

**MICROBIOTA DA BEBIDA FERMENTADA DE
ARROZ COM AMENDOIM PRODUZIDA PELOS
ÍNDIOS BRASILEIROS**

CÍNTIA LACERDA RAMOS

2009

CÍNTIA LACERDA RAMOS

**MICROBIOTA DA BEBIDA FERMENTADA DE ARROZ
COM AMENDOIM PRODUZIDA PELOS ÍNDIOS
BRASILEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Ramos, Cíntia Lacerda.

Microbiota da bebida fermentada de arroz com amendoim
produzida pelos índios brasileiros / Cíntia Lacerda Ramos. – Lavras :
UFLA, 2009.

51 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. DGGE. 2. Bebida indígena. 3. Bebida fermentada. 4. Lacto
bacillus. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.13

CÍNTIA LACERDA RAMOS

**MICROBIOTA DA BEBIDA FERMENTADA DE ARROZ
COM AMENDOIM PRODUZIDA PELOS ÍNDIOS
BRASILEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Aprovada em 05 de março de 2008

Profa. Dra. Rosane Freitas Schawn UFLA

Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso UFLA

Dra. Cristina Ferreira Silva UFLA

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos e força para a realização deste trabalho;
Aos meus pais e irmãos pela confiança e apoio em minhas decisões;
Ao Pedro pela compreensão, carinho e força nesta etapa tão importante da minha vida;
Aos professores Eustáquio, Rosane e Patrícia pelos ensinamentos e oportunidades;
Ao colega de trabalho Euziclei pelo companheirismo, conselhos e paciência;
Aos companheiros Gilberto e Claudia que não mediram esforços para realização deste trabalho;
As amigas Ivani, Magda e Cidinha pela ajuda constante e amizade;
A Adriene, Vivian e Fernanda pelo companheirismo e amizade;
A todos os colegas do laboratório de Microbiologia.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO I	1
FERMENTAÇÃO E BEBIDAS FERMENTADAS APARTIR DE CEREAIS	1
1 INTRODUÇÃO	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Fermentação.....	3
2.2 Alimentos fermentados a partir de cereais.....	6
2.3 A fermentação e os povos indígenas.....	8
2.4 Uso de métodos moleculares para estudo da biodiversidade Microbiana.....	10
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO II	18
Microbiota da bebida fermentada de arroz com amendoim produzida pelos Índios Brasileiros	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Cauim.....	24
2.2 Amostragem.....	25
2.3 Isolamento e Identificação.....	26
2.3.1 Contagem dos microrganismos.....	26
2.3.2 Identificação das bactérias.....	26
2.3.3 Identificação das leveduras.....	27
2.4 Extração do DNA.....	28
2.5 PCR.....	29
2.6 DGGE.....	30
2.7 Análises estatísticas.....	31

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1 Identificação das bactérias.....	33
3.2 Identificação das leveduras.....	37
3.3 DGGE.....	40
4 CONCLUSÃO.....	46
5 REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

RAMOS, Cíntia Lacerda. **Microbiota da bebida fermentada de arroz com amendoim produzida pelos índios brasileiros**. 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Preparada pelas índias brasileiras da tribo Tapirapé, o Cauim é uma bebida fermentada produzida a partir de substratos diversos tais como mandioca, arroz, amendoim, abóbora, semente de algodão, milho entre outros. Seu preparo envolve a adição de um inóculo obtido através da mastigação da batata-doce. Este líquido da batata-doce, juntamente com a saliva da índia, possui uma diversidade de microrganismos que irão participar da fermentação da bebida. O inóculo também apresenta a enzima amilase, que quebra o amido, liberando açúcares para que os microrganismos possam utilizá-los. Para o isolamento e identificação da microbiota presente na bebida cauim produzida a partir de amendoim com arroz, amostras foram coletadas a cada 8h de fermentação durante 48h. A população bacteriana variou de 7.4 a 8,4 log UFC/ml, enquanto a de levedura variou de 4.0 a 6,6 log UFC/ml. Um total de 198 estirpes de bactérias foram isoladas e identificadas. As bactérias foram agrupadas em Gram-negativa (21,2%), Gram-positivas catalase negativa (42,9%) e Gram-positiva catalase positiva (35,9%). Os *Lactobacillus* foram dominantes durante todo o processo de fermentação. As espécies *L. confusus* (20), *L. viridescens* (17), *L. fermentum* (13), *L. plantarum* (8), *L. homohiochii* (7) e *L. paracasei* ssp. *paracasei* (7) foram isoladas com maior frequência. Outras espécies menos frequentes foram *L. sake* (3), *L. salivarius* (2), *L. sanfranciseo* (2), *L. brevis* (1), *L. jensenii* (1), *L. collinoides* (1), *L. celobiosus* (1), *L. pentosus* (1) e *L. agilis* (1). Em relação às leveduras, 82 estirpes foram isoladas e identificadas. Foram encontrados representantes das espécies *Pichia guilliermondii*, *Candida* sp., *Rhodosporidium toruloides*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula minuta*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida sake*, *Debaryomyces occidentalis* e *Metschnikowia pulcherrima*. Análises de DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) foram realizadas com o objetivo de conhecer as mudanças das comunidades de bactérias e fungos durante o processo fermentativo. As comunidades microbianas mostraram-se alteradas durante todo o processo. Estudos sobre os microrganismos envolvidos no processo de fermentação para a

¹ Comitê Orientador: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Orientador); Rosane Freitas Schwan – UFLA (Co-orientador); Patrícia Gomes Cardoso – UFLA (Co-orientador)

produção da bebida cauí são de grande importância para o desenvolvimento de uma bebida com maior qualidade, segurança e estabilidade.

ABSTRACT

RAMOS, Cíntia Lacerda. **Microbial of fermented beverage from peanut with rice produced by brazilian amerindians.** 2008. 51p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) Federal University of Lavras, Lavras, MG.²

Cauim is a fermented beverage prepared by Tapirapé Amerindians in Brazil from several substrates such as cassava, rice, peanuts, pumpkin, cotton seed, maize. A mixture of sewed sweet potato and saliva was used as inoculum to introduce microorganisms. The inoculum has amylase enzyme that hydrolyses the starch and then sugars were free for microorganisms. Samples from cauim produced from peanut and rice were collected at 8 h intervals during 48 h for microbiological analysis. The bacteria population varied from 7.4 to 8.4 log CFU/mL. The yeast population varied from 4.0 to 6.6 log CFU/mL. A total of 198 bacteria were isolated and identified. All the isolates were grouped into Gram-negative (21.2%), Gram-positive negative-catalase (42.9%) and Gram positive positive-catalase (35.9%). The *Lactobacillus* genus was dominant throughout fermentation. The species *L. confusus* (20), *L. viridescens* (17), *L. fermentum* (13), *L. plantarum* (8), *L. homohiochii* (7) and *L. paracasei* ssp. *paracasei* (7) were more frequently isolated. Others species less frequently were *L. sake* (3), *L. salivarius* (2), *L. sanfranciseo* (2), *L. brevis* (1), *L. jensenii* (1), *L. collinoides* (1), *L. celobiosus* (1), *L. pentosus* (1) and *L. agilis* (1). A total of 82 yeast strains were isolated and identified. Yeast of genera *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* and *Torulasporea* were found. DGGE analysis were performed and it was possible to observe the dynamic of bacteria and yeast community during fermentative process. The microbial community modified during all stages of fermentation. Studies about the microbial involved in fermentation process for production of cauim were very important to development a beverage with quality, safety and stability.

² Guidance Committee: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Major Professor); Rosane Freitas Schwan – UFLA; Patrícia Gomes Cardoso – UFLA.

CAPÍTULO I

FERMENTAÇÃO E BEBIDAS FERMENTADAS APARTIR DE CEREAIS

1 INTRODUÇÃO

A fermentação é um dos métodos mais antigos e econômicos de produzir e preservar alimentos. Atualmente alguns alimentos fermentados são industrializados e fazem parte da dieta da população de todo o mundo, como por exemplo: pão, queijo, iogurte, vinagre, bebidas fermentadas (cerveja, vinho) e fermentadas/destiladas (uísque, cachaça, tequila).

Diversos povos de várias partes do mundo contribuíram para o aperfeiçoamento e utilização das técnicas fermentativas. Entre estes, destacam-se os estudos realizados com alimentos e bebidas fermentadas em países asiáticos e do continente africano onde muitos alimentos produzidos por processos fermentativos espontâneos envolvendo bactérias, leveduras e fungos são conhecidos.

No Brasil, várias tribos indígenas brasileiras também fazem uso da fermentação para produção de alimentos e bebidas, porém pouco se conhece sobre o assunto. A literatura sobre o uso da fermentação para a produção de alimentos pelos índios brasileiros é ainda escassa. Almeida et al. (2007) e Schwan et al. (2007) realizaram estudos sobre a microbiota envolvida na fermentação de bebidas produzidas pelos índios Tapirapé. Chamadas de “cauim”, estas bebidas são preparadas pelos índios utilizando-se os mais diversos substratos como arroz, mandioca, amendoim, milho, semente de algodão entre outros. Estes substratos são cultivados pelos membros da aldeia em suas roças. O preparo das bebidas é cultural e passa de geração para geração. É um preparo rudimentar no qual o líquido obtido a partir da mastigação da batata-doce é adicionado ao recipiente de preparação da bebida como inóculo para realização do processo de fermentação.

Estudos sobre os microrganismos envolvidos na fermentação destas bebidas e a dinâmica das comunidades microbianas presente durante todo o processo fermentativo são de grande importância para estudos futuros que busquem obter um produto final de maior qualidade e estabilidade. Neste sentido, este trabalho objetivou isolar e identificar os microrganismos presentes durante todo o processo de fermentação da produção do cauim, bem como conhecer a dinâmica das comunidades pela técnica de DGGE.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fermentação

A produção de alimentos fermentados é uma das tecnologias de processamento de alimentos mais antigas conhecida pelo homem. Desde o início das civilizações, métodos de fermentação de leite, carnes e vegetais têm sido descritos. Porém, estes processos eram artesanais, naturais e não havia conhecimento sobre a ação dos microrganismos (Caplice, 1999). A fermentação de alimentos envolve culturas mistas de microrganismos que crescem simultaneamente ou em sucessão. De acordo com Steinkraus (1993), alimentos fermentados tradicionais contêm alto valor nutritivo e uma diversidade de sabores, aromas e texturas.

A fermentação tem sido usada por milhares de anos como um meio efetivo e de baixo custo para preservar a qualidade e a segurança dos alimentos. (Parveen et al., 2003).

Os países em desenvolvimento enfrentam uma escassez de recursos de ampla e variada natureza. Uma das conseqüências de tal escassez se reflete, por exemplo, em sua capacidade limitada de utilização de técnicas como o enriquecimento de vitaminas dos alimentos, ou processos que requerem o uso intensivo de energia e capital para a preservação dos alimentos. Dessa forma, a utilização de alimentos fermentados é uma fonte alimentar alternativa importante (Parveen et al., 2003).

Os microrganismos responsáveis pela fermentação podem estar presentes na microbiota natural do substrato utilizado ou podem ser adicionados como cultura iniciadora.

A fermentação proporciona um caminho natural para a transformação de um determinado substrato em um produto de qualidade, com maior valor

nutritivo, melhor aparência, além de reduzir a energia gasta no cozimento (Simango, 1997).

Em meados do século XIX, dois eventos ampliaram o conhecimento sobre o processo de fermentação de alimentos, o que também modificou a sua forma de produção. O primeiro deles refere-se à revolução industrial que resultou na concentração de grande massa populacional nas cidades. A partir de então, surgiu a necessidade de se produzir alimentos em escalas cada vez maiores a fim de atender à demanda da população. Essa necessidade levou a uma outra, ou seja, à de industrialização de seu processo de produção. O segundo evento foi o surgimento da Microbiologia como ciência em 1850, estabelecendo a base biológica da fermentação e, assim, seu processo foi entendido (Caplice et al., 1999). Foram realizados trabalhos científicos e tecnologias forma desenvolvidas para a produção industrial de produtos fermentados de leite, carne, frutas, vegetais e cereais (Blandino et al., 2003).

Alimentos fermentados são produzidos por todo o mundo utilizando várias técnicas de produção, substratos e microrganismos. No entanto, existem apenas quatro tipos de fermentação principais: fermentação alcoólica, ácido-lática, ácido-acética e alcalina (Soni & Sandhu, 1990). A fermentação alcoólica resulta na produção de etanol e gás carbônico em que as leveduras são os microrganismos predominantes. A produção de vinhos e cervejas é um exemplo deste tipo de fermentação. Já a fermentação ácido-lática é principalmente realizada por bactérias ácido-láticas. Como exemplo, podemos citar a produção de leites e cereais fermentados. Um segundo grupo de bactérias de importância na fermentação de alimentos é o grupo da espécie *Acetobacter*, que produz ácido acético. Na presença de oxigênio, estas convertem álcool em ácido acético. Fermentações alcalinas frequentemente ganham destaque durante a fermentação de peixes e sementes, popularmente usados como condimento (Mckay & Baldwin, 1990)

No passado, não havia nenhum relato sobre implicações econômicas, nutricionais, técnicas ou sobre o controle de qualidade de alimentos fermentados naturalmente. Recentemente, tem crescido o volume de publicações sobre alimentos e bebidas fermentadas naturalmente e encontradas por todo o mundo (Steinkraus et al., 1993).

2.2 Alimentos fermentados a partir de cereais.

Em várias partes do mundo, os alimentos fermentados preparados a partir de grãos como arroz, trigo, milho ou sorgo são bastante conhecidos e tradicionais. Geralmente, são alimentos secundários da dieta e utilizados, em grande parte, como corantes, especiarias, bebidas. (Steinkraus, 1998).

A microbiota destes produtos é complexa e desconhecida. Na maioria destes produtos, a fermentação é natural e envolve microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Alguns podem participar paralelamente, enquanto outros atuam de maneira seqüencial com uma mudança da microbiota dominante durante a fermentação. As bactérias pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bacillus* são geralmente identificadas em produtos fermentados a partir de cereais, assim como representantes dos gêneros de fungos *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*. As leveduras mais comumente encontradas são as da espécie *Saccharomyces* que geralmente resultam em fermentação alcoólica (Steinkraus, 1998)

As espécies bacterianas desenvolvidas em cada alimento fermentado dependem da atividade de água, pH, concentração de sal, temperatura e composição do alimento. Em sua maioria, a produção de alimentos fermentados a partir de cereais é realizada por bactérias ácido lácticas (Conway, 1996). A fermentação ácido-láctica contribui para o aumento do valor nutritivo, da vida de prateleira e da aceitabilidade de grande número de alimentos fermentados à base

de cereais (Oyewole, 1997). Em muitos destes processos, após serem lavados, os grãos de cereais são deixados de molho em água por alguns dias. Os microrganismos que ocorrem naturalmente irão fermentar estes substratos. A fermentação é apenas um passo no preparo dos alimentos; outras operações como adição de sal ou cozimento também afetam as propriedades dos produtos finais (Nout et al., 1997).

Exemplos de alimento e bebidas fermentadas espontaneamente preparados a partir de cereais em diferentes regiões do mundo são listados na Tabela 1.

TABELA 1 Exemplos de bebidas e alimentos fermentados espontaneamente à base de cereais e legumes

Produto	Substratos	Microrganismos	País	Referência
Agbelima	Mandioca	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i>	Gana, Togo, Benin	Kofi et al. (1995).
Boza	Trigo, milhete, milho e outros cereais	<i>Lactobacillus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Leuconostoc</i>	Albânia, Turquia, Bulgária e Romênia	Gotcheva et al. (2000), Botes et al. (2007).
Cauim	Arroz com mandioca	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> ,	Brasil	Almeida et al. (2007), Schwan et al. (2007).
Chicha	Milho	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , leveduras e bactérias ácido lácticas	Países da América Latina	Steinkraus et al. (1993).
Fufu	Mandioca	<i>Streptococcus lacticus</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Corynebacterium manihot</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i>	Nigéria	Fagbemi et al, 2006.
Gari	Mandioca	Bactérias ácido lácticas e leveduras	Nigéria e Oeste da África	Kosinek et al. (2005).

... continua...

TABELA 1 Cont.

Ogi	Milho, millhete	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida mycoderma</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>	Nigéria, Oeste da África	Halm et al.(1993).
Polvilho	Mandioca		Brasil	Cereda (1983), Carvalho (1999)
Pozol	Milho	Fungo filamentosos, leveduras e bactérias	México	Ampe et al. (1999), Omar et al. (2000), Wacher et al. (2000)
Pulque	Agave	Leveduras e bactérias ácido lácticas	México	Steinkraus et al. (1993).
Seketeh	Milho	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces chevalieri</i> , <i>Saccharomyces elegans</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Mucor rouxii</i>	Nigéria	Sanii et al. (1993)
Uji	Milho, sorgo	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Kenia, Uganda.	Sanii et al. (1993)

2.3 A fermentação e os povos indígenas

A cultura dos povos indígenas no Brasil é ampla e diversificada. Em sua maioria, os índios brasileiros sobrevivem da caça, da pesca e da agricultura (milho, amendoim, grãos, batata doce e mandioca). Muitas tribos utilizam processos fermentativos para a produção de alimentos e bebidas com valores nutricionais, medicinais e até mesmo religiosos (Wagley, 1988). Diferentes substratos são utilizados como matéria-prima, destacando-se a mandioca, o

arroz, o milho, o amendoim, a seiva de palmeiras e frutos tais como o ananás e o caju (Ribeiro, 1982). Alguns dos alimentos produzidos pelos índios passaram a fazer parte também da dieta da população brasileira e entre eles destacam-se a farinha de mandioca, o polvilho (Carvalho et al., 1999; Lacerda et al., 2005), a farinha de ‘puba’ (De Almeida et al., 1993) e o ‘beiju’.

Os índios Tapirapé habitaram uma área localizada entre os rios Tocantins e Xingu até o século XVII (Baldus, 1970). Hoje, estão localizados na região Oeste do Mato Grosso, entre os Rio Xingu e Araguaia. Os índios Tapirapé produzem bebidas não alcoólicas, fermentadas a partir de diversos substratos como arroz, mandioca, amendoim, milho, semente de algodão entre outros, resultando em uma bebida chamada “cauim” (Melatti, 1983).

O cauim é produzido durante festivais chamados cauinagem, realizados para comemorar a chegada da colheita em agradecimento à boa produtividade da terra, em virtude das chuvas ocorridas. O mais importante neste festival é que o anfitrião da festa oferece o que produziu em sua roça, compartilhando com todos os membros da aldeia (Wagley, 1988). A bebida cauim é produzida a partir do cozimento e fermentação dos substratos, sendo consumida diariamente por adultos e crianças. A preparação da bebida é bem rudimentar. Enquanto o substrato é preparado, a água é aquecida até a fervura em uma panela. Após a água ser pré-aquecida, os substratos são adicionados e então cozidos. Em seguida, estes ingredientes são removidos e resfriados à temperatura ambiente. Para fermentação do cauim, um inóculo é adicionado. Este inóculo é obtido a partir da mastigação da batata-doce por uma índia jovem. O líquido da mastigação é adicionado aos poucos no recipiente de preparação da bebida, favorecendo o crescimento e multiplicação dos microrganismos. Deixa-se fermentar de 24 a 48 horas para obter o produto final já pronto para o consumo (Schwan et al., 2007).

Existem poucos relatos sobre microrganismos envolvidos na fermentação de bebidas indígenas. Provavelmente, este processo é realizado por uma grande diversidade microbiana devido ao modo de preparo destas bebidas.

2.4 Uso de métodos moleculares para estudo da diversidade microbiana

Nos últimos anos, devido ao uso de técnicas moleculares, o conhecimento sobre a diversidade microbiana em comunidades complexas têm aumentado. As técnicas moleculares proporcionam uma ferramenta confiável para a detecção, identificação e caracterização de microrganismos presentes em diversos ambientes e ecossistemas de alimentos. No entanto, o estudo da biodiversidade microbiana é ainda escasso devido à dificuldade de identificação e caracterização dos microrganismos antes de serem isolados em uma cultura pura (Girafa et al., 2001). Dunbar et al. (1997) demonstraram que qualquer desvio dos parâmetros ambientais originais durante o cultivo, como o uso de técnicas de cultura enriquecida, pode alterar a estrutura da comunidade natural pelas novas condições seletivas. Em muitos casos, não é possível obter uma visão completa da diversidade microbiana de um determinado ecossistema.

As técnicas moleculares para estudo da biodiversidade microbiana são caracterizadas por serem rápidas e reprodutíveis. Técnicas de *fingerprinting* são capazes de proporcionar um perfil da diversidade genética de uma comunidade microbiana de um ambiente específico. A DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) é um exemplo de técnica de *fingerprinting* independente do cultivo e baseia-se na separação de produtos do PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de mesmo tamanho, porém de seqüências diferentes (Ercolini, 2004). PCR-DGGE foi introduzido na ecologia microbiana por Muyzer et al. (1993). Muitos cientistas têm utilizado esta técnica, sendo atualmente uma ferramenta bem estabelecida para investigações da diversidade microbiana. PCR-DGGE é empregada para caracterizar a estrutura de

comunidades microbianas em amostras ambientais sem o cultivo, e para determinar a dinâmica das comunidades em respostas às variações ambientais (Ercolini, 2004).

Nesta técnica, utilizam-se géis de poliacrilamida contendo gradiente linear de desnaturante, geralmente uréia e formamida, nos quais fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com seqüências de bases nucleotídicas distintas, apresentam padrão de desnaturação diferente. Essa separação baseia-se em um princípio físico simples de que a mobilidade eletroforética do DNA em um gel de poliacrilamida seja sensível à estrutura secundária da molécula com respeito à sua conformação, que pode ser helicoidal, parcialmente desnaturada ou fita simples. Parcialmente desnaturadas, as moléculas compostas por partes dupla hélice e partes em fita simples movimentam-se mais lentamente no gel do que moléculas em fita dupla ou simples (Muyzer et al., 1998).

Quando o DNA é submetido à eletroforese em condições crescentes de desnaturação, os fragmentos permanecem em dupla fita até que eles atinjam as condições necessárias para a desnaturação dos domínios da molécula chamados “domínios de desnaturação”. Quando há a desnaturação de um domínio, processa-se uma transição na conformação da molécula, que passa de helicoidal para parcialmente desnaturada e a migração da molécula no gel é interrompida. Variações nas seqüências nucleotídicas desses domínios levam a uma diferença nessas condições de desnaturação e as moléculas com diferentes seqüências vão interromper sua migração em diferentes posições no gel (Rosado & Duarte, 2002). Um grampo de GC é anexado à extremidade 5' de um dos *primers*, amplificado por PCR juntamente com o DNA e introduzido no fragmento de DNA amplificado (Sheffield et al., 1989), agindo como um domínio de alta resistência à desnaturação, que impede a completa dissociação das duas fitas do DNA.(Muyzer et al., 1998).

Os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade. Seus genes (os rDNAs) são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula com o maior grau de conservação existente. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula (Lane et al., 1985). Organismos procariotos possuem moléculas de rRNA de tamanho 70S (5S, 23S e 16S), enquanto organismos eucariotos possuem rRNA 80S (5S, 5.8S, 28S e 18S) divididos em subunidades maior e menor (Tabela 2 e Figura 1). Uma das vantagens de se usar informações sobre as seqüências de rRNA é sua disponibilização em bases de dados (RDP, GeneBank, EMBL), permitindo a comparação de novas seqüências obtidas com as seqüências presentes nessas bases (Coutinho et al., 1999).

TABELA 2 Tamanho das subunidades maior e menor da molécula de rRNA de procariotos e eucariotos.

TIPO	TAMANHO	SUBUNIDADE MAIOR	SUBUNIDADE MENOR
Procarioto	70 S	50S (5S, 23S)	30S (16S)
Eucarioto	80 S	60S (5S, 5.8S, 28S)	40S (18S)

Presente em organismos procariotos, o gene 16S rRNA (aproximadamente 1500 nucleotídeos) gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas. Apesar de o 23S rRNA (aproximadamente 3000 nucleotídeos) conter duas vezes mais informações e, portanto, gerar maior confiabilidade nas inferências filogenéticas, a molécula menor (16S rRNA), por causa da maior facilidade de sequenciamento, tornou-se referência. Porém, o

23S rRNA tem sido utilizado como suplemento para os dados gerados do 16S rRNA em estudos de organismos intimamente relacionados (Stahl, 1997).

Em estudos sobre a diversidade estrutural de comunidades microbianas, os genes 16S e 18S rRNA de procariotos e eucariotos respectivamente (Figura 2) são úteis por apresentar alto grau de conservação e presença de regiões variáveis entre as espécies (Heuer & Smalla, 1997).

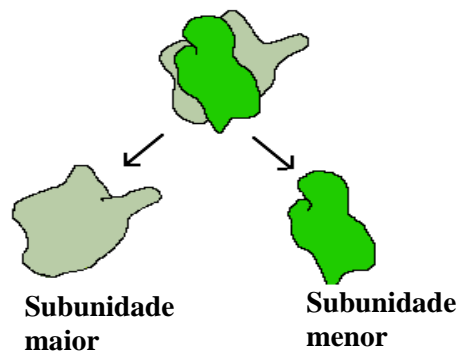


FIGURA 1 Esquema mostrando as subunidades que compõem a molécula de rRNA.

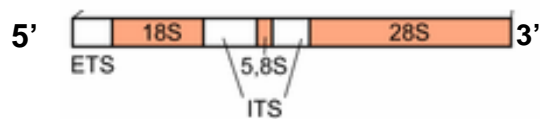


FIGURA 2 Esquema representando o gene rDNA de eucariotos, composto pelas regiões 18S, 5.8S e 28S. A região ITS possui uma maior variação entre as espécies.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.G.; RACHID, C.C.T.C.; SCHWAN, R.F. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by brazilian amerindians. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.120, p.146-151, 2007.
- ALMEIDA, P.F. de; MORAES, I.O.; CASTRO, R.C.; MENEZES, T.J.B. Fermentação de mandioca para produção de puba carimã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.13, n.2, p. 113-120, 1993.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M.E.; PANDIELLA S.S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Review: Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research international**, Amsterdam, v.36, n.6, p. 527-543, Dec. 2003.
- CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.50, n.1/2, p. 131-149, Sept. 1999.
- CARVALHO, E.P.; CANHOS, V.P.; VILELA, E.R.; ASQUERI, E.R.; CARVALHO, H.P. Determinacion de la flora microbiana de la fecula de yuca fermentada (polvilho azedo) durante las diferentes etapas de procesamiento. **Alimentaria**, Madrid, v.305, p. 97-103, 1999.
- CEREDA, M.P. Tecnologia e qualidade do polvilho azedo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n.145, p. 63-68, jan 1987.
- CONWAY, P. L. Selection criteria for probiotics microorganisms. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, Victoria, v.5, p. 10-14 1996.
- COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 491-503, 1999.
- DUNBAR, J.; WHITE, S.; FORNEY, L.J. Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington., v.63, n.4, p.1326-1331, Apr. 1997.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.56, p. 297–314, 2004.

GIRAFFA, G.; NEVIANI, E.. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.67, n. 1-2, p.19-34, July 2001.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: ELSAS, J.D. van; WELLINGTON, E.M.H.; TREVORS, J.T.; DEKKER, M. (Ed.). **Modern Soil Microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.353-373.

LACERDA, I.C.A.; MIRANDA, R.L.; BORELLI, B.M.; NUNES, A.C.; NARDI, R.M.D.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.105, n.5, p. 213–219, Apr. 2005.

LANE, D.L.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 82, n.20, p. 6955-6959, Oct. 1985.

MCKAY, L. L.; BALDWIN, K. A. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.87, n.1-2, p. 3–14, Sept. 1990.

MELATTI, J.C. **Índios do Brasil**. São Paulo: Hucitec, 1983.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.73, n.1, p. 127-141, Jan. 1998.

NOOT, M. J. R.; MOTARJEMI, Y. Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop. **Food Control**, London, v. 8, n.5, p. 221–226, Oct. 1997.

- OYEWOLE, O. B. Lactic fermented foods in Africa and their benefits. **Food Control**, London, v. 8, n.5, p. 289–297, Oct. 1997.
- PARVEEN, S.; HAFIZ, F. Fermented Cereal from Indigenous Raw Materials. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v.2, n.5, p. 289-291, 2003.
- RIBEIRO, D. **Os índios e a civilização**: a integração das populações indígenas no Brasil moderno. Petrópolis: Vozes, 1982. p. 509.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: MELLO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. (Ed.). **Genética e melhoramento de microrganismos**. São Paulo: USP, 2002. p. 97-128.
- SCHWAN, R.F.; ALMEIDA, E.G.; SOUZA-DIAS, M.A.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 7, n.6, p. 966-972, Sept. 2007.
- SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; MYERS, R.M. Attachment of a 40bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 86, n.1, p. 232-236, Jan. 1989.
- SIMANGO, C. Potential use of traditional fermented foods for weaning in Zimbabwe. **Journal of Social Science and Medicine**, London, v. 44, n.6, p. 1065–1068, 1997.
- SONI, S. K.; SANDHU, D. K. Indian fermented foods: microbiological and biochemical aspects. **Indian Journal of Microbiology**, London, v. 30, p. 135–157, 1990.
- STAHL, D.A. Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. In HUST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McINERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WATER, M.W. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: ASM, 1997. p. 102-114.
- STEINKRAUS, K. H. Bio-enrichment: production of vitamins in fermented foods. In: WOOD, J. B. (Ed.). **Microbiology of fermented foods**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p. 603–619.

STEINKRAUS, K. H.; AYRES, R.; OLEK, A.; FARR, D. Biochemistry of Saccharomyces. In: STEINKRAUS, K.H. (Ed.). **Handbook of indigenous fermented foods**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 517–519.

WAGLEY, C. **Lágrimas de boas vindas: os índios Tapirapé do Brasil Central**. São Paulo: USP, 1988.

CAPÍTULO II

MICROBIOTA DA BEBIDA FERMENTADA DE ARROZ COM AMENDOIM PRODUZIDA PELOS ÍNDIOS BRASILEIROS

RESUMO

O cauim é uma bebida não alcoólica produzida pelos índios Tapirapé a partir dos mais diversos substratos como mandioca, arroz, amendoim, semente de algodão, abóbora, milho entre outros. Amostras de cauim produzido a partir de amendoim com arroz foram coletadas a cada 8h de fermentação para isolamento e identificação da microbiota presente na bebida. A população bacteriana variou de 7,4 a 8,4 log UFC/ml, enquanto que a de levedura variou de 4,0 a 6,6 log UFC/ml. Ao todo, 198 estirpes de bactérias foi isoladas e identificadas. As bactérias foram agrupadas em Gram-negativas (21,2%), Gram-positivas catalase negativa (42,9%) e Gram-positivas catalase positiva (35,9,0%). Os *Lactobacillus* foram dominantes durante todo o processo de fermentação. Em relação às leveduras, 82 estirpes foram isoladas e identificadas. Foram encontradas espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodospodium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Torulaspora*. Análise de DGGE foi realizada com o objetivo de observar a dinâmica das comunidades de bactérias e fungos. Foi possível observar que as comunidades microbianas se alteraram durante todo o processo fermentativo.

Palavras-chave: cauim, *Lactobacillus*, alimento fermentado, DGGE.

¹ Comitê Orientador: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Orientador); Rosane Freitas Schwan – UFLA (Co-orientador); Patrícia Gomes Cardoso – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

Cauim is a nonalcoholic beverage made by Tapirapé Amerindians from several substrates such as: cassava, rice, peanuts, cotton seeds, pumpkin, maize. Samples of cauim produced from peanuts and rice were collected at 8 h intervals for microbiological analysis. The bacteria population varied from 7.4 to 8.4 log cfu/mL. The yeast population varied from 4.0 to 6.6 log cfu/mL. A total of 198 bacteria were isolated and identified. All the isolates were grouped into Gram-negative (21.2%), Gram-positive negative-catalase (42.9%) and Gram positive positive-catalase (35.9%). The *Lactobacillus* genus was dominant throughout fermentation. A total of 82 yeast strains were isolated and identified. Yeast of genera *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* and *Torulasporea* were found. DGGE analysis were performed and it was possible to observe the dynamic of bacteria and yeast community. The microbial community modified during all stages of fermentation.

Keywords: Cauim, *Lactobacillus*, fermented food, DGGE

² Guidance Committee: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Major Professor); Rosane Freitas Schwan – UFLA; Patrícia Gomes Cardoso – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Formatado: Início da seção:
Contínuo, Distância do
cabeçalho da margem: 0 cm,
Distância do rodapé da
margem: 3,3 cm

A fermentação é normalmente um processo desejável através do qual dá-se a modificação de um alimento primário em decorrência da atividade de microrganismos e suas enzimas. Este processo é realizado em todas as partes do mundo e pode realçar as propriedades dos alimentos como sabor, textura, valor nutricional assim como a vida de prateleira (Oyewole, 1997). A preparação de muitos alimentos fermentados tradicionais ou espontâneos à base de cereais é realizada pela fermentação natural envolvendo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. As bactérias pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bacillus* são geralmente identificadas em produtos fermentados a partir de cereais (Steinkraus, 1998). As leveduras frequentemente encontradas são espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Geotrichum* e *Torulopsis* (Gotcheva et al., 2000).

A diversidade de alimentos fermentados consumidos é grande. Blandino et al. (2003) relataram mais de 80 alimentos e bebidas fermentados a partir de cereais.

Os conhecimentos dos índios que habitam o Brasil sobre a produção de alimentos fermentados devem ser documentados. Várias tribos brasileiras (Araweté, Kayapó, Karajá, Javaé e Tapirapé) utilizam a fermentação em pequena escala para a preparação de alimentos (Wagley, 1988). Estas tribos utilizam processos fermentativos para produzir alimentos e bebidas com alto valor nutricional, estimulantes, com fins medicinais e também religiosos (Wagley, 1988). A produção destes alimentos e bebidas é baseada em conhecimentos empíricos antigos que são transferidos de geração para geração (Melatti, 1983).

O cauim (*kawí*) é uma bebida fermentada e não alcoólica produzida pelos índios brasileiros a partir de diversos substratos: arroz, mandioca, milho, amendoim, semente de algodão, banana, abóbora, entre outros. A preparação da bebida indígena envolve um cozimento prolongado dos substratos e exposição a enzimas salivares como um método primitivo de iniciar a quebra do amido (amilase) em açúcares que são conseqüentemente utilizados pelos microrganismos que iniciam o processo fermentativo (Almeida et al., 2007). As interações entre os microrganismos não são controladas durante o processo, o que leva a variações na qualidade e estabilidade do produto.

Métodos tradicionais para a identificação de microrganismos são amplamente utilizados por muitos autores (Gotcheva et al., 2000; Muyanja et al., 2003; Almeida et al. 2007; Schwan et al., 2007; Kofi et al., 1995; Fagbemi et al., 2006). Estas técnicas tradicionais consistem em um grande número de testes, consumindo muito tempo para a identificação (Deak et al., 1993). Tradicionalmente, os microrganismos são cultivados e então caracterizados por suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. Estes métodos possuem desvantagens devido à impossibilidade de alguns microrganismos serem isolados e cultivados. Estima-se que menos de 1% das bactérias do ambiente natural são cultivadas (Amann et al., 1995). Novas ferramentas surgiram, como a aplicação de técnicas de Biologia Molecular, facilitando a identificação dos microrganismos.

Técnicas moleculares como a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) oferecem uma alternativa rápida para a investigação da microbiota envolvida no processo fermentativo e também permitem a detecção de organismos que não podem ser cultivados pelas técnicas convencionais (Muyzer & Smalla, 1998; Giraffa & Neviani, 2001). A técnica de PCR-DGGE detecta 90 a 99% das mais numerosas espécies de uma comunidade, não discriminando células mortas de vivas, sem a realização do cultivo (Meroth et

al., 2003). DGGE é uma técnica baseada na separação de fragmentos de DNA específicos e de mesmo tamanho de amplicons, derivados do PCR, em um gel de poliacrilamida contendo um aumento linear da concentração de desnaturante (uréia e formamida) (Muyzer & Smalla, 1998). Nos últimos anos, a técnica de DGGE vem sendo empregada para conhecer a dinâmica dos microrganismos em produtos fermentados tais como vinho, fermentados de mandioca, massa de milho, grãos de café e cacau (Ampe & Miambi, 2000; Cocolin et al., 2000; Masoud et al., 2004; Prakitchaiwattana et al., 2004; Nielsen et al., 2007a).

Pouco se sabe sobre a diversidade microbiana presente durante a fermentação da bebida indígena cauim e o conhecimento da população microbiana desta bebida é de grande importância para estudos futuros. Neste trabalho, a microbiota envolvida na fermentação do cauim produzido a partir de amendoim com arroz foi identificada por técnicas tradicionais durante o processo de fermentação. Foi empregada a técnica molecular PCR-DGGE para determinar o perfil da comunidade de bactérias e leveduras durante o processo de fermentação da bebida cauim.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cauim

O cauim foi preparado pelos índios Tapirapé, da tribo Tapi'itãwa, situada próximo à montanha Urubu Branco (Mato Grosso, Brasil) localizada 10,8° S e 51,3° O, no extremo norte do estado do Mato Grosso. Os índios prepararam o cauim a partir de amendoim com arroz. Foram utilizados 2,5 kg de amendoim, 5 kg de arroz e aproximadamente 10 L de água. Esta mistura foi cozida até obter uma distribuição uniforme do substrato. O líquido da mastigação de batata doce, obtido pela índia, foi utilizado como inóculo, introduzindo microrganismos junto com a saliva. Deixou-se toda mistura fermentar em um recipiente aberto por 48h à temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C) para obtenção do produto final. O preparo da bebida é ilustrado no fluxograma (Figura 1).

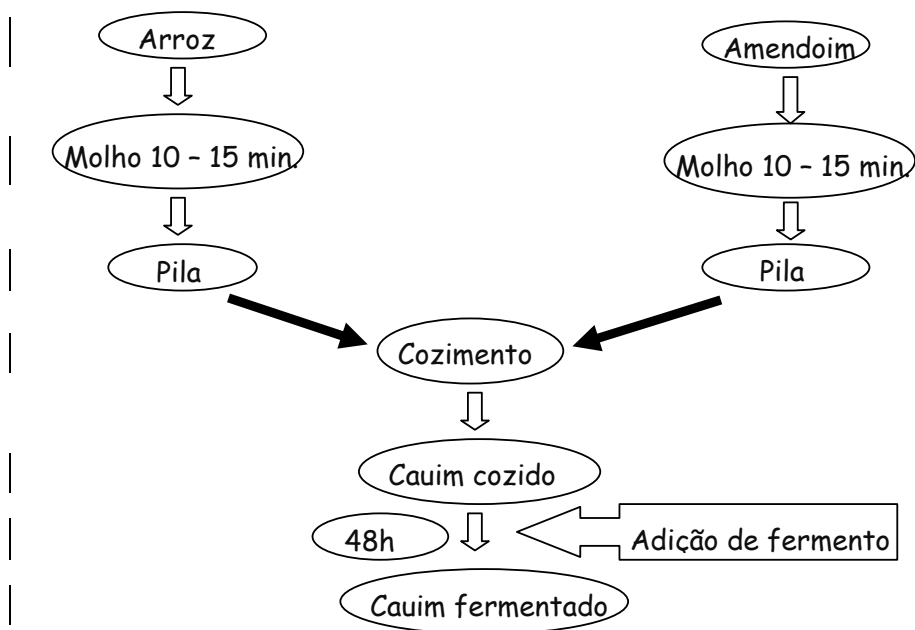


FIGURA 1 Fluxograma ilustrando o preparo da bebida cauim, fermentada a partir de amendoim com arroz. O fermento corresponde ao líquido da mastigação da batata-doce juntamente com a saliva.

2.2 Amostragem

As amostras foram obtidas assepticamente a cada 8h. Para cada amostra, foram coletados 20 ml do substrato cozido e fermentado em um frasco contendo 180 ml de solução peptonada (0,1% de peptona, 0,5% de NaCl e 0,03% de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$). Todas as amostras foram mantidas congeladas ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) até a realização das análises.

2.3 Isolamento e Identificação

2.3.1 Contagem dos microrganismos

Excluído: ¶

As amostras foram homogeneizadas e as diluições foram preparadas. Aliquota de 0,1 ml de cada diluição foi plaqueada em três meios de cultura diferentes: Agar Nutriente (AN) para contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais, De Man Rogosa Sharpe (MRS) pH 6,0 (em m/v: peptona bacteriológica 1%, extrato de carne 0,8%, extrato de levedura 0,4%, glicose 2%, Tween 80 0,1%, K₂HPO₄ 0,2%, acetato de sódio 0,3%, citrato de amônia 0,2%, sulfato de magnésio 0,001%, sulfato de manganês 0,0036%) para contagem de bactérias do ácido lático e Yeast Extract Peptone Glucose Agar (YEPG) pH 3,5 (em m/v: extrato de levedura 1%, peptona 1%, glicose 2% e Agar 1,3%) para contagem de leveduras. Após o plaqueamento, foram incubadas a 28°C por 2 dias para o crescimento das bactérias e por 5 dias para o crescimento de leveduras. Após a incubação, a contagem foi realizada e 280 colônias foram isoladas e purificadas.

2.3.2 Identificação das bactérias

As bactérias Gram-negativas foram identificadas utilizando-se os kits Bac-Tray I, II e III (Difco), conforme as instruções do fabricante.

As bactérias Gram-positivas foram subdivididas em dois grupos: catalase positiva e catalase negativa. A identificação subsequente das espécies foi realizada por testes bioquímicos, esporulação e motilidade como recomendado pelo “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” e “The Prokaryotes”.

Os *Lactobacillus* presuntivos foram contados em meio MRS. Os isolados foram examinados pela aparência da colônia e da célula, atividade da catalase, coloração de Gram, motilidade e produção de CO₂ a partir de glicose em caldo MRS contendo um tubo de Durham. Para identificação das espécies,

foram realizados testes de fermentação de carboidratos e crescimento a 15 e 45°C respectivamente.

Os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Corynebacterium* foram submetidos aos testes de atividade da catalase, coloração de Gram, motilidade e esporulação. Para a identificação das espécies; testes de fermentação em carboidratos, redução do nitrato, atividade da urease, Voges-Proskauer (VP), tirosina, atividade da amilase e esculina foram realizados.

2.3.3 Identificação das leveduras

As leveduras isoladas foram identificadas empregando-se testes convencionais como a habilidade de fermentar açúcares, assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, produção de ácido, crescimento em diferentes temperaturas e teste DBB (diazonium blue B), conforme descrito por Barnett et al. (2000) e Kurtzman & Fell (1998).

A habilidade das leveduras de fermentarem açúcares foi detectada pela avaliação da produção de gás CO₂ pelas culturas. Uma solução filtro-esterilizada (0,6 ml) de açúcar 0,25 M (glicose, galactose, sacarose, maltose, metil- α -D-glucoside, rafinose, melibiose, celobiose e xilose) foi adicionada a 2,4 mL de peptona de soja (0,75 % m/v), extrato de levedura (0,5 % m/v) e azul de bromotimol (0,04 % m/v); contendo cada tubo, um tubo de Durham invertido. Uma suspensão de células de leveduras (0,15 ml) foi adicionada em cada tubo e estes foram incubados a 28° C.

O teste de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio pelas leveduras foi realizado utilizando-se o método do carimbo, isto é, uma placa de ferro estéril com 21 perfurações; a suspensão de células foi adicionada em cada perfuração e então inoculada nas placas.

A produção de ácido foi avaliada pela formação de halo em volta da colônia cultivada em meio contendo glicose (5% m/v), carbonato de cálcio

(0,5% m/v), extrato de levedura (0,5% m/v) e Agar (2% m/v). O crescimento das leveduras foi observado em placas contendo meio YEPD incubadas a 25, 30, 35, 35,9, 40 e 45 °C. Os resultados de todos os testes descritos foram observados após 1, 2, 3, 7, 14 e 21 dias de incubação.

O teste DBB foi avaliado pela mudança de cor da colônia crescida por 10 dias ao gotear a solução de DBB sobre elas. O meio utilizado para o crescimento foi o YW pH 3,5 (extrato de levedura 0,3% m/v, extrato de malte 0,3% m/v, peptona 0,5% m/v, glicose 1,0% m/v e Agar 1,2% m/v).

2.4 Extração do DNA

O DNA total foi extraído das amostras coletadas em diferentes tempos de fermentação, conforme o protocolo descrito por Ampe et al. (1999) modificado. 1,5 mL de cada amostra da bebida foram centrifugados em tubos de 2 ml a 13000 rpm, durante 4 min (este passo foi repetido 5 vezes). O precipitado obtido foi ressuscitado em 400 µL de tampão TES (50 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA; 8,56% (m/v) sacarose). Um volume de 20 µL de lisozima (20 µg/µl) foi adicionado em cada tubo de amostra e incubados por 30 min a 37 °C. Cinco microlitros de proteinase K (10 mg/mL) foram adicionados e os tubos foram incubados por 1h a 50 °C e depois por 10 min a 65 °C. Duzentos microlitros de tampão (0,2 M NaCl, 0,1 M Tris-HCL pH 8, 2% SDS) a 65 °C foram adicionados aos tubos e incubados por 30 min a 65 °C. Após a incubação, 200 µl de NaCl 5 M foram adicionados e então incubados por 10 min a 4 °C. Essa mistura foi centrifugada durante 15 min a 13000 rpm e a 4°C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 400 µL de isopropanol a -20°C por 2 h. O pellet foi recuperado centrifugando por 30 min a 13000 rpm e 4 °C. Lavado com etanol 70%, ressuscitou-se o pellet em 500 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8). Quinhentos microlitros de fenol:clorofórmio (1:1) foram adicionados e centrifugados a 13000 rpm à temperatura ambiente por 10

al., 2006). A mistura de PCR conteve 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,5 µL de tampão 10x buffer, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µL de DNA extraído de cada amostra de cauim em um volume final de reação de 25 µL. A reação consistiu de 35 ciclos: desnaturação foi a 95°C por 60 s, o anelamento dos *primers* foi a 55°C por 60 s e a extensão a 72°C por 60 s. Uma desnaturação inicial de 5 min a 95°C e uma extensão final de 7 min a 72°C foram realizadas. A qualidade dos produtos foi observada em gel de agarose 1,5 %.

2.6 DGGE

Seguindo os procedimentos já descritos por Muyzer et al. (1993) e utilizando um sistema vertical DCode (Bio-Rad), os produtos do PCR foram então analisados por DGGE. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8% (m/v) em tampão 0,5X TAE com gradiente de desnaturação variando de 15 a 55% para a comunidade bacteriana e 12 a 50% para a comunidade fúngica (100% correspondeu a 7 M de uréia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em uma voltagem constante de 200 V por 3h com uma temperatura constante de 60°C. Após a eletroforese, os géis foram corados com SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000 (v/v)) por 30 min e a imagem foi capturada por varredura, utilizando-se o densitômetro laser FluorImager e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences).

2.7 Análises estatísticas

A similaridade da composição das comunidades microbianas nas diferentes horas de fermentação foi determinada com base na presença ou na ausência de amplicons detectados após DGGE. Os géis foram analisados utilizando-se o programa Diversity Database para determinação da riqueza de

Excluído: ¶

amplicons (Sa). Utilizando-se o algoritmo de Ward e a distância euclidiana como unidade de medida, o agrupamento hierárquico foi realizado através do programa Systat 8.0, com base em matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (“simple matching”).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Associações de bactérias ácido-láticas e leveduras são responsáveis pela fermentação espontânea de muitos alimentos fermentados à base de cereais (Gotcheva et al., 2000). Espécies de *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Torulaspora* foram encontradas neste trabalho. Espécies destes gêneros já foram descritas em outros alimentos fermentados como boza, uma bebida fermentada a partir de cereais e consumida na Turquia, Albânia e Romênia (Gotcheva et al., 2000); na bebida fermentada tradicional da Uganda, chamada bushera (Muyanja et al., 2003), em alimento fermentado a partir de mandioca, como o cauim (Almeida et al. 2007; Schwan et al., 2007), agbelima (Kofi et al., 1995), fufu (Fagbemi et al., 2006) e no sekete, uma bebida alcoólica produzida a partir da fermentação do milho (Sanii, 1993).

A contagem total dos microrganismos foi realizada para os diferentes grupos e é apresentada na Figura 2. Um total de 280 isolados de bactérias e leveduras foi obtido do cauim produzido a partir de amendoim com arroz.

Bactérias e leveduras estavam presentes durante todo o processo fermentativo (Figura 2). Nout & Sarkar (1999) sugeriram que o desenvolvimento de leveduras nos alimentos fermentados é favorecido pela acidificação do ambiente criado pelas bactérias e que o crescimento das bactérias é estimulado pela presença das leveduras, que podem proporcionar fatores de crescimento como vitaminas e compostos de nitrogênio solúveis. A produção de ácidos e outros componentes antimicrobianos durante a fermentação podem promover a segurança e estabilidade do produto final.

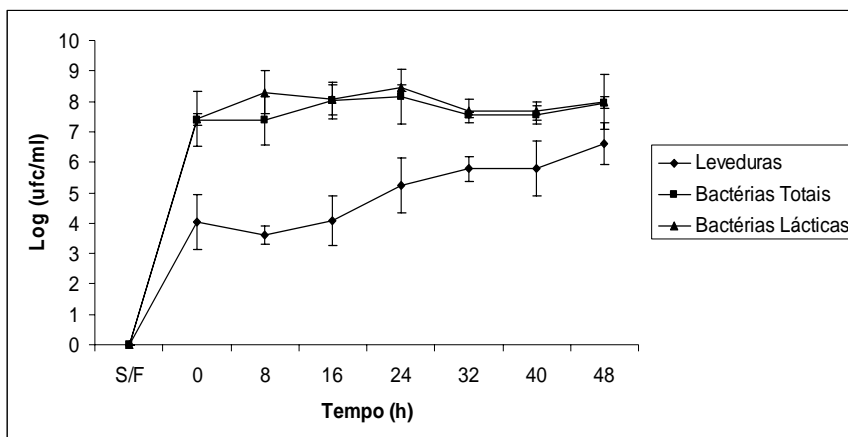


FIGURA 2 População microbiana (log/UFC) presente durante a fermentação de amendoim com arroz.

Formatado: Recuo: A esquerda: 0 cm, Deslocamento: 2 cm

3.1 Identificação das bactérias

Neste trabalho, 198 isolados de bactérias foram obtidos e identificados das amostras de cauíim produzido a partir de amendoim com arroz. A contagem total de bactérias variou de 7,4 a 8,4 log UFC/ml (Figura 2). O número de bactérias foi mais abundante que o número de leveduras presentes durante todo o processo de fermentação. As bactérias isoladas foram classificadas em 3 grupos: Gram-negativa (21,2%), Gram-positiva catalase-negativa (42,9%) e Gram-positiva catalase-positiva (35,9,0%). As bactérias Gram-negativas e Gram-positivas catalase-positiva foram encontradas nas amostras durante toda a fermentação, sendo que algumas espécies estavam presentes no inóculo (líquido da mastigação da batata-doce). As bactérias Gram-positiva catalase-negativa foram encontradas após a adição do inóculo quando isolou-se o *Lactobacillus platarum*.

O isolamento e identificação do inóculo revelaram a presença de leveduras e bactérias (Tabela 1). Foi possível identificar isolados de bactérias Gram-negativas pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella* e *Shigella*. Todos estes isolados pertencem à família Enterobacteriaceae. As espécies *Enterobacter cloacae* e *Hafnia alvei* estavam presentes no inóculo e durante todo o processo de fermentação, enquanto a espécie *Klebsiella rhinoschleromatis* foi encontrada durante a fermentação, mas não no inóculo. *Klebsiella ozaenae* foi encontrada apenas no inóculo. *Klebsiella pneumoniae* e apenas um isolado de *Shigella boydii* foram encontrados nas primeiras horas de fermentação. Espécies pertencente à família Enterobacteriaceae são intolerantes a ácidos (Steinkraus, 1996). Resultados similares já foram descritos em outros produtos fermentados (Mbugua, 1984, Nche et al., 1994). Foi observado um declínio rápido no número de *Enterobacteriaceae* durante a produção de *kenkey*, uma massa fermentada de milho da Gana (Nche et al, 1994). A descrição segundo a qual o valor do pH em torno de 3,5-4,0 inibiu o crescimento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram-negativas (Mbugua, 1985; Chavan and Kadam, 1989; Nout, 1991; Steinkraus, 1996). Outras substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias ácido-láticas dominantes (Helander et al., 1997) em adição ao ácido láctico podem também contribuir para a inibição de enterobacteriaceae (Mensah et al., 1991; Nche et al., 1994).

Estas espécies de bactérias Gram-negativas encontradas são freqüentemente descritas em publicações sobre o aspecto clínico. Suas funções ecológicas e ambientais são raramente estabelecidas. As espécies de *Enterobacter*, *Hafnia* and *Shigella* são facilmente encontradas no ambiente (água, solo). Isto pode explicar sua presença no cauim, já que seu preparo é rudimentar e não possui controle de assepsia. Almeida et al. (2007) isolaram

espécies do gênero *Enterobacter* em cauim de mandioca. Fagbemi & Ijah (2006) encontraram espécies de *Klebsiella* no fufu.

O grupo de bactérias Gram-positivas catalase-negativa foram classificadas como *Lactobacillus*. Este gênero compreendeu o maior número de isolados, sendo identificadas 15 espécies diferentes na fermentação do cauim, incluindo-se as espécies *L. pentosus* (1) e *L. plantarum* (8). Almeida et al. (2007) encontraram estas mesmas espécies no cauim produzido a partir de mandioca. As espécies isoladas no cauim de amendoim com arroz foram (Tabela 1): *L. confusus* (20), *L. viridescens* (17), *L. fermentum* (13), *L. plantarum* (8), *L. homohiochii* (7) e *L. paracasei* ssp. *paracasei* (7). Outras espécies isoladas foram menos freqüentes: *L. sake* (3), *L. salivarius* (2), *L. sanfranciseo* (2), *L. brevis* (1), *L. jensenii* (1), *L. collinoides* (1), *L. celobiosus* (1), *L. pentosus* (1) e *L. agilis* (1). De origem Búlgara, o boza, uma bebida fermentada à base de cereais, Gotcheva et al. (2000) identificaram a microbiota presente e observaram a presença de *L. plantarum*. Esta espécie vem sendo descrita em muitos alimentos fermentados à base de cereais como Ogi, Uji, Boza, Gari, Agbelina, polpa fermentada de masau e cauim (Halm et al., 1993; Sanni, 1993; Holzapfel, 1997; Oyewole, 1997; Gotcheva et al., 2000; Kosinek et al., 2005; Amoa-Awua et al., 2005; Nyanga et al., 2007; Almeida et al., 2007). A predominância de bactérias ácido-láticas é comum em alimentos fermentados devido à tolerância ao baixo pH (Abriouel et al., 2006).

Estudos com certos isolados de *L. plantarum* e *L. sanfranciseo* têm atribuído atividade antifúngica a estas espécies (Strom et al., 2002; Corsetti et al., 1998). Efeitos probióticos vêm sendo descrito para as espécies de *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. cellobiosus*, *L. plantarum* e *L. brevis* (Blandino et al., 2003).

Outro grupo de bactérias detectadas durante o processo fermentativo foram as Gram-positivas com atividade da catalase-positiva. Este grupo foi

identificado como *Corynebacterium*, compreendendo 71 isolados. As espécies aqui identificadas foram *C. amycolatum* (37), *C. striatum* (22), *C. minutissimum* (9), *C. colunae* (1), *C. vitarumen* (1) e *C. paurometabolum* (1) (Tabela 1). A maioria das espécies do gênero *Corynebacterium* encontradas na fermentação do cauim estava presente no líquido da mastigação da batata-doce, sendo, provavelmente, proveniente deste inóculo peculiar. As espécies de *Corynebacterium amycolatum* e *C. vitarumen* foram reportadas por Almeida et al. (2007) em cauim produzido a partir de mandioca. Fagbemi & Ijah (2006) também descreveram a presença de *Corynebacterium* no fufu, um alimento fermentado de mandioca.

TABELA 1 Bactérias Gram-positiva e Gram-negativa isoladas durante as 48 horas de fermentação do cauim produzido a partir de arroz com amendoim.

Tempo (h)	Bactérias isoladas	
	Gram-positiva	Gram-negativa
I	<i>Lactobacillus plantrum</i> (2), <i>Corynebacterium striatum</i> (4), <i>C. amycolatum</i> (20), <i>C. vitarumen</i> (1), <i>C. minutissimum</i> (3), <i>C. paurometabolum</i> (1)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2), <i>Klebsiella ozaenae</i> (2), <i>Hafnia alvei</i> (2)
S/I		
0	<i>L. confusus</i> (4), <i>L. fermentum</i> (3), <i>L. plantarum</i> (1), <i>L. paracasei ssp paracasei</i> (2), <i>L. viridescens</i> (4), <i>L. homohiochii</i> (1), <i>L. salivarius</i> (1), <i>L. sanfranciseo</i> (1), <i>L. brevis</i> (1), <i>L. jensenii</i> (1), <i>L. collinoides</i> (1)	<i>K. pneumoniae</i> (2), <i>K. rhinoschleromatis</i> (5)
8	<i>L. confusus</i> (3), <i>L. fermentum</i> (3), <i>L. celobiosus</i> (1), <i>L. paracasei ssp paracasei</i> (1), <i>L. viridescens</i> (4), <i>L. homohiochii</i> (1), <i>C. amycolatum</i> (2)	<i>K. pneumoniae</i> (3), <i>K. rhinoschleromatis</i> (3), <i>Shigella boydii</i> Grupo C (1)

... continua ...

TABELA 1 Cont.

16	<i>L. confusus</i> (3), <i>L. fermentum</i> (1), <i>L. K. rhinoschleromatis</i> (2) <i>viridescens</i> (1), <i>C. striatum</i> (1)	<i>E. cloacae</i> (2)
24	<i>L. confusus</i> (3), <i>L. fermentum</i> (1), <i>L. K. rhinoschleromatis</i> (2) <i>plantarum</i> (1), <i>L. paracasei ssp paracasei</i> (1), <i>E. cloacae</i> (2) <i>L. viridescens</i> (2), <i>L. homohiochii</i> (1), <i>L. sake</i> (1), <i>C. striatum</i> (3), <i>C. amycolatum</i> (2)	
32	<i>L. confusus</i> (4), <i>L. fermentum</i> (3), <i>L. K. rhinoschleromatis</i> (1) <i>viridescens</i> (2), <i>L. sanfranciseo</i> (1), <i>L. E. cloacae</i> (2) <i>pentosus</i> (1), <i>C. striatum</i> (4), <i>C. colunae</i> (1)	<i>H. alvei</i> (5)
40	<i>L. confusus</i> (3), <i>L. fermentum</i> (1), <i>L. K. rhinoschleromatis</i> (1) <i>plantarum</i> (1), <i>L. paracasei ssp paracasei</i> (1), <i>E. cloacae</i> (2) <i>L. viridescens</i> (2), <i>L. homohiochii</i> (1), <i>L. sake</i> (1), <i>C. striatum</i> (3), <i>C. amycolatum</i> (2), <i>C.</i> <i>minutissimum</i> (1)	
48	<i>L. fermentum</i> (1), <i>L. plantarum</i> (3), <i>L. H. alvei</i> (3) <i>paracasei ssp paracasei</i> (2), <i>L. viridescens</i> (2), <i>L. homohiochii</i> (3), <i>L. salivarius</i> (1), <i>L.</i> <i>sake</i> (1), <i>L. agilis</i> (1), <i>C. striatum</i> (7), <i>C.</i> <i>amycolatum</i> (11), <i>C. minutissimum</i> (5)	

() número de isolados

Excluído: c

Formatado: Cor da fonte:
Preto

3.2 Identificação das leveduras

Um total de 82 isolados de leveduras foram obtidos e identificados durante o processo de fermentação do cauim. A contagem de leveduras variou de 4.0 a 6.6 log UFC/ml durante as 48 horas de fermentação (**Fig. 2**). Schwan et al. (2007) observaram resultados similares nesta mesma bebida produzida pelos índios Tapirapé do Brasil; fermentada a partir de arroz com mandioca. Foi possível identificar espécies de leveduras pertencendo a 10 diferentes gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Torulaspora*.

Formatado: Recuo: Primeira
linha: 1,25 cm

As espécies de leveduras mais freqüentemente isoladas foram *Pichia guilliermondii* (24,4%), *Candida* sp (24,4%) e *Rhodospodium toruloides* (18,3%). Outras espécies isoladas com menor freqüência foram: *Candida albicans* (6,1%), *Saccharomyces cerevisiae* (4,9%), *Candida membranifaciens* (3,7%), *Rhodotorula minuta* (3,7%), *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (3,7%), *Torulaspora delbrueckii* (2,4%), *Rhodotorula mucilaginosa* (2,4%), *Cryptococcus laurentii* (2,4%), *Candida sake* (1,2%), *Debaryomyces occidentalis* var. *occidentalis* (1,2%), *Metschnikowia pulcherrima* (1,2%). Todas as espécies encontradas já foram isoladas em alimentos fermentados. Em seu trabalho, Schwan et al. (2007) isolaram as espécies de *C. tropicalis* (26%), *P. guilliermondii* (22%), *C. intermedia* (17%) e *S. cerevisiae* (11%). Leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula* também foram identificadas na fermentação de mandioca para produção do fufu (Fagbemi & Ijah, 2006). Ao estudarem os microrganismos do pozol, uma bebida não alcoólica produzida a partir de milho, Wachter et al. (2000) identificaram *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *K. lactis* var. *lactis*. As espécies *Rhodotorula mucilaginosa* e *P. guilliermondii* também foram encontradas na fermentação do boza (Botes et al., 2007). O *Rhodotorula mucilaginosa* tem sido relatado como patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos e associados a doenças como endocardites e meningites (Gómez-Lopes et al., 2005). *Candida albicans* também é uma levedura oportunista, causadora da candidíase e pode ser relacionada à cavidade oral, sendo também encontrada no cauim de amendoim com arroz. A espécie *P. guilliermondii* é encontrada em diversos habitats naturais como água e solo. É possível que as leveduras presentes no cauim possam ter originado do ambiente, ou de objetos utilizados para a produção da bebida ou ainda do inóculo.

As espécies *P. guilliermondii*, *Candida* sp, *Rhodospodium toruloides*, *C. membranifaciens*, *C. albicans*, *Rhodotorula minuta*, *K. lactis* var. *lactis* e *T.*

delbrueckii estavam presentes no inóculo, sendo que destas, apenas *C. albicans* e *K. lactis* var. *lactis* não foram detectadas novamente no processo fermentativo. A espécie *S. cerevisiae* foi observada após a inoculação no substrato cozido. Isolados de *D. occidentalis* var. *occidentalis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *C. sake* foram observados após 24 horas de fermentação. Após 32 horas, foi possível observar a presença de *Cryptococcus laurentii* e após 40 horas notou-se a presença de *M. pulcherrima* (Tabela 2).

TABELA 2 Distribuição dos isolados de leveduras durante as 48 horas de fermentação do cauim produzido a partir de arroz com amendoim e no inóculo da mastigação da batata-doce.

Tempo (h)	Leveduras isoladas
I	<i>Pichia guilliermondii</i> (16), <i>Candida</i> sp (15), <i>Rhodospordium toruloides</i> (12), <i>C. membranifaciens</i> (2), <i>C. albicans</i> (3), <i>Rhodotorula minuta</i> (3), <i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i> (3), <i>Torulaspota delbrueckii</i> (1)
S/I	-
TO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)
T8	-
T16	-
T24	<i>P. guilliermondii</i> (3), <i>Candida</i> sp (3), <i>Rhodospordium toruloides</i> (2), <i>Debaryomyces occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i> (1), <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (1), <i>C. sake</i> (1)
T32	<i>Candida</i> sp (2), <i>Cryptococcus laurentii</i> (1)
T40	<i>P. guilliermondii</i> (1), <i>Candida</i> sp (1), <i>Rhodospordium toruloides</i> (1), <i>C. membranifaciens</i> (1), <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (1), <i>S. cerevisiae</i> (2), <i>Metschnikowia pulcherrima</i> (1)
T48	<i>Candida</i> sp (1), <i>S. cerevisiae</i> (1), <i>Cryptococcus laurentii</i> (1), <i>T. delbrueckii</i> (1)

() número de isolados

3.3 DGGE

Estudos de identificação baseados no cultivo são laboriosos e demorados. Estudando microrganismos associados à fermentação de cacau, Nielsen et al. (2005) e Nielsen et al. (2007a) demonstraram que a técnica de DGGE é uma ferramenta eficiente para estudos de dinâmica de populações de microrganismos. Vários autores têm empregado esta técnica para o estudo dos microrganismos envolvidos na produção dos mais diversos alimentos fermentados (Ampe et al., 1999; Ampe et al., 2000, Haruta et al., 2006; Omar et al., 2000).

O DNA total das amostras obtidas de cauim foi utilizado como molde nas reações de PCR. Foram obtidos produtos de DNA com aproximadamente 180 pb, utilizando-se *primers* específicos para a comunidade bacteriana e, aproximadamente 390 pb, utilizando *primers* específicos para a comunidade fúngica.

A Figura 3 apresenta o gel de DGGE mostrando o perfil de fragmentos amplificados do gene 16S rRNA da comunidade bacteriana presente durante a fermentação do cauim de arroz com amendoim. A identificação dos fragmentos foi realizada pela co-migração dos fragmentos obtidos pelos isolados do cauim, e das amostras da bebida nos diferentes tempos de fermentação.

Os fragmentos identificados como *a,b,c,d,e,f* e *g* foram identificados como *L. confusus*, *L. viridescens*, *L. plantarum*, *L. homohiochii*, *L. fermentum*, *L. paracasei* ssp. *paracasei* e *L. brevis* respectivamente. As espécies *L. confusus* e *L. plantarum* surgiram a partir de 8 horas de fermentação, já a espécie *L. viridescens* foi identificada na bebida logo após a adição do inóculo. As espécies *L. homohiochii* e *L. fermentum* estavam presentes no inóculo e fazem parte da microbiota da bebida durante todo o processo de fermentação. Os fragmentos *f* e *g* correspondente às espécies *L. paracasei* ssp. *paracasei* e *L. brevis* respectivamente, foram observados na bebida antes da adição do inóculo, sendo

que *L. paracasei ssp paracasei* permaneceu durante todo o processo fermentativo.

De acordo com os resultados obtidos pela técnica de DGGE, todas as espécies identificadas foram dominantes durante todo o processo fermentativo do cauim de arroz com amendoim, com exceção do fragmento correspondente à espécie *L. brevis*, que aparece apenas na amostra que antecede a adição do inoculo. Utilizando-se a técnica tradicional baseada no cultivo, apenas no início da fermentação foi possível observar *L brevis*, na amostra logo após a adição do inóculo. Os resultados obtidos pela técnica de DGGE e pelo método tradicional baseado no cultivo tiveram boa correspondência, exceto pela ocorrência de alguns casos devido à diluição utilizada no método tradicional, ou devido à possibilidade de as espécies estarem em uma quantidade limitada tal que não puderam ser detectadas pela técnica de DGGE.

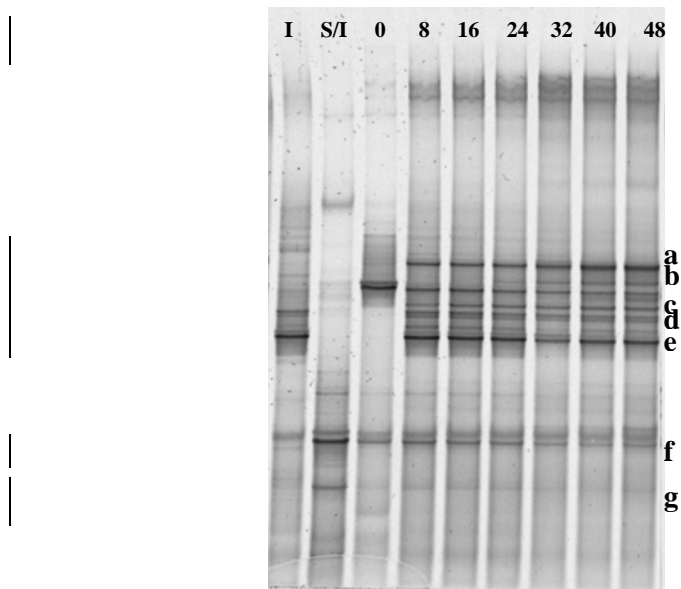


FIGURA 3 Gel de poliacrilamida de DGGE dos fragmentos de DNA do gene 16S rDNA amplificados com *primer* específico para a comunidade bacteriana das amostras do cauim durante 48h de fermentação. I = inóculo, S/I = sem inóculo, T0 = 0h, T8 = 8h, T16 = 16h, T24 = 24h, T32 = 32h, T40 = 40h, T48 = 48h.

Formatado: Recuo: A esquerda: 0 cm, Deslocamento: 2,1 cm

O gel de DGGE mostrando o perfil da comunidade de leveduras é ilustrado nas Figura 4. A identificação dos fragmentos foi realizada da mesma forma como foi a da comunidade bacteriana, ou seja, através da co-migração dos fragmentos obtidos em cada amostra e a partir dos isolados obtidos pela técnica tradicional baseada no cultivo. Os fragmentos *a*, *b*, *c*, *d*, *e* e *f* correspondem as espécies *Pichia guilliermondii*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Candida* sp, *Rhodospordium toruloides*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente. Todas as espécies identificadas pela técnica de DGGE foram detectadas no inóculo e predominaram durante toda a fermentação, à exceção de

C. albicans que não foi observada na bebida antes da adição do inóculo ou logo após a sua adição. Esta espécie pode ser notada na bebida após 8 horas de fermentação, sugerindo que o inóculo foi o responsável pela presença de *C. albicans* na bebida indígena cauim fermentada a partir de arroz com amendoim. Pela técnica tradicional baseada no cultivo, estes resultados não puderam ser notados. Uma razão para isto seria a diluição utilizada pela técnica tradicional baseada no cultivo, ou, ainda, a dificuldade do cultivo de determinados microrganismos.

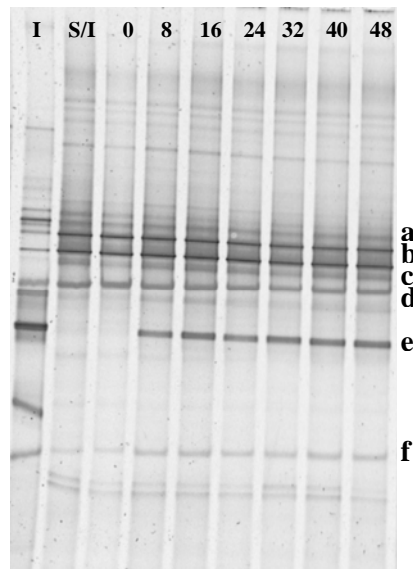


FIGURA 4 Gel de poliacrilamida de DGGE dos fragmentos de DNA do gene 18S rDNA amplificados com *primer* específico para a comunidade fúngica das amostras do cauíim durante 48h de fermentação. I = inóculo, S/I = sem inóculo, T0= 0h, T8 = 8h, T16 = 16h, T24 = 24h, T32 = 32h, T40 = 40h, T48 = 48 h.

Formatado: Recuo: A
esquerda: 0,31 cm,
Deslocamento: 2,1 cm

Em função da presença e da ausência de bandas detectadas nas diferentes horas de fermentação, a análise do agrupamento hierárquico é visualizada em forma de dendrograma (Fig. 5 e 6). O dendrograma indicou a presença de dois grupos distintos tanto para comunidade procariótica (Fig. 5) como para eucariótica (Fig. 6). O dendrograma da comunidade procariótica agrupou as amostras de saliva, bebida sem a adição do inóculo e bebida com 0 horas de fermentação (cauim cozido com a adição do fermento no início da fermentação) no primeiro grupo e as amostras a partir de 8h de fermentação, no segundo grupo. Já para a comunidade eucariótica, todas as amostras foram colocadas num mesmo grupo, com exceção da saliva. As amostras em horas próximas são mais semelhantes em relação à composição da microbiota. Resultados semelhantes puderam ser observado por Nielsen et al. (2007b), cujo trabalho analisou os microrganismos envolvidos na fermentação do cacau. Estes autores observaram que a dinâmica das comunidades microbianas se alterara durante o curso da fermentação.

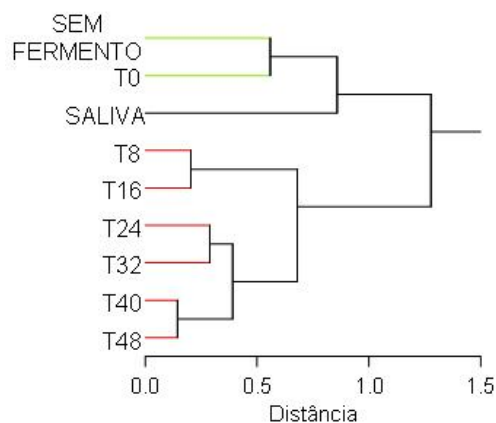


FIGURA 5 Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de bactérias presente nas 48h de fermentação do cauim. Sendo: T0 = 0h, T8 = 8h, T16 = 16h, T24 = 24h, T32 = 32h, T40 = 40h, T48 = 48h.

Formatado: Recuo: A esquerda: 0 cm, Deslocamento: 2,1 cm

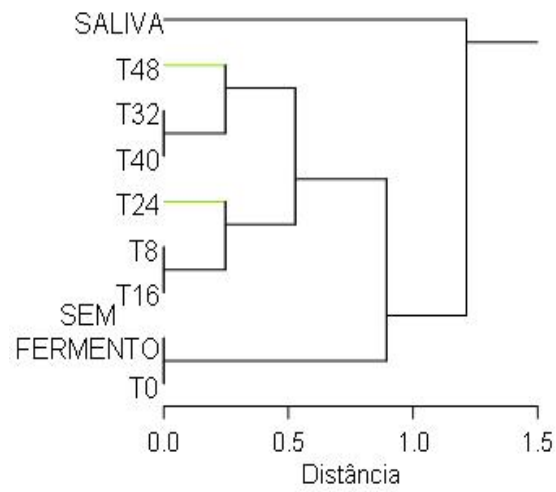


FIGURA 6 Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 18S de fungos presente nas 48 h de fermentação do cauim. Sendo: T0 = 0h, T8 = 8h, T16 = 16h, T24 = 24h, T32 = 32h, T40 = 40h, T48 = 48h.

Formatado: Recuo: A esquerda: 0 cm, Deslocamento: 2,1 cm

4 CONCLUSÃO

É importante conhecer os microrganismos envolvidos no processo de fermentação e sua dinâmica para a produção da bebida cauim com o objetivo de desenvolver uma bebida com maior qualidade. Assim sendo, o estudo da sua microbiota torna-se tão importante visto que a preparação do cauim pelos índios é rudimentar, higienicamente descuidada e desprovida do emprego de qualquer tecnologia.

A população microbiana foi maior para bactérias Gram positivas (55,7%), seguida por leveduras (29,3%) e bactérias Gram negativas (15%). Dentre todos os isolados, predominaram as bactérias Gram positivas catalase negativas (30,4%) pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, que são responsáveis pela produção de ácido láctico, influenciando seu aroma e sabor.

Pela técnica de DGGE, foi possível observar que, possivelmente, o número de espécies envolvidas na fermentação do cauim é maior do que o obtido pela técnica tradicional de isolamento.

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.G.; RACHID, C.C.T.C.; SCHWAN, R.F. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by brazilian amerindians. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.120, p.146-151, 2007.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Bethesda, v.59, p.143-169, Mar. 1995.
- AMOA-AWUA, W.K.A.; OWUSU, M.; FEGLO, P. Utilization of unfermented cassava flour for the production of an indigenous African fermented food, agbelima. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v.21, n.6-7, p.1201-1207, Oct. 2005.
- AMPE, F.; MIAMBI, E. Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.60, n.1, p.91-97, Sept. 2000.
- AMPE, F.; BEN OMAR, N.; MOIZAN, C.; WACHER, C.; GUYOT, J.P.. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a maize-fermented dough, demonstrates the need for cultivation-independents methods to investigate traditional fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.12, p. 5464-5473, 1999.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast**: characteristic and identification. 3. ed. Cambridge: Cambridge University, 2000. 1139p.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M.E.; PANDIELLA, S.S.; CANTERO, D.; WEBB, C.. Review: cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, Toronto, v.36, n.6, p.527-543, Apr. 2003.
- BOTES, A.; TODOROV, S.D.; VON MOLLENDORFF, J.W.; BOTHA, A.; DICKS, L.M.T.; Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. **Process Biochemistry**, Toronto, v.42, n.2, p.267-270, Feb. 2007.

- COCOLIN, L.; BISSON, L.F.; MILLS, D.A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, n.1, p.81–87, Aug. 2000.
- CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J.; DAMIANI, P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.50, p.253-256, 1998.
- DEAK, T.; BEUCHAT, L.R. Comparison of the SIM, API 20C, and ID 32C systems for identification of yeast isolated from fruit juice concentrates and beverages. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.56, p.585–592, July 1993.
- FAGBEMI, A.O.; IJAH, U.J.J. Microbial population and biochemical changes during production of protein-enriched fufu. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, London, v.22, p.635-640, 2006.
- GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.67, n.19-34, 2004.
- GOTCHEVA, V.; PANDIELLA, S.S.; ANGELOV, A.; ROSHKOVA, Z.G.; WEBB, C. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. **Process Biochemistry**, Toronto, v.36, n.1, p.127-130, Sept. 2000.
- HALM, M.; LILLIE, A.; SORENSEN, A.K.; JAKOBSEN, M. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. **International Journal Food Microbiology**, Copenhagen, v.19, n.2, p.135-143, July 1993.
- HARUTA, S.; UENO, S.; EGAWA, I.; HASHIGUCHI, K.; FUJII, A.; NAGANO, M.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.109, n.1-2, p.79-87, May 2006.
- HOLZAPFEL, W.H. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. **Food Control**, London, v.8, n.5, 241-258, Oct. 1997

KOSINEK, M.; SPECHT, I.; EDWARD, V.A.; SCHILLINGER, U.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W.H.; FRANZ, C.M.A.P. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. **Systematic and Applied Microbiology**, Zurich, v.28, n.6, p.527-540, 2005.

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

MASOUD, W.; CESAR, L.B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, New York, v.21, n.7, p. 549–556, May 2004.

MELATTI, J.C. **Índios do Brasil**. 48. ed. São Paulo: Hucitec, 1983. p. 220.

MEROTH, C.B., HAMMES, W.P., HERTEL, C. Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Stuttgart, v.69, n.12, p.7453-7461, Dec. 2003.

MUYANJA, C.M.B.K.; NARVHUS, J.A.; TREIMO, J.; TANGSRUD, T. Isolation, characterization and identification acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.80, n.3, p. 201-210, Feb. 2003.

MUYZER, G., SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.73, n.73, p.127-141, Jan. 1998

MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, Stuttgart, v.69, n.3, p.695–700, Mar. 1993

NIELSEN, D.S.; TENIOLA, O.D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T.S.; HOLZAPFEL, W.H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.114, n.2, p.168-186, Mar. 2007a.

- NIELSEN, D.S.; HØNHOLT, S.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations investigated using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). **Yeast**, New York, v.22, n.4, p.271-284, Mar. 2007b.
- NOUT, M.J.R.; SARKAR, P.K. Lactic acid fermentation in tropical climates. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.76, n.2-4, p.395-401, Nov. 1999
- NYANGA, L.K.; NOUT, M.J.R.; GADAGA, T.H.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; ZWIETERING, M.H. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.120, n.1-2, p.159-166, 2007
- OMAR, N.B.; AMPE, F. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough Pozol. **Applied and Environmental Microbiology**, Stuttgart, v.66, n.9, p.3664-3673, Sept. 2000.
- OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Stuttgart, v.63, n.9, p.3367-335, Sept. 1997.
- OYEWOLE, O.B. Lactic fermented foods in Africa and their benefits. **Food Control**, London, v.8, n.5, p.289-297, Oct. 1997.
- PRAKITCHAIWATTANA, C.J.; FLEET, G.H.; HEARD, G.M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyze the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v.4, n.8, p.865-877, Sept. 2004.
- SANNI, A.I. The need for process optimization of African fermented foods and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v.18, n.2, p.85-95, Apr. 1993
- SCHWAN, R.F.; ALMEIDA, E.G.; SOUZA-DIAS, M.A.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v.7, n.6, p.966-972, Sept. 2007.

STRÖM, K.; SJÖGREN, J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Stuttgart, v.68, n.9, p.4322-4327, Sept. 2002.

WACHER, C.; CAÑAS, A.; BÁRZANA, E.; LAPPE, P., ULLOA, M.; OWENS, J.D. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*, v.17, n.3, p.251-256, June 2000.

WAGLEY, C. **Lágrimas de boas vindas: os índios Tapirapé do Brasil Central**. São Paulo: USP, 1988. p. 160.

ZORBA, M.; HANCIOGLU, O.; GENÇ, M.; KARAPINAR, M.; OVA, G. The use of starter cultures in the fermentation of boza, a traditional Turkish beverage. **Process Biochemistry**, Toronto, v.38, n.10, p.1405-1411, May 2003.