo BHI, em diferentes valores de pH inicial. -x- pH 3,0; -Δ- pH 3,5; -○- pH 4,0; -●- pH 4,5; -◇- pH 5,0; -▲- pH 5,5; -■- pH 6,0; -□- pH 6,5; -◆- pH 7,0. O desvio padrão entre as médias foi menor do que 10 %. 24
- Figura 4 – Velocidade específica de crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45 (-▲-), LMA 63 (-x-), LMA 72 (-○-) e LMA 104 (-□-) cultivado em caldo BHI, a 30 °C, com diferentes valores de pH..... 26
- Figura 5 – Crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 (D) em caldo BHI, por 72 horas em temperaturas de incubação diferentes. -◆- 10 °C; -□- 18 °C; -▲- 25 °C; -■- 30 °C; -○- 35 °C; -●- 40 °C; -x- 45 °C; -Δ- 50 °C. O desvio padrão entre as médias foi menor que 10 % 27

Figura 6 – Modelo da raiz Quadrada ajustada para o crescimento de <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45 (...▲...), LMA 63 (-.-x-.-), LMA 72 (-●-) e LMA 104 (--■--). As células foram cultivadas em caldo BHI e incubadas em temperaturas variando de 7 °C a 40 °C .	30
Figura 7 – Produção de gás por <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 (D), cultivados a 30 °C em 10 mL de polpa de manga anaeróbia em diferentes valores de pH inicial. x- pH 3,0; -□- pH 3,5; -○- pH 4,0; -●- pH 4,5; -▲-pH 5,0. As barras de erro representam o desvio padrão da média.	33
Figura 8 – Produtos da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH 4,0 (A) e pH 4,5 (B) por <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45. -●- Succinato; -■- Etanol; -▲- Acetato; - x- Butirato.	36
Figura 9 – Produtos da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH 4,0 (A) e pH 4,5 (B) por <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 63. -●- Succinato; -■- Etanol; -▲- Acetato; - x- Butirato	37
Figura 10 – Produtos da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH 4,0 (A) e pH 4,5 (B) por <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 72. -●- Succinato; -■- Etanol; -▲- Acetato; - x- Butirato.	38
Figura 11 – Produtos da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH 4,0 (A) e pH 4,5 (B) por <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 104. -●- Succinato; -■- Etanol; -▲- Acetato; - x- Butirato.	39
Figura 12 – Consumo de açúcares por <i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 (D) cultivados a 30 °C em 10 mL de polpa de manga anaeróbia com pH inicial 4,0, sacarose (-○-), glicose (-□-) e frutose (-Δ-), e pH inicial 4,5, sacarose (-●-), glicose (-■-) e frutose (-▲-)	43

RESUMO

COSTA, Esther Dantas, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2006.
Isolamento, caracterização e atividade fermentativa de bactérias deterioradoras de polpa de manga. Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Frederico José Vieira Passos e Hilário Cuquetto Mantovani.

A manga (*Mangifera indica* Linn.) é uma das mais importantes frutas tropicais, muito apreciada pelo sabor, aroma e por suas propriedades nutricionais. Os frutos são perecíveis em razão dos fatores intrínsecos, dificultando a sua comercialização *in natura*. Uma alternativa para reduzir as perdas é a conservação da manga na forma de polpa, suco ou néctar. O tratamento térmico é o processo mais empregado para a conservação desses produtos. Entretanto, a inativação completa de microrganismos durante o processamento térmico normalmente adotado pelas indústrias processadoras de sucos e polpas é limitada pela presença de organismos formadores de esporos e de termorresistentes. Este trabalho teve como objetivos isolar e identificar as bactérias deterioradoras de polpa de manga tratada termicamente e caracterizar a atividade fermentativa desses microrganismos. Amostras de 25 lotes de polpa de manga deteriorada provenientes de duas unidades industriais processadoras de polpa de manga foram analisadas em ágar padrão para contagem, enriquecido com 20 % de polpa de manga esterilizada. Um total de 104 isolados foi obtido e essas bactérias foram caracterizadas como bastonetes, Gram-positivas, formadoras de esporos sendo a grande maioria constituída de anaeróbias estritas, do gênero *Clostridium*. Destes, os isolados

LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 obtidos de lotes diferentes de polpa de manga provenientes de duas unidades industriais, foram identificados por teste bioquímicos e pelo perfil de ácidos graxos de membrana como *Clostridium tyrobutyricum* e selecionados para a continuidade deste estudo. Os isolados foram cultivados em caldo BHI com pH variando de 3,0 a 7,0 e em temperatura entre 7 °C e 50 °C. O crescimento de *C. tyrobutyricum* ocorreu em valores de pH de 4,0 a 7,0 com exceção do isolado LMA 104 que não apresentou crescimento em pH 4,0 em até 48 horas de incubação. Não houve crescimento em pH 3,5. A velocidade específica de crescimento (μ) foi maior em pH entre 6,5 e 7,0 e alcançou valores entre 0,18 e 0,31 h⁻¹. O crescimento foi observado em temperaturas de 10 °C a 40 °C, com ótimo entre 35 °C e 40 °C. A atividade fermentativa de *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 foi avaliada em polpa de manga com pH variando de 3,0 a 5,0. A produção de gás foi detectada em valores de pH de 4,0, 4,5 e 5,0 em menos de 50 horas de incubação a 30 °C, com exceção do isolado LMA 104 cuja produção de gás foi detectada após 100 horas de incubação. Além de gás, os principais produtos da fermentação da polpa de manga com pH entre 4,0 e 4,5 foram acetato e butirato, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O consumo de sacarose, glicose e frutose durante a fermentação de polpa de manga com pH 4,0 e 4,5 foi determinado utilizando-se HPLC. Os isolados de *C. tyrobutyricum* avaliados apresentaram capacidade de crescer em altas concentrações de açúcar, pois fermentaram a polpa de manga com 729,2 mM de açúcares e não utilizaram todo o substrato durante a fermentação. A inibição do crescimento dos isolados em polpa de manga com pH 3,5 permite sugerir a adoção da estratégia de acidificação para garantir a conservação do produto pela indústria, que geralmente processa esse produto com pH 4,0.

ABSTRACT

COSTA, Esther Dantas, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2006.
Isolation, characterization and fermentative activity of mango pulp spoilage bacteria. Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee Members: Frederico José Vieira Passos and Hilário Cuquetto Mantovani.

The mango (*Mangifera indica* Linn.) is one of the most important tropical fruits. It is very appreciated due to its flavor and nutritional characteristics. The fruits are easily spoiled because of intrinsic factors, which makes difficult its commercialization *in natura*. An alternative to reduce the losses is the conservation of the mango as pulp, juice and nectar. The thermal treatment is the most used process to conserve these products. However, the complete inactivation of microorganisms during the thermal processing adopted by most industries of fruit juices and fruit pulps is limited by the presence of spore formers and thermoresistant microorganisms. This work aimed to isolate and to identify spoilage bacteria from thermally processed mango pulp, and to characterize the fermentative activity of these microorganisms. Samples of 25 lots of spoiled mango pulp from two industrial units processing mango pulp were evaluated in plate count agar, added with 20 % of sterile mango pulp. A number of 104 bacteria were isolated and were characterized as Gram-positive rods, spore formers and mostly strict anaerobic, indicating that belonged to the genus *Clostridium*. Four isolated named LMA 45, LMA 63, LMA 72 and LMA 104, provenient of different lots of mango pulp from two industrial units, were identified by biochemical tests and by the cell membrane fatty

acids profile as *Clostridium tyrobutyricum*. These four isolates were selected for use in the experiments that followed. The isolates were cultivated in BHI broth within a pH range of 3.0 to 7.0 and temperatures between 7 °C to 50 °C. *C. tyrobutyricum* grew in the pH range of 4.0 to 7.0, except for isolate LMA 104, that did not grow in pH 4.0 up to 48 hours of incubation. None of the isolates was able to grow in pH 3.5. The specific growth rate (μ) was higher in pH values between 6.5 and 7.0 and varied from 0.18 to 0.31 h⁻¹. The growth was observed in a temperature range from 10 °C to 40 °C, with an optimum between 35 °C and 40 °C. The fermentative activity of *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63, LMA 72 and LMA 104 was evaluated in mango pulp with pH varying from 3.0 to 5.0. Gas production was detected in pH of 4.0, 4.5 and 5.0 before 50 hours of the incubation at 30 °C, except for isolate LMA 104 which produced gas only after 100 hours of incubation. The other main products that resulted from mango pulp fermentation in pH values between 4.0 and 4.5 were acetate and butyrate, which was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The consumption of sucrose, glucose and fructose during mango pulp fermentation in pH 4.0 and 4.5 was also determined using HPLC. The *C. tyrobutyricum* isolates evaluated could grow at high sugar concentrations, as they fermented the mango pulp containing 729,2 mM of sugars, but did not use all the substrate. The growth of the isolates was inhibited in mango pulp at pH 3.5. This results suggest the adoption of the acidification strategy by the industries, wich generally process mango pulp with pH 4.0. This strategy might ensure the conservation of the fruit product, without changes in the thermal treatment.

1. INTRODUÇÃO

A manga (*Mangifera indica* Linn.) é originária da Ásia e uma das mais importantes frutas tropicais, muito apreciada pelo sabor, aroma e pelas características nutricionais. Pertencente à família *Anacardeaceae*, a mangueira foi trazida ao Brasil pelos portugueses no século XVI. Atualmente existem cerca de 100 variedades dessa fruta cultivada no país, sendo que na região da zona da mata do estado de Minas Gerais, a principal é a variedade Ubá. Entre os principais municípios produtores dessa variedade estão as cidades de Visconde do Rio Branco e Ubá. Em razão do sabor e textura, a variedade de manga Ubá é muito utilizada na produção de polpas e sucos.

Atualmente, o Brasil está entre os principais países produtores de manga do mundo, com uma área plantada de 67 mil hectares. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Nutrição (FAO), em 2005 o país produziu um total de 850 mil toneladas dessa fruta e, em 2003, de acordo com a Secretaria de Comércio Exterior, foram exportadas 133.329,7 toneladas, o que rendeu, aproximadamente, 73 milhões de dólares. O Nordeste é a principal região produtora com 53 % da produção nacional, e o Vale do São Francisco se destaca como maior produtor e exportador.

A produção de polpas, sucos e néctares tem despertado interesse do setor do agronegócio, pois é um mercado em expansão no Brasil e no mundo. O consumo de sucos de frutas no mundo cresce a cada ano e no Brasil, o aumento do consumo é, em média, de 12 % ao ano. Esse crescimento está diretamente relacionado a mudanças de hábitos alimentares da população. As exportações brasileiras de sucos de 2002 para

2003 apresentaram crescimento de 13,9 % e segundo dados da Secretaria de Comércio Exterior (Secex), de janeiro a abril de 2004, as vendas externas de sucos naturais e congelados cresceram 254,4 % em relação ao primeiro quadrimestre de 2003, gerando uma receita de 339,78 milhões de dólares.

O tratamento térmico é o processo mais empregado para a conservação de polpas, néctares e sucos de frutas. Entretanto, a inativação completa de microrganismos durante o processamento térmico comercial de sucos de frutas é limitada pela presença de organismos formadores de esporos e de termorresistentes. Esporos bacterianos estão presentes no solo e podem estar presentes na casca da fruta quando esta chega à indústria. Muitas bactérias formadoras de esporos são capazes de crescer em substratos com valores de pH baixos e são normalmente associadas à deterioração de alimentos ácidos tratados termicamente. A atividade de água elevada, o pH em torno de 4 e a composição química da manga permitem o desenvolvimento de muitos desses microrganismos.

Para a eliminação de esporos bacterianos em sucos de frutas é necessário um tratamento térmico drástico, que pode afetar as características sensoriais e nutricionais do produto, além de representar maior custo para a indústria. Uma alternativa é o uso de ácidos orgânicos para reduzir o pH, como por exemplo, o ácido cítrico que está presente em frutas. O efeito do pH de sucos na germinação e na redução da resistência térmica de esporos é amplamente reconhecido.

Buscando obter informações sobre microrganismos deterioradores de polpa de manga, este trabalho teve como objetivos, isolar, identificar e caracterizar a atividade fermentativa de bactérias deterioradoras de polpa de manga.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A demanda mundial de manga tem crescido mais do que a de qualquer outra fruta, com 54 % de aumento entre 1996 e 2000 (FAO, 2001). A produção mundial desta fruta em 2005 foi de 27.966.749 toneladas, e o Brasil ocupa a oitava posição entre principais países produtores (Tabela 1), que são responsáveis por mais de 80 % da produção mundial (FAO, 2006). Em 2003 o Brasil exportou 133.329,7 toneladas, o que rendeu, aproximadamente, 73 milhões de dólares ao país (SECEX, 2004). A produção brasileira de manga em 2005 foi de 850.000 toneladas (FAO, 2006). Os principais estados produtores são: Bahia, São Paulo, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Sergipe, Piauí e Tocantins (IBGE, 2004).

A manga é uma das mais importantes frutas tropicais, apreciada pelas suas características nutricionais, sabor, aroma e coloração (CARDELLO e CARDELLO, 1998; BRUNINI *et al.*, 2002). A composição química e as características físicas da manga variam de acordo com as condições da cultura, variedade e estágio de maturação, sendo constituída principalmente de água, carboidratos, ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, vitaminas e pigmentos (CARDELLO e CARDELLO, 1998). Os açúcares mais abundantes são glicose, frutose e sacarose e as concentrações variam de acordo com a safra (GIL *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Produção de manga pelos principais países produtores em 2005.

País	Produção (t)
Índia	10.800.000
China	3.673.000
Tailândia	1.800.000
Paquistão	1.673.900
México	1.503.010
Indonésia	1.478.204
Filipinas	950.000
Brasil	850.000
Nigéria	730.000
Produção Mundial	27.966.749

Fonte: FAO (2006).

Os frutos são muito perecíveis em razão dos fatores intrínsecos e da susceptibilidade a doenças, requerendo técnicas adequadas de armazenamento, transporte e comercialização (MORAES, 1988). Uma vez colhidos, os frutos apresentam respiração intensa, o que resulta em uma deterioração mais rápida, dificultando a comercialização da fruta *in natura* (PIGLIONE, 1995). Do total produzido, uma parte é perdida como excedente de produção e essa perda está diretamente relacionada à logística inadequada e à falta de cuidado no manuseio dos frutos (SUGAI, 2002). Além das perdas, a produção da manga é concentrada no período da safra, que vai de novembro a janeiro (TODA FRUTA, 2004), diminuindo a sua oferta nos demais meses.

A industrialização da manga representa uma alternativa ao consumo *in natura* para a utilização dos excedentes de produção e possibilita o consumo durante a entressafra (BRUNINI *et al.*, 2002). Além disso, os produtos oriundos do processamento da manga representam uma parcela das exportações brasileiras de produtos agroindustriais, agregando maior valor ao produto, gerando novas receitas e criando novos empregos no país.

Em 1987, o consumo de sucos no Brasil foi de 51 milhões de litros, passando para 112,5 milhões de litros em 1996, o que representou uma variação média de 12 % ao ano (IBGE, 2003). Estes dados expressam o forte crescimento do consumo desse

produto, que atualmente está se tornando uma parte importante da dieta do consumidor (GHENGHESH *et al.*, 2005). As exportações brasileiras de sucos apresentaram um crescimento de 13,9 % em 2003 em relação a 2002, gerando uma receita de 1,25 bilhões de dólares (SECEX, 2004). Segundo dados da Secretaria de Comércio Exterior (Secex), de janeiro a abril de 2004, as vendas externas de sucos, naturais e congelados, cresceram 254,4 % em relação ao primeiro quadrimestre de 2003, gerando uma receita de 339,78 milhões de dólares.

Os sucos são obtidos a partir da polpa da fruta. Segundo a Instrução Normativa nº 1, de 7 de Janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que aprovou o Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta, polpa de fruta é caracterizada como “produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido de frutos polposos, através de processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais”. Este mesmo regulamento estabelece que a polpa de fruta destinada à industrialização de outras bebidas e não destinada ao consumo direto poderá ser adicionada de aditivos químicos previstos para a bebida a que se destina. Na polpa de fruta poderão ser adicionados acidulantes como regulador de acidez, conservadores químicos e corantes naturais, nos mesmos limites estabelecidos para sucos de frutas, ressalvados os casos específicos (BRASIL, 2000). Os padrões legais de identidade e qualidade para polpa de manga estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição da polpa de manga de acordo com o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de manga, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Requisitos	Mínimo	Máximo
Sólidos solúveis em °Brix, a 20 °C	11,0	
pH	3,3	4,5
Acidez total expressa em ácido cítrico (g/100 g)	0,32	
Açúcares totais naturais da manga (g/100 g)		17,00
Sólidos totais (g/100 g)	14,00	

Fonte: Brasil (2000).

A Instrução Normativa nº 1 estabeleceu também, limites microbiológicos máximos para bolores e leveduras, que é de 5×10^3 UFC/g para polpa *in natura*, congelada ou não, e 2×10^3 UFC/g para polpa conservada quimicamente e, ou submetida a tratamento térmico; coliformes a 45 °C, máximo 1/g; e ausência de *Salmonella* em 25 g (BRASIL, 2000). Entretanto, os microrganismos relevantes em sucos e polpas frutas submetidos a tratamento térmico são os termorresistentes e os formadores de esporos, que podem sobreviver ao processamento e deteriorar esses produtos. Para esses microrganismos, a legislação não estabelece os limites máximos.

As técnicas de conservação de alimentos visam reduzir a contaminação por microrganismos a números aceitáveis, preservando a segurança alimentar e as características nutricionais e sensoriais do produto (KWOK *et al.*, 2002; FINE e GERVAIS, 2005; ICIEK *et al.*, 2005). A inativação térmica de microrganismos é um método frequente de conservação usado nas indústrias de alimentos (CERF *et al.*, 1996; TCHANGO-TCHANGO, 1997), sendo o mais empregado para a conservação de polpas, néctares e sucos de frutas. A garantia da segurança microbiológica e a vida de prateleira desses produtos dependem da contaminação inicial e da taxa de crescimento dos microrganismos contaminantes, além da inativação da população microbiana durante o tratamento térmico (AHVENAINEM, 1996; ICIEK *et al.*, 2005). Entretanto, a inativação completa de microrganismos durante o processamento térmico comercial de sucos de frutas é limitada pela presença de organismos formadores de esporos e de termorresistentes (RAJASHEKHARA *et al.*, 2000).

Esporos bacterianos estão entre as estruturas microbianas mais resistentes que se conhece (NICHOLSON *et al.*, 2000; DRIKS, 2002; MOIR, 2003, DÜRRE e HOLLERGSCHWANDNER, 2004). Eles são formados em resposta a situações de estresse e sobrevivem em condições extremas, como o calor, a radiação, tratamentos químicos e tempo (DRIKS, 1999; NICHOLSON *et al.*, 2000). A estrutura complexa dos esporos assegura a manutenção do estado dormente e protege seu interior das agressões ambientais (NICHOLSON *et al.*, 2000). Existem vários fatores que determinam a resistência dos esporos, dentre eles destacam-se os fatores genéticos da espécie bacteriana, as condições de esporulação, principalmente temperatura, a concentração de minerais e de ácido dipicolínico e o baixo conteúdo de água da parte central e a saturação do DNA com proteínas pequenas, solúveis em ácido, denominadas SASP (NICHOLSON *et al.*, 2000; SETLOW e JOHNSON, 2001). O esporo germina em resposta ao ambiente e, nos primeiros estágios da germinação, perde a sua característica

de resistência ao calor. A germinação é estimulada por determinadas substâncias, principalmente por aminoácidos, açúcares e ribosídeos (MOIR, 2003), o que faz dos alimentos, um ambiente propício para a germinação.

O calor pode danificar diferentes estruturas do esporo e os danos causados dependem da intensidade do tratamento térmico (PALOP *et al.*, 1997). Quando o DNA é inativado pelo calor, a célula é irreversivelmente inativada, mas a desnaturação do DNA do esporo não ocorre facilmente, devido à sua ligação às SASP (SETLOW, 1995). Antes do DNA ser desnaturado, outras estruturas são danificadas, impedindo a germinação (PALOP *et al.*, 1997). Dependendo da intensidade do tratamento térmico empregado, os danos podem ser reparados após a germinação dos esporos, mas isso depende das condições a que estão submetidos, como a composição do meio, temperatura e, principalmente, pH (PALOP *et al.*, 1997).

Esporos bacterianos e fúngicos estão presentes no solo, na matéria orgânica em decomposição, nas frutas deterioradas e em equipamentos de processamento de alimentos (SAMSON *et al.*, 1984; BEUCHAT, 1986). Essa disseminação ampla, aliada à susceptibilidade alta dos frutos ao desenvolvimento microbiano, contribui para que a matéria-prima usada no processamento de sucos possua contaminação elevada por microrganismos esporulados. Em geral, frutas frescas contêm uma contagem total de microrganismos entre 10^4 e 10^6 unidades formadoras de colônias - UFC/g quando chegam à indústria (PAO e BROWN, 1998). Essa contaminação pode ser maior, caso as condições adotadas no manuseio das frutas não atendam as recomendações das Boas Práticas de Produção (BPP).

Muitas bactérias formadoras de esporos são capazes de crescer em substratos com valores de pH baixos (EVERIS e BETTS, 2001). Esses microrganismos são normalmente associados com a deterioração de alimentos ácidos tratados termicamente (EVERIS e BETTS, 2001). A resistência térmica de esporos de bactérias de espécies dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Alicyclobacillus* é amplamente reconhecida e esses microrganismos podem deteriorar produtos ácidos tratados termicamente (YAMAZAKI *et al.*, 2000). Crescimento de bactérias esporuladas em polpas e sucos de manga acidificados e enlatados foi detectado, mesmo após o tratamento térmico (AZIZI e RANGANNA, 1993). Esses autores verificaram o desenvolvimento de *Bacillus licheniformis*, que é uma bactéria anaeróbia facultativa e formadora de esporos e de

Clostridium sporogenes, um anaeróbio obrigatório e também formador de esporos, em sucos de manga acidificados e tratados termicamente.

Dentre os microrganismos comumente relacionados com a deterioração de alimentos com o pH entre 3,6 e 4,1, estão *Clostridium pasteurianum* entre os anaeróbios e *Bacillus coagulans* entre os aeróbios (AZIZI E RANGANNA, 1993). Bactérias como *B. licheniformis* e *Clostridium butyricum* também são reconhecidos como agentes de deterioração de conservas alimentícias ácidas (YAMASAKI *et al.*, 2000; EVERIS e BETTS, 2001). Outro termoacidófilo e formador de esporos, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, foi recentemente isolado de sucos ácidos deteriorados e identificado (YAMASAKI *et al.*, 1996; YAMASAKI *et al.*, 2000). *A. acidoterrestris* é considerado um dos microrganismos mais importantes para o controle de qualidade de alimentos ácidos submetidos a tratamentos térmicos (SILVA *et al.*, 1999; YAMASAKI *et al.*, 2000; SILVA e GIBBS, 2001; LEE *et al.*, 2004). A termorresistência dos seus esporos não é afetada pela variação do pH do meio de aquecimento entre 2,5 a 6,9 (YAMASAKI *et al.*, 1997) e entre 3,0 e 8,0 (MURAKAMI *et al.*, 1998) ou pelo tipo de ácido orgânico utilizado (PONTIUS *et al.*, 1998; TERANO *et al.*, 2005).

A capacidade dessa bactéria em crescer em valores de pH abaixo de 4,5 e de seus esporos apresentarem resistência térmica elevada em bebidas ácidas, determina a necessidade de se desenvolver estratégias para inativar ou controlar a germinação dos esporos e o crescimento das células vegetativas (LEE *et al.*, 2004).

Além de esporos bacterianos, esporos fúngicos, como os ascósporos dos gêneros *Neosartorya*, *Byssochlamys*, *Talaromyces* e *Eupenicillium* podem sobreviver a tratamentos térmicos comerciais, germinarem após processamento e deteriorarem produtos à base de frutas (BEUCHAT, 1998; EVERIS e BETTS, 2001).

Para a eliminação completa de esporos bacterianos e de ascósporos fúngicos em sucos de frutas é necessário o prolongamento de tratamento térmico. Entretanto, esta prática não é desejável na produção comercial de sucos de qualidade, pois pode afetar as características sensoriais e nutricionais do produto (CERF *et al.*, 1996).

Aspectos técnicos e científicos envolvidos na conservação de alimentos refletem na indústria de alimentos, que procura aumentar a vida de prateleira dos produtos (SANTOS e ZARZO, 1996). Uma das tentativas adotadas para evitar os efeitos indesejáveis dos tratamentos térmicos drásticos em alimentos é o uso combinado de diferentes métodos de conservação (PALOP *et al.*, 1996). A aplicação de condições que

inibem o desenvolvimento de bactérias em combinação com tratamento térmico pode ser vantajosa, pois além de aumentar a segurança e a estabilidade microbiológica do produto, permite a redução na intensidade dos tratamentos, com conseqüente aumento na qualidade (OCIO *et al.*, 1994).

O uso de conservantes químicos não é de fácil aceitação pelo consumidor moderno, que está cada vez mais preocupado em consumir produtos naturais e com alto valor nutritivo (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004). A adição de ácidos orgânicos, que geralmente estão presentes nas frutas, é uma das medidas mais importantes geralmente adotadas para o controle de microrganismos deterioradores e patogênicos em alimentos (JAY, 1996). O uso de acidulantes como coadjuvante tecnológico pode aumentar a conservação de produtos de frutas tratados termicamente e reduzir a termorresistência microbiana. O pH é o fator mais importante que determina a resistência térmica de microrganismos que é influenciada também pelas características genéticas do microrganismo, da carga microbiana da matéria-prima e das condições a que as bactérias estão submetidas, como a composição do meio, presença de enzimas, atividade de água (A_w), entre outros (DAUTHY, 1995; COUVERT *et al.*, 1999; LEGUERINEL *et al.*, 2005).

A acidez aumenta a sensibilidade de esporos e de células vegetativas ao calor e pode também impedir a germinação dos esporos que sobreviverem ao tratamento térmico (PALOP *et al.*, 1996; 1997). O valor mínimo do pH que garante a segurança microbiológica sem afetar as características sensoriais e nutricionais é um fator crítico para a otimização do tratamento térmico para produtos ácidos. Em produtos com pH acima de 4,5, o tratamento térmico deve assegurar a eliminação de esporos de *Clostridium botulinum*. Tal preocupação não existe em produtos que têm o pH abaixo de 4,5, pois os esporos desta bactéria não são capazes de germinar sob tais condições (JAY, 1996; VIEIRA *et al.*, 2002). Nesses produtos, o tratamento térmico deve ser dimensionado para a inativação dos esporos de bactérias e fungos deterioradores capazes de crescer em valores baixos de pH (AZIZI e RANGANNA, 1993).

O efeito da acidificação depende do tipo de acidulante usado (SANTOS e ZARZO, 1996). O efeito antimicrobiano de um ácido em particular depende de suas propriedades como, por exemplo, pKa, pH e concentração do ácido no meio, além do microrganismo estudado (BLOCHER e BUSTA, 1983). Conseqüentemente, a escolha do ácido deve ser feita com base em sua atividade antimicrobiana sobre um microrganismo em particular, em um valor fixo de pH e de concentração (McCormick,

1983, citado por SANTOS e ZARZO, 1995). Entretanto, outros fatores também devem ser considerados, como a solubilidade, custo, e as características sensoriais, que contribuem com a qualidade do produto (SANTOS e ZARZO, 1995).

Ácidos podem inibir a germinação de esporos, por um mecanismo ainda não esclarecido, e o crescimento de células vegetativas, por reduzirem o pH do meio ou, no caso de ácidos fracos, por terem efeito inibitório específico em um ou mais estádios de desenvolvimento como resultado da atividade antimicrobiana da sua forma não dissociada (BLOCHER e BUSTA, 1983). De acordo com SANTOS e ZARZO (1996), o valor de pH e a concentração e tipo de ácido usado atuam sinergisticamente, ao invés de independentemente. O ácido cítrico é um dos acidulantes mais comumente usados na fabricação de produtos de frutas (GRAHAM e LUND, 1986). O ácido cítrico é um ácido orgânico fraco, de baixo custo, presente na maioria das frutas, usado como conservante natural, além de dar um sabor ácido na preparação de alimentos e de bebidas. Esse ácido é uma substância GRAS (geralmente reconhecida como segura) de acordo com o FDA (Food and Drug Administration). A acidez do ácido cítrico é em razão de três grupos carboxilas (-COOH) que podem perder um próton em soluções, formando um íon citrato. A ionização desse ácido ocorre em etapas, e por essa razão, ele possui três valores de pKa, que são 3,13; 4,76 e 6,39 (COSTILOW, 1981).

A combinação de temperatura e pH é frequentemente adotada no processamento de alimentos e foi um dos primeiros processos combinados a ser usado, com o objetivo de reduzir a intensidade do tratamento térmico de alguns vegetais enlatados (PALOP *et al.*, 1996). Hoje, a acidificação de produtos a valores de pH abaixo de 4,5 é uma prática normal. Muitas bactérias apresentam uma relação linear entre o tempo de redução decimal (valor D) e o pH, como por exemplo, *Escherichia coli* (REICHART, 1994) e *Bacillus cereus* (MAZAS *et al.*, 1988).

A taxa de morte exponencial resultante do tratamento térmico de células vegetativas ou esporos é a base para os cálculos convencionais usados no processamento térmico na indústria de alimentos (MAFART e LEGUÉRINEL, 1997). O método tradicional para cálculo de tratamento térmico para a preservação de alimentos assume que a inativação de microrganismos segue o modelo cinético de primeira ordem:

$$\frac{dN}{dt} = -K_d N$$

Onde N é o número de células ou esporos sobreviventes, t é o tempo de tratamento térmico e K_d é a constante definida como velocidade específica de morte térmica.

A inativação térmica de microrganismos geralmente é descrita em termos de redução logarítmica, onde o modelo cinético de primeira ordem é:

$$\text{Log } N = \text{log } N_0 - t/D$$

O Valor D ou tempo de redução decimal é o tempo, em minutos, necessário para inativar 90 % de uma população microbiana a uma dada temperatura (PELEG, 1999), ou o tempo que leva a uma redução de 10 vezes na população sobrevivente (COUVERT *et al.*, 2005) ou ainda o inverso da inclinação de log N *versus* tempo de tratamento térmico. Esse conceito para o valor D ainda governa o cálculo do tratamento térmico de um alimento (COUVERT *et al.*, 2005).

Por razões probabilísticas e genéticas, todos os indivíduos de uma população microbiana raramente morrem ao mesmo tempo sob um agente letal. O tempo de inativação é dependente do microrganismo e do seu número inicial, além da natureza e da intensidade do agente letal (PELEG, 1999).

O efeito do pH na redução da resistência térmica de esporos é amplamente reconhecido, mas informações disponíveis relacionadas a um efeito quantitativo de pH são escassas (COUVERT *et al.*, 1999, MAFART *et al.*, 2001). Faltam informações sobre o trinômio tempo, temperatura e pH a ser utilizado na indústria de processamento para minimizar as perdas decorrentes da sobrevivência de esporos, que podem se desenvolver, levando à deterioração do produto.

A garantia da qualidade de produtos de frutas ainda se baseia na análise do produto final, incluindo a necessidade de manter os lotes em quarentena antes da liberação para a comercialização. Tal estratégia resulta em grandes prejuízos com o descarte de unidades defeituosas. Um programa de garantia de qualidade, respaldado pelo tratamento eficaz na inativação de microrganismos formadores de esporos pode representar diminuição significativa nos custos da indústria, bem como na maior confiabilidade do processo adotado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Microbiologia de Anaeróbios, Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade e Fisiologia de Microorganismos no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa - MG.

3.1. Isolamento de bactérias deterioradoras de polpa de manga

Amostras variando de 250 g a 2 kg de polpa de manga industrializadas que apresentavam sinais de deterioração, representada pela produção de gás e odor desagradável, foram coletadas em duas indústrias processadoras do produto, na região da zona da Mata Mineira na safra de 2003 e 2004. A manga utilizada por essas indústrias é da variedade Ubá e a polpa é submetida a tratamento térmico correspondente à esterilização comercial, que é de 109 °C por 9 segundos e envasada assepticamente. Após a coleta, amostras de polpas deterioradas de 25 lotes foram levadas imediatamente para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, onde foram mantidas refrigeradas até que se procedesse ao isolamento das bactérias. Todo o procedimento de isolamento foi realizado em câmara de anaerobiose.

As amostras de polpa de manga deteriorada foram diluídas sucessivamente em solução salina preparada anaerobicamente (HUNGATE, 1950), sob atmosfera de CO₂

até a diluição 10^{-5} . Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram plaqueadas pela técnica de *pour plate* em ágar Padrão para Contagem de Microrganismos – PCA (Acumedia®). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas em câmara de anaerobiose.

Após crescimento, foram selecionadas de três a cinco colônias isoladas com morfologias distintas nas placas que apresentaram contagem entre 25 e 250 colônias. As colônias selecionadas foram transferidas, em câmara de anaerobiose, para tubos Belco® (18 mm x 150 mm) contendo caldo Infusão de Cérebro e Coração - caldo BHI (Acumedia®) adicionado de 0,3 % (p/v) de cisteína (Vetec®) e de 0,1 % (v/v) de solução de resazurina (Sigma®) a 0,01 %, preparada anaerobicamente (HUNGATE, 1950) sob atmosfera de CO₂. Os tubos foram incubados a 30 °C por 48 horas. As culturas foram reisoladas pela técnica de estrias compostas em ágar BHI anaeróbio e transferidas novamente para caldo BHI anaeróbio.

Os isolados cultivados em caldo BHI anaeróbio foram estocados em solução anaeróbia de glicerol que continha em cada litro: 292 mg de K₂HPO₄, 240 mg de KH₂PO₄, 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄.7H₂O, 64 mg de CaCl₂.2H₂O, 600 mg de cisteína-HCl, 460 mL de glicerol e 460 mL água destilada (TEATHER, 1982). Esse meio de estocagem foi preparado sob atmosfera de N₂, transferido para câmara de anaerobiose e alíquotas de 3 mL foram distribuídas em frascos de 10 mL. Os frascos foram então vedados com rolhas de borracha, lacrados com selos de alumínio e autoclavados (121 °C por 15 min). Alíquotas de 4 mL da cultura de cada isolado foram inoculadas em solução anaeróbia de glicerol e estocadas a -20 °C.

Para a ativação das culturas, os estoques foram descongelados e alíquotas foram inoculadas na proporção de 10 % em relação ao volume de caldo BHI anaeróbio. Antes de qualquer experimento, as culturas foram transferidas pelo menos três vezes em caldo BHI para ativação.

3.2. Identificação dos isolados

A produção da enzima catalase pelos isolados foi avaliada pela adição de algumas gotas de peróxido de hidrogênio (Merck®) a 10 % sobre as colônias, e observada a liberação de oxigênio pela efervescência na superfície das colônias.

Foram preparadas lâminas para observação microscópica da polpa de manga deteriorada e também das bactérias isoladas. As lâminas foram coradas de acordo com a técnica de Gram e a morfologia, arranjo das células e presença de esporos foram observados.

Entre os isolados obtidos, quatro foram selecionados para a continuidade do estudo. A identificação dos isolados selecionados foi feita pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). Os isolados foram transferidos três vezes consecutivas para ágar BHI, adicionado de 5 % de sangue de carneiro desfibrilado, preparado anaerobicamente. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas em câmara de anaerobiose. A massa celular obtida foi submetida à análise de ésteres metílicos de ácidos graxos. Os ácidos graxos foram saponificados, metilados, extraídos e analisados por cromatografia gasosa utilizando-se o sistema Sherlock da Microbial Identification System – MIS, versão 4.0 (MIDI). A identificação foi realizada pela comparação do perfil de ácidos graxos com uma biblioteca de referência armazenada em banco de dados para microrganismos anaeróbios.

Testes bioquímicos recomendados no Manual de Bergey para caracterização de bactérias do gênero *Clostridium* foram realizados para auxiliar na caracterização das espécies e incluíram: redução de nitrato, motilidade, hemólise, produção de indol, produção de lecitinase, hidrólise de amido, hidrólise de gelatina, hidrólise de esculina, produção de H₂S e ácido produzido a partir de amidalina, amido, arabinose, celobiose, frutose, glicose, galactose, inositol, inulina, lactose, maltose, manitol, manose, melibiose, rafinose, ribose, sacarose, salicina, sorbitol, trealose e xilose. Os testes foram feitos de acordo com a metodologia descrita por SMIBERT e KRIEG (1994). Amônia foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (CHANNEY e MARBACH, 1962) a partir do sobrenadante livre de células dos isolados selecionados, obtido pela centrifugação a 10.000 RPM por 10 minutos do cultivo dos isolados em polpa de manga e em caldo BHI. A absorvância (630 nm) foi medida em espectrofotômetro Spectronic 20D, utilizando-se cloreto de amônio como padrão.

3.3. Crescimento dos isolados em diferentes valores de pH

O crescimento dos quatro isolados selecionados foi avaliado em caldo BHI anaeróbio, com o pH de: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; e 7,0, ajustado com HCl 1 N ou NaOH 1 N. O crescimento foi monitorado por meio da determinação da densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}), utilizando-se espectrofotômetro Spectronic 20D. As culturas foram quantitativamente diluídas quando a DO foi maior que 0,7 unidades. A duração da fase lag (L) foi estimada pelo método gráfico, extrapolando-se a parte linear da curva de crescimento plotada com os dados de logaritmo neperiano (\ln) DO *versus* tempo até cruzar o eixo x que representa o \ln da concentração inicial de células. Pelo ponto de interseção dessas duas retas estimou-se o tempo de duração da fase lag (PIRT, 1975). A velocidade específica de crescimento (μ) foi determinada a partir da inclinação da reta obtida da regressão linear do gráfico \ln da DO *versus* tempo (h), durante a fase de crescimento exponencial.

3.4. Crescimento dos isolados em diferentes temperaturas

O crescimento de isolados selecionados foi avaliado em caldo BHI anaeróbio, pH 7,2, em temperaturas de incubação de 7 °C, 10 °C, 18 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C. O crescimento foi monitorado pela determinação da densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}). As culturas foram quantitativamente diluídas quando a DO foi maior que 0,7 unidades. A velocidade específica de crescimento (μ) foi determinada a partir da inclinação da reta obtida da regressão linear do gráfico \ln da DO *versus* tempo (h), durante a fase de crescimento exponencial. Para relacionar os valores de μ determinados para cada isolado com as temperaturas correspondentes foram testados o modelo da Raiz Quadrada (RATKOWSKY *et al.*, 1982; ROSS e MCMEEKIN, 1994; ZWIETERING *et al.*, 1996) e a modelo de Arrhenius (ROSS e MCMEEKIN, 1994). O modelo escolhido foi aquele que apresentou menor valor de quadrado médio de resíduo, ou seja, menor variação residual. A temperatura ótima de crescimento foi considerada como sendo aquela onde o microrganismo apresentou maior velocidade específica de crescimento.

3.5. Preparo e caracterização da polpa de manga

3.5.1. Preparo da polpa de manga

A atividade fermentativa dos isolados foi avaliada em polpa de manga preparada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos utilizando manga da variedade Ubá. Após uma seleção prévia, os frutos foram descascados, fatiados e triturados em um copo de liquidificador doméstico. A polpa obtida foi acondicionada em sacos plásticos, e armazenada a - 20 °C. Antes dos experimentos, porções da polpa de manga foram descongeladas à temperatura ambiente e o pH ajustado para 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 com solução a 10 % de ácido cítrico ou solução 1 N da NaOH, quando necessário. Após ajuste de pH, a polpa foi distribuída em garrafas anaeróbias (10 mL) sob atmosfera de CO₂, vedadas com rolhas de borracha, lacradas com selos de alumínio e autoclavadas a 121 °C por 15 minutos.

3.5.2. Atividade de água

A atividade de água (A_w) da polpa de manga foi determinada em equipamento AquaLab CX2 (Adelaide, Austrália), a 25 °C, em triplicata.

3.5.3. Sólidos solúveis

Os sólidos solúveis foram determinados, em triplicata, utilizando-se refratômetro manual com escala de 0 a 32 °Brix (Atago - USA). Alíquotas de 500 µL de amostra, devidamente homogeneizadas à temperatura ambiente, foram depositadas sob o prisma do equipamento.

3.5.4. pH

O pH foi medido, em triplicata, em potenciômetro digital (Tec-2 mp Tecnal), à temperatura ambiente. O pH também foi medido ao longo da fermentação da polpa de manga com pH inicial ajustado para 4,0 e 4,5.

3.6. Acidez total da polpa de manga nos diferentes valores de pH

A acidez total foi determinada em polpa de manga com pH ajustado para 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0. A acidez foi medida por titulometria segundo ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (1997), utilizando-se NaOH 0,025 mol/L. Para cálculo da acidez titulável a seguinte equação foi utilizada:

$$A = \frac{V \times F \times N \times Eq}{10 \times V_a}$$

Onde:

A: acidez expressa em g de ácido cítrico/100 mL de amostra

V: Volume gasto (mL) de solução de NaOH 0,025 mol/L

F: Fator de correção da solução de NaOH 0,025 mol/L

N: Normalidade da solução de NaOH 0,025 mol/L

Eq: Equivalente-grama do ácido cítrico (64,067)

V_a: Volume (mL) da alíquota da amostra

3.7. Atividade fermentativa das bactérias isoladas de polpa de manga deteriorada

A atividade fermentativa das espécies identificadas foi avaliada em polpa de manga com pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 ajustado com ácido cítrico determinando-se o gás produzido pelo método da seringa (NCHE *et al.*, 1994). Um inóculo de 2 % (v/v) das culturas ativas dos isolados selecionados foi transferido para tubos vedados com rolhas de borracha, contendo 10 mL de polpa de manga anaeróbia. Seringas de 10 mL foram acopladas, por meio de agulhas, aos frascos de polpa de manga para a medida de produção de gás ao longo da fermentação. Os frascos foram incubados a 30 °C e o volume de gás liberado foi determinado, medindo-se o deslocamento êmbolo da seringa. Leituras foram realizadas em intervalos regulares de tempo. O ensaio foi feito em triplicata e foram realizadas três repetições. A taxa de produção de gás (mL/h) foi

determinada a partir da inclinação da reta obtida da regressão linear do gráfico produção de gás (mL) *versus* tempo (h).

Ao longo da fermentação da polpa de manga com pH 4,0 e 4,5, a acidez titulável foi determinada como descrito anteriormente, no item 3.5.5 e, os produtos da fermentação e o consumo de açúcares, foram avaliados a partir do sobrenadante livre de células obtido a partir da centrifugação do cultivo a 10.000 RPM por 10 minutos. Amostras de 20 µL dos sobrenadantes livres de células coletados ao longo da incubação foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo Hewlett Packard modelo 1050 com detector de índice de refração modelo HP 1047A, e coluna BioRad HPX87H, mantida a 60 °C. Usou-se ácido sulfúrico (5 mmol/L) como fase móvel, sob fluxo de 0,7 mL/min. Os padrões utilizados foram: succinato, lactato, formato, acetato, propionato, etanol e butirato. A concentração de açúcares foi determinada comparando-se as áreas dos picos obtidos a partir da amostra com as áreas dos picos de uma curva padrão de calibração correspondente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de bactérias deterioradoras de polpa de manga

Colônias de morfologias distintas foram observadas quando amostras de 25 lotes de polpa de manga deteriorada provenientes de duas indústrias foram plaqueadas, anaerobicamente, em ágar PCA e incubadas a 30 °C por 48 horas. Foi observada a formação de bolhas no ágar, provenientes da produção de gás intensa pelas bactérias deterioradoras (Figura 1). Um total de 104 colônias isoladas, representantes dos 25 lotes de polpa de manga deteriorada analisados, foram obtidas. Os isolados foram transferidos para tubos contendo caldo BHI anaeróbio e denominados como isolados LMA 1 a LMA 104.

Dos 104 isolados, 101 apresentaram resultado negativo para o teste de catalase, indicando uma predominância de bactérias anaeróbias como detrioradoras da polpa de manga. Todos os isolados eram bastonetes, Gram-positivos e o arranjo predominante entre eles era de paliçada (Figura 2A). Nas lâminas preparadas a partir da polpa de manga e dos isolados purificados observou-se a presença de esporos (Figura 2B). Estas características sugerem tratar-se de bactérias do gênero *Clostridium*. Segundo o Manual de Bergey (1981), bactérias do gênero *Clostridium* são ubiqúitárias, sendo comumente encontradas no solo, esgoto e vegetação em decomposição. Portanto, a contaminação da polpa de manga nas indústrias deve ter ocorrido a partir da matéria-prima. A colheita da

manga Ubá é feita manualmente, sendo frequente o contato da fruta com o solo, o que aumenta os riscos de contaminação por bactérias esporuladas.



Figura 1 – Colônias de bactérias anaeróbias deterioradoras de polpa de manga tratada termicamente em Ágar Padrão para Contagem, a 30 °C, por 48 horas. Destaque para as bolhas resultantes da intensa atividade fermentativa.

Além disso, os lotes de polpa de manga deteriorados foram produzidos com a fruta colhida em um ano mais chuvoso do que os anteriores, o que aumenta as chances de contaminação com partículas de solo.

Foram selecionados, ao acaso, os isolados LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 para a continuidade dos experimentos. O isolado LMA 45 é proveniente do lote 2, o isolado LMA 63 do lote 7 e o isolado LMA 72 do lote 4, da indústria A. O isolado LMA 104 era proveniente do lote 14 da indústria B.

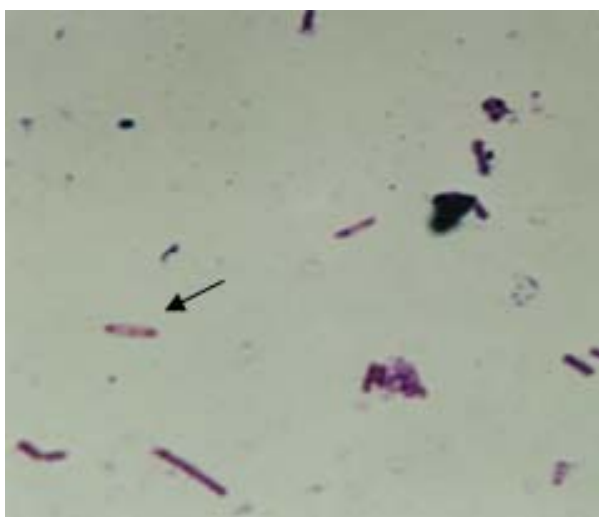
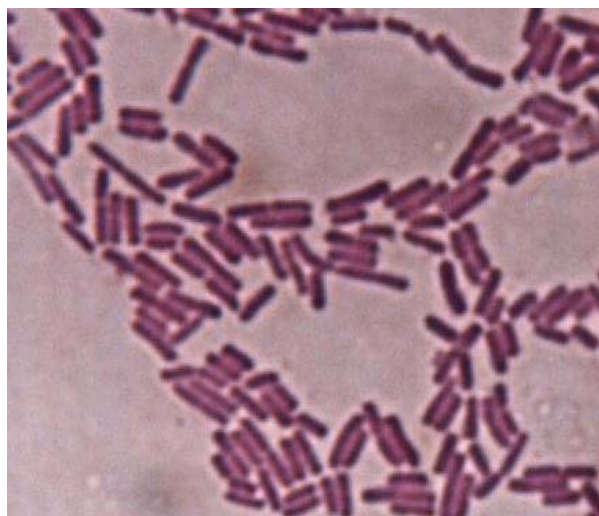


Figura 2 – Características microscópicas de isolado de polpa de manga: (A) bastonetes, Gram-positivos, arranjo paliçada e (B) presença de esporo (seta). Aumento: 2000 x.

4.2. Identificação dos isolados

Os isolados de LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 foram identificados como *Clostridium tyrobutyricum* pelo sistema Sherlock da Microbial Identification System – MIS, versão 4.0.

Esses quatro isolados apresentaram o mesmo perfil bioquímico (Tabela 3), com exceção do isolado LMA 104 que apresentou resultado negativo para o teste de hemólise em ágar sangue. *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63 e LMA 72 foram isolados de lotes diferentes de polpa de manga produzidos na indústria A, enquanto o isolado LMA 104 foi isolado de um lote de polpa de manga produzido na indústria B.

Os isolados LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 não produziram amônia em polpa de manga e em caldo BHI. Esse resultado indica que esses isolados de *C. tyrobutyricum* são sacarolíticos e não proteolíticos. *Clostridium* sacarolíticos produzem CO₂ e H₂ como produto final da fermentação de carboidratos e a síntese de ATP ocorre principalmente através de fosforilação ao nível de substrato (DOELLE, 1975).

4.3. Crescimento dos isolados de *C. tyrobutyricum* em diferentes valores de pH

O crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 em caldo BHI foi favorecido pelos valores de pH entre 6,0 e 7,0 e completamente inibido a partir do pH 3,5 (Figura 3). O aumento da fase lag foi evidente nos meios com pH menor ou igual a 4,0, alcançando valores superiores a 20 horas de incubação (Figura 3 e Tabela 4). Exceção é feita para o isolado LMA 104, que não apresentou crescimento em até 48 horas de incubação em pH 4,0 (Figura 3D). Entretanto, este isolado tendeu a apresentar maiores valores de densidade óptica em caldo BHI, com pH ajustado entre 4,5 e 7,0 (Tabela 4). O pH mínimo para crescimento de bactérias do gênero *Clostridium* varia de acordo com a espécie. Algumas espécies são capazes de crescer em valores baixos de pH, como por exemplo, *Clostridium pasteurianum*, que cresce em pH 3,6 (AZIZI e RANGANNA, 1993). A capacidade dessas bactérias em crescer em valores baixos de pH e de seus esporos apresentarem resistência térmica elevada representa um problema sério para indústrias processadoras de sucos de frutas e de outros alimentos ácidos, pois se os esporos não forem eliminados durante o tratamento térmico, eles poderão germinar e deteriorar o produto.

Tabela 3 – Resultados dos testes bioquímicos realizados com os isolados LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 e o descrito pelo Manual de Bergey para *Clostridium tyrobutyricum*.

Testes Bioquímicos	LMA 45	LMA 63	LMA 72	LMA 104	Manual de Bergey
Redução de Nitrato	+	+	+	+	±
Motilidade	+	+	+	+	±
Hemólise	+	+	+	-	±
Produção de Indol	-	-	-	-	-
Produção de Lecitinase	-	-	-	-	-
Hidrólise de amido	-	-	-	-	-
Hidrólise de gelatina	-	-	-	-	-
Hidrólise de esculina	-	-	-	-	-
Amônia	-	-	-	-	nd
H ₂ S	-	-	-	-	nd
Ácido produzido de:*					
Amidalina	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-
Frutose	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	nd
Inulina	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	-
Manitol	+	+	+	+	-
Manose	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	-
Ribose	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	-
Trealose	+	+	+	+	-
Xilose	-	-	-	-	±

*: a produção de ácido pode variar de acordo com a estirpe.
nd: não especificado no manual de Bergey

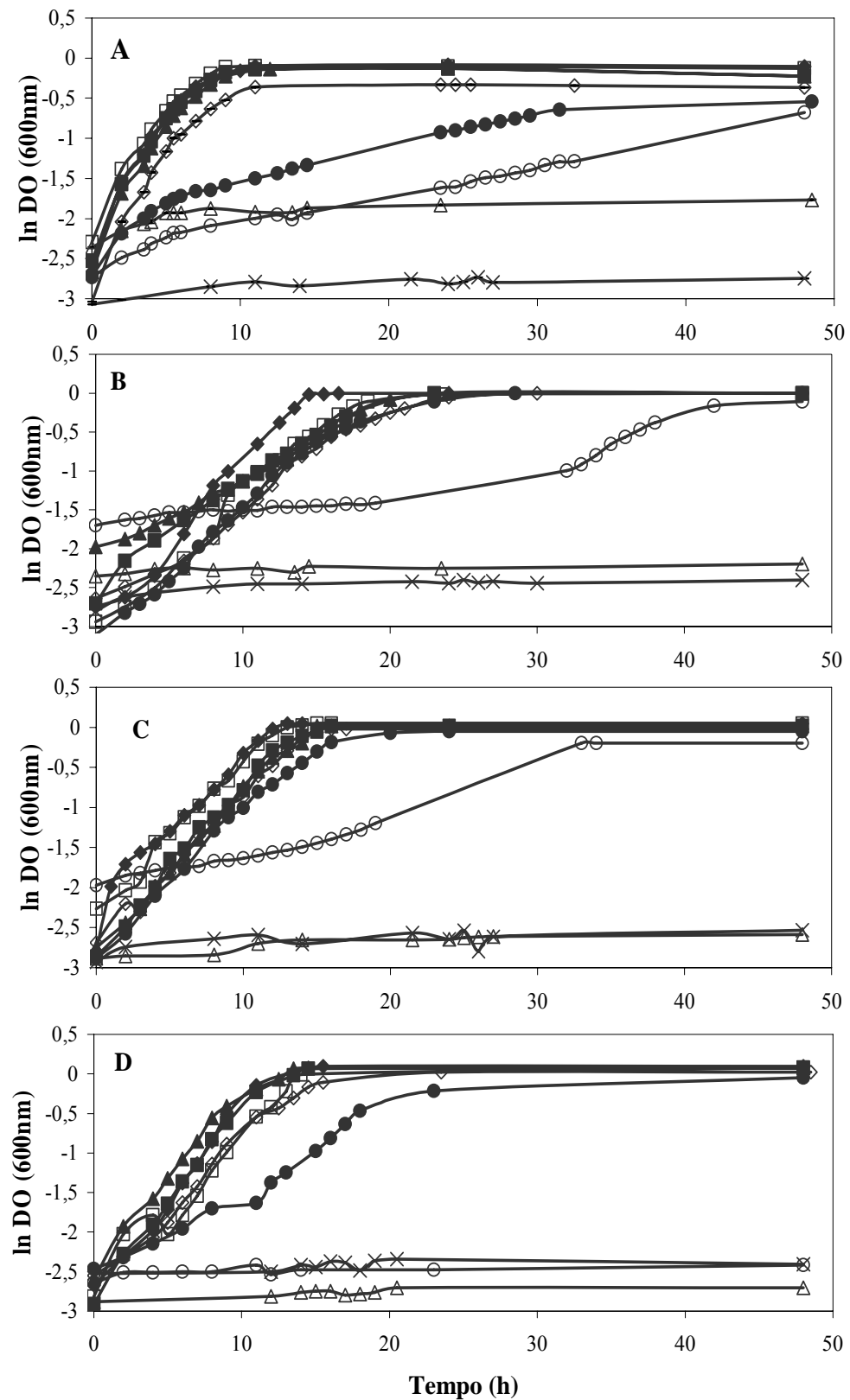


Figura 3 – Crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 (D) a 30 °C, por 48 horas, em caldo BHI, em diferentes valores de pH inicial. -x- pH 3,0; -Δ- pH 3,5; -○- pH 4,0; -●- pH 4,5; -◇- pH 5,0; -▲- pH 5,5; -■- pH 6,0; -□- pH 6,5; -◆- pH 7,0. Os dados apresentados representam a média de duas repetições. O desvio padrão entre as médias foi menor que 10 %.

Tabela 4 – Velocidade específica de crescimento (μ), duração da fase lag (L) e densidade óptica máxima (DO_{max}) de *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 cultivados em caldo BHI com pH ajustado para valores entre 3,0 e 7,0 e incubados a 30 °C. Os valores representam a média de duas repetições.

Isolado	pH	μ (h^{-1})	L (h)	DO_{max} (600nm)
LMA 45	3,0	-*	-	-
	3,5	-	-	-
	4,0	0,036	< 12	0,5
	4,5	0,040	< 2	0,58
	5,0	0,143	< 2	0,72
	5,5	0,146	< 2	0,88
	6,0	0,154	< 2	0,88
	6,5	0,171	< 2	0,9
	7,0	0,209	< 2	0,92
LMA 63	3,0	-	-	-
	3,5	-	-	-
	4,0	0,091	28	0,9
	4,5	0,090	4	1,0
	5,0	0,120	4	1,0
	5,5	0,121	< 2	1,0
	6,0	0,126	< 2	1,0
	6,5	0,148	< 2	1,0
	7,0	0,181	< 2	1,0
LMA 72	3,0	-	-	-
	3,5	-	-	-
	4,0	0,072	14	0,82
	4,5	0,131	< 2	0,95
	5,0	0,158	< 2	0,98
	5,5	0,180	< 2	1,02
	6,0	0,206	< 2	1,02
	6,5	0,232	< 2	1,05
	7,0	0,213	< 1	1,05
LMA 104	3,0	-	-	-
	3,5	-	-	-
	4,0	-	-	-
	4,5	0,172	< 2	1,01
	5,0	0,194	< 2	1,02
	5,5	0,223	< 2	1,08
	6,0	0,230	< 2	1,08
	6,5	0,246	< 2	1,08
	7,0	0,311	< 2	1,1

* ausência de crescimento em até 48 horas de incubação

Valores de velocidade específica de crescimento de $0,21 \text{ h}^{-1}$ e $0,23 \text{ h}^{-1}$ foram verificados para os isolados LMA 72 e LMA 104 em pH 6,0. LIU e YANG (2006) encontraram um valor de $0,214 \text{ h}^{-1}$ para *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 cultivado em anaerobiose em um meio com pH mantido em 6,0, contendo glicose como substrato e sob agitação de 150 RPM.

Os valores de pH influenciaram a velocidade específica de crescimento dos isolados, que aumentou, aproximadamente, 87 % quando o pH aumentou de 4,0 para 7,0 (Figura 4).

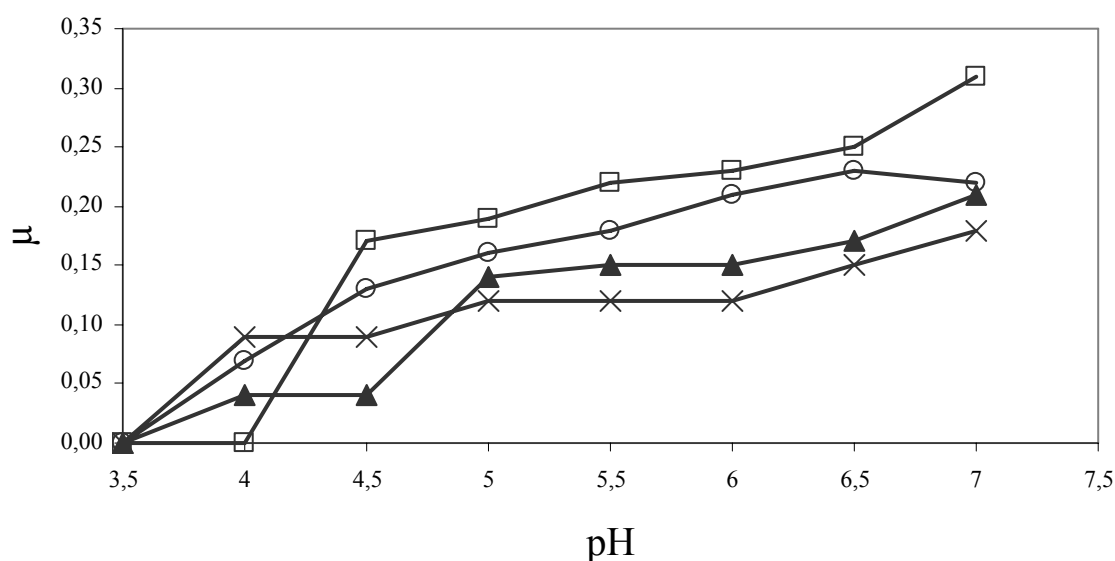


Figura 4 – Velocidade específica de crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45 (-▲-), LMA 63 (-x-), LMA 72 (-○-) e LMA 104 (-□-) cultivado em caldo BHI, a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com diferentes valores de pH.

4.4. Crescimento dos isolados de *C. tyrobutyricum* em diferentes temperaturas

C. tyrobutyricum LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 cresceram em temperaturas entre de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 5). O aumento da fase lag foi evidente nas temperaturas de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e a densidade óptica máxima alcançada na temperatura de $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foi maior do que em $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabela 5). A temperatura é um dos principais fatores ambientais que afetam a viabilidade e o crescimento de microrganismos,

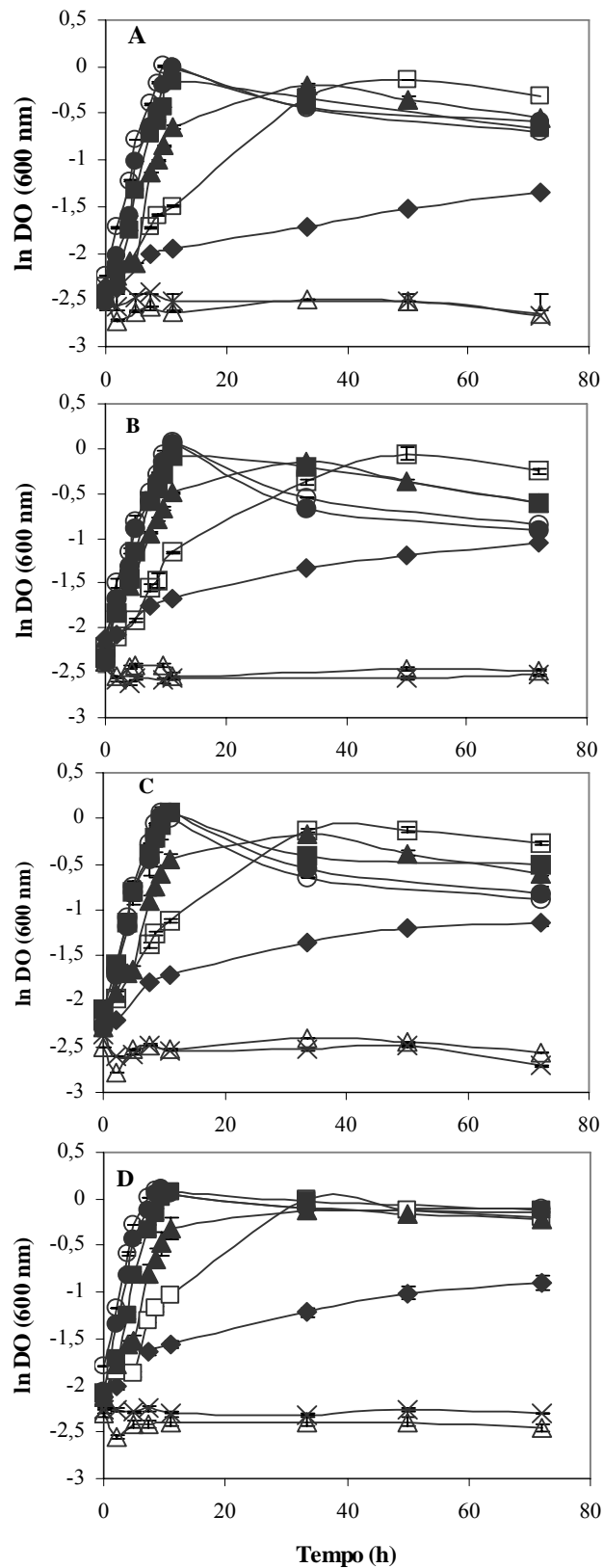


Figura 5 – Crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 (D) em caldo BHI, por 72 horas em temperaturas de incubação diferentes. -♦- 10 °C; -□- 18 °C; -▲- 25 °C; -■- 30 °C; -○- 35 °C; -●- 40 °C; -x- 45 °C; -△- 50 °C. O desvio padrão entre as médias foi menor que 10 %.

Tabela 5 – Velocidade específica de crescimento (μ), duração da fase lag (L) e densidade óptica máxima (DO_{max}) de *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63, LMA72 e LMA104 cultivados em caldo BHI e incubados em temperaturas entre 10 °C a 50 °C. Os valores representam a média de três repetições.

Isolado	Temperatura (°C)	μ (h^{-1})	L (h)	DO_{max} (600nm)
LMA 45	10	0,011	< 7	0,26
	18	0,051	< 7	0,87
	25	0,142	< 5	0,82
	30	0,161	< 2	0,85
	35	0,178	< 2	1,00
	40	0,152	< 2	1,00
	45	-*	-	-
	50	-	-	-
LMA 63	10	0,016	< 7	0,35
	18	0,040	5	0,94
	25	0,118	< 2	0,86
	30	0,144	< 2	0,92
	35	0,147	< 2	1,09
	40	0,219	< 2	1,05
	45	-	-	-
	50	-	-	-
LMA 72	10	0,014	< 7	0,32
	18	0,047	< 7	0,88
	25	0,127	4	0,85
	30	0,166	< 2	1,06
	35	0,196	< 2	1,06
	40	0,243	< 2	1,03
	45	-	-	-
	50	-	-	-
LMA 104	10	0,014	< 5	0,41
	18	0,047	< 5	1,00
	25	0,163	4	0,89
	30	0,187	< 2	1,07
	35	0,295	< 2	1,1
	40	0,299	< 2	1,1
	45	-	-	-
	50	-	-	-

* ausência de crescimento em até 72 horas de incubação

tendo efeito na duração da fase lag, na taxa de crescimento e no número final de células (ICMSF, 1980). A velocidade específica de crescimento dos isolados foi influenciada pela temperatura e variou de 0,01 h⁻¹ em 10 °C a 0,3 h⁻¹ em 40 °C (Tabela 5). *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 podem ser classificados como mesófilos, pois apresentaram temperatura ótima de crescimento entre 35 °C e 40 °C (Tabela 5). O decréscimo na velocidade específica de crescimento acima da temperatura ótima foi acentuado e a temperatura máxima de crescimento foi menor do que 45 °C. A diferença entre as temperaturas ótima e máxima de crescimento foi de, aproximadamente, 5° C. CANGANELLA *et al.* (2002) encontraram uma diferença entre a temperatura ótima e máxima de crescimento de aproximadamente 4°C para *Clostridium thermobutyricum*. Entretanto, o intervalo entre temperatura ótima e máxima de crescimento mais comumente encontrada é de aproximadamente 8 °C (WIEGEL, 1990).

O modelo da Raiz Quadrada (Tabela 6) foi o que melhor descreveu o crescimento dos isolados LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 de *C. tyrobutyricum* em caldo BHI, em função da temperatura, porque apresentou um menor erro residual em relação ao modelo de Arrhenius (Tabela 7). As curvas de ajuste pelo modelo da raiz quadrada são apresentadas na Figura 6.

Tabela 6 – Equações da Raiz Quadrada ajustadas para o crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 cultivados em caldo BHI e o quadrado médio do resíduo da regressão.

Isolados	Equação da Raiz Quadrada	QM ^a
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45	$\sqrt{\mu^b} = 0,0154*(T^c - 4,8)$	0,001304144
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA 63	$\sqrt{\mu} = 0,0128*(T - 2,2)$	0,002471
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA 72	$\sqrt{\mu} = 0,0147*(T - 4,0)$	0,000998
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA 104	$\sqrt{\mu} = 0,0171*(T - 4,4)$	0,001127

^a QM = Quadrado médio do resíduo.

^b μ = Velocidade específica de crescimento (h⁻¹).

^c T = Temperatura (°C).

Tabela 7 – Equações de Arrhenius ajustadas para o crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 cultivados em caldo BHI e o quadrado médio do resíduo da regressão.

Isolados	Equação de Arrhenius	QM ^a
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA 45	$\ln\mu^b = -\frac{14888}{T^c} + 0,5$	0,365425
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA 63	$\ln\mu = -\frac{11802}{T} - 0,45$	0,446063
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA 72	$\ln\mu = -\frac{13184}{T} - 0,1$	0,365617
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA 104	$\ln\mu = -\frac{14019}{T} + 0,25$	0,351888

^a QM = Quadrado médio do resíduo.

^b μ = Velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

^c T = Temperatura absoluta (K).

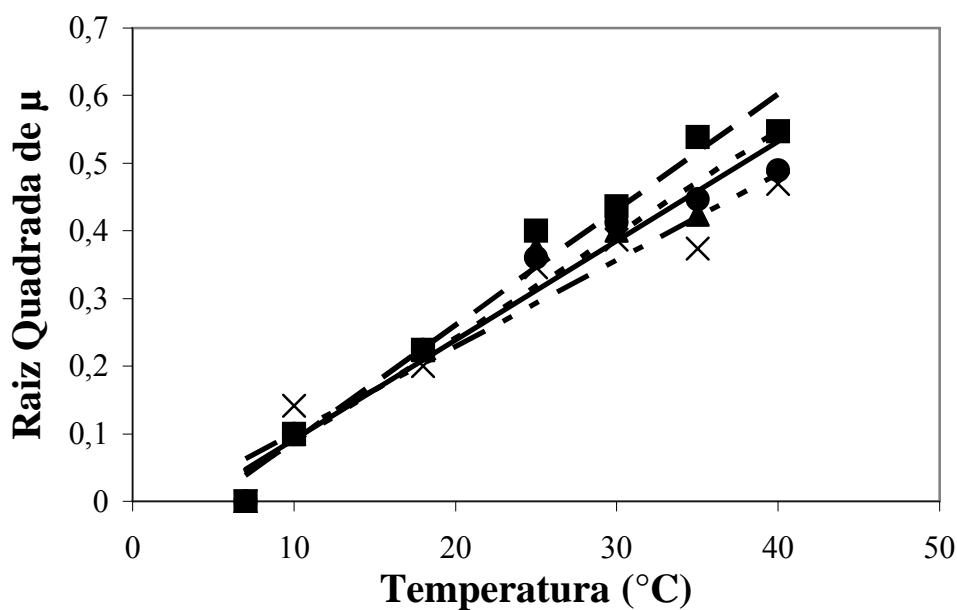


Figura 6 – Modelo da Raiz Quadrada ajustada para o crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA 45 (...▲...), LMA 63 (-.-x-.-), LMA 72 (-●-) e LMA 104 (--■--). As células foram cultivadas em caldo BHI e incubadas em temperaturas variando de 7 °C a 40 °C .

4.5. Caracterização da polpa de manga utilizada para determinação da atividade fermentativa

A polpa de manga Ubá utilizada nos experimentos foi proveniente de dois lotes diferentes, apresentando atividade de água (A_w) entre 0,976 a 0,984, conteúdo de sólidos solúveis entre 17 e 20 °Brix, pH de 4,2 e acidez titulável de 0,38 gramas de ácido cítrico por 100 mL de polpa. Valores semelhantes ao conteúdo de sólidos solúveis e de pH foram encontrados por GONÇALVES *et al.* (1998) em polpa de manga da variedade Ubá cultivada em Lavras, Minas Gerais, com Brix, de 16,8° e pH 4,2. Porém, a acidez titulável encontrada por esses autores foi de 0,54 % de ácido cítrico. Essa diferença provavelmente se deve às condições de cultivo e estágio de maturação que, segundo CARDELLO e CARDELLO (1998), afetam a composição química da manga.

A concentração de açúcares totais, representados por sacarose, glicose e frutose, na manga utilizada nos experimentos foi de, aproximadamente, 161 g/L. Este resultado é semelhante aos apresentados por DUARTE *et al.* (2006), que encontraram 179 g/L de açúcares redutores totais em suco de manga da variedade Haden. O teor de açúcares totais, incluindo glicose, frutose e sacarose de mangas da variedade Tommy Atkins mantidas a 22 °C variou de 82,5 g/L no primeiro dia de incubação a 141,9 g/L no décimo nono dia quando dosado por espectrometria, e variou de 96,59 no primeiro dia a 137,96 no décimo nono dia quando a dosagem dos açúcares foi por teste enzimático (DUARTE *et al.*, 2002).

Os valores encontrados para a polpa de manga utilizada nos experimentos estavam de acordo com os padrões legais exigidos para polpa de manga pela Instrução Normativa nº 1, de 7 de Janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Tabela 2).

A Tabela 8 apresenta os valores de acidez titulável da polpa de manga usada para o cultivo dos isolados após o ajuste do pH para diferentes valores com ácido cítrico (Tabela 8).

Tabela 8 – Acidez titulável da polpa de manga utilizada nos experimentos.

pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Acidez titulável*	1,95	1,00	0,471	0,251	0,203

* expressa em gramas de ácido cítrico por 100 mL de polpa de manga

4.6. Atividade fermentativa dos isolados de *C. tyrobutyricum* em polpa de manga

A atividade fermentativa medida pela produção de gás foi detectada na polpa de manga com pH ajustado para valores de 4,0; 4,5 e 5,0. Não foi constatada a produção de gás em polpa de manga com o pH ajustado para 3,0 e 3,5 (Figura 7). Estes resultados podem ser comparados com aqueles obtidos em caldo BHI em diferentes valores de pH (Figura 3). Ficou confirmado que o isolado LMA 104 de *C. tyrobutyricum* foi mais sensível ao abaixamento do pH para 4,0 e, nesta condição, a produção de gás só foi detectada após 100 horas de incubação (Figura 7D). Entretanto, *C. tyrobutyricum* LMA 104 apresentou maior taxa de produção de gás em pH 4,0, 4,5 e 5,0 (Tabela 9).

A produção de gás é um método indireto de determinação do crescimento microbiano e KRISHNAMOORTHY *et al.* (1991) observaram uma relação linear entre a síntese de proteína microbiana e a produção de gás em uma mistura de carboidratos contendo 10 % de glicose, 40 % de amido e 50 % de celulose. Portanto, menor produção de gás em valores mais baixos de pH, está diretamente relacionada ao menor crescimento.

A maior fase lag em valores de pH mais baixos pode ser atribuída à necessidade de adaptação das bactérias às condições de pH pouco favoráveis ao crescimento. A presença do ácido cítrico na polpa de manga resulta em pH baixo e, os valores de pKa do ácido cítrico de 3,13, 4,76 e 6,39 garantem a presença de maior concentração do ácido na forma não dissociada. Ácidos orgânicos na forma não dissociada passam livremente pela membrana plasmática bacteriana e, como o pH citoplasmático é geralmente, maior do que o do meio de crescimento, o ácido fraco se dissocia, liberando prótons, o que leva à acidificação do citoplasma (COTTER e HILL, 2003). Esta condição pode resultar na perda da atividade de enzimas da via glicolítica e danos estruturais à membrana celular, DNA e proteínas, reduzindo o crescimento ou até mesmo, inativando as células (FERCHICHI *et al.*, 2005). Em resposta, a bactéria induz mecanismos de tolerância a ácidos. Em bactérias Gram-positivas, os mecanismos de resistência a valores baixos de pH resultam na remoção de prótons (H^+) pelas bombas de prótons, como por exemplo F_1F_0 ATPase ou as que utilizam o sistema de glutamato descarboxilases (GAD), aumentando o pH interno e externo; no reparo e proteção de proteínas pela produção de chaperonas, proteases e proteínas do choque térmico; nos

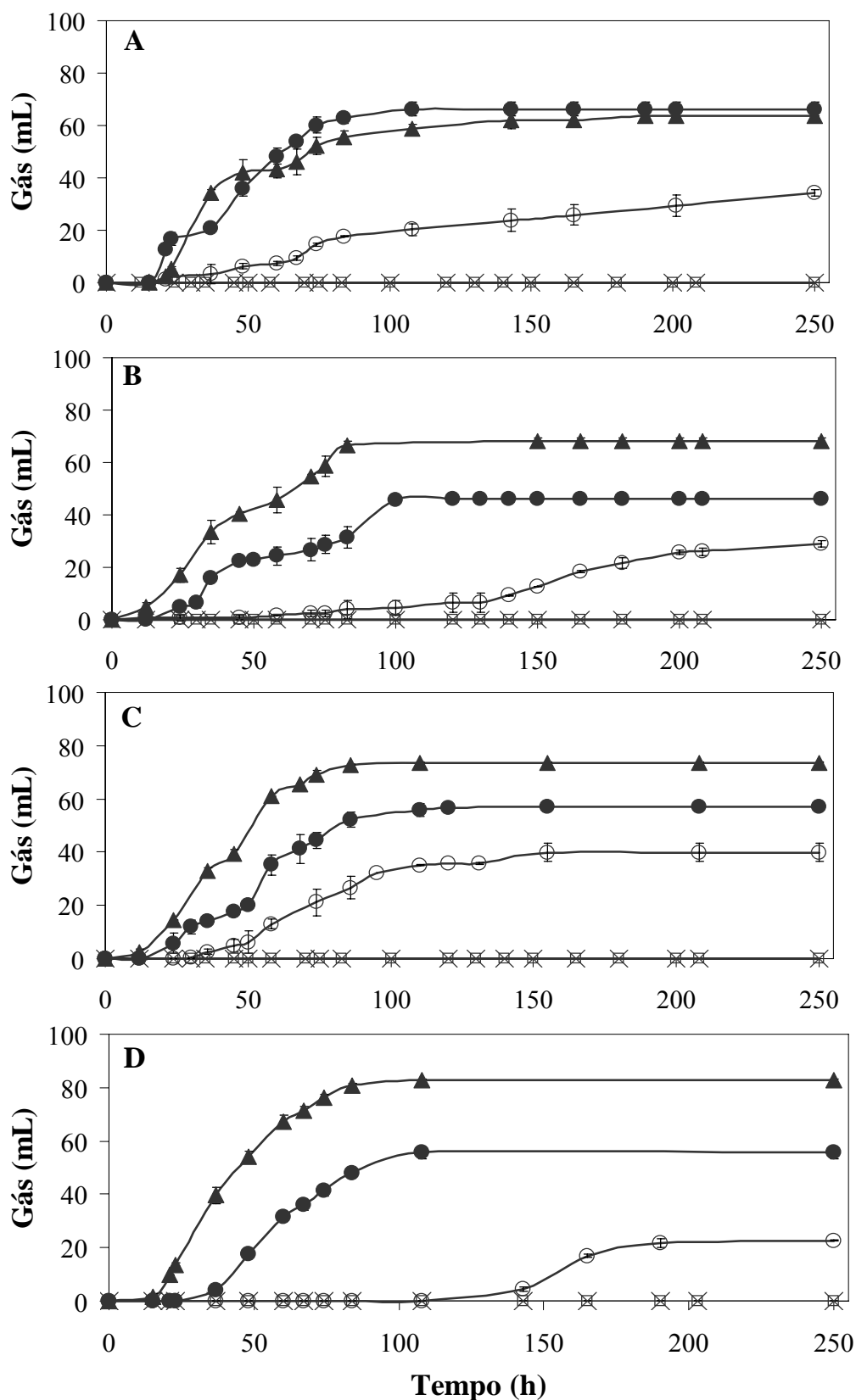


Figura 7 – Produção de gás por *C. tyrobutyricum* LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 (D), cultivados a 30 °C em 10 mL de polpa de manga anaeróbia em diferentes valores de pH inicial. -x- pH 3,0; -□- pH 3,5; -○- pH 4,0; -●- pH 4,5; -▲- pH 5,0. As barras de erro representam o desvio padrão da média.

Tabela 9 – Taxa de produção de gás (mL/h) por *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104 em polpa de manga com valores de pH entre 3,0 e 5,0.

pH	Taxa de produção de gás (mL/h)			
	LMA 45	LMA 63	LMA 72	LMA 104
3,0	-*	-	-	-
3,5	-	-	-	-
4,0	0,52	0,34	0,51	0,56
4,5	1,05	0,43	0,87	1,14
5,0	1,5	0,82	1,32	1,66

* Não houve produção de gás em até 312 horas de incubação.

sistemas de reparo de DNA; na expressão de reguladores transcricionais, como fatores σ , que podem induzir respostas globais; nas respostas a mudanças na densidade celular, por meio da comunicação célula-célula; nas alterações na composição do envelope celular; na produção de substâncias alcalinas por arginina desaminase ou urease, aumentando o pH interno da célula (COTTER e HILL, 2003). A eliminação de prótons possibilita a retomada do crescimento celular. Em *Clostridium perfringens*, ocorre a indução de proteínas do choque ácido em resposta à adaptação em pH 4,5, resultando em um aumento de quinze vezes na resistência a ácido por esta bactéria (VILLARREAL *et al.*, 2000).

A fermentação da polpa de manga em pH 4,0, que é o mais frequentemente usado nas indústrias processadoras, torna os isolados potenciais deterioradores desse produto que, segundo a legislação brasileira, deve apresentar o pH entre 3,3 e 4,5 (BRASIL, 2000). Portanto, o pH para polpa de manga nas indústrias processadoras, que é em torno de 4,0, não é fator limitante para o crescimento dos isolados avaliados neste estudo. A inibição em pH 3,5 pode ser uma informação importante para a indústria, pois pode ser mais uma barreira a ser adotada para a conservação da polpa de manga.

O valor máximo de gás produzido foi de, aproximadamente, 83 mL por *C. tyrobutyricum* LMA 104 em pH 5,0 em 140 horas de fermentação em 10 mL de polpa de manga. Os volumes de gás produzidos pelos isolados de polpa de manga podem ser considerados elevados quando comparados com valores encontrados na literatura. Volumes de, aproximadamente, 12 mL de gás foram produzidos por *C. perfringens* NCTC8239 e determinados pelo método da seringa, em 5 horas de incubação em 10

mL de caldo tioglicolato com 2 % de glicose, pH 7,0, sendo que este valor praticamente se manteve em até 24 horas de incubação (NCHE *et al.*, 1994). Fermentando 100 mL de meio tioglicolato contendo 2 % de glicose, três estirpes de *Clostridium butyricum* e uma estirpe de *C. acetobutylicum* produziram, respectivamente, volumes de 259, 282, 301 e 260 mL de gás, após 48 horas de incubação em pH 7,0 (OGINO *et al.*, 2005).

Além de gás, os isolados avaliados produziram também acetato e butirato como principais produtos de fermentação (Figuras 8 a 11). Estes produtos são metabólitos conhecidos da fermentação anaeróbia de carboidratos e o acetato é frequentemente produzido por bactérias fermentativas por ser o produto final de uma via de produção de energia. Bactérias fermentativas oxidam piruvato a acetato, usando as enzimas fosfotransacetilase (PTA) e acetato kinase e derivam ATP desse processo, liberando acetato no meio (WHITE, 2000). O ácido butírico é produzido pela via do ácido butírico (fermentação butírica ou do butirato). Os produtos de fermentação também incluem gás hidrogênio, dióxido de carbono e pequenas quantidades de acetato. O rendimento de energia é de 3 ATPs para cada molécula de glicose oxidada, que é um rendimento relativamente alto para um processo anaeróbio (WHITE, 2000).

Em pH 4,0, acetato e butirato só foram detectados após 140 horas de fermentação (Figura 8A, 10A e 11A), com exceção de *C. tyrobutyricum* LMA 63, que produziu acetato a partir de 90 horas (Figura 9A). Em pH 4,5, a presença desses produtos na polpa de manga foi observada antes de 50 horas de incubação (Figura 8B, 9B, 10B e 11B).

Os teores máximos de acetato e butirato encontrados nas fermentações realizadas pelos quatro isolados foram de 82 mM ou 7,22 g/L e 130 mM ou 7,8 g/L, respectivamente. O rendimento em butirato tendeu a aumentar ou permaneceu constante com o aumento do pH de 4,0 para 4,5 (Tabela 10). O rendimento encontrado (Y_p/s) em acetato na fermentação da polpa de manga com pH 4,0 e 4,5 apresentou uma variação de 0,22 mM/mM a 0,5 mM/mM entre os isolados (Tabela 10). Valores variáveis de rendimento em butirato e acetato por espécies de *Clostridium* são encontrados na literatura. Em fermentação de meio contendo 30 g/L de glicose, por 32 horas a 37°C, sob agitação de 150 RPM e com pH mantido constante, *C. butyricum* S21 produziu 11,75 g/L, 2,08 g/L e 1,14 g/L de butirato, com rendimento de 0,39 g/g, 0,07 g/g e 0,04 g/g em pH 6,5, pH 4,8 ajustado com HCl e pH 4,8 ajustado com ácido acético, respectivamente (VANDÁK *et al.*, 1997). Produção de 28,6 g/L de butirato, com rendimento de 0,34 g/g e 9,7 g/L de acetato, com rendimento de 0,12 g/g foi registrado

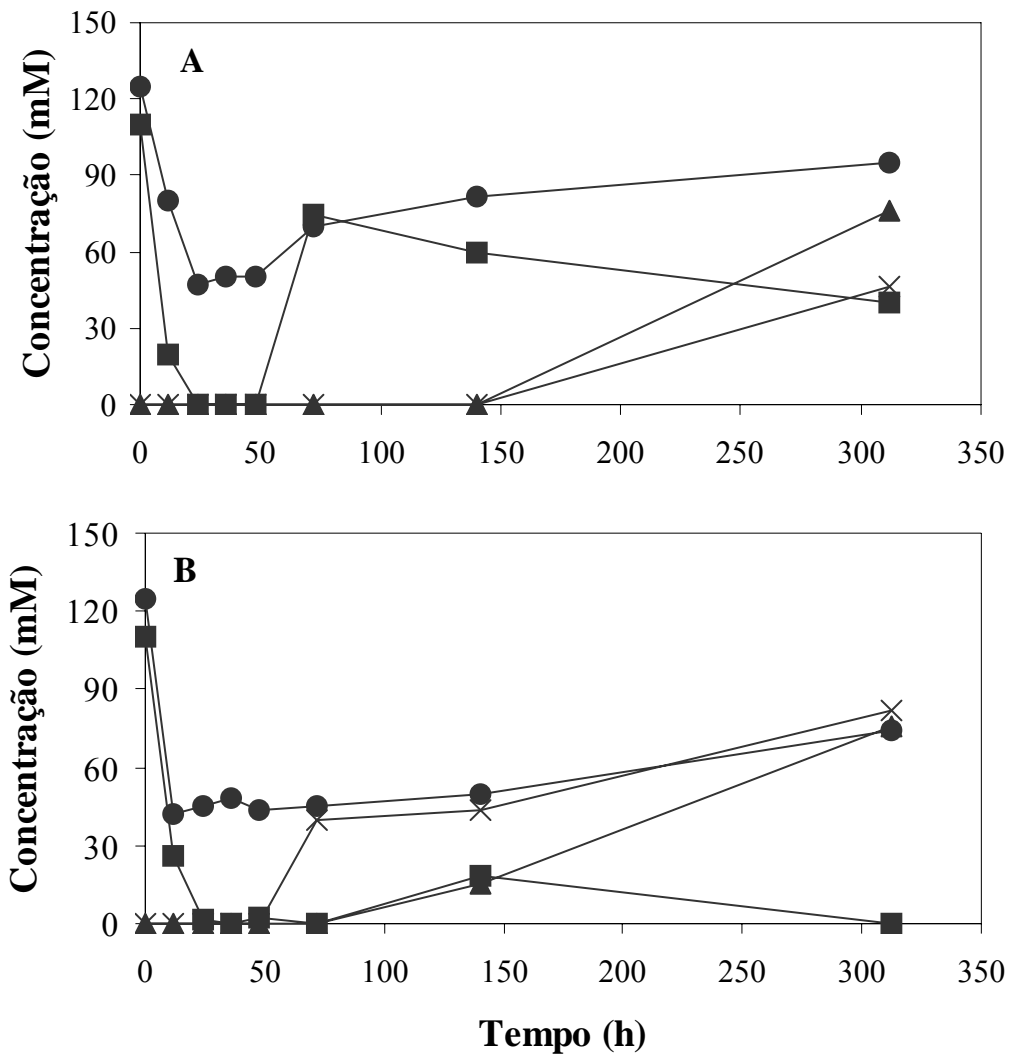


Figura 8 – Produtos da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH 4,0 (A) e pH 4,5 (B) por *C. tyrobutyricum* LMA 45. -●- Succinato; -■- Etanol; -▲- Acetato; -x- Butirato.

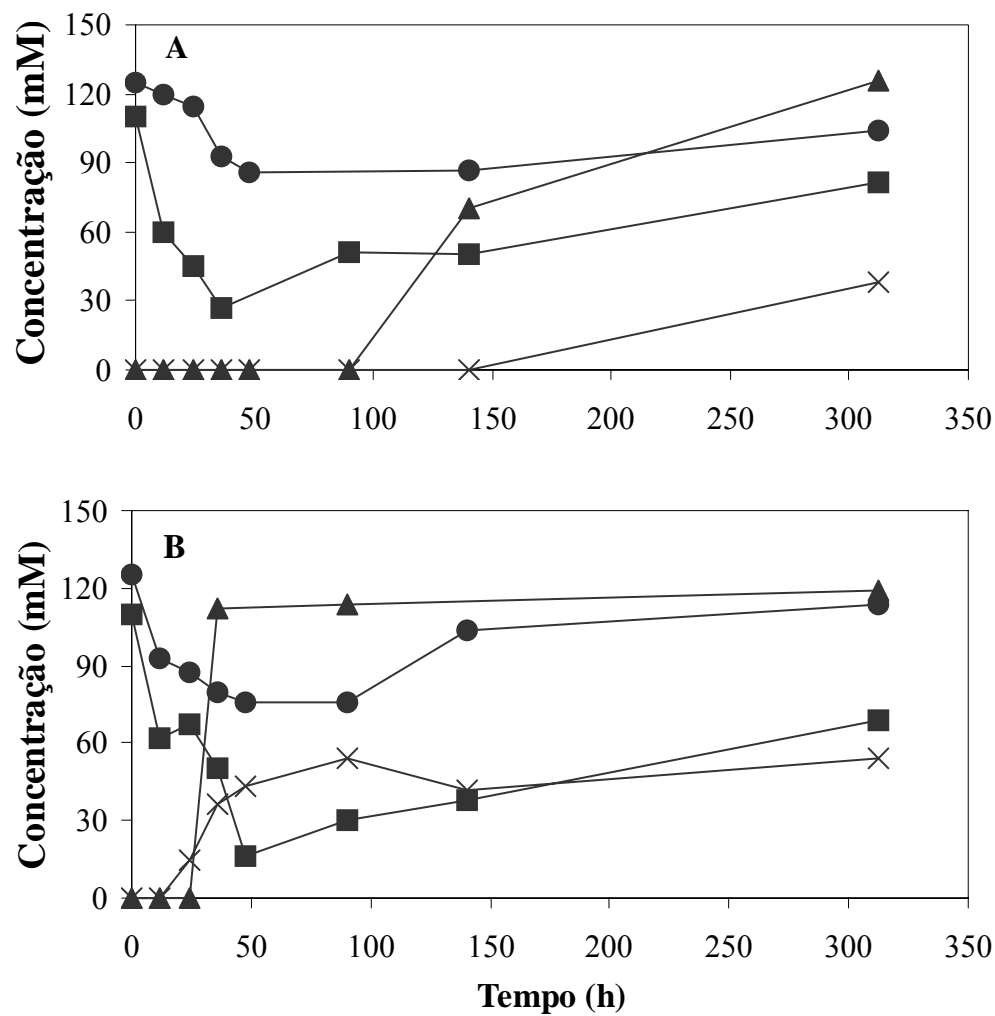


Figura 9 – Produtos da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH 4,0 (A) e pH 4,5 (B) por *C. tyrobutyricum* LMA 63. -●- Succinato; -■- Etanol; -▲- Acetato; -x- Butirato.

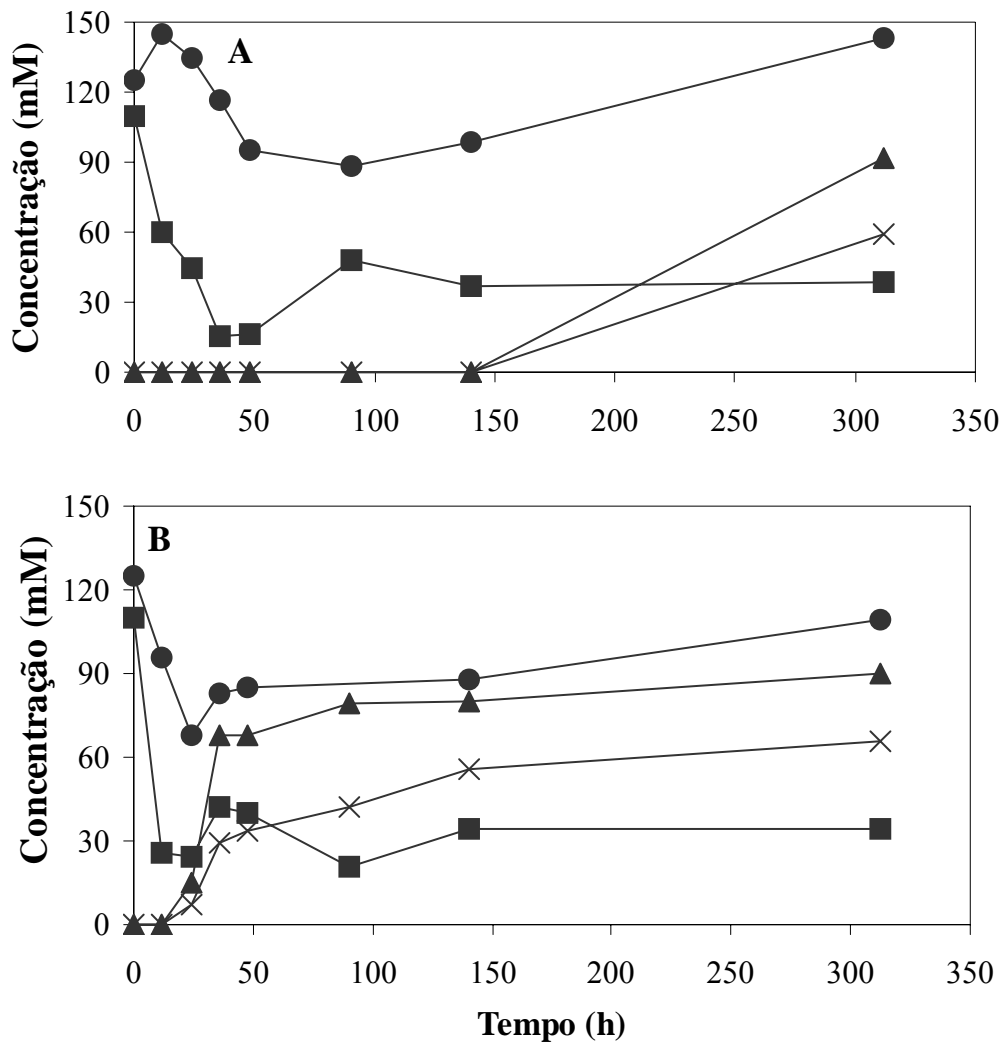


Figura 10 – Produtos da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH 4,0 (A) e pH 4,5 (B) por *C. tyrobutyricum* LMA 72. -●- Succinato; -■- Etanol; -▲- Acetato; -x- Butirato.

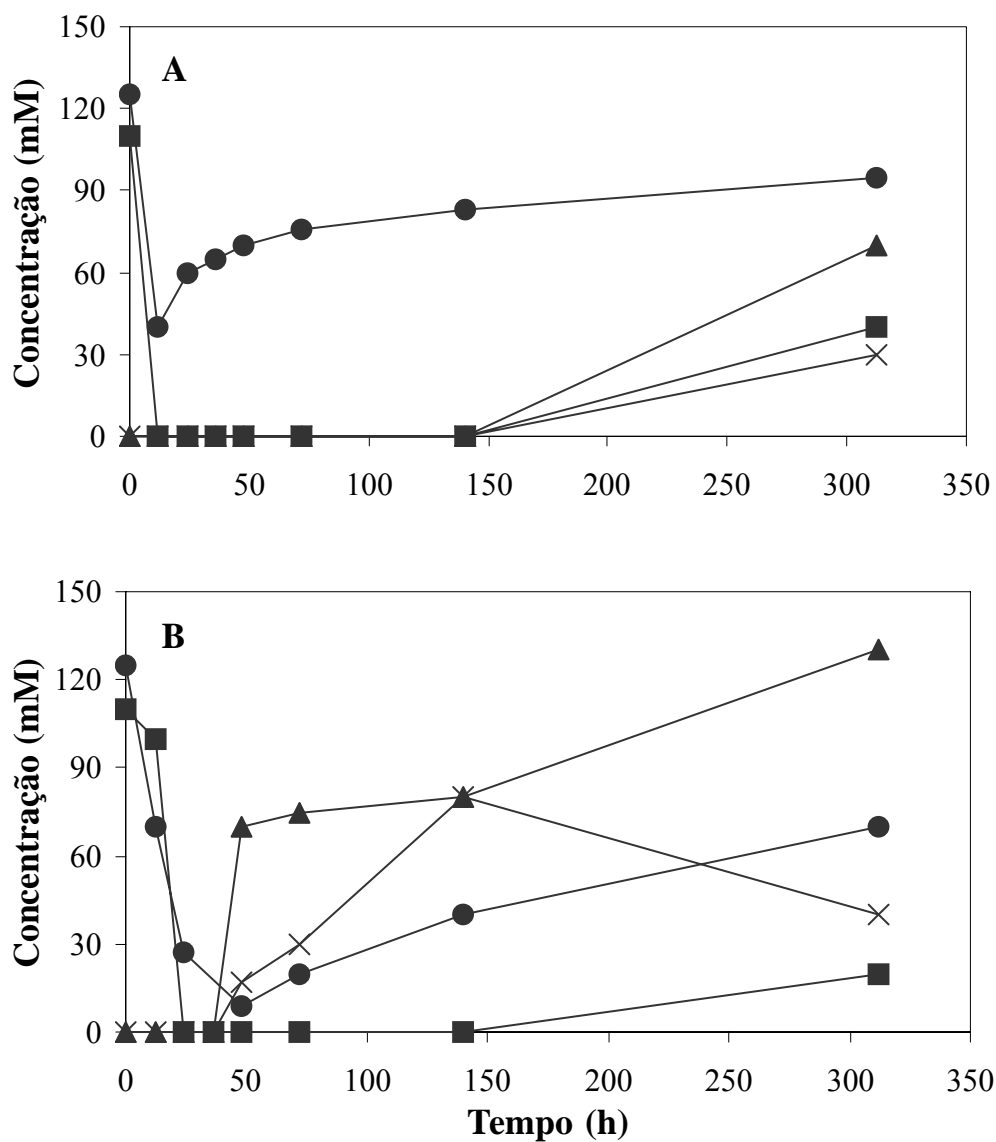


Figura 11 – Produtos da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH 4,0 (A) e pH 4,5 (B) por *C. tyrobutyricum* LMA 104. -●- Succinato; -■- Etanol; -▲- Acetato; -x- Butirato.

Tabela 10: Rendimento (Yp/s) em butirato (mM/mM), acetato (mM/mM) e gás (mL/mM) a partir da fermentação de polpa de manga com pH inicial de 4,0 e 4,5 por 312 horas de *C. tyrobutyricum* LMA 45, LMA 63, LMA 72 e LMA 104.

Yp/s	LMA 45		LMA 63		LMA 72		LMA 104	
	pH 4,0	pH 4,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 4,0	pH 4,5
Butirato (mM/mM)	0,17	0,24	0,15	0,2	0,21	0,21	0,11	0,11
Acetato (mM/mM)	0,27	0,22	0,5	0,45	0,33	0,28	0,27	0,37
Gás (mL/mM)	0,12	0,19	0,12	0,17	0,14	0,18	0,09	0,16

em fermentação de substrato contendo 35 g/L de glicose, mantida a 37 °C, 150 RPM e pH constante 6,0 por *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 (LIU *et al.*, 2006). Em geral, concentrações de butirato altas e produtividade alta têm sido obtidas em fermentação em reator com alimentação e em fermentação contínua (ZHU *et al.*, 2002). A comparação com resultados da literatura é dificultada pela variação nas condições de cultivo usadas, principalmente com relação ao pH. Valores baixos de pH não são convenientes para a produção de ácido e segundo GODDIN *et al.* (1990), o pH ótimo para a produção de ácido butírico por *C. acetobutylicum* é entre 6,0 e 6,5, sendo que valores de pH entre 4,5 e 4,8 são ótimos para a produção de butanol. O rendimento em gás produzido durante a fermentação de polpa de manga aumentou com a variação do pH de 4,0 para 4,5 (Tabela 8), em consequência do maior crescimento bacteriano em pH mais elevado.

Concentrações de 110 mM de etanol e 125 mM de succinato foram detectadas na polpa de manga após esterilização. A incubação da polpa sem inoculação por 320 horas reduziu estas concentrações para 10 mM e 75 mM de succinato. Entretanto, na polpa de manga inoculada com os isolados de *C. tyrobutyricum* esta redução foi mais acentuada em até 50 horas de fermentação (Figuras 8 a 11) e pode ser atribuída a utilização desses constituintes como substrato para crescimento. O aumento da concentração de etanol e succinato após 50 horas do processo fermentativo (Figura 8 a 11), indica a produção destas substâncias pelos isolados.

A redução da acidez titulável da polpa de manga com pH 4,0 durante o crescimento dos isolados de *C. tyrobutyricum* (Tabela 11) confirma dados anteriores de que, nesta condição houve o consumo de ácidos orgânicos naturais da fruta. Entretanto, quando o pH inicial da polpa foi ajustado para 4,5, a produção de ácidos foi detectada

pelo aumento da acidez titulável e pela redução do pH (Tabela 11). Ficou evidenciado que o metabolismo de *C. tyrobutyricum* foi alterado pelo pH inicial do substrato. A modificação das vias de fermentação é uma das estratégias adotadas microbianas para superar condições de estresses, como concentrações elevadas de ácidos. Em polpa de manga com pH inicial de 4,0 e 4,5 inoculada com *Clostridium sporogenes* e incubada por seis meses, verificou-se uma queda de pH 4,5 para 4,4 ao passo que o pH da manga com pH inicial 4,0, não se alterou (AZIZI e RANGANNA, 1993). Outros resultados da literatura mostram a capacidade de bactérias do gênero *Clostridium* em produzir ácidos e promoverem queda acentuada de pH do substrato. A redução do pH do meio de fermentação de 7,0 para valores entre 4,1 e 4,4 por *C. butyricum* e de *C. acetobutylicum* cultivados em meio tioglicolato foi registrada por OGINO *et al.* (2005).

O consumo de açúcares tendeu a aumentar quando o pH da polpa de manga foi ajustado para 4,5 (Figura 12). Os açúcares presentes na polpa de manga não foram completamente utilizados pelas bactérias no processo fermentativo (Figura 12) e quantidades residuais de 374,4 mM a 480,2 mM de açúcares, representados por sacarose, glicose e frutose, foram detectadas após 312 horas de fermentação. É possível que o pH baixo resultante do acúmulo de ácidos e de outros metabólitos produzidos na fermentação tenham promovido a inibição do crescimento bacteriano. LIU e YANG (2006) também verificaram que estirpes de *C. tyrobutyricum* pararam de fermentar o meio contendo glicose como substrato sem que este açúcar fosse totalmente consumido e atribuíram esse comportamento à inibição da via fermentativa pelo ácido butírico.

Houve um decréscimo de aproximadamente 75 % no total de sacarose presente na polpa de manga. Para glicose e frutose essa diminuição foi de menos de 50% (Figura 12). A diminuição dos teores de glicose e frutose, observada ao longo da fermentação, pode ser atribuída à utilização desses carboidratos como fonte de carbono por *C. tyrobutyricum* (Figura 12). A redução da sacarose se deve à hidrólise desse açúcar em glicose e frutose. A redução do teor de sacarose foi maior do que de glicose e frutose, pois estes estavam sendo produzidos, além de consumidos ao longo da fermentação.

Os isolados utilizados nesse estudo apresentaram capacidade de crescer na presença de concentrações altas de açúcar, pois fermentaram a polpa de manga com aproximadamente 730 mM de açúcares. Apesar da concentração alta de açúcares, a polpa de manga utilizada apresentou atividade de água entre 0,976 e 0,984, que está dentro da faixa de A_w requerida para o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium*, que normalmente é acima de 0,95 (ICMSF, 1980; JAY, 1996).

Tabela 11: Acidez titulável (expressa em g de ácido cítrico/100 g polpa de manga) e valores de pH ao longo da fermentação de 10 mL de polpa de manga com pH inicial de 4,0 e 4,5.

Polpa de manga pH inicial 4,0			Polpa de manga pH inicial 4,5	
Tempo (h)	Acidez titulável	pH	Acidez titulável	pH
Isolado LMA 45				
0	0,451	4,0	0,251	4,5
12	0,377	4,0	0,251	4,4
24	0,439	4,0	0,251	4,4
36	0,439	4,0	0,251	4,4
48	0,408	4,1	0,439	4,2
72	0,377	4,0	0,596	4,0
140	0,424	4,2	0,596	4,1
312	0,533	4,1	0,753	4,2
Isolado LMA 63				
0	0,451	4,0	0,251	4,5
12	0,377	4,0	0,22	4,5
24	0,377	4,0	0,251	4,4
36	0,377	4,0	0,439	4,2
48	0,408	4,0	0,534	4,1
72	0,408	4,0	0,691	4,0
140	0,424	4,1	0,691	4,2
312	0,658	4,1	0,785	4,3
Isolado LMA 72				
0	0,451	4,0	0,251	4,5
12	0,377	4,0	0,22	4,5
24	0,439	4,0	0,22	4,4
36	0,424	4,0	0,283	4,3
48	0,408	4,0	0,439	4,2
72	0,377	4,0	0,534	4,1
140	0,377	4,1	0,534	4,1
312	0,630	4,1	0,753	4,2
Isolado LMA 104				
0	0,451	4,0	0,251	4,5
12	0,377	4,0	0,22	4,5
24	0,439	4,0	0,22	4,5
36	0,424	4,0	0,283	4,3
48	0,408	4,0	0,439	4,2
72	0,377	4,0	0,534	4,0
140	0,377	4,1	0,534	4,1
312	0,500	4,2	0,785	4,2

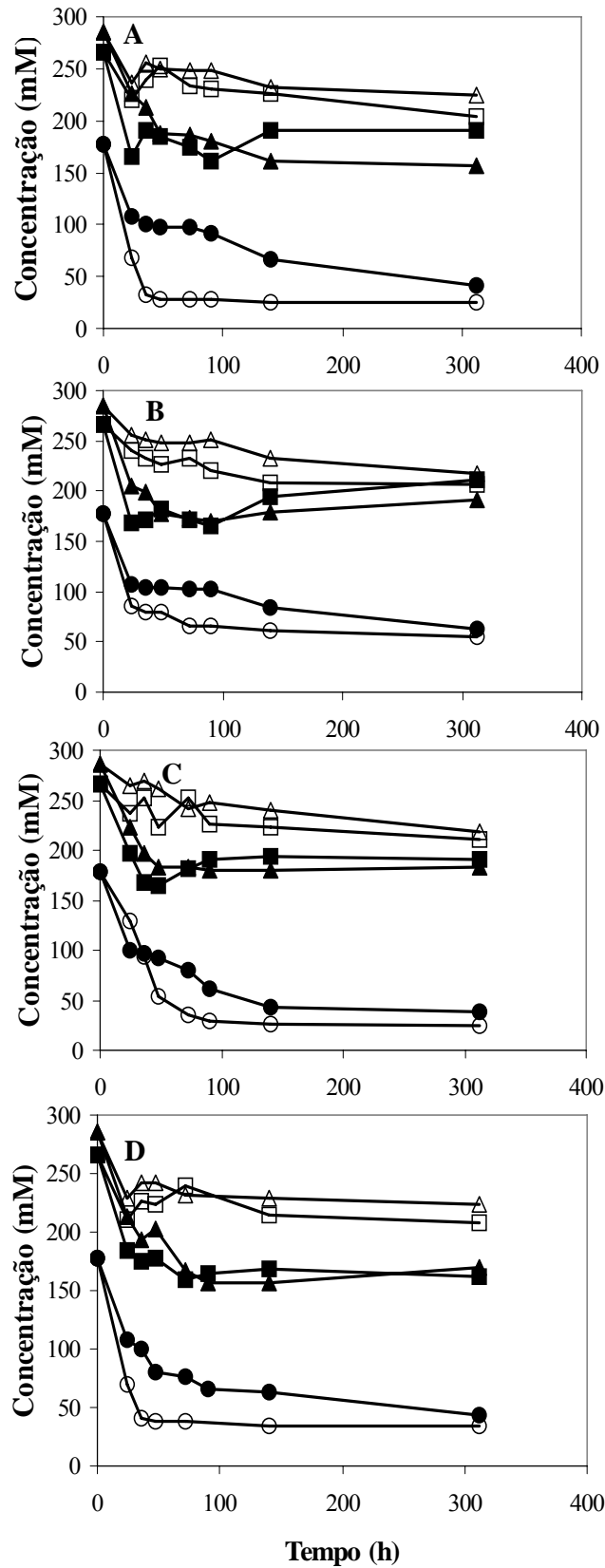


Figura 12 – Consumo de açúcares por *C. tyrobutyricum* LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 (D) cultivados a 30 °C em 10 mL de polpa de manga anaeróbia com pH inicial 4,0, sacarose (-○-), glicose (-□-) e frutose (-△-), e pH inicial 4,5, sacarose (-●-), glicose (-■-) e frutose (-▲-).

5. CONCLUSÕES

- Bactérias Gram-positivas, formadoras de esporos e anaeróbias do gênero *Clostridium* foram as principais deterioradores de polpa de manga tratada termicamente;
- A identificação de quatro isolados representativos indicou a presença da espécie *C. tyrobutyricum*.
- Os deterioradores avaliados cresceram em pH de 4,0 a 7,0 e em temperatura de 10 °C a 40 °C, com ótimo entre 35 °C e 40 °C.
- A fermentação da polpa de manga com pH entre 4,0 e 4,5 pelos isolados de *C. tyrobutyricum* resultou como principais produtos: gás, acetato e butirato.
- Os isolados de *C. tyrobutyricum* avaliados apresentaram capacidade de crescer em altas concentrações de açúcar, pois fermentaram a polpa de manga com 729,2 mM de açúcares, mas não utilizaram todo o substrato durante a fermentação.
- A informação de que os isolados são inibidos em pH 3,5 é de relevância para a indústria de polpa de manga, que geralmente processa esse produto com pH 4,0, mas que pode adotar a estratégia de acidificação para garantir a sua conservação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHVENAINEM, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**. vol. 7, p. 179-187, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Acidez titulável total, volátil total e fixa** – NBR 13856. São Paulo: ABNT, 1997.

AZIZI, A., RANGANNA, S. Spoilage organisms of canned acidified mango pulp and their relevance to thermal processing of acid foods. **Journal of Food Science and Technology**. vol. 30, n. 04, p. 241-245, 1993.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Waverly Press, vol. I e vol. II, Baltimore, 1981.

BEUCHAT, L. R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* in fruit products. **Journal of Food Science**. vol. 51, p. 1506-1510, 1986.

BEUCHAT, L.R. Spoilage of acid products by heat resistant moulds. **Dairy Food Environment Sanitation**. vol. 18, p. 588-593, 1998.

BLOCHER, J.C., BUSTA, F.F. Bacterial spore resistance to acid. **Food Technology**. vol. 37, n. 11, p. 87-99, 1983.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa nº1, de 7 de janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União, Brasília, nº6, 10 de janeiro de 2000.** Seção I, p. 54-58 [Aprova os regulamentos técnicos para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpas e sucos de frutas].

BRUNINI, M.A., DURIGAN, J.F., OLIVEIRA, A.L. Avaliação das alterações em polpa de manga “Tommy-Atkins” congeladas. **Revista Brasileira de Fruticultura.** vol. 24, n. 3, p. 651-653, 2002.

CANGANELLA, F., KUK, S.U., MORGAN, H., WIEGEL, J. *Clostridium thermobutyricum*: growth studies and stimulation of butyrate formation by acetate supplementation. **Microbiological Research.** vol. 157, p. 149-156, 2002.

CARDELLO, H. M. A. B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangifera indica* L.) var. Haden durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** vol. 18, n. 2, 1998.

CERF, O., DAVEY, K.R., SADOUDI, A.K. Thermal inactivation of bacteria - a new predictive model for the combined effect of three environmental factors: temperature, pH and water activity. **Food Research International.** vol. 29, n. 3/4, p. 219-226, 1996.

CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry.** vol. 8, p. 130-132, 1962.

COSTILOW, R.N. Biophysical factors in growth, p. 66-78. In: GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., COSTILOW, R.N., NESTER, E.W., WOOD, W.A., KRIEG, N.R., PHILLIPS, G.B. (eds.). **Manual of methods for general bacteriology.** American Society for Microbiology, Washington D.C., 1981.

COTTER, P.D., HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** vol. 67, p. 429-453, 2003.

COUVERT, O., LEGUÉRINEL, I., MAFART, P. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology.** vol. 49, p. 57-62, 1999.

COUVERT, O., GAILLARD, S., SAVY, N., MAFART, P., LEGUÉRINEL, I. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 101, p. 73-81, 2005.

DAUTHY, M.E. **Fruit and vegetable processing**. Food and Agricultural Services FAO. (Bulletin n.119), 1995.

DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**. vol. 14, p. 273-285, 2004.

DOELLE, H.W. **Bacterial metabolism**. 2th ed. Academic Press, New York, 1975, 738 p.

DRIKS, A. Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat. **Trends in Microbiology**. vol. 10, p. 251-254, 2002.

DRIKS, A. *Bacillus subtilis* spore coat. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. vol. 63, p. 1-20, 1999.

DUARTE, I.F., DELGADILLO, I., GIL, A.M. Study of natural mango juice spoilage and microbial contamination with *Penicillium expansum* by high resolution 1H NMR spectroscopy. **Food Chemistry**. vol. 96, p. 313-324, 2006.

DUARTE, I.F., BARROS, A., DELGADILLO, I., ALMEIDA, C., GIL, A.M. Application of FTIR spectroscopy for the quantification of sugars in mango juice as a function of ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 50, p. 3104-3111, 2002.

DÜRRE, P., HOLLERGSCHWANDNER, C. Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. **Anaerobe**. vol. 10, 69-74, 2004.

EVERIS, L., BETTS, G. pH stress can cause cell elongation in *Bacillus* and *Clostridium* species: a research note. **Food Control**. vol. 12, p. 53-56, 2001.

FAO (Roma, Itália). **FAOSTAT (FAO Statistical) Databases**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org>. 2001 e 2006. Acesso em: 23 de fevereiro de 2006.

FERCHICHI, M., CRABBE, E., GIL, G.H., HINTZ, W., ALMADIDY, A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of Biotechnology**. vol. 120, p. 402-409, 2005.

FINE, F., GERVAIS, P. Thermal destruction of dried vegetative yeast cells and dried bacterial spores in a convective hot air flow: strong influence of initial water activity. **Environmental Microbiology**. vol. 7, n. 1, p. 40-46, 2005.

GHENGHESH, K.S, BELHAJ, K., EL-AMIN, W.B., EL-NEFATHI, S.E., ZALMUN, A. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli-Libya. **Food Control**. vol. 16, p. 855-858, 2005.

GIL, A.M., DUARTE, I.F., DELGADILLO, I., COLQUHOUN, I.J., CASUSCELLI, F., HUMPFER, E., SPRAUL, M. Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 48, p. 1524-1536, 2000.

GODDIN, C., ENGASSER, J.M. Two- stage continuous fermentation of *Clostridium acetobutylicum*: effect of pH and dilution rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. vol. 33, p. 269-273, 1990.

GONÇALVES, N. B. et al. Caracterização Física e Química dos Frutos de Cultivares de Mangueira (*Mangifera indica* L). **Ciência e Agrotecnologia**. v. 22, p. 72-78, 1998.

GRAHAM, A.F., LUND, B.M. The effect of citric acid on growth of proteolytic strains of *Clostridium botulinum*. **Journal of Applied Bacteriology**. vol. 61, p. 39-49, 1986.

HUNGATE, R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. **Bacteriological Reviews**. vol.14, p.1-49. 1950.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Banco de Dados Agregados. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br/bda.

ICIEK, J., PAPIEWSKA, A., MOLSKA, M. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. **Journal of Food Engineering**. Article in press, disponível on line, 13 de setembro de 2005.

ICMSF. **Microbial ecology of foods**. Vol. I. Academic Press, New York, 1980, 332p.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 5.ed. New York: Chapman & Hall. 661p., 1996.

KRISHNAMOORTHY, U., STEINGASS, H., MENKE, K.H. Preliminary observations on the relationship between gas production and microbial protein synthesis *in vitro*. **Archiv fur Tierernahrung**. v. 41, p. 521-526, 1991.

KWOK, K.C., LIANG, H.H., NIRANJAN, K. Optimizing conditions for thermal processes of soy milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 50, p. 4834-4838, 2002.

LEE, S.Y., GRAY, P.M., DOUGHERTY, R.H., KANG, D.H. The use of dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 92, p. 121-127, 2004.

LEGUÉRINEL, I., SPEGAGNE, I., COUVERT, O., GAILLARD, S., MAFART, P. Validation of an overall model describing the effect of three environmental factors on the apparent D-value of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 100, p. 223-229, 2005.

LIU, X., YANG, S.T. Kinetics of butyric acid fermentation of glucose and xylose by *Clostridium tyrobutyricum* wild type and mutant. **Process Biochemistry**. vol. 41, p. 801-808, 2006.

LIU, X., ZHU, Y., YANG, S.T. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. **Enzyme and Microbiology Technology**. vol. 38, p. 521-528, 2006.

MAFART, P., LEGUÉRINEL, I. Modelling the heat stress and the recovery of bacterial spores. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 37, p. 131-135, 1997.

MAFART, P., COUVERT, O., LEGUÉRINEL, I. Effect of pH on the heat resistance of spores: comparison of two models. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 63, p. 51-56, 2001.

- MAZAS, M., LOPEZ, M., GONZALEZ, I., GONZALEZ, A., BERNARDO, A., MARTIN, R. Effects of the heating medium pH on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **Journal of Food Safety**. vol. 18, p. 25-36, 1988.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. vol. 31, p. 426-428, 1959.
- MOIR, A. Bacterial spore germination and protein mobility. **Trends in Microbiology**. vol. 11, p. 452-454, 2003.
- MORAES, D.M. **Desenvolvimento e maturação pós-colheita de frutos de manga (*Mangifera indica* L.) Cv. "Ubá"**. Viçosa, 1988. Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- MURAKAMI, M., TEDZUKA, H., YAMAZAKI, K. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. **Food Microbiology**. vol. 15, p. 577-582, 1998.
- NCHE, P.F., NOUT, M.J.R., ROMBOUTS, F.M. Gas production by *Clostridium perfringens* as a measure of the fermentability of carbohydrates and processed cereal-legume foods. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 11, p. 21-29, 1994.
- NICHOLSON, W.L., MUNAKATA, N., HORNECK, G., MELOSH, H.J., SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. vol. 64, n. 3, 548-572, 2000.
- OCIO, M.J., SÁNCHEZ, T., FERNÁNDEZ, P.S., RODRIGO, M., MARTÍNEZ, A. Thermal resistance characteristics of PA 3679 in the temperature range of 110-121°C as affected by pH, type of acidulant and substrate. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 22, n. 4, p. 239-2247, 1994.
- OGINO, H., TAKASHI, M., ISHIMI, K., SEKI, M., YOSHIDA, H. Hydrogen production from glucose by anaerobes. **Biotechnology Progress**. vol. 21, p. 1786-1788, 2005.

- PALOP, A., RASO, J., PAGÁN, R., CONDÓN, S., SALA, F. J. Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 29, p. 1-10, 1996.
- PALOP, A., MARCO, A., RASO, J., SALA, F.J., CONDÓN, S. Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 38, p. 25-30, 1997.
- PAO, S., BROWN, G.E. Reduction of microorganisms on citrus fruit surfaces during packinghouse processing. **Journal of Food Protection**. vol. 61, p. 903-906, 1998.
- PELEG, M. On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. **Food Research International**. vol. 32, p. 271-278, 1999.
- PIGLIONE, C. Pesquisas prolongam vida da manga. **Jornal da UNICAMP**, Campinas, julho, p. 4, 1995.
- PIRT, S.J. **Principles of microbe and cell cultivation**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.
- PONTIUS, A.J., RUSHING, J.E., FOEGEDING, P.M. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. **Journal of Food Protection**. vol. 61, p. 41-46, 1998.
- RAJASHEKHARA, E., SURESH, E.R., ETHIRAJ, S. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. **Food Microbiology**. vol. 17, p. 269-275, 2000.
- RATKOWSKY, D.A., OLLEY, J., McMEEKIN, T.A., BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**. v. 149, p. 1-5, 1982.
- REICHART, O. Modelling the destruction of *Escherichia coli* on the base of reaction kinetics. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 23, p. 449-465, 1994.
- ROSS, T., McMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**. v.23, p. 241-264, 1994.

SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., VAN OORSCHOT, C.A.N. **Introduction to foodborne fungi**. Baarn Ed. p. 40-41, 1984.

SANTOS, M.H.S.; ZARZO, J.T. Glucono- δ -lactone and citric acid as acidulants for lowering the heat resistance of *Clostridium sporogenes* PA 3679 in HTST working conditions. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 25, p. 191-197, 1995.

SANTOS, M.H.S.; ZARZO, J.T. Evaluation of citric acid and GLD in the recovery at different pH levels of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores subjected to HTST treatment conditions. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 29, p. 241-254, 1996.

SECEX - **Secretaria de Comércio Exterior**. Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br>.

SETLOW, P. Mechanisms for the prevention of damage to the DNA spores of *Bacillus* species. **Annual Review of Microbiology**. v. 49, p. 29-54, 1995.

SETLOW, P., JOHNSON, E.A. Spores and their significance, p. 33-70. *In*: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. ASM Press, Washington D. C., 2001.

SILVA, F.M., GIBBS, P., VIEIRA, M.C., SILVA, C.L.M. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 51, p. 95-103, 1999.

SILVA, F.V.M., GIBBS, P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. **Trends in Food Science & Technology**. vol. 12, p. 68-74, 2001.

SMIBERT, R.M., KRIEG, N.R. Phenotypic characterization, p. 607-654. *In*: GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., WOOD, W.A., KRIEG, N.R. (eds.). **Manual of methods for general microbiology**. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1994.

SUGAI, A.Y. **Processamento descontínuo de purê de manga (*Mangifera indica* Linn.), variedade Haden: Estudo da viabilidade do produto para pronto consumo.** São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 99p., 2002.

TCHANGO-TCHANGO, J., TAILLIEZ, R., EB, P., NJINE, T., HORNEZ, J. P. Heat resistance of the spoilage yeasts *Candida pelliculosa* and *Kloeckera apis* and pasteurization values for some tropical fruit juices and nectars. **Food Microbiology**, 14, 93-99, 1997.

TEATHER R.M. Maintenance of laboratory strains of obligately anaerobic rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 44, n. 2, p. 499-501, 1982.

TERANO, H., TAKAHASHI, K., SAKAKIBARA, Y. Characterization of spore germination of a thermoacidophilic spore-forming bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**. vol. 69, n. 6, p. 1217-1220, 2005.

TODA FRUTA. Disponível em: www.todafruta.com.br. Acesso em: 15 de abril de 2006.

VANDÁK, D., ZIGOVÁ, J., STURDÍK, E., SCHLOSSER, S. Evaluation of solvent and pH for extractive fermentation of butyric acid. **Process Biochemistry**. vol. 32, p. 245-251, 1997.

VIEIRA, M.C., TEIXEIRA, A.A., SILVA, F.M., GASPARGAS, N., SILVA, C.L.M. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 77, p. 71-81, 2002.

VILLARREAL, L., HEREDIA, N.L., GARCÍA, S. Changes in protein synthesis and acid tolerance in *Clostridium perfringens* type A in response to acid shock. **International Microbiology**. vol. 3, p. 113-116, 2000.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes.** 2th ed. Oxford University Press, New York, 2000.

WIEGEL, J. Temperature spans for growth: a hypothesis and discussion. **FEMS Microbiological Reviews**. vol. 75, p. 155-170, 1990.

YAMASAKI, K., TEDUKA, H., SHINANO, H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**. 60, 543-545, 1996.

YAMASAKI, K., MURAKAMI, M., KAWAI, Y., INOUE, N., MATSUDA, T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 17, p. 315-320, 2000.

ZHU, Y., WU, Z., YANG, S.T. Butyric acid production from acid hydrolysate of corn fibre by *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor. **Process Biochemistry**. vol. 38, p. 657-666, 2002.

ZWIETERING, M. H., WIT, J. C., NOTERMANS, S. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. **International Journal of Food Microbiology**. v.30, p.55-70, 1996.

APÊNDICE

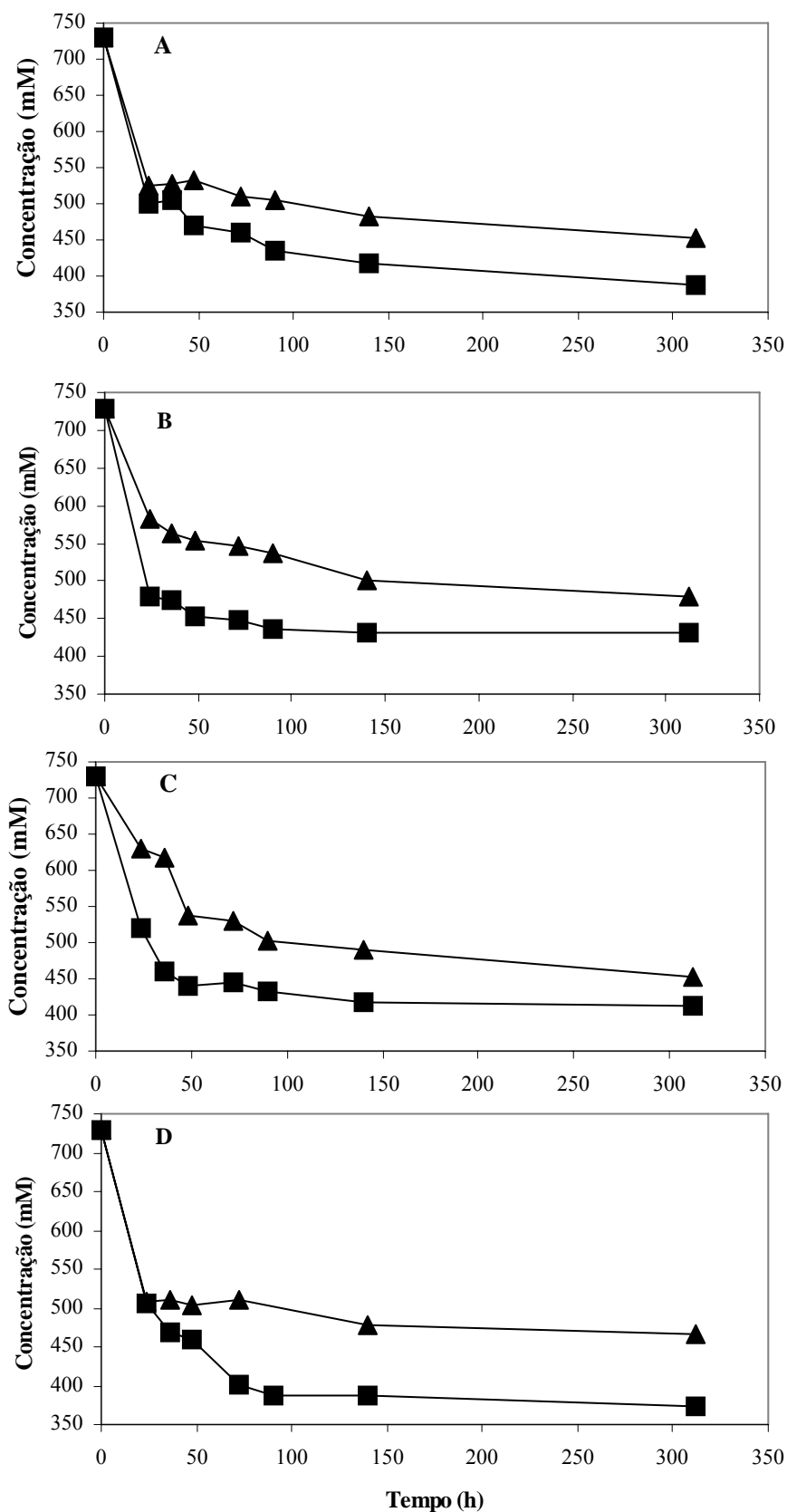


Figura 1A – Consumo de açúcares totais (sacarose, glicose e frutose) por *C. tyrobutyricum* LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 cultivados em 10 mL de polpa de manga com pH inicial 4,0 (-▲-) e 4,5 (-■-). Foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

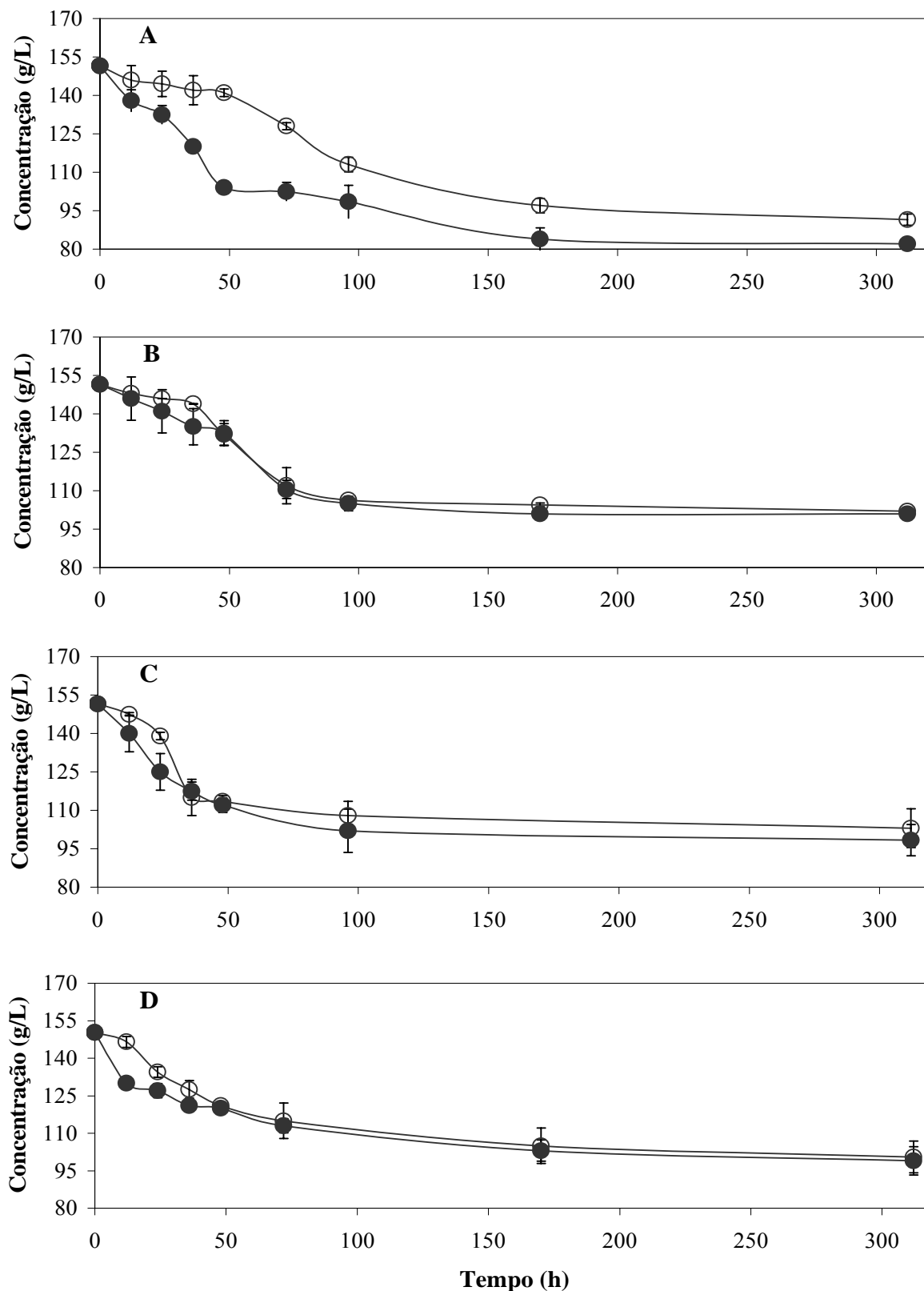


Figura 2A – Consumo de açúcares redutores por *C. tyrobutyricum* LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 cultivados em 10 mL de polpa de manga com pH inicial 4,0 (-○-) e 4,5 (-●-). Foi utilizado o método do ácido 3,5 dinitrossalicílico-DNS (MILLER, 1959). As barras de erro representam o desvio padrão da média.

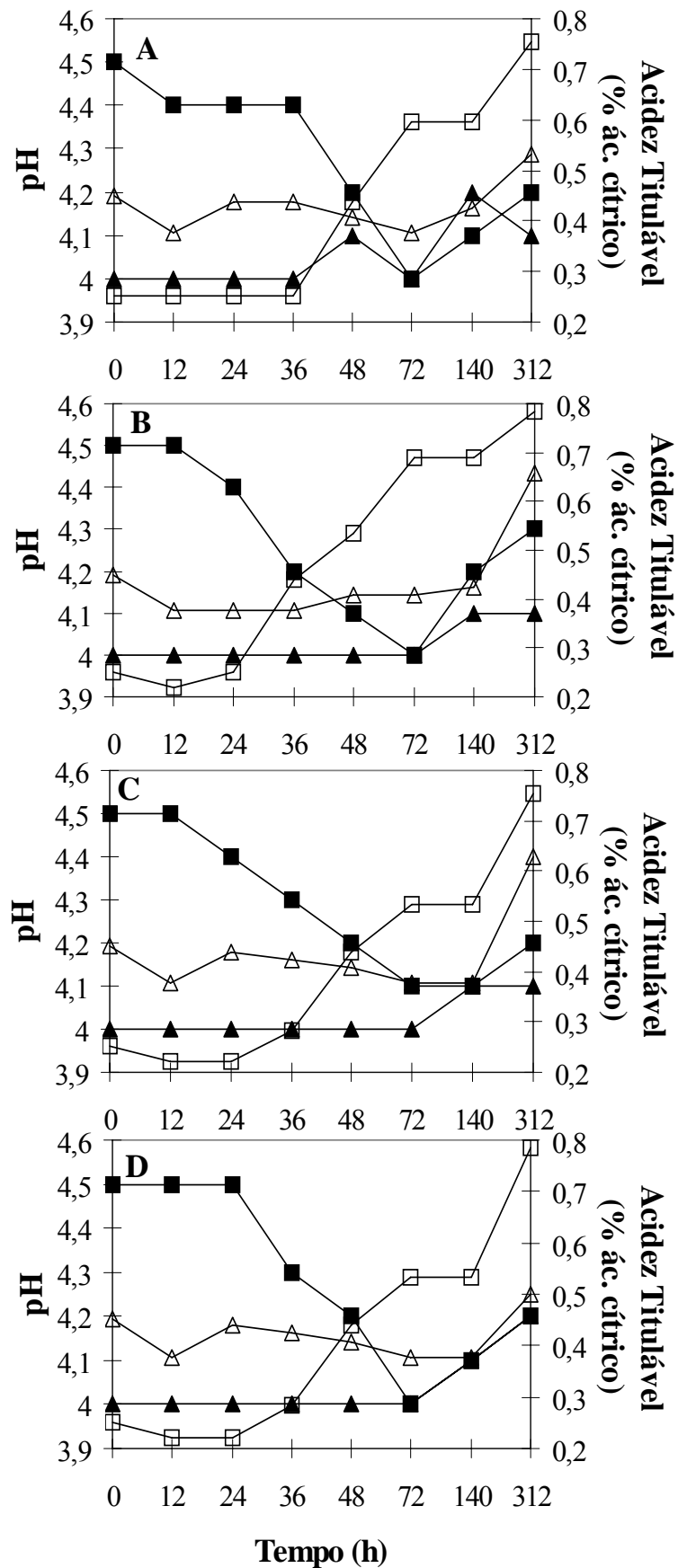


Figura 3A – Acidez titulável ao longo da fermentação da polpa de manga com pH inicial 4,0 (-▲-) e 4,5 (-■-) pelos isolados de *C. tyrobutyricum* LMA 45 (A), LMA 63 (B), LMA 72 (C) e LMA 104 (D). O pH ao longo da fermentação de polpa de manga com pH inicial 4,0 (-▲-) e 4,5 (-■-) também é mostrado.