



ANA LUIZA FREIRE

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS E
LEVEDURAS E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DA BEBIDA FERMENTADA *YAKUPA*
PRODUZIDA PELO POVO JURUNA (YUDJÁ),
MATO GROSSO, BRASIL**

LAVRAS – MG

2013

ANA LUIZA FREIRE

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURAS E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BEBIDA FERMENTADA
YAKUPA PRODUZIDA PELO POVO JURUNA (YUDJÁ), MATO
GROSSO, BRASIL**

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

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Freire, Ana Luiza.

Diversidade de bactérias lácticas e leveduras e caracterização físico-química da bebida fermentada *yakupa* produzida pelo Povo Juruna (Yudjá), Mato Grosso, Brasil / Ana Luiza Freire. – Lavras : UFLA, 2013.

72 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. PCR-DGGE. 2. HPLC. 3. GC-FID. 4. Bebida não alcoólica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.9

ANA LUIZA FREIRE

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURAS E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BEBIDA FERMENTADA
YAKUPA PRODUZIDA PELO POVO JURUNA (YUDJÁ), MATO
GROSSO, BRASIL**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2013.

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli UFLA

Dra. Maria Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan
Orientadora

**LAVRAS – MG
2013**

À minha família e ao amor da minha, e todos os amigos, mestres e colegas que me acompanharam sempre e estiveram envolvidos direta ou indiretamente na realização deste trabalho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por guiar meus passos e me manter forte para enfrentar todos os desafios e dificuldades, e por colocar em minha vida as pessoas certas.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela estrutura e excelência em ensino, possibilitando minha formação acadêmica, a realização do Mestrado e meu crescimento profissional.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela confiança, ensinamentos e oportunidades oferecidos. Agradeço pelo carinho, amizade e paciência desde a graduação, e por todo crescimento que obtive como sua aluna.

À todos os Mestres pelo conhecimento transmitido, em especial ao professor Dr. Whasley Ferreira Duarte por sua disponibilidade em sempre me ajudar, muitas vezes participando diretamente dos trabalhos realizados e sendo seus ensinamentos de grande importância para um trabalho de qualidade.

Aos professores Dr. Disney Ribeiro Dias e Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli pela participação e colaboração em minha banca de defesa.

À Dra. Maria Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel por toda a ajuda durante a realização deste trabalho, pela paciência, ensinamentos e amizade. Agradeço muito por sua disponibilidade.

À todos meu amigos e companheiros de laboratório, por toda ajuda, convivência e pelos momentos de descontração, em especial aos meus colegas de Mestrado 2011/2012.

À minha querida amiga Cíntia, por sua paciência imensurável, ajuda e ensinamentos desde a graduação. Agradeço muito por sua disposição em sempre me ajudar quando precisei com certeza você também possui méritos neste trabalho!

À Ivani pela amizade, paciência e disponibilidade em ajudar; às minhas grandes companheiras de laboratório Carol Colella, Mari Rabello, Cláudia Auler, Cláudia Puerari, pelo bom convívio e ajuda mútua.

À minha grande amiga Noelly Queiroz pelo prazer de conviver com uma pessoa tão especial e companheira, sempre disposta a ajudar. Agradeço por todos os momentos de descontração, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pelas palavras certas nos momentos de dúvida e pelo companheirismo durante esses dois anos.

Finalmente, agradeço às pessoas mais importantes da minha vida, que são meus pais, Maria José e Eduardo, meus irmãos Paulo Eduardo e Bianca, meus familiares e meu amor Renan, por serem meu porto seguro, pelo apoio e incentivo incondicional aos meus estudos e por todo amor, que me dá forças para continuar.

“Sejam quais forem os resultados com êxito ou não, o importante é que no final cada um possa dizer: ‘fiz o que pude’.”

Louis Pasteur

RESUMO

O *yakupa* é uma bebida não alcoólica preparada tradicionalmente pelos índios Juruna no Brasil, e é produzido a partir da fermentação espontânea de raízes de mandioca. Amostras da bebida foram microbiologicamente e quimicamente caracterizadas. A contagem microbiana foi realizada por plaqueamento das amostras em dois diferentes meios de cultura, ágar YEPG para as leveduras e ágar MRS (De Man Rogosa Sharpe, Merck) para as bactérias do ácido láctico (BAL). A dinâmica da população microbiana foi analisada por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE). Os compostos químicos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID). As populações de leveduras e BAL aumentaram até 36 h de fermentação permanecendo constante após esse período. A técnica de PCR-DGGE identificou as bactérias *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria* e *W. confusa* e as espécies de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* e *Pichia exiqua*. As espécies *L. fermentum* e *W. cibaria* foram as bactérias dominantes durante todo o processo fermentativo e responsáveis pela produção do ácido láctico e consequentemente pela redução do pH, o que favoreceu o crescimento de leveduras e a produção de etanol. Maltose (41,2 g/L), etanol (6,5 g/L) e ácido láctico (7,8 g/L) foram os compostos mais abundantes identificados por HPLC e 14 compostos voláteis foram identificados e quantificados por GC-FID. Os carboidratos, os ácidos butírico, nonanóico e decanóico, 1,3-butanodiol, acetato de 2-feniletila, 1,1-dietoxietano, acetaldeído e furfural foram associados, respectivamente ao substrato e a atividade microbiana no início do processo fermentativo, enquanto acetato de isobutila, acetato de etila, butirato, lactato de etila e 2-feniletanol foram relacionados com a atividade microbiana no final do processo. Concluindo, o *yakupa* é uma bebida ligeiramente ácida de consistência líquida e cor amarelada. LAB foram as bactérias dominantes durante as 60 h de fermentação e foram responsáveis pela presença do ácido láctico. *S. cerevisiae* foi a espécie de levedura dominante. Alguns compostos voláteis identificados, particularmente os ésteres, são considerados bons compostos aromáticos, os quais são responsáveis ou estão associados às propriedades sensoriais da bebida. Este foi o primeiro relato descrevendo a caracterização microbiológica e físico-química envolvida na bebida indígena fermentada *yakupa*.

Palavras-chave: *Yakupa*. Fermentação. PCR-DGGE. HPLC. GC-FID.

ABSTRACT

Yakupa is a non-alcoholic beverage traditionally prepared by the Juruna Indians in Brazil. It is produced from the spontaneous fermentation of cassava roots. Samples of this beverage were microbiologically and chemically characterized. The microbial count was performed by plating the samples in two different culture mediums: YEPG agar, for the yeast and MRS (De Man Rogosa Sharpe, Merck) agar for the lactic acid bacteria (LCB). The dynamics of the microbial population was analyzed by electrophoresis in gel with denaturing gradient (PCR-DGGE). The chemical compounds were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography with detection by flame ionization detection (GC-FID). The yeast population and LCB increased until 36 h of fermentation, remaining constant after this period. The PCR-DGGE technique identified the bacterial species *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria* and *W. confusa*. The yeasts identified were: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Pichia exigua*. Species *L. fermentum* and *W. cibaria* were the dominant bacteria during the entire fermenting process and are responsible for the production of lactic acid and, consequently, pH reduction, which favored yeast growth and the production of ethanol. Maltose (41.2 g/L), ethanol (6.5 g/L) and lactic acid (7.8 g/L) were the most abundant compounds identified by the HPLC. The GC-FID identified and quantified 14 volatile compounds. The carbohydrates, the nonanoic and decanoic butyric acids, 1,3-butanediol, 2-phenylethyl acetate, 1,1-diethoxyethane, acetaldehyde and furfural were associated, respectively, to the substrate and to the microbial activity in the beginning of the fermentation process, while the isobutyl acetate, ethyl acetate, butyrate, ethyl lactate and 2-phenylethane were related to microbial activity at the end of the process. Concluding, the *yakupa* is a slightly acid beverage of liquid consistency and yellowish coloring. LAB were the dominant bacteria during 60 h of fermentation and were responsible for the presence of lactic acid. *S. cerevisiae* was the dominant yeast species. Some volatile compounds identified, especially the esters, are considered good aromatic compounds, which are responsible or associated to the sensorial properties of the beverage. This was the first report describing the microbial and physical-chemical characteristics involved in the indigenous fermented beverage, *yakupa*.

Keywords: *Yakupa*. Fermentation. PCR-DGGE. HPLC. GC-FID.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Distribuição das tribos indígenas de diferentes etnias ao longo do Parque Indígena do Xingu – MT 17
- Figura 2 Etapas na preparação do *yakupa*: mandioca no processo de pubagem (A); as raízes descascadas e secas são piladas (B); obtenção da massa de mandioca (C); Cozimento do mingau (D); mistura do mingau com a batata-doce (E); bebida pronta (F) 20

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1

- Figure 1 Flow diagram representing the *yakupa* processing 54
- Figure 2 Microbial and physicochemical parameter of *yakupa* during 60 h of fermentation 59
- Figure 3 Principal component analysis (PCA) of the microbial counts, substrates, metabolites (by HPLC) and volatile compounds (by GC-FID) during the fermentation of the *yakupa* beverage 61
- Figure 4 DGGE analysis of the bacterial community during 60 h of fermentation 62
- Figure 5 DGGE analysis of the fungal community during 60 h of fermentation 63

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	População indígena no Brasil e nas Grandes Regiões e sua distribuição por situação de domicílio (urbano ou rural), no ano de 2010	15
Tabela 2	Alimentos e bebidas fermentados indígenas mais comuns produzidos a partir de diferentes cereais	23
Tabela 3	Coexistência entre a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e outros microrganismos em alimentos e bebidas fermentados tradicionais da África	25

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	População Indígena no Brasil	15
2.1.1	A etnia Juruna (Yudjá)	18
2.1.2	O <i>cauim</i> de mandioca dos Juruna: <i>Yakupa</i>	19
2.2	O processo fermentativo na produção de alimentos	21
2.2.1	Alimentos fermentados produzidos em diversas partes do mundo e os principais microrganismos envolvidos	22
2.2.2	Estudo da microbiota em alimentos e bebidas fermentados a partir de mandioca	26
2.2.3	Estudo da microbiota presente em alimentos e bebidas fermentados indígenas produzidos no Brasil	29
2.3	A Biologia molecular no estudo de comunidades microbianas	31
2.3.1	Técnicas moleculares independentes de cultivo – DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante)	32
2.4	A Era da Metabolômica	34
2.4.1	O uso da Metabolômica nos estudos de alimentos e bebidas fermentados tradicionais	36
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	38
	REFERÊNCIAS	39
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	49
	ARTIGO 1 Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of <i>Yakupa</i>, an indigenous beverage produced by brazilian amerindians	49

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A fermentação é uma das formas mais antigas de preservação dos alimentos, além de melhorar a qualidade, aceitabilidade sensorial e contribuir para a redução de componentes tóxicos ou indesejáveis presentes nas matérias-primas fermentescíveis. O consumo de alimentos e bebidas fermentados tradicionais produzidos a partir de diferentes substratos (milho, arroz, mandioca, frutos, trigo) é bastante comum em países da Ásia, África e América Latina. No entanto, a maioria dos alimentos e bebidas ainda é produzida de forma artesanal em pequena escala a partir do conhecimento empírico passado de geração para geração.

No Brasil, muitas tribos indígenas produzem diferentes alimentos e bebidas fermentados que são consumidos diariamente ou em rituais religiosos e festivos. Os substratos (mandioca, milho, frutos, amendoim e arroz, por exemplo), o processamento, o modo de preparo que varia desde a fermentação natural direta do substrato até um processo que envolve a mastigação prévia do substrato e o posterior regurgito, diferem entre as bebidas e as tribos. Alguns exemplos de alimentos e bebidas fermentados produzidos por comunidades indígenas brasileiras são o *caxiri*, feito a partir de mandioca (SANTOS et al., 2012), o *cauim* a partir de mandioca, arroz, milho, amendoim ou frutas (ALMEIDA; RACHID; SCHWAN, 2007; RAMOS et al., 2010; RAMOS; ALMEIDA; FREIRE, 2011; SCHWAN et al., 2007), e o *calugi*, produzido a partir de milho e arroz (MIGUEL et al., 2012).

Os índios Juruna (etnia Yudjá), que habitam a parte norte do Parque Indígena do Xingu no Mato Grosso, são grandes produtores de bebidas fermentadas. Dentre elas está o *yakupa*, também chamado ‘mingau azedo’, uma

bebida não alcoólica produzida a partir da puba seca de mandioca, que é consumida diariamente por todos (crianças, adultos e idosos). O *yakupa* é uma bebida produzida via fermentação natural, o que desperta o interesse em conhecer os microrganismos envolvidos e os metabólitos produzidos durante o processo fermentativo, assim como entender a sua forma de produção pelos índios.

Diversos trabalhos sobre alimentos e bebidas fermentados tradicionais produzidos em países africanos e asiáticos (BLANDINO et al., 2003; CHADARE et al., 2010; JESPERSEN, 2003; KAYODE et al., 2011; KOSTINEK et al., 2005; OGUNTOYINBO; DODD, 2010) têm sido realizados. No entanto, ainda há poucos estudos acerca das características microbiológicas dos processos fermentativos utilizados para a produção de alimentos e bebidas pelos índios brasileiros. O que se sabe é que há uma expressiva população microbiana associada à produção desses alimentos e bebidas fermentados, que podem representar uma fonte potencial para estudos de biodiversidade e para aplicação biotecnológica.

Portanto, com o intuito de aumentar o conhecimento sobre a bebida fermentada *yakupa* produzida pelos índios Juruna, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar a população de bactérias lácticas e leveduras, conhecer sua dinâmica populacional durante o processo fermentativo e caracterizar físico-quimicamente a bebida através da identificação dos substratos e metabólitos produzidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 População Indígena no Brasil

Segundo dados do Censo Demográfico 2010, apresentados na Tabela 1, o Brasil possui hoje uma população indígena de 817.963, que representa aproximadamente 0,42% da população brasileira. A maior parte está concentrada nas regiões Norte (37,4%) e Nordeste (25,5%), seguido pelas regiões Centro-Oeste (15,9%), Sudeste (11,9%) e Sul (9,1%), e se concentram, principalmente, nas áreas rurais (61,5%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2012). Atualmente existem 238 povos indígenas (etnias) e 685 Terras Indígenas (TIs) distribuídas por todo o território nacional, sendo que, a região da Amazônia Legal (que inclui 16 regiões) possui cerca de 60% da população indígena vivendo em TIs, enquanto a região Leste do Mato Grosso é a que possui o menor número de povos em TIs (INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL - ISA, 2013).

Tabela 1 População indígena no Brasil e nas Grandes Regiões e sua distribuição por situação de domicílio (urbano ou rural), no ano de 2010

Região	Total	Urbana	Rural
Norte	305.873	61.520	244.353
Nordeste	208.691	106.150	102.541
Sudeste	97.960	79.263	18.697
Sul	74.945	34.009	40.936
Centro-Oeste	130.494	34.238	96.256
Brasil	817.963	315.180	502.783

Fonte: IBGE, Censo Demográfico 2010

No Estado do Mato Grosso habitam, segundo dados preliminares do IBGE 2010, 42 etnias indígenas (Quadro 1) das quais 16 estão localizadas na

Terra Indígena Parque Indígena do Xingu (PIX) (FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO - FUNAI, 2010).

Povos Indígenas				
Apiaká	Juruna	Mehináko	Rikbaktsa	Yawalapiti
Arara	Kalapalo	Metuktire	Suyá	Zoró
Aweti	Kamayurá	Munduruku	Tapayuna	
Bakairi	Karajá	Mynky	Tapirapé	
Bororo	Katitaulú	Nafukuá	Terena	
Cinta Larga	Kayabí	Nambikwara	Trumai	
Enawené- Nawê	Kayapó	Naravute	Umutina	
Hahaintsú	Kreen- Akarôre	Panará	Waurá	
Ikpeng	Kuikuro	Pareci	Xavante	
Irantxe	Matipu	Parintintin	Xiquitano	

Quadro 1 Etnias localizadas no estado do Mato Grosso, Centro-Oeste, Brasil.

Fonte: FUNAI (2010)

O PIX ocupa uma área de 2.653.012 ha. ao norte do Estado de Mato Grosso e possui uma população indígena de 4.829, sendo a etnia Kaiabi a mais representativa (2.202 indivíduos) e a Yudjá a sétima, com 348 indivíduos (Figura 1) (ISA, 2013).

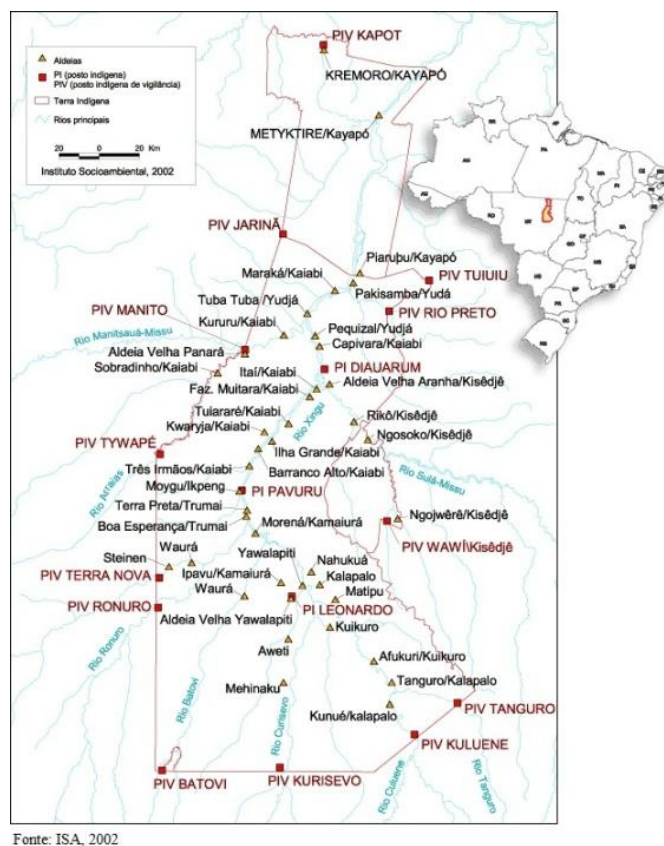


Figura 1 Distribuição das tribos indígenas de diferentes etnias ao longo do Parque Indígena do Xingu – MT

Atualmente, mais de 180 línguas e dialetos indígenas são falados no Brasil, sendo que tal número exclui aquelas faladas pelos índios isolados. As línguas indígenas são agrupadas em famílias e classificadas como pertencentes aos troncos Tupi, Macro-Jê e Aruak. Entretanto há famílias que não puderam ser identificadas e relacionadas a nenhum destes troncos. Outras línguas que não puderam ser classificadas pelos linguistas dentro de alguma família permanecem não-classificadas ou isoladas e as línguas que se subdividem em diferentes dialetos (FUNAI, 2010).

2.1.1 A etnia Juruna (Yudjá)

O etnônimo Juruna (Yuruna, Jurúna, Juruúna, Juruhuna, Geruna) é de origem estrangeira e significa “boca preta”, devido à tatuagem que, segundo consta em registros do século XVII, os índios usavam quando o seu território no baixo Xingu foi invadido, alguns anos depois da fundação de Belém (1615) (ISA, 2007). Antigos habitantes do baixo e médio Xingu há cerca de 100 anos encontram-se separados em dois grupos. Uma parte vive na região de ocupação muito antiga, o médio Xingu, na Terra Indígena Paquiçamba e em Altamira (Pará) e a outra vive no alto curso do mesmo rio, na área do Parque Indígena do Xingu (ISA, 2007). A língua juruna é classificada como pertencente ao tronco tupi, família linguística Juruna.

Segundo dados do ISA (2013), os Yudjá encontram-se distribuídos em quatro TIs, o Parque Indígena do Xingu no Mato Grosso, Paquiçamba e Paquiçamba (ampliação) no Pará e Kapotnhinore que abrange os dois estados. Dados do Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena (SIASI) totalizam uma população cadastrada de 682 indivíduos Juruna distribuída em 26 aldeias, sendo que a aldeia Pakaya, local de estudo deste trabalho, possui 97 indivíduos (BRASIL, 2012).

Os Yudjá são retratados em sua mitologia como canoieiros e produtores de *cauim* (ISA, 2007). O *cauim*, cujo consumo serve de fundamento para a sociabilidade ritual, é produzido estritamente pelas mulheres, a partir da mandioca, produto que é (nesse contexto) atribuído aos homens, ainda que efetivamente as mulheres tenham um papel muito ativo no plantio (LIMA, 2005).

Sua subsistência é baseada essencialmente no cultivo de roças – a mandioca é seu principal produto – e na pesca, embora apreciem muito a carne de caça (GARCIA, 2008). Dentre muitas bebidas fermentadas que produzem

dois *cauins* de mandioca, o *dubia* (alcoólico) e o *yakupa* (não alcoólico), destacam-se por sua importância na dieta e seu simbolismo.

2.1.2 O cauim de mandioca dos Juruna: *Yakupa*

O *Yakupa* enquadra-se na classe de cauins refrescantes, os quais são consumidos o ano inteiro, diariamente, para matar a sede da família (velhos, adultos, jovens e crianças). A característica básica dos cauins refrescantes é que a fermentação, além de menos intensa, é um fim subordinado à conservação. Estão prontos para o consumo no momento em que se acaba de prepará-los, quando então são definidos como “doce”, e vão fermentando com o passar dos dias (LIMA, 2005).

A puba seca de mandioca é o substrato utilizado para o preparo do *yakupa*, mas dependendo da estação do ano alguns substratos são utilizados para o preparo de outros cauins, tais como, inhame, cará, batata, macaxeira, abóbora, pequi, palmito de irajá e milho verde (LIMA, 2005). A produção do *cauim yakupa*, é subordinada à produção do *dubia* (cauim embriagante), ou seja, o *yakupa* é um subproduto do *dubia*. A mandioca é posta a pubar (em canoas de navegação ou em cercados na beira do rio ou de igarapés), até o ponto em que se torna pastosa, momento em que é necessário interromper o processo de pubagem. Esse processo apresenta três fases consecutivas: a fermentação, que leva ao amadurecimento e que evolui para o azedamento (LIMA, 2005).

Após a pubagem, a mandioca é descascada e deixada secar ao sol, em jirau por alguns dias. A puba seca é então socada em pilão, dissolvida em água e peneirada. As fibras e a massa que não passam pela peneira são socadas novamente, e passadas pela peneira com a mesma água já peneirada. Mais água é adicionada até que toda massa se desprenda das fibras da mandioca (que são descartadas), dando origem a um líquido branco que vai ao fogo, resultando no

mingau cozido. Para liquefazer o mingau, acrescenta-se uma porção de batata-doce crua ralada. Após a mistura completa do mingau com a batata doce, este é peneirado para retirar os pedaços da batata doce, e está pronto (Figura 2). O *yakupa* começa a ser ingerido logo após seu resfriamento, e se torna azedo após 24 horas de fermentação.

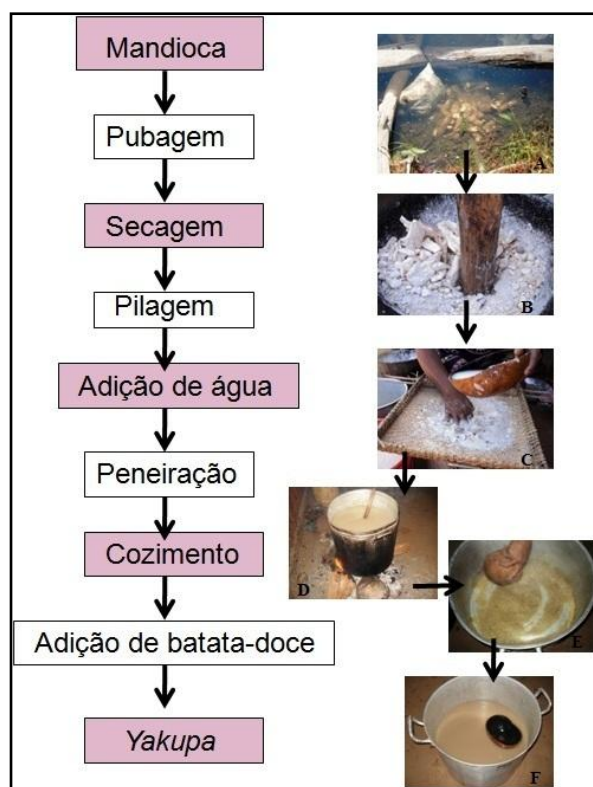


Figura 2 Etapas na preparação do *yakupa*: mandioca no processo de pubagem (A); as raízes descascadas e secas são piladas (B); obtenção da massa de mandioca (C); Cozimento do mingau (D); mistura do mingau com a batata-doce (E); bebida pronta (F)

2.2 O processo fermentativo na produção de alimentos

Os alimentos fermentados contribuem de forma expressiva para a dieta de populações nos mais diversos países Asiáticos, Africanos e da América do Sul. Basicamente, esses alimentos são resultado da atividade enzimática microbiana (amilases, lipases, proteases) que hidrolisa polissacarídeos, proteínas e lipídeos presentes no substrato em produtos não tóxicos, com aroma, sabor e textura agradáveis e atrativas ao consumidor (STEINKRAUS, 1997). Os microrganismos responsáveis pelo processo fermentativo podem ser inoculados como culturas iniciadoras ou podem ser a própria microbiota indígena presente no substrato (HARLANDER, 1992).

Por todo o mundo são produzidos bebidas e alimentos fermentados envolvendo diferentes técnicas de produção, substratos utilizados e microrganismos. Existem quatro processos fermentativos principais: fermentação alcoólica, láctica, acética e alcalina (SONI; SANDHU, 1990). O primeiro resulta na produção de etanol e as leveduras são predominantes (produção de vinho, cerveja), no segundo predominam as bactérias do ácido láctico (fermentação do leite, cereais), no terceiro predominam as bactérias acéticas, principalmente do gênero *Acetobacter*, e o quarto processo ocorre durante a fermentação de peixes e sementes, popularmente utilizados como condimento (MCKAY; BALDWIN, 1990).

A fermentação tem importante papel no processamento dos alimentos, que vai desde a preservação e melhora na segurança alimentar, até o aumento do valor nutricional e da qualidade das características sensoriais (BOURDICHON et al., 2012). A atividade biológica dos microrganismos durante o processo resulta na produção de uma gama de metabólitos capazes de suprimir o crescimento e a sobrevivência de microrganismos indesejáveis (ROSS; MORGAN; HILL, 2002). Tais compostos, como ácidos orgânicos (lático,

acético, propiônico, fórmico), etanol e bacteriocinas, em combinação com a redução na atividade de água por desidratação ou adição de sal, inibem o crescimento de patógenos (GAGGIA et al., 2011; ROSS; MORGAN; HILL, 2002).

2.2.1 Alimentos fermentados produzidos em diversas partes do mundo e os principais microrganismos envolvidos

Originalmente, o preparo de alimentos e bebidas fermentados era feito de forma artesanal e sem nenhum conhecimento sobre a função dos microrganismos envolvidos. Somente a partir do século 19, com o advento da Revolução Industrial e o surgimento da Microbiologia como ciência os processos fermentativos passaram a ser estudados e entendidos (BLANDINO et al., 2003). A partir daí novas tecnologias permitiram a produção industrial de muitos alimentos fermentados a partir de leite, carne, cereais e vegetais (HIRAHARA, 1998).

Nos últimos anos, alimentos e bebidas fermentados indígenas produzidos no mundo todo vem sendo amplamente estudados (STEINKRAUS et al., 1993). A maioria deles são produzidos artesanalmente ou em pequena escala, e por isso sua qualidade muitas vezes é instável (SANNI, 1993; ZULU; DILLON; OWENS, 1997). Nos países Africanos esses alimentos são a base da alimentação de muitas populações, e diversos substratos são utilizados, principalmente cereais, legumes e raízes (STEINKRAUS, 1996).

Alimentos fermentados tradicionais preparados com cereais (como arroz, trigo, milho e sorgo) são bem conhecidos no mundo todo. Em muitos destes produtos a fermentação é natural e não controlada, envolvendo um conjunto de microrganismos (leveduras, bactérias e fungos) que podem atuar paralelamente ou em sucessão durante o processo fermentativo (BLANDINO et

al., 2003). Alguns gêneros são relatados como mais comuns nesse tipo de fermentação. São eles *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus*, para bactérias, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichothecium*, para fungos, e *Saccharomyces*, para leveduras (STEINKRAUS, 1998).

Na Tabela 2 estão listados alguns alimentos e bebidas fermentados tradicionais, produzidos a partir de cereais e os principais microrganismos envolvidos, e na Tabela 3 os principais microrganismos relatados em alimentos e bebidas fermentados tradicionais na África, produzidos a partir de diferentes substratos.

Tabela 2 Alimentos e bebidas fermentados indígenas mais comuns produzidos a partir de diferentes cereais

Produto	Substrato	Microrganismos	Regiões
Dosa	Arroz	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Torulopsis candida</i> , <i>T. pullulans</i>	Índia
Dhokla	Arroz ou trigo	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Torulopsis candida</i> , <i>T. pullulans</i>	Norte da Índia
Shoyu (soy sauce)	Trigo e soja	<i>Aspergillus oryzae</i> ou <i>A. soyae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxi</i>	Japão, China, Taiwan
Kishk	Trigo e leite	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e leveduras	Egito, Síria e países da Arábia
Tarhana	Farinha de trigo e iogurte	LAB	Turquia

“Tabela 2, conclusão”

Produto	Substrato	Microrganismos	Regiões
Ogi	Milho, sorgo ou milheto	<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> e <i>Penicillium</i>	Nigéria e oeste da África
Kenkey	Milho	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i>	Gana
Pozol	Milho	Fungos, leveduras e bactérias	México
Kisra	Sorgo	Desconhecido	Sudão
Sake	Arroz	<i>Saccharomyces sake</i>	Japão
Bouza	Trigo	Desconhecido	Egito
Chicha	Milho	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , Leveduras e bactérias	Peru
Mahewu	Milho	<i>Streptococcus lactis</i>	África do Sul
Boza	Trigo, milheto, milho e outros	<i>Lactobacillus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Leuconostoc</i>	Albânia, Turquia, Bulgária e Romênia

Fonte: Blandino et al. (2003)

Tabela 3 Coexistência entre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e outros microrganismos em alimentos e bebidas fermentados tradicionais da África

Tipo de Produto	Nome	Microrganismos^a	Referências
Alimento não alcoólico a base de produtos amiláceos	‘kenkey’	BAL ^b , <i>Candida krusei</i> , <i>Debaryomyces</i> spp., <i>Kluyveromyces</i> spp., <i>Trichosporon</i> spp.	Halm et al. (1993), Hayford e Jakobsen (1999), Hayford e Jespersen (1999) e Jespersen et al. (1994)
	‘ogi’	BAL, acetic acid bacteria, <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Candida vini</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Iwuoha e Eke (1996), Odunfa e Oyewole (1998) e Teniola e Odunfa (2001)
Bebidas alcólicas	‘dolo’/‘pito’	BAL, <i>Candida</i> spp., <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces</i> spp., <i>Pichia anomala</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i>	Demuyakor e Ohta (1991, 1993), Kolani et al. (1996), Kuhle et al. (2001) e Sefaddeh et al. (1999)
	‘munkoyo’/‘busaa’	BAL, <i>Candida krusei</i>	Nout (1980) e Zulu, Dillon e Owens (1997)

“Tabela 3, conclusão”

Tipo de Produto	Nome	Microrganismos^a	Referências
	palm wine	BAL, acetic acid bacteria, <i>Candida</i> spp., <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Pichia</i> spp. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Atacador-Ramos (1996), Odunfa e Oyewole (1998) e Owuama e Saunders (1990)
Leite fermentado	‘amasi’	BAL, <i>Candida kefir</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida lusitaniae</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Dekkera bruxellensis</i> , <i>Saccharomyces dairenensis</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i>	Gadaga et al. (2001) e Gadaga, Mutukumira e Narvhus (2000)
	‘rob’	BAL, <i>Candida kefir</i>	Abdelgadir et al. (2001)

Fonte: Jespersen (2003)

^a Microrganismos que ocorrem durante a fermentação dos produtos além da levedura *S. cerevisiae*.

^b Bactérias do ácido lático.

2.2.2 Estudo da microbiota em alimentos e bebidas fermentados a partir de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um alimento de primeira necessidade para mais milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que diversos alimentos e bebidas são produzidos a partir deste substrato. Existem diferentes maneiras de processamento da mandioca, que inclui a fervura, torrefação, secagem e fermentação, dependendo da variedade (HOLLEMAN; ATTEN, 1956). Entretanto, o método mais popular de processamento é a fermentação,

principalmente nas variedades com alto teor de glicosídeos cianogênicos (KOSTINEK et al., 2005). A degradação dos compostos cianogênicos libera o ácido cianídrico (HCN), o princípio tóxico da mandioca, cuja ingestão ou mesmo inalação, representa sério perigo à saúde, podendo ocorrer casos extremos de envenenamento. Considera-se que a dose letal é de aproximadamente 10 mg de HCN por kg de peso vivo. Em relação ao teor de ácido cianídrico na raiz, as cultivares são classificadas em mansas: menos de 50 mg de HCN/kg de raiz fresca sem casca; moderadamente venenosas: 50 a 100 mg de HCN/kg de raiz fresca sem casca; e bravas ou venenosas: acima de 100 mg de HCN/kg de raiz fresca sem casca, sendo as cultivares mansas também conhecidas como de mesa, aipim e macaxeira (CAGNON; CEREDA; PANTAROTTO, 2002).

Vários estudos com alimentos fermentados a partir de mandioca vêm sendo realizados para se conhecer as formas de produção e, principalmente, os microrganismos envolvidos. Alguns exemplos destes alimentos e bebidas são o *gari*, *fufu*, *candi*, *kpokpogari* e *lafun* (Nigéria), *kumkum*, *myiodo* e *atangana* (Camarões), *agbelima* e *akyeke* (Gana), tapioca, *cauim* e *caxiri* (Brasil), e *foofoo* (Congo) (ALMEIDA; RACHID; SCHWAN, 2007; OBILIE; TANO-DEBRAH; AMOA-AWUA, 2004; ODUNFA, 1985; OGUNTOYINBO; DODD, 2010; OKAFOR, 1977; OYEWOLE, 1990; RAMOS et al., 2010; SANTOS et al., 2012; SCHWAN et al., 2007).

O *gari* é uma farinha granular de coloração creme e sabor levemente azedo, consumida na Nigéria e em outros países do oeste Africano (INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE - IITA, 2013). Para seu preparo, raízes de mandioca raladas são colocadas em sacos de pano e prensadas até que todo o líquido saia, e a fermentação ali ocorre por 3 a 5 dias. Em seguida as polpas desidratadas são torradas e o produto final é obtido (OJO; DEANE, 2002). A fermentação em estado sólido é um processo

espontâneo na qual muitas mudanças microbiológicas e bioquímicas ocorrem (OGUNTOYINBO; DODD, 2010), como a metabolização do amido por bactérias do ácido láctico levando à produção de ácidos orgânicos (como o ácido láctico) e a redução do pH (COULIN et al., 2006; ODUNFA, 1985; OKAFOR; EJIJOFOR, 1990). Espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Staphylococcus* e *Candida* são relatadas como envolvidas na produção do *gari* (KOSTINEK et al., 2005, 2007; OGUNTOYINBO, 2008; OGUNTOYINBO; DODD, 2010).

O *fufu* é uma pasta úmida fermentada produzida a partir da mandioca, consumida na Nigéria e no Congo. As raízes são descascadas e deixadas imersas em água para fermentar até no máximo três dias, em seguida são retiradas, maceradas e peneiradas para retirar as fibras. Espera-se decantar e depois retira-se a massa deixando-a secar (IITA, 2013). Durante a fermentação do *fufu* (OYEWOLE, 2001) leveduras dos gêneros *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* e bactérias pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Geotrichum*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* foram identificados.

O *lafun* é uma forma fibrosa de farinha de mandioca semelhante ao *fufu*. As raízes frescas de mandioca são cortadas em pedaços e deixadas em água para fermentar (3 a 4 dias) até se tornarem macias, em seguida são descascadas, maceradas e deixadas secar ao sol. Após secos, os pedaços são moídos, obtendo a farinha (IITA, 2013). A microbiota presente durante a produção deste alimento inclui espécies dos gêneros: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hanseniaspora*, *Candida* e *Trichosporon* (PADONOU et al., 2009).

A *agbelima* é um alimento a base de mandioca, na qual as raízes são descascadas e raladas e misturadas ao inóculo tradicional. Este alimento é amplamente consumido em países como Gana, Togo e Benin. A microbiota

predominante durante sua fermentação inclui os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Bacillus*, para bactéria e *Candida* e *Zygosaccharomyces*, para leveduras e alguns fungos filamentosos (MANTE; SAKYI-DAWSON; AMOA-AWUA, 2003).

Dois diferentes processos fermentativos são observados para a produção desses alimentos, a fermentação em estado sólido na produção do *gari* e *agbelina*, e a fermentação submersa na qual as raízes ficam imersas em água por alguns dias, como na produção *fufu* e *lafun* (OYEWOLE, 1995). Segundo (OYEWOLE; ODUNFA, 1990) as bactérias do ácido láctico predominam em ambos processos, no entanto, o envolvimento de outros microrganismos, como espécies do gênero *Bacillus*, parece ser influenciado pelo tipo de processo fermentativo utilizado (AMOA-AWUA; APPOH; JAKOBSEN, 1996; OYEWOLE, 1992). As leveduras também predominam durante as fermentações de mandioca depois das BAL, e as espécies relatadas diferem nos diferentes tipos de processos fermentativos (AMOA-AWUA; APPOH; JAKOBSEN, 1996; AMOA-AWUA et al., 1997; PADONOU et al., 2009).

2.2.3 Estudo da microbiota presente em alimentos e bebidas fermentados indígenas produzidos no Brasil

No Brasil, diversos povos indígenas utilizam processos fermentativos para a produção de alimentos e bebidas com valores nutricionais, medicinais e religiosos. Os mais variados substratos são utilizados destacando-se, principalmente, a mandioca, o milho e o arroz ou, ainda, amendoim, banana e abóbora (WAGLEY, 1988). Entretanto, o conhecimento sobre os microrganismos envolvidos nessas fermentações espontâneas ainda é escasso.

O *cauim* é uma bebida não alcoólica produzida pela tribo indígena Tapirapé a partir de vários substratos como, mandioca, arroz, amendoim,

abóbora, semente de algodão e milho (RAMOS et al., 2010). No preparo do *cauim*, os diferentes substratos são cozidos e deixados esfriar a temperatura ambiente, quando então é adicionado o inóculo para iniciar a fermentação. O inóculo é obtido a partir da mastigação da batata-doce por uma índia da tribo (SCHWAN et al., 2007). Estudando o *cauim* de arroz e mandioca produzido pelos índios Tapirapé da tribo Tapi'tãwa (Confresa, MT) Almeida, Rachid e Schwan (2007) isolaram e identificaram a microbiota presente nessa bebida. Dentre os isolados bacterianos houve predomínio de *Lactobacillus pentosus* e *L. plantarum*, mas espécies dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Paenibacillus* também foram identificadas. Schwan et al. (2007) encontraram, em bebidas fermentadas de mandioca (*cauim*), predominância das leveduras *Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichosporon asahii*.

Estudando o *cauim* de semente de algodão e arroz, Ramos et al. (2011) encontraram uma microbiota dominada por BAL, principalmente *Lactobacillus plantarum*, *L. vermiforme* e *L. paracasei*, sendo que a espécie *Bacillus subtilis* esteve presente a partir de 16 h de fermentação até o final. Para leveduras, as espécies detectadas foram *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Clavispora lusitaniae* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Resultados semelhantes foram encontrados para o *cauim* de amendoim e arroz, no qual novamente as BAL (principalmente o gênero *Lactobacillus*), foram dominantes durante toda a fermentação, e espécies de leveduras (*P. guilliermondii*, *K. lactis*, *Candida* sp, *R. toruloides* e *Saccharomyces cerevisiae*) também estiveram presentes (RAMOS et al., 2010).

O *caxiri* é uma tradicional bebida alcoólica produzida pelos índios Juruna (Yudjá), a partir de mandioca e batata-doce, e é fermentada espontaneamente por 24 a 48h. A população de leveduras foi maior do que a de bactérias, e as espécies identificadas foram *Saccharomyces cerevisiae* (a espécie

dominante), *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia guilliermondii* e *Cryptococcus luteolus*. Para bactérias, o gênero *Bacillus* spp. foi dominante, e incluiu espécies do grupo *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, além de *Sphingomonas* sp. e *Pediococcus acidilactici* (SANTOS et al., 2012).

O *calugi* é um mingau fermentado não alcóolico preparado a partir de milho e arroz pelos índios da etnia Javaé. Miguel et al. (2012), estudando este alimento identificaram, por métodos independentes de cultivo, as seguintes espécies durante o processo fermentativo: *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius*, *S. parasanguis*, *Weissella confusa*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus* e *Bacillus* sp. e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans* e *Candida* sp.

A existência de uma enorme variedade de alimentos e bebidas produzidos por fermentações naturais associadas à falta de dados na literatura sobre a microbiota envolvida nesses processos torna a microbiologia das fermentações naturais uma potencial linha de pesquisa nos dias atuais.

2.3 A Biologia molecular no estudo de comunidades microbianas

Nos últimos 20 anos um grande desenvolvimento de métodos de identificação e detecção de microrganismos baseados nos ácidos nucleicos (DNA, RNA) tem sido observado. Tal fato se deve a grande vantagem dos métodos genotípicos de não dependerem das condições de crescimento dos microrganismos, uma vez que muitos desses métodos se baseiam no princípio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (TEMMERMAN; HUYS; SWINGS, 2004).

A PCR é uma técnica na qual uma região alvo do DNA é amplificada utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos (primers) em uma reação

com condições ideais (TEMMERMAN; HUYS; SWINGS, 2004). O sequenciamento dessas regiões e a posterior comparação dessas sequências em bancos de dados têm revelado uma grande diversidade de microrganismos ainda desconhecida (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997).

O uso de técnicas moleculares na microbiologia de alimentos tem permitido uma melhor detecção e identificação microbiana (COCOLIN et al., 2004; KOSTINEK et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2010; MIGUEL et al., 2010, 2012; OGUNTOYINBO; DODD, 2010; OWUSU-KWARTENG et al., 2012; PADONOU et al., 2009; RAMOS; ALMEIDA; FREIRE, 2011; RAMOS et al., 2010; SANTOS et al., 2012) sendo muitas vezes implementadas para estabelecer a diversidade microbiana de uma complexa amostra de alimentos (GONZALEZ et al., 2003).

2.3.1 Técnicas moleculares independentes de cultivo – DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante)

As técnicas moleculares que independem de cultivo têm demonstrado ser importantes ferramentas para a caracterização da diversidade microbiana presente em alimentos (GIRAFFA; NEVIANI, 2001). Essas técnicas superam as limitações das técnicas dependentes de cultivo, em que nem todos os microrganismos crescem em meio de cultura, tornando-se impossível isolar e identificar um número significativo de espécies (THEUNISSEN et al., 2005).

A técnica PCR-DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) tem sido amplamente utilizada em estudos de diversidade genética microbiana nos mais diversos ambientes. Esta técnica baseia-se na separação de fragmentos de fita dupla do DNA de mesmo tamanho, porém com sequências distintas, em gel de acrilamida contendo gradientes de desnaturação (uréia e formamida) (ROSADO; DUARTE, 2002). Na separação do DNA no gradiente desnaturante

os fragmentos migram diferencialmente de acordo com seu teor de GC, resultando em um padrão de bandas distinto (MUYZER; SMALLA, 1998).

Nos últimos anos a técnica de PCR-DGGE tem sido aplicada com sucesso em diversos estudos para análise da composição de bactérias e de leveduras nos diferentes alimentos como, grãos de Kefir (CHEN; WANG; CHEN, 2008; MAGALHÃES et al., 2010; MIGUEL et al., 2010; WANG et al., 2008), na identificação de probióticos em produtos lácteos da África do Sul (THEUNISSEN et al., 2005), no estudo da diversidade microbiana em alimentos e bebidas fermentados, tais como vinho (COCOLIN; BISSON; MILLS, 2000), salsicha (RANTSIUO et al., 2005), café (VILELA et al., 2010), cacau (NIELSEN et al., 2007) e *cauim* (RAMOS et al., 2010).

Oguntoyinbo (2011) estudou a composição das comunidades bacterianas em dois alimentos tradicionais da Nigéria feitos a base de cereais fermentados, *kunu-zaki* e *ogi*, utilizando a técnica de PCR-DGGE e o seqüenciamento. As seqüências de DNA da região V3 do gene 16S rRNA foram identificadas como *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bacillus* spp. e *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. Neste estudo o autor associou esta técnica com a construção de bibliotecas de clones do gene 16S rRNA para analisar a microbiota presente nesses alimentos. Ele concluiu que a associação dessas duas técnicas é uma ferramenta bastante útil para investigar a diversidade microbiana e identificar os microrganismos presentes em alimentos fermentados tradicionais.

Para determinar a dinâmica das comunidades bacteriana e de leveduras na bebida fermentada de arroz e semente de algodão produzidas por índios brasileiros, Ramos, Almeida e Freire (2011) combinaram métodos dependentes e independentes de cultivo. A análise de DGGE revelou que bactérias do ácido láctico predominaram no processo fermentativo, que a comunidade de leveduras não apresentou mudanças, sendo que as espécies detectadas foram *Candida*

parapsilosis, *Candida orthopsilosis*, *Clavispora lusitaniae* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Os resultados obtidos demonstraram que a combinação de métodos dependentes de cultivo com a técnica de DGGE é essencial para avaliar a dinâmica das comunidades microbianas nessa bebida.

A técnica de DGGE é uma das poucas que permite uma análise de comunidades microbianas complexas presentes na maioria dos alimentos fermentados. Entretanto, ainda há uma necessidade de se utilizar métodos dependentes de cultivo para obtenção de dados quantitativos. Nesse sentido diversas pesquisas vêm sendo realizadas para o aperfeiçoamento da técnica de DGGE, a fim de permitir uma análise quantitativa sem o cultivo das comunidades microbianas investigadas (TEMMERMAN; HUYS; SWINGS, 2004).

2.4 A Era da Metabolômica

Atualmente estamos vivenciando a “Era Omics”, na realidade um neologismo utilizado como sufixo para se referir às grandes áreas da Genômica, Proteômica, Transcriptômica e Metabolômica, as quais estudam, de uma forma global, determinados grupos de moléculas (MOZZI et al., 2012).

A Metabolômica, por sua vez, lida com a determinação e quantificação simultânea de compostos metabólicos produzidos e modificados pelos organismos vivos (como microorganismos), incluindo peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis, alcalóides e minerais (JEWETT; HOFMANN; NIELSEN, 2006; WISHART, 2008). Dessa forma, ela vem sendo aplicada na área da Ciência dos Alimentos através do monitoramento da qualidade, da segurança e da microbiologia tanto da matéria-prima quanto do produto final (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009). Para se obter o perfil metabólico duas peças chaves devem ser

consideradas, o método de separação e o de detecção. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e de ultra-eficiência (UPLC), a cromatografia gasosa (GC) e a eletroforese capilar (CE), hoje são as técnicas de separação mais utilizadas. Para a detecção, as mais comuns incluem espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear (MNR) e espectrometria de infra-vermelho próximo (NIR) (MOZZI et al., 2012).

Na HPLC separações altamente eficientes, rápidas e sem pré-tratamentos rigorosos da amostra podem ser obtidos. Por esta técnica diferentes compostos são separados por sua interação diferenciada com uma fase estacionária, constituída por colunas empacotadas por partículas porosas de 3 a 5 μm . Dessa forma, cada pico cromatográfico possui um tempo de retenção específico e corresponde à um metabólito, sendo que sua área correspondente permite calcular a concentração de cada metabólito dentro de uma amostra (MOZZI et al., 2012). Acoplada a diferentes métodos de detecção, ela vem sendo utilizada nas mais diversas linhas de pesquisa.

Para a separação de metabólitos voláteis utiliza-se a cromatografia gasosa (GC) comumente acoplada aos sistemas de detecção que utilizam a ionização de chama (YOSHIDA et al., 2012). Nesta técnica utiliza-se um forno com temperatura programada que aumenta a temperatura da coluna gradativamente e os metabólitos, ao passarem por essa coluna capilar juntamente com um gás de arraste, são separados por sua interação com a fase estacionária (MOZZI et al., 2012).

Os dados obtidos em uma análise metabolômica normalmente são submetidos a duas formas de análise, a identificação de compostos e a análise multivariada de dados (MVDA), por exemplo o PCA (análise do componente principal). No primeiro caso a identificação é obtida através da correspondência com um banco de dados e a comparação com padrões puros injetados sob as mesmas condições de corrida (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

Atualmente o PCA é ferramenta mais comumente utilizada nos estudos com alimentos (MCGHIE; ROWAN, 2012; OCHI et al., 2012), permitindo investigar se um grupo é diferente de outro (MOZZI et al., 2012).

2.4.1 O uso da Metabolômica nos estudos de alimentos e bebidas fermentados tradicionais

Muitos estudos metabolômicos vem sendo aplicados nos mais diversos tipos de alimentos e bebidas fermentados, como vinho (ROCHFORT, 2005; SADOUDI et al., 2012), suco de maçã (RITA et al., 2011), queijos (OCHI et al., 2012); cacau (CAMU et al., 2008) e muitos alimentos e bebidas fermentados tradicionais como o *meju* (KANG et al., 2011), *doenjang* (NAMGUNG et al., 2010), *cheonggukjang* (BAEK et al., 2010; PARK et al., 2010), *calugi* (MIGUEL et al., 2012); *soumbala* (OUOBA et al., 2005), massa de milho (ANNAN et al., 2003).

O *meju*, *doenjang* e *cheonggukjang* são alimentos a base de soja tradicionais na Coréia. Estudos do perfil metabolômico destes alimentos têm permitido conhecer os principais compostos presentes nesses alimentos, tais como proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares (MOZZI et al., 2012). O perfil de metabólitos produzidos durante a fermentação do *calugi*, um mingau produzido pelos índios Javaé (Brasil) a partir de milho e arroz, demonstrou a presença de 15 compostos voláteis, ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico), açúcares (principalmente maltose) e de etanol (MIGUEL et al., 2012). Na massa de milho fermentada produzida em Gana, Annan et al. (2003) identificaram por GC-MS compostos como alcóois, carbonilas, ésteres, ácidos, compostos fenólicos e furano, sendo que muitos deles contribuem para o aroma desse alimento.

A fermentação dos alimentos, de uma maneira geral, leva à uma melhora do produto final quanto a sua preservação (tempo de prateleira), textura, sabor e aroma (BLANDINO et al., 2003). Nesse contexto, a aplicação da Metabolômica permite observar as mudanças que ocorrem com os metabólitos durante o processo fermentativo e assim, prever a qualidade nutricional e sensorial do produto final (MOZZI et al., 2012).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho destacam-se as seguintes contribuições de maior relevância:

- a) O conhecimento da dinâmica populacional microbiana durante a fermentação da bebida *yakupa* através da técnica de PCR-DGGE (independente de cultivo), permitiu identificar os microrganismos dominantes do processo, e que portanto, desempenham um papel importante na obtenção do produto final. O resultado da identificação associado às técnicas para análises químicas (HPLC e GC-FID) permitiu compreender a relação entre atividade microbiana e metabólitos produzidos, possibilitando a identificação de compostos químicos que influenciam no aroma e sabor da bebida.
- b) O estudo de alimentos e bebidas fermentados produzidos pelos índios brasileiros possibilita a divulgação e a continuidade da cultura indígena para toda a população, permitindo a obtenção de novos alimentos de alto valor nutricional a partir de matérias-primas de baixo custo.

Para o maior conhecimento da diversidade microbiana presente na bebida *yakupa* a identificação dos isolados microbianos obtidos é necessária. A partir daí será possível, através de investigações futuras, a seleção de culturas iniciadoras para o desenvolvimento de uma bebida de alto valor nutricional, qualidade controlada e com aceitabilidade pelo consumidor.

REFERÊNCIAS

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

AMOA-AWUA, W. K. A. et al. The contribution of moulds and yeasts to the fermentation of agbelima cassava dough. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, n. 3, p. 288-296, Sept. 1997.

AMOA-AWUA, W. K. A.; APPOH, F. E.; JAKOBSEN, M. Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 1/3, p. 87-98, Aug. 1996.

ANNAN, N. T. et al. Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 3, p. 462-474, 2003.

BAEK, J. G. et al. Metabolite profiling of Cheonggukjang, a fermented soybean paste, inoculated with various *Bacillus* strains during fermentation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, n. 9, p. 1860-1868, Sept. 2010.

BLANDINO, A. et al. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, Barking, v. 36, n. 6, p. 527-543, 2003.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, July 1997.

BOURDICHON, F. et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 154, n. 3, p. 87-97, Mar. 2012.

- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de informação da atenção à saúde indígena**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=40846>. Acesso em: 10 jan. 2013.
- CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. Goiânia: Fundação Cargill, 2002. (Série Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino-Americanas, 2). 1 CD-ROM.
- CAMU, N. et al. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 13, p. 2288-2297, Oct. 2008.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J. M. et al. Metabolomic analysis in food science: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n. 11/12, p. 557-566, Dec. 2009.
- CHADARE, F. J. et al. Three traditional fermented Baobab foods from Benin, Mutchayan, Dikouanyouri, and Tayohounta: preparation, properties, and consumption. **Ecology of Food and Nutrition**, New York, v. 49, n. 4, p. 279-297, Apr. 2010.
- CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 492-501, May 2008.
- COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, n. 1, p. 81-87, Aug. 2000.
- COCOLIN, L. et al. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 83-91, Jan. 2004.
- COULIN, P. et al. Characterisation of the microflora of attieke, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 106, n. 2, p. 131-136, Feb. 2006.

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO. **Povos indígenas**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.funai.gov.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

GAGGIA, F. et al. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 22, p. S58-S66, Nov. 2011. Supplement.

GARCIA, M. C. M. Povos da Amazônia: juruna, makuna, krahô. **Geoambiente Online**, Jataí, n. 11, p. 1-18, 2008.

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

GONZALEZ, J. M. et al. An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 459-463, Nov. 2003.

HARLANDER, S. Food biotechnology. In: LEDERBERG, J. (Ed.). **Encyclopaedia of microbiology**. New York: Academic, 1992. p. 191-207.

HIRAHARA, T. Functional food science in Japan. In: MATTILA-SANDHOLM, T.; KAUPPILA, K. (Ed.). **Functional food research in Europe**. Helsínquia: Julkaisija-Utgivare, 1998. p. 19-20.

HOLLEMAN, W. J.; ATTEN, A. **Processing of cassava and cassava products in rural industries**. Rome: FAO, 1956. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/x5032e/x5032E0a.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Os indígenas no censo demográfico 2010**: primeiras considerações com base no quesito cor ou raça. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/indigenas/indigena_censo2010.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2013.

INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. **De olho nas terras indígenas**. Disponível em: <<http://ti.socioambiental.org>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

_____. **Enciclopédia dos povos indígenas**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://pib.socioambiental.org/pt>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE. **Integrated Cassava Project (ICP)**. Disponível em: <<http://www.cassavabiz.org/index.asp>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

JESPERSEN, L. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. **FEMS Yeast Research**, New York, v. 3, n. 2, p. 191-200, Apr. 2003.

JEWETT, M. C.; HOFMANN, G.; NIELSEN, J. Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 2, p. 191-197, Apr. 2006.

KANG, H. J. et al. Metabolomic analysis of meju during fermentation by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS). **Food Chemistry**, London, v. 127, n. 3, p. 1056-1064, Aug. 2011.

KAYODE, A. P. P. et al. Diversity of yeasts involved in the fermentation of tchoukoutou, an opaque sorghum beer from Benin. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 5, n. 18, p. 2737-2742, Sept. 2011.

KOSTINEK, M. et al. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 114, n. 3, p. 342-351, Mar. 2007.

_____. 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**, Stuttgart, v. 28, n. 6, p. 527-540, Aug. 2005.

LIMA, T. S. **Um peixe olhou para mim: o povo Yudjá e a perspectiva**. São Paulo: UNESP/ISA; Rio de Janeiro: NUTI, 2005. 399 p.

MAGALHAES, K. T. et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1241-1250, July 2010.

MANTE, E. S.; SAKYI-DAWSON, E.; AMOA-AWUA, W. K. Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 1, p. 41-50, Dec. 2003.

MCGHIE, T. K.; ROWAN, D. D. Metabolomics for measuring phytochemicals, and assessing human and animal responses to phytochemicals, in food science. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 56, n. 1, p. 147-158, Jan. 2012.

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.

MIGUEL, M. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 5, p. 1523-1528, June 2010.

_____. Physico-chemical and microbiological characterization of corn and rice 'calugi' produced by Brazilian Amerindian people. **Food Research International**, Barking, v. 49, n. 1, p. 524-532, Nov. 2012.

MOZZI, F. et al. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. **Food Research International**, Barking, 2012. In press.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 127-141, Jan. 1998.

NAMGUNG, H. J. et al. Metabolite profiling of doenjang, fermented soybean paste, during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 11, p. 1926-1935, Aug. 2010.

NIELSEN, D. S. et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 114, n. 2, p. 168-186, Mar. 2007.

OBILIE, E. M.; TANO-DEBRAH, K.; AMOA-AWUA, W. K. Souring and breakdown of cyanogenic glucosides during the processing of cassava into akyeke. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 115-121, May 2004.

OCHI, H. et al. Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 113, n. 6, p. 751-758, June 2012.

ODUNFA, S. A. African fermented foods. In: WOOD, B. J. B. (Ed.). **Microbiology of fermented foods**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 2, p. 155-191.

OGUNTOYINBO, F. A. Culture-independent analysis for determination of yeast diversity during solid substrate fermentation of grated cassava for gari production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 2461-2465, Oct. 2011.

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

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

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

OKAFOR, N. Microorganisms associated with cassava fermentation for gari production. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 42, p. 279-284, 1977.

OKAFOR, N.; EJIOFOR, A. O. Rapid detoxification of cassava mash fermenting for garri production following inoculation with a yeast simultaneously producing linamarase and amylase. **Process Biochemistry**, London, v. 25, n. 3, p. 82-86, June 1990.

OUOBA, L. I. I. et al. Volatile compounds of Soumbala, a fermented African locust bean (*Parkia biglobosa*) food condiment. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 6, p. 1413-1421, 2005.

OWUSU-KWARTENG, J. et al. Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. **Food Microbiology**, London, v. 32, n. 1, p. 72-78, Oct. 2012.

OYEWOLE, O. B. Application of biotechnology to cassava processing in Africa. In: EGBE, T. A. et al. (Ed.). **Transformation alimentaire du manioc: cassava food processing**. Paris: ORSTROM, 1995. p. 277-286.

_____. Cassava processing in Africa. In: _____. **Application of biotechnology to traditional fermented foods**. Washington: National Research Council, 1992. p. 89-92.

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

_____. Optimization of cassava fermentation for fufu production: effects of single starter cultures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 49-54, Jan. 1990.

OYEWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Characterization and distribution of lactic-acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 145-152, Feb. 1990.

PADONOU, S. W. et al. The microbiota of Lafun, an African traditional cassava food product. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 133, n. 1/2, p. 22-30, July 2009.

PARK, M. K. et al. Metabolite profiling of Cheonggukjang, a fermented soybean paste, during fermentation by gas chromatography-mass spectrometry and principal component analysis. **Food Chemistry**, London, v. 122, n. 4, p. 1313-1319, Oct. 2010.

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

RAMOS, C. L. et al. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 140, n. 2/3, p. 225-231, June 2010.

RANTSIOU, K. et al. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1977-1986, Apr. 2005.

RITA, R. D. et al. Composition of aroma compounds in fermented apple juice: effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration. **Procedia Food Science**, New York, v. 1, p. 1709-1704, 2011.

ROCHFORT, S. Metabolomics reviewed: a new "Omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, n. 12, p. 1813-1820, Dec. 2005.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I. S. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramentos**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2002. p. 97-128.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 79, n. 1/2, p. 3-16, Nov. 2002.

SADOUDI, M. et al. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. **Food Microbiology**, London, v. 32, n. 2, p. 243-253, Dec. 2012.

SANNI, A. I. The need for process optimization of African fermented foods and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 85-95, Apr. 1993.

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

SCHWAN, R. F. et al. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirape people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, New York, v. 7, n. 6, p. 966-972, Sept. 2007.

SONI, S. K.; SANDHU, D. K. Indian fermented foods: microbiological and biochemical aspects. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 30, n. 1, p. 135-157, 1990.

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.

_____. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. **Food Control**, Guildford, v. 8, n. 5/6, p. 311-317, Oct./Dec. 1997.

_____. **Handbook of indigenous fermented foods**. 2nd ed. New York: M. Dekker, 1996. 792 p.

STEINKRAUS, K. H. et al. Biochemistry of *Saccharomyces*. In: STEINKRAUS, K. H. (Ed.). **Handbook of indigenous fermented foods**. New York: M. Dekker, 1993. p. 517-519.

TEMMERMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, n. 7/8, p. 348-359, July/Aug. 2004.

THEUNISSEN, J. et al. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 1, p. 11-21, Jan. 2005.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

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

WANG, S. Y. et al. Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese kefir and viili starters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 10, p. 3798-3805, Oct. 2008.

WISHART, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, n. 9, p. 482-493, Sept. 2008.

YOSHIDA, M. et al. Diagnosis of gastroenterological diseases by metabolome analysis using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Gastroenterology**, Tokyo, v. 47, n. 1, p. 9-20, Jan. 2012.

ZULU, R. M.; DILLON, V. M.; OWENS, J. D. Munkoyo beverage, a traditional Zambian fermented maize gruel using *Rhynchosia* root as amylase source. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 249-258, Mar. 1997.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of *Yakupa*, an indigenous beverage produced by brazilian amerindians

Artigo submetido ao periódico: Journal of the Science of Food and Agriculture

ABSTRACT

Background: *Yakupa* is a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians. In this work the microbial dynamics and metabolites involved in *yakupa* fermentation were investigated.

Results: The lactic acid bacteria (LAB) population was higher than yeast in the beginning of fermentation ($5 \log \text{CFU mL}^{-1}$ and $3 \log \text{CFU mL}^{-1}$, respectively) and after 36 h both population increased reaching $7 \log \text{CFU mL}^{-1}$, remaining constant until 60 h. The PCR-DGGE analysis identified the bacteria *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria* and *W. confusa*, responsible mainly for the lactic production, and yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, responsible mainly for the ethanol and glycerol production, *Torulaspora delbrueckii* and *Pichia exiqua*. Maltose (41.2 g L^{-1}), ethanol (6.5 g L^{-1}) and lactic acid (7.8 g L^{-1}) were the most abundant compounds identified by HPLC. Aldehydes, acids, alcohols and esters were identified by GC-FID. By the metabolites and PCA analysis we may assign the beverage's flavor to the microbial metabolism.

Conclusion: Heterolactic LAB and *S. cerevisiae* were dominant, being responsible for the organoleptic characteristics of the final product. This is the first time that the microbial dynamics and physicochemical parameters were investigated in the *yakupa* beverage and it may contribute to the future selection of starter cultures to perform *yakupa* fermentations.

Keywords: *yakupa*, PCR-DGGE, HPLC, lactic acid bacteria, volatile compounds

RESUMO

Introdução: *Yakupa* é uma bebida fermentada produzida por índios brasileiros. Neste trabalho a dinâmica microbiana e os metabólitos envolvidos na fermentação do *yakupa* foram investigados.

Resultados: A população de bactérias do ácido láctico (BAL) foi maior do que a de leveduras no início da fermentação ($5 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ e $3 \log \text{ UFC mL}^{-1}$, respectivamente) e após 36 h ambas populações aumentaram atingindo $7 \log \text{ UFC mL}^{-1}$, assim mantendo-se constante até 60 h. A análise de PCR-DGGE identificou as bactérias *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria* e *W. confusa*, responsáveis principalmente pela produção de ácido láctico, e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, responsável principalmente pela produção de etanol e glicerol, *Torulaspora delbrueckii* e *Pichia exiguua*. Maltose (41.2 g L^{-1}), etanol (6.5 g L^{-1}) e ácido láctico (7.8 g L^{-1}) foram os compostos mais abundantes identificados por HPLC. Aldeídos, ácidos, álcoois e ésteres foram identificados por GC-FID. Por meio dos metabólitos identificados e da análise de PCA foi possível atribuir o flavor da bebida ao metabolismo microbiano.

Conclusão: BAL heteroláticas e *S. cerevisiae* foram dominantes, sendo responsáveis pelas características sensoriais do produto final. Esta foi a primeira investigação sobre a dinâmica microbiana e os parâmetros físico-químicos da bebida *yakupa*, o que pode contribuir para a futura seleção de uma cultura iniciadora para fermentação do *yakupa*.

Pavras-chave: *yakupa*, PCR-DGGE, bactéria do ácido láctico, compostos voláteis

INTRODUCTION

The fermentation process is an old and economical method used to produce and preserve different foods worldwide. Naturally fermented foods and beverages are produced from distinct substrates, microorganisms and techniques, and many of them are still prepared in homes, villages and small-scale industries.¹ Brazilian indigenous fermented foods and beverages have been studied regarding the microbial diversity associated with different fermentation processes and substrates²⁻⁵ however, information about the metabolites and chemical parameters of these fermented foods are still scarce.^{6,7}

It is well-known that microbial metabolism produces fermented products with different physicochemical characteristics. Organic acids, alcohols and volatile compounds are directly related to the characteristics of the final product.⁸ Djeni et al. (2011),⁸ studying *attiéké*, a steamed granular cassava meal consumed in Côte d'Ivoire, observed that acidity was proportional to the organic acid content (lactic, acetic and oxalic acids were the most abundant acids), which was important for the quality of the final product. Therefore, analyses of the physicochemical parameters associated to microbial communities show the importance of the fermentation stage in the processing of cassava products and how it has been linked to flavor development and the lowering of pH in the fermented product.

Yakupa is a spontaneously fermented beverage produced by indigenous *Juruna* people, who inhabit the Indigenous Xingu Park, Mato Grosso, Brazil. This non-alcoholic beverage is consumed daily by children and adults and is classified within refreshing *cauims*.⁹ To prepare *yakupa*, cassava roots are first left to soak in water for 2-3 days. This step allows the pre-fermentation of the substrate. Next, the pre-fermented roots, called *puba*, are sundried and mashed, water is added, the mixture is sieved and a white liquid is obtained, which is

then cooked and mixed with grated sweet potatoes. The beverage is consumed as soon as it is prepared and after fermentation for 24-48 h. The final product presents a liquid consistency and yellowish color, it is slightly acidic with a sour taste.

Studies about naturally fermented foods and beverages produced from rice, corn and cassava have demonstrated that both bacteria and yeast were present in a symbiotic relationship during spontaneous fermentation. These bacterial species are often from the genera *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* and others lactic acid bacteria (LAB), and the yeasts species are from the genera *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* and *Pichia*.^{2,3,5-7,10,11}

The microbial dynamics of the fermentation process to produce *yakupa* have never been investigated, and there is no information about the microbial, physicochemical parameters and volatile compounds of the final product. The aim of this work was to study the microbial dynamics involved in the fermentation of this beverage using denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and to identify the metabolites present during the fermentation process using gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) and high performance liquid chromatography (HPLC).

MATERIALS AND METHODS

Beverage making and sampling

Yakupa was prepared by the local Amerindian Yudjá-Pakaya tribe, which is located in the Xingu Indigenous Park (Mato Grosso, Brazil). Figure 1 shows a flow diagram for the production of the *yakupa* beverage. To prepare approximately 60 L of the beverage, 5 kg of pre-fermented (*puba*) bitter cassava roots (*Manihot esculenta* Crantz) and 1.5 kg of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) were used. First, the cassava roots were allowed to ferment for 48 h in

stagnant water to soften the skin. After this time, the cassava tubers were peeled and placed in a bed frame, called *jirau*, to dry for five days. Subsequently, the dried tubers were mashed using a wood pestle, mixed with approximately 15 L of water and sieved to remove the fibers. The resulting white liquid was cooked for 40 min and more water was added. After the mash had cooled, the sweet potato was added bit by bit. Then, the mixture was sieved again, and the beverage was ready for consumption. Fermentation occurred for 60 h at approximately 30 °C, and the taste became a little sour. Four fermentations were performed using the same method described above.

The samplings were performed at 12 h (0, 12, 24, 36, 48 and 60 h) intervals. Twenty milliliters of beverage was collected into sterile empty bottles for physicochemical analysis, and another sample of 20 mL for microbial analysis was added to sterile bottles containing 180 ml of saline peptone diluents (1 g L⁻¹ soy peptone [Himedia, Mumbai, India], 5 g L⁻¹ NaCl [Merck, Darmstadt, Germany], 0.3 g L⁻¹ Na₂H₂PO₄ [Merck], 200 g L⁻¹ glycerol [Himedia]). The samples were maintained at – 20 °C until analysis.

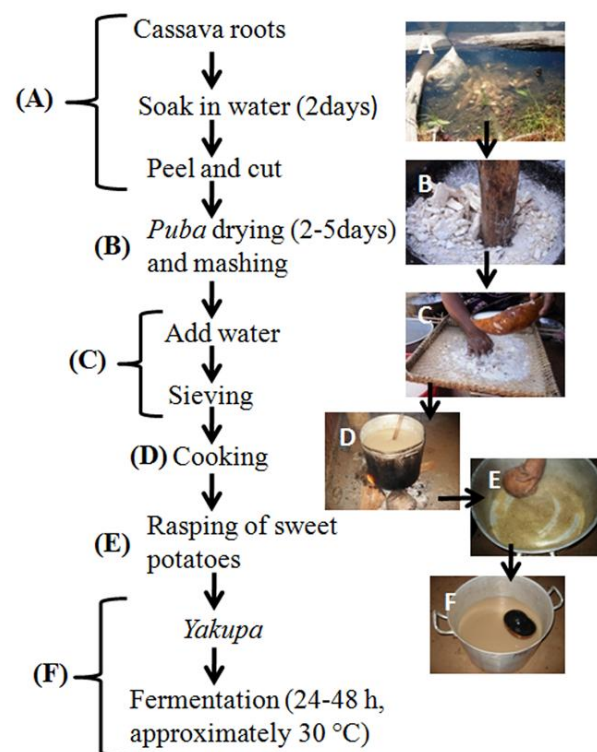


Figure 1 Flow diagram representing the yakupa processing

Enumeration of bacteria and yeast

The samples were mixed in a Stomacher circulator (Seward, USA) for 60 s and 10-fold dilutions were prepared. Counts of LAB and yeast populations during the *yakupa* fermentation were performed. YPD agar (10 g L⁻¹ yeast extract [Merck, Darmstadt, Germany] 10 g L⁻¹ soy peptone [Himedia, Mumbai, India] , 20 g L⁻¹ glucose [Merck, Darmstadt, Germany], 20 g L⁻¹ agar [Merck, Darmstadt, Germany] containing 100 mg L⁻¹ chloramphenicol [Sigma, St. Louis, USA] and 50 mg L⁻¹ chlortetracycline [Sigma, St. Louis, USA]) was used for yeast enumeration, the plates were incubated at 30 °C for 96 h. MRS agar (De Man Rogosa Sharpe, Merck) containing 1 g L⁻¹ nystatin (Sigma, St. Louis, USA) under anaerobic conditions was used for the LAB counts, the plates were

incubated at 30 °C for 72 h. All samples were plated in triplicate. Counts of LAB and yeast were performed.

Physicochemical parameters

Chemical analysis of the beverage

The samples were characterized by pH, total soluble solids (° Brix), protein, fat¹² and total sugars.¹³

HPLC analysis

Carbohydrate (glucose, sucrose, maltose and fructose), organic acid (acetic acid, lactic acid, malic acid and succinic acid) and alcohol (ethanol and glycerol) analyses were performed according to the methodology proposed by Duarte et al. (2010).¹⁴ A Shimadzu liquid chromatography system (Shimadzu Corp., Japan) equipped with a dual detection system consisting of a UV-Vis detector (SPD 10Ai) and a refractive index detector (RID-10Ai) was used. A Shimadzu ion exclusion column, Shim-pack SCR-101 H (7.9 mm x 30 cm), was used at an operating temperature of 30 °C for ethanol and glycerol and 50 °C for acids. Perchloric acid (10 g L⁻¹) was used as the eluent at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. Acids were detected via UV absorbance (210 nm), while alcohols were detected via RID. Carbohydrates were analyzed on a Supelcosil LC-NH₂ column (4.6 mm x 25 cm) operating at 30 °C with acetonitrile:water (75:25) as the mobile phase at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The sugars were detected via RID. Individual compounds were identified by comparing their retention times with the retention times of certified standards, and concentrations were determined using an external calibration methodology. All samples were analyzed in duplicate.

GC-FID analysis

Before GC-FID analysis, volatile compounds from the samples were extracted according to Duarte et al. (2010).¹⁴ The extract containing the volatile compounds was analyzed using a Shimadzu GC Model 17A equipped with a flame ionization detector (FID) and a capillary column of silica DB Wax (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm) (J & W Scientific, Folsom, Calif., USA). The temperature program began with 5 min at 50 °C, followed by a gradient of 50 °C to 190 °C at 3 °C min^{-1} ; the temperature was then maintained at 190 °C for 10 min. The injector and detector temperatures were maintained at 230 °C and 240 °C, respectively. The carrier gas (N_2) was used at a flow rate of 1.2 mL min^{-1} . Injections of 1 μL were made in the split mode (1:10). Volatile compounds were identified by comparing the retention times of the compounds in the samples with the retention times of standard compounds injected under the same conditions. Volatile compounds were semi-quantified with 4-nonanol at a final concentration of 312 $\mu\text{g L}^{-1}$ as an internal standard. All samples were examined in duplicate.

Analysis of the microbial community during *yakupa* fermentation by PCR-DGGE

Total DNA extraction and PCR amplification

Total DNA from samples collected at different times of fermentation (0, 12, 24, 36, 48 and 60 h) was extracted using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and was performed according to the manufacturer's instructions. The DNA samples were verified in 10 g L^{-1} agarose gels.

The DNA from the bacterial community was amplified with primers 968fGC /1401r,¹⁵ spanning the V6–V8 region of the 16S rRNA gene. The DNA from the yeast population was amplified with the eukaryotic universal primers NL1GC and LS2, which amplified a 250 bp fragment of the D1-region of the

26S rRNA gene.¹⁶ The amplification was performed as previously described by Ramos et al. (2010).⁴ Aliquots (2 mL) of the amplified products were analyzed by electrophoresis on 10 g L⁻¹ agarose gels before the DGGE analysis.

PCR-DGGE analysis and bands sequencing

The PCR products from the microbial communities were analyzed by PCR–DGGE using a BioRad DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, Richmond, CA, USA) according to the procedures previously described by Ramos et al. (2010).⁴ Denaturation gradients that varied from 40 to 70 % were used for the bacterial products (100 % corresponded to 7 M urea and 40 % [v v⁻¹] formamide) and 30 to 60 % for the yeasts products. Electrophoresis was conducted at a constant 70 V for 16 h (bacteria and yeast) and at a constant temperature of 60 °C. Following electrophoresis, the gels were stained with SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000 v v⁻¹) for 30 min. The images were visualized and photographed using a transilluminator (LPix®).

Bands from the PCR–DGGE gels were excised with a sterile blade and placed in 50 µL of sterile Milli-Q water at 4 °C overnight to allow the DNA to diffuse out of the polyacrylamide matrix. The DNA was subsequently re-amplified using the same PCR conditions described above. The PCR products were purified and sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea), and the sequences were compared with those available in the GenBank database using the BLAST algorithm (National Center for Biotechnology Information, Maryland, USA).

Statistical analysis

Principal component analyses were performed with the software XLSTAT 7.5.2 (Addinsoft, New York, N.Y., USA) for group data from microbial counts and metabolites produced during cassava *yakupa* fermentation.

RESULTS

Fermentation performance

LAB and yeast counts

The counts of LAB and yeast were evaluated and are presented in Figure 2a. The population of LAB was approximately 5 log CFU mL⁻¹ in the beginning of fermentation, reached approximately 7 log CFU mL⁻¹ after 36 h, and it remained constant until the end of fermentation. Yeasts were found in low populations during the beginning of the fermentative process (approximately 3 log CFU mL⁻¹), and their population increased to 7 log CFU mL⁻¹ by 36 h and remained constant until the end of the process.

Chemical analysis

Samples collected at different times during the *yakupa* fermentation were submitted to chemical analysis. At the beginning of fermentation the soluble fat value was around 50 g L⁻¹, but it decreased to approximately 1 g L⁻¹ at the end (60 h) (Table 1). Soluble protein remained constant (approximately 20 g L⁻¹) during the entire fermentation process. The content of soluble total sugar was low, ranging from 32 g L⁻¹ (0 h) to 24 g L⁻¹ (60 h). A low °Brix value (approximately 5 °Brix) was observed during all fermentation times. The pH value decreased during the fermentation process from 4.5 (at the beginning) to 3.0 (24 h until the end) as showed in Figure 2a.

Substrate and metabolite analysis

Substrate and metabolite compounds, such as carbohydrates, alcohols and organic acids, were evaluated by HPLC. The major carbohydrate identified in the fermentation process was maltose (Figure 2b). At the beginning of fermentation, the concentration of maltose was 41.2 g L⁻¹; however, it was utilized by microorganisms, and 16.2 g L⁻¹ remained after 60 h of fermentation.

Glucose, sucrose and fructose were also detected in lower concentrations (less than 2.0 g L^{-1}). The ethanol concentration increased from 24 h of fermentation, reaching maximum production at 60 h (6.4 g L^{-1}) (Figure 2c). The maximum production of glycerol was 3.7 g L^{-1} , which was also observed at 60 h of fermentation. Organic acids were evaluated, and the results are presented in Figure 2d. Lactic acid was the main acid detected, with the highest amounts observed at 48 and 60 h (7.8 and 7.6 g L^{-1} , respectively). Other organic acids (malic, succinic and acetic acid) were also detected in lower concentrations, presenting values of less than 1 g L^{-1} .

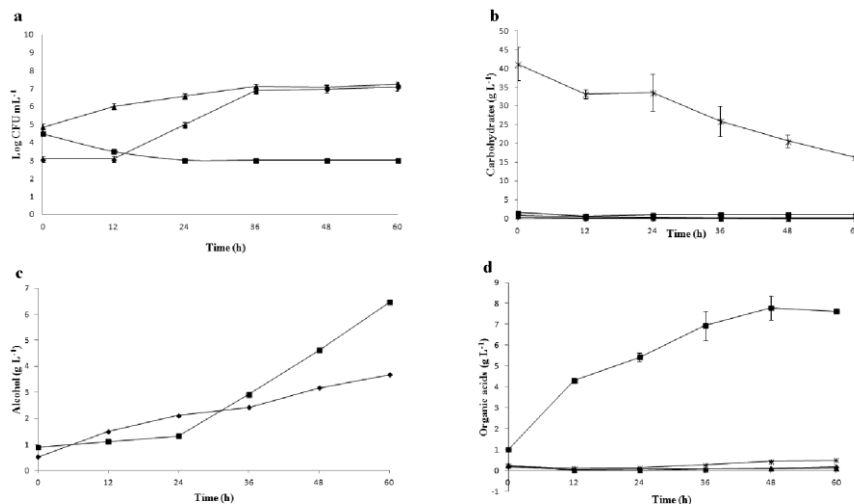


Figure 2 Microbial and physicochemical parameter of *yakupa* during 60 h of fermentation

(a) Counts of microbial population and pH values, ▲ = LAB; ◆ = yeast; ■ = pH. (b) Carbohydrate concentrations, * = maltose; ■ = glucose; ▲ = sucrose; ◆ = fructose. (c) Ethanol and glycerol production, ■ = ethanol; ◆ = glycerol. (d) Changes in the organic acids content, ■ = lactic acid; * = acetic acid; ▲ = succinic acid; ◆ = malic acid.

The volatile compounds detected during *yakupa* fermentation are shown in Table 2. A total of 14 volatile compounds were detected and quantified by GC-FID during the 60 h of fermentation. These compounds included aldehydes

(acetaldehyde, furfural and 1,1-diethoxyethane), acids (butyric, octanoic, nonanoic and decanoic acids), alcohols (2-phenylethanol and 1,3-butanediol) and esters (isobutyl acetate, ethyl butyrate, ethyl lactate, 2-phenylethyl acetate and diethyl malate).

The results obtained for the microbial counts, substrates and metabolites evaluated by HPLC and GC-FID during the 60 hours of *yakupa* fermentation were submitted to PCA (Figure 3). The first (PC1) and second (PC2) principal components explain 75.65 and 14.76 %, respectively, of the total variance (90.41 %). On the positive side of PC1 and PC2, the beginning of fermentation (T0) was correlated with carbohydrates (glucose, fructose, sucrose and maltose), and three volatile compounds (acetaldehyde, butyric acid and 1,1-diethoxyethane). On the positive side of PC1 and the negative side of PC2, the initial times of *yakupa* fermentation (T12 and T24) were correlated with several volatile compounds, which are most likely related to the microbial activity. On the negative side of the F1, the following times (T36, T48 and T60) were correlated with the microbial counts (LAB and yeast), organic acids (lactic and acetic acid), alcohols (ethanol and glycerol) and some volatile compounds (mainly esters).

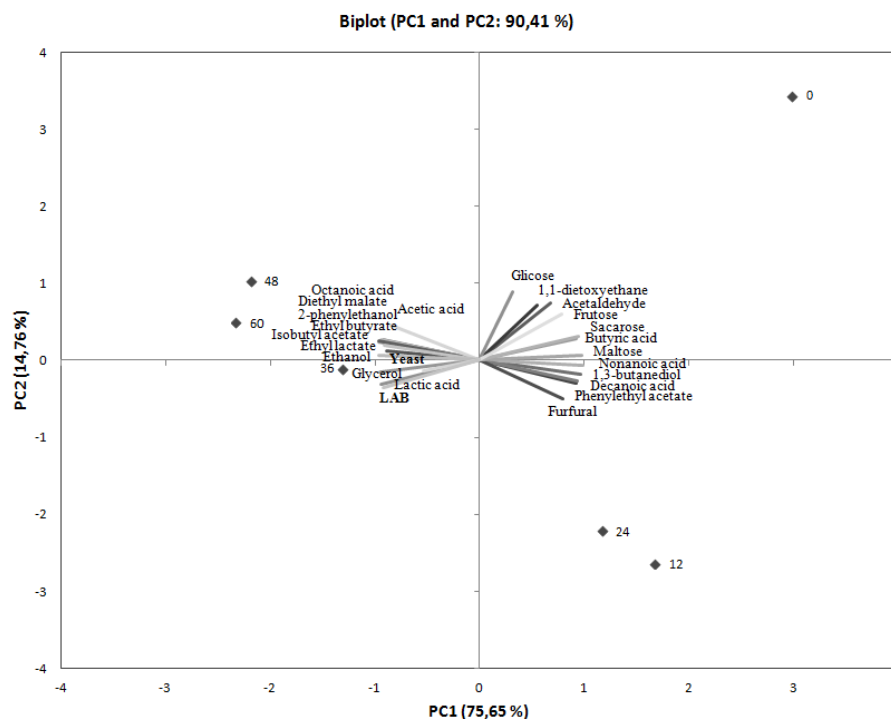


Figure 3 Principal component analysis (PCA) of the microbial counts, substrates, metabolites (by HPLC) and volatile compounds (by GC-FID) during the fermentation of the yakupa beverage

Figure 4 shows the analysis of the bacterial community by PCR-DGGE of the V6-V8 region. It was possible to identify 3 different bacterial species in the yakupa fermentation, which were *Lactobacillus fermentum* (access number HQ293047), *Weissella confusa* (JX041931) and *Weissella cibaria* (KC456621). The main species detected in all samples during 60 h of fermentation were *L. fermentum* and *W. cibaria*. As observed in Figure 4, different bands correspond to the same species, *L. fermentum*. The band D corresponded to uncultured *Lactobacillus* sp. (HQ889826). Figure 5 shows the analysis of the fungal community observed by PCR-DGGE using the D1-region of the 26S rRNA gene. Based on sequences analysis of the bands, three distinct yeast species were

identified, *Pichia exigua* (access number HE799658.1), *Saccharomyces cerevisiae* (J01355.1) and *Torulasporea delbrueckii* (EU441895.1), but two bands (E and F) corresponded to uncultured yeast isolate DGGE gel and uncultured eukaryote, respectively. Band C was identified as DNA from plant *Ipomoea lacunosa* (AF146016.1). Because the primers NL1 and LS2 are universal, they can amplify DNA from different eukaryotic organisms, including the DNA of plants.

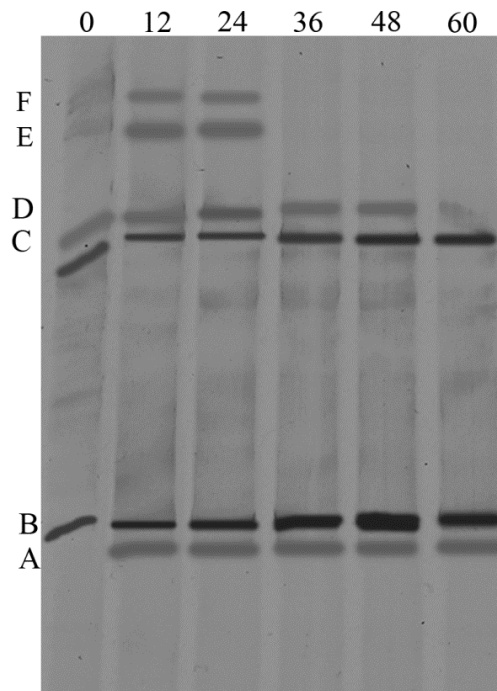


Figure 4 DGGE analysis of the bacterial community during 60 h of fermentation

A= *Lactobacillus fermentum* (100 % similarity); B= *L. fermentum* (100 %); C= *Weissella cibaria* (99 %); D= Uncultured *Lactobacillus* sp. (100 %); E= *Weissella confusa* (98 %); F = *L. fermentum* (98 %).

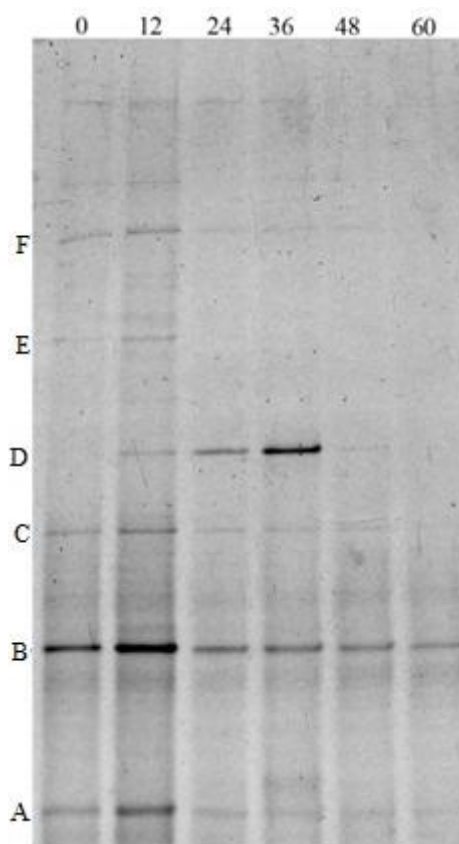


Figure 5 DGGE analysis of the fungal community during 60 h of fermentation

A= *Pichia exigua* (97 % similarity); B = *Saccharomyces cerevisiae* (97 %); C = *Ipomoea lacunosa* (99 %); D = *Torulaspota delbrueckii* (97 %); E= Uncultured yeast isolate DGGE gel (97 %); F= Uncultured eukaryote (97 %).

DISCUSSION

Studying the spontaneous fermentation of products from cassava, such as *gari*, *agbelima*, *attiéké* and *cauim*,^{2,11,17,18} many authors have reported that LAB were the predominant microorganisms involved in these fermentations. Our results for *yakupa* were consistent with theirs, since LAB population increased throughout the fermentation and maintained high until the end, and only LAB species were detected by the PCR-DGGE analysis, indicating that

they were the dominant bacteria. As well known, LAB species play very important roles in the production of a range of traditional fermented foods and beverages due to their acid tolerance and ability to transport and metabolize different carbohydrates.¹⁹ The decrease observed in the pH values (4.5 to 3.0) during the first hours of fermentation (T24-T36) coincided with the increase of LAB population and with the raise on the lactic acid production, mainly acid produced by LAB and it was the major metabolite detected during *yakupa* fermentation. According to Blandino et al. (2003)¹, the production of organic acids in fermented foods commonly reduces the pH value below 4.0, which ensures the microbiological safety of the product because some pathogens do not survive at low pH.

In the present study, high lactic acid content was detected (approximately 8 g L⁻¹ at 48 h) which may be associated with the LAB presence, mainly *L. fermentum* and *Weissella* sp. since they were the dominant bacteria detected during fermentation. Other organic acids were also identified, however in low concentrations, such as acetic, malic and succinic acid. This result can be explained by the heterolactic metabolism of these LAB species producing other organic acids besides lactic acid. According to Coulin et al. (2006),¹⁸ heterolactic fermentation often occurs in most spontaneously fermented cassava products in Africa. The *L. fermentum* species has been reported to dominate the intermediate and final stages during the fermentation of *fufu* and to produce the flavor typical of the product.²⁰ Therefore, the presence of heterolactic bacteria may be important in *yakupa* fermentation for the characteristics of the final product. The dominance of *L. fermentum* species may be attributed to high ambient temperatures (approximately 30 °C) in Mato Grosso, Brazil, where the beverage was produced. Meroth et al. (2003)²¹ reported that *L. fermentum* dominates dried sourdoughs when the incubation temperature was 30 °C or higher.

Ampe et al. (1999)²² reported that species of the *Leuconostoc*–*Weissella* group are regularly present in the early stages of both vegetable and pozol fermentations and that these species contribute to the acidification of the products. The presence of *W. cibaria* in indigenous fermented foods has, to our knowledge, not been reported. This species was previously detected in the fermented fish product of Thailand, *plaa-som*²³ and it was the major LAB found in *jiang-gua* (fermented cucumbers consumed in Taiwan) together with *Leuconostoc lactis*;²⁴ while *L. fermentum* and *W. confusa* were previously identified in some cassava products, such as *attiéké* and *fura*^{18,25}.

Besides LAB population, yeasts were also present throughout the *yakupa* fermentation process. These groups of microorganisms may act simultaneously in a cooperative manner, and thus, the dominant microorganism can vary during the fermentation process.¹ As showed (Fig. 2a), the low yeast population at the beginning of the *yakupa* fermentation increased (from 12 to 36 h of fermentation) simultaneously with the reduction of pH value. Taking that into consideration, we can suggest that the presence of LAB favored yeast growth by the production of the lactic acid, since, as related, the yeast growth in fermented food ecosystems may be favored by the acidification of the environment by bacterial-produced acids.²⁶

Saccharomyces cerevisiae was detected during all fermentation period and thus, it was considered the dominant yeast in *yakupa*. It has been widely reported that *S. cerevisiae* is the most abundant yeast involved in fermenting cassava, such as *fufu* and *attieke*,^{18,27,28} and the alcoholic beverage *caxiri*.⁷ This specie is known to metabolize reducing sugars into ethanol and CO₂ and converts carbohydrates into alcohols and other aromatic components, such as esters, organic acids and carbonyl compounds.^{29,30} Besides, it may stimulate lactic acid bacteria by providing essential metabolites, such as pyruvate, amino acids and vitamins,³¹ and this way BAL population can be maintained during the

process. This is interesting and much important for *yakupa* production and characteristic since its fermentation process involves the coexistence mainly of lactic acid bacteria and *S. cerevisiae*. Glycerol and ethanol were produced during the fermentation process. After 24 hours of fermentation, the yeast population increased and the ethanol concentration also began to simultaneously increase, confirming the *S. cerevisiae*'s metabolic activity. However, ethanol can also result from the heterofermentative fermentation of carbohydrates by LAB, which can be associated to the obligatory heterofermentative species identified, *L. fermentum*, *W. cibaria* and *W. confusa* at the beginning of fermentation. The increase in the glycerol content coincided with the increase in the yeast population, and this compound is one of the main products of fermentation by *S. cerevisiae*.³²

The other yeast specie identified, *Torulasporea delbrueckii*, has been already identified in the alcoholic beverage *pito*³³ and in the fermented milk product *amasi*,³⁴ both consumed in Africa. In these two food products this yeast is related to coexist with the dominant specie *S. cerevisiae*, and this coexistence between *S. cerevisiae* and other yeasts is very common in indigenous fermentations.³¹ During the *yakupa* fermentation, we could observe that *T. delbrueckii* profile in the DGGE gel disappeared after 36 hours of fermentation. However the other non-*Saccharomyces* specie identified in this work, *Pichia exiqa*, was detected during almost all fermentation process (until 60 h). It has been previous reported that apiculate yeasts such as *Candida* and *Pichia* can tolerate ethanol concentrations higher than 6%^{35,36}.

There was a reduction in fat content (1 g L^{-1} at the end), which may be associated with the lipolytic activity of some microorganisms, such as *Saccharomyces*.³⁷ The major carbohydrate identified in the fermentation process was maltose, which is the main disaccharide obtained from the hydrolysis of cassava starch. The concentration of maltose continuously decreased during

fermentation, most likely due to microbial amyolytic activities and consumption.^{28,38} Some LAB species isolated from starchy fermented foods in Africa are reported as amyolytic lactic acid bacteria (ALAB), such as the amyolytic *L. fermentum* (strains OgiE1 and Mw2) isolated from *mawè* and *ogi* from Benin.³⁹ Sanni et al. (2002)⁴⁰ isolated ALAB from Nigerian traditional fermented foods (*fufu*, *burukutu*, *ogi-baba* and *kunu-zakki*) and the isolates also showed a high yield of amylase production.

The influence of microbial metabolisms on the production of many compounds and the organoleptic quality of indigenous fermented foods has been previously described.^{6,17,31} The PCA analysis demonstrated the correlation between microbial counts, substrates and metabolites into two distinct groups. It showed that the carbohydrates (which were consumed by microorganisms) and some volatile compounds were correlated with the initial times of the fermentation and thus, they may be associated with the substrate and the initial microbial activity, respectively. By the other hand, LAB and yeast counts, organic acids, ethanol, glycerol and the esters were correlated with the final fermentation times, which corresponded to the periods of the highest growth rate and activity of the microorganisms. As well known the flavour is usually the result of the presence, within complex matrices, of many volatile and nonvolatile components, which contribute to the taste and to the both taste and aroma, respectively.⁴¹ Within the volatile compounds, acids, acetaldehyde, 1,3-butanediol, 2-phenylethyl acetate, 1,1-dioxyethane, and furfural were the most abundant in the beginning of *yakupa* fermentation, while the esters isobutyl acetate, ethyl butyrate, ethyl lactate and the alcohol 2-phenylethanol were associated with the end, corresponding to high microbial activity (Fig 3). The volatiles compounds found in the end of fermentation process have great influence in the flavour of the final product. Isobutyl acetate and ethyl butyrate are associated with fruit or floral smells.⁴² This compound is used to produce

artificial flavoring reminiscent of orange or pineapple in alcoholic beverages (e.g., martinis, daiquiris etc.). In addition, ethyl butyrate is often added to orange juice, as most associate its odor with that of fresh orange juice.⁴² Ethyl lactate is a monobasic ester formed from lactic acid and ethanol, products from the microbial activity during *yakupa* fermentation. This compound is naturally found in small quantities in a wide variety of foods, including wine and various fruits. The odor of ethyl lactate when dilute is mild, buttery and creamy, with hints of fruit and coconut.⁴³

In conclusion, the dynamic of *yakupa* spontaneous fermentation demonstrated the dominance of heterolactic LAB species, in which *L. fermentum*, *W. cibaria* and *W. confusa* were present and responsible for the lactic acid production and thus, for the beverage acidification. Further, a significant yeast population was observed and *P. exiguus*, *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* (the dominant species) were identified. *S. cerevisiae* may be responsible for the main ethanol content, glycerol and some organic acids and volatile compounds detected. By PCA analysis and metabolites production we may assign the beverage's flavor to the microbial metabolism, especially to the production of volatile compounds (mainly esters) in the middle to final periods of the fermentation process. This is the first time that the microbial dynamics and physicochemical parameters were investigated in the indigenous *yakupa* beverage, and it may contribute to the future selection of candidates for the development of defined starter cultures to perform successful *yakupa* fermentations.

Acknowledgements

The authors thank C. C A A Santos for collecting. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial and scholarship support.

References

- ¹ Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D and Webb C, Cereal-based fermented foods and beverages. A review. *Food Res Int* **36**:527-543 (2003).
- ² Almeida EG, Rachid CCTC and Schwan RF, Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Amerindians. *Int J Food Microbiol* **120**:146–151 (2007).
- ³ Schwan RF, Almeida EG, Souza-Dias MAG and Jespersen L, Yeast diversity in rice cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. *FEMS Yeast Res* **7**:966–972 (2007).
- ⁴ Ramos CL, Almeida EG, Pereira GVM, Cardoso PG, Dias ES and Schwan RS, Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture independent methods. *Int J Food Microbiol* **140**:225–231 (2010).
- ⁵ Ramos CL, Almeida EG, Freire AL and Schwan RS, Diversity of bacteria and yeast in the naturally fermented cotton seed and rice beverage produced by Brazilian Amerindians. *Food Microbiol* **28**:1380–1386 (2011).
- ⁶ Miguel MGCP, Santos MRRM, Duarte WF, Almeida EG and Schwan RF, Physico chemical and microbiological characterization of corn and rice 'calugi' produced by Brazilian Amerindian people. *Food Res Int* **49**:524-532 (2012).
- ⁷ Santos CCAA, Almeida EG, Melo VP and Schwan RF, Microbiological and physicochemical characterisation of caxiri, na alcoholic beverage produced by the indigenous Juruna people of Brazil. *Int J Food Microbiol* **156**:112-121 (2012).
- ⁸ Djeni NT, N'Guessan KF, Toka DM, Kouame KA and Dje KM, Quality of attieke (a fermented cassava product) from the three main processing zones in Côte d'Ivoire. *Food Res Int* **44**:410–416 (2011).
- ⁹ Lima TS, *Um peixe olhou para mim: o povo Yudjá e a perspectiva*. NUTI, Rio de Janeiro (2005).

- ¹⁰ Oguntoyinbo FA, Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale gari production in Nigeria. *Food Control* **19**:465–469 (2008).
- ¹¹ Kostinek M, Specht I, Edward VA, Schillinger U, Hertel C, Holzapfel WH and Franz CMAP, Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Syst Appl Microbiol* **28**:527–540 (2005).
- ¹² AOAC, *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. AOAC International, Gaithersburg, pp.915-922 (2000).
- ¹³ Dische Z, General color reactions, in *Carbohydrates chemistry*, ed. by Wolfran ML and Whistler RL. Academic Press, New York, pp.477-512 (1962).
- ¹⁴ Duarte WF, Dias DR, Oliveira JM, Teixeira JA, Silva JBA and Schwan RF, Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabiroba, jabuticaba and umbu. *LWT-Food Sci Technol* **43**:1564–1572 (2010).
- ¹⁵ Zoetendal EG, Akkermans ADL and de Vos WM, Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**:3854–3859 (1998).
- ¹⁶ Cocolin L, Bisson LF and Mills DA, Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett* **189**:81–87 (2000).
- ¹⁷ Amoa-Awua WKA, Appoh FE and Jakobsen M, Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. *Int J Food Microbiol* **31**:87–98 (1996).
- ¹⁸ Coulin P, Farah Z, Assanvo J, Spillmann H and Puhan Z, Characterization of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *Int J Food Microbiol* **106**:131–136 (2006).
- ¹⁹ McDonald LC, Fleming HP and Hassan HM, Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* **56**:2120–2124 (1990).
- ²⁰ Adekoge GO and Babaola AK, Characteristics of microorganisms of importance in the fermentation of fufu and ogie two Nigerian foods. *J Appl Bacteriol* **65**:449-453 (1988).
- ²¹ Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ and Hammes WP, Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **69**:475–482 (2003).
- ²² Ampe F, ben Omar N, Moizan C, Wachter C and Guyot JP, Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* **65**:5464–5473 (1999).

- ²³ Srionnual S, Yanagida F, Lin LH, Hsiao KN and Chen YS, Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaa-som, a fermented fish product from Thailand. *Appl Environ Microbiol* **7**:2247–2250 (2007).
- ²⁴ Chen YS, Wu HC, Lo HY, Lin WC, Hsu WH, Lin CW, Lin PY. and Yanagida, F, Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from *jiang-gua* (fermented cucumbers), a traditional fermented food in Taiwan. *J Sci Food Agric* **92**: 2069 - 2075 (2012).
- ²⁵ Owusu-Kwarteng J, Akabanda F, Nielsen DS, Tano-Debrah K, Glover RLK and Jespersen L, Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food Microbiol* **32**:72-78 (2012).
- ²⁶ Nout MJR and Sarkar PK, Lactic acid fermentation in tropical climates. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**:395–401 (1999).
- ²⁷ Assanvo JB, Agbo GN, Behi YEN, Coulin P and Farah Z, Microflora of traditional starter made from cassava for attieke production in Dabou (Côte d'Ivoire). *Food Control*, **17**:37–41 (2006).
- ²⁸ Oyewole OB, Characteristics and significance of yeasts involvement in cassava fermentation for 'fufu' production. *Int J Food Microbiol* **65**:213–218 (2001).
- ²⁹ Torner MJ, Martinez-Anaya MA, Antuña B and Benedito de Barber C, Headspace flavour compounds produced by yeasts and lactobacilli during fermentation of preferments and bread doughs. *Int J Food Microbiol* **15**:145-152 (1992).
- ³⁰ Janssens L, De Pooter HL, Schamp NM and Vandamme EJ, Production of flavours by microorganisms. A review. *Process Biochem* **27**:195-215 (1992).
- ³¹ Jespersen L, Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. A mini-review. *FEMS Yeast Res* **3**:191-200 (2003).
- ³² Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA and Pretorius IS, Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Aust J Grape Wine Res* **11**:139-173 (2005).
- ³³ Sefa-Dedeh S, Sanni AI, Tetteh G and Sakyi-Dawson E, Yeasts in the traditional brewing of 'pito' in Ghana. *World J Microbiol Biotechnol* **15**:593-597 (1999).
- ³⁴ Gadaga TH, Mutukumira AN and Narvhus JA, Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. *Int Dairy J* **10**:459-466 (2000).
- ³⁵ Pallman C, Brown J, Olineka T, Cocolin L, Mills D, Bisson L, Use of WL medium of profile native flora fermentations. *Am J Enol Vitic* **52**:198–203 (2001).³⁶ Combina M, Eli'a A, Mercado L, Catania C, Ganga A,

- Martínez C, Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int J Food Microbiol* **99**:237–243 (2004).
- ³⁷ Arpigny JL and Jaeger KH, Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343**:177–183 (1999).
- ³⁸ Fleet GH, Yeast in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr Opin Biotechnol* **18**:170–175 (2007).
- ³⁹ Agati V, Guyot JP, Morlon-Guyot J, Talamond P and Hounhouigan DJ, Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe` and ogi) from Benin. *J Appl Microbiol* **85**:512–520 (1998).
- ⁴⁰ Sanni AI, Morlon-Guyot J and Guyot JP, New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int J Food Microbiol* **72**:53-62 (2002).
- ⁴¹ Longo MA and Sanromán MA, Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies. *Food Technol Biotechnol* **44**:335–353 (2006).
- ⁴² Jiang Y and Song J, Fruits and fruit flavor: classification and biological characterization, in *Handbook of fruit and vegetable flavors*, ed. by Hui YH. Willey, New Jersey, pp.3-24 (2010).
- ⁴³ Pérez-Coelho MS and Díaz-Maroto MC, Volatile compounds and wine aging, in *Wine chemistry and biochemistry*, ed. by Polo MC and Moreno-Arribas MV. Springer, New York, pp.295-312 (2009).