



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

LETÍCIA KLEINHANS PINHEIRO; LUDMILA VILELA REZENDE

**ESTUDO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E FERMENTATIVOS
DURANTE A PRODUÇÃO TRADICIONAL DA BEBIDA INDÍGENA CHICHA**

Dourados/MS

2016



LETÍCIA KLEINHANS PINHEIRO; LUDMILA VILELA REZENDE

**ESTUDO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E FERMENTATIVOS
DURANTE A PRODUÇÃO TRADICIONAL DA BEBIDA INDÍGENA CHICHA**

Artigo escrito seguindo as normas de publicação na revista Food Microbiology, apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, como defesa de Trabalho de Conclusão de Curso, para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Danielle Marques vilela.

Dourados/MS

2016

LETÍCIA KLEINHANS PINHEIRO; LUDMILA VILELA REZENDE

**ESTUDO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E FERMENTATIVOS
DURANTE A PRODUÇÃO TRADICIONAL DA BEBIDA INDÍGENA CHICHA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Prof^a. Dr^a. Danielle Marques Vilela
(Orientadora)

UFGD-FCBA

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
(Membro da banca)

UFGD-FCBA

Prof^a. Dr^a. Rosane Freitas Schwan
(Membro da banca)

UFLA – DBI

Dedicamos aos nossos pais pelo amor e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter nos concedido força e determinação para seguirmos em frente.

Aos nossos pais, por todo o apoio e dedicação que sempre tiveram conosco, nos dando força e confiança para seguirmos nosso caminho.

A todos os nossos familiares e amigos que sempre estiveram presentes nos apoiando e incentivando a persistir.

À universidade e ao corpo docente do curso de Biotecnologia, que auxiliaram de alguma forma em nossa formação e tem participação nesta conquista. Obrigada por todos os ensinamentos durante esses anos.

À Prof^a. Dr^a. Rosane Freitas Schwan e a todo seu grupo de pesquisa na UFLA, por generosamente nos orientar e permitir que realizássemos parte desta pesquisa em seu laboratório. Obrigada pela oportunidade, pela receptividade e por todo o aprendizado adquirido nessa experiência.

À toda equipe do laboratório Multidisciplinar de Biotecnologia da UFGD, principalmente às técnicas de laboratório, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, e por todo o acolhimento e auxílio.

À nossa orientadora, Prof^a. Dr^a. Danielle Marques Vilela, nossa admiração e agradecimento por ter nos acolhido e orientado durante toda a graduação, seu exemplo e ensinamentos serão levados para a vida toda.

A todos, nossos sinceros agradecimentos.

“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutro lugar o que ela não nos pode dar”.

Sigmund Freud

ESTUDO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E FERMENTATIVOS DURANTE A PRODUÇÃO TRADICIONAL DA BEBIDA INDÍGENA CHICHA

Letícia Kleinhans Pinheiro, Ludmila Vilela Rezende, Rosane Freitas Schwan, Danielle Marques Vilela*

* Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Email: daniellevilela@ufgd.edu.br

RESUMO

A chicha é uma bebida tradicional fermentada de milho produzida pelos índios da etnia Guarani-Kaiowá de Dourados-MS, Brasil. Amostras desta bebida foram caracterizadas físico-química e microbiologicamente. A comunidade microbiana foi composta de leveduras, bactérias ácido-láticas (BAL) e bactérias aeróbicas mesofílicas (BAM), que foram identificadas através de métodos dependente (Malditof e sequenciamento) e independente (PCR-DGGE) de cultivo. Os gêneros de bactérias *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterobacter* e *Weissella* foram identificados por sequenciamento da região intergênica 16S rDNA, e os gêneros de leveduras *Rhodotorula*, *Lodderomyces* e *Candida* foram identificados por sequenciamento da região ITS. Além dos micro-organismos encontrados por método dependente de cultivo, a análise de PCR-DGGE detectou algumas outras espécies, tais como *Chroococcidiopsis thermalis*, *Nostoc punctiforme*, *Weissella cibaria*, *Pectobacterium wasabiae*, *Shimwellia blattae*, *Leuconostoc lactis*, *Vibrio campbellii*, *Erwinia toletana* e *Citrobacter koseri*. As BAL dominaram o processo fermentativo, seguidas pelas BAM, que também apresentaram uma população elevada ($6,5 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ em 36h). A alta população de BAL foi responsável pelos elevados índices de ácido láctico encontrados durante o processo fermentativo ($1,2 \text{ g.L}^{-1}$), o que está diretamente relacionado à diminuição dos valores de pH de 6,95 (0h) para 3,7 (36h). A maltose foi o principal carboidrato detectado durante o processo de produção da chicha ($7,02 \text{ g.L}^{-1}$ em 36h). Etanol foi encontrado em concentrações muito baixas (média de $0,181 \text{ g.L}^{-1}$), podendo caracterizar a bebida como não alcóolica, e o teor médio de glicerol na bebida foi de $0,224 \text{ g.L}^{-1}$. Este estudo possibilitou o conhecimento do processo fermentativo da bebida tradicional indígena, a chicha de milho, possibilitando a futura obtenção de

um produto final de maior estabilidade e qualidade através da utilização de culturas iniciadoras além da maior valorização da cultura indígena.

Palavras chave: Fermentado não alcoólico; Microbiota; PCR-DGGE, Maldi-tof

1. INTRODUÇÃO

A fermentação é um dos métodos mais antigos e econômicos de produzir e preservar alimentos. A população indígena de diferentes lugares do mundo vem aprimorando o conhecimento prático sobre a fermentação espontânea que ocorre em diversos substratos (Freire et al., 2013). No Brasil, várias tribos indígenas produzem alimentos e bebidas utilizando a fermentação, geralmente realizada em pequena escala, para uso medicinal e em rituais sagrados (Ramos et al., 2010).

Alguns exemplos de bebidas fermentadas produzidas por comunidades indígenas brasileiras são tarubá, mocororó ou makururu, tiquira, caxiri ou caxiry, aluá, cayssuma, pajauarú, kiki e o cauim ou chicha (Puerari et al., 2015; Freire et al., 2013; Miguel et al., 2012; Ramos et al., 2011; Ramos et al., 2010; Almeida et al., 2007;). Os substratos e a forma de produção dessas diferentes bebidas variam para cada comunidade indígena.

A chicha pode ser feita à base de mandioca, arroz, milho ou frutas, que podem ser ou não mastigados e regurgitados em recipientes nos quais a fermentação ocorrerá de maneira espontânea (Puerari et al., 2015). Os indígenas da etnia Guarani-Kaiowá da aldeia Jaguapiru, localizada em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, preparam a chicha utilizando milho e cana de açúcar como substrato. A produção é feita da maneira tradicional, onde a fermentação é espontânea e iniciada pela microbiota do milho, associada com os utensílios usados durante a preparação da bebida, mãos e ambientes.

A microbiota destas bebidas é complexa e até então desconhecida. Na maioria destes produtos, a fermentação é natural e envolve micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Alguns destes podem participar paralelamente, enquanto outros atuam de maneira sequencial com uma mudança da microbiota dominante durante a fermentação. As bactérias pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bacillus* são geralmente identificadas em produtos fermentados a partir de cereais, assim como fungos dos

gêneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*. As leveduras mais comumente encontradas são as da espécie *Saccharomyces* sp. que geralmente resultam em fermentação alcoólica (Steinkraus, 1998). No entanto, a diversidade microbiana existente durante o processo de produção da chicha em aldeias indígenas, no geral, e principalmente no Mato Grosso do Sul ainda é pouco explorada.

Estudos sobre os micro-organismos envolvidos na fermentação destas bebidas e a dinâmica das comunidades microbianas presente durante todo o processo fermentativo são de grande importância para estudos futuros que busquem obter um produto final de maior qualidade e estabilidade. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo caracterizar o processo fermentativo de produção tradicional de chicha de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção da Chicha e coleta das amostras

A bebida tradicional indígena fermentada de milho - chicha - foi preparada pelos índios da etnia Guarani-Kaiowá, na aldeia Jaguapiru, situada na região de Dourados, Mato Grosso do Sul (Fig. 1). O preparo da bebida foi realizado da forma tradicional pelos indígenas, onde o milho foi previamente moído com o auxílio de um pilão de madeira, em seguida colocado em uma panela com água e fervido; adicionou-se açúcar lentamente durante o processo, realizando degustações até que estivesse em condições favoráveis para a fermentação. A fermentação foi realizada em temperatura ambiente durante 36h, e as amostras foram coletadas assepticamente a cada 6h (Fig. 2). Para cada amostra foram coletadas duas alíquotas de 50 ml, as quais foram armazenadas em sacos plásticos estéreis com fechamento tipo zip lock, contendo 150 ml de solução peptonada 0,1% + 50 ml de glicerol 40%, mantido congelado até a realização das análises.

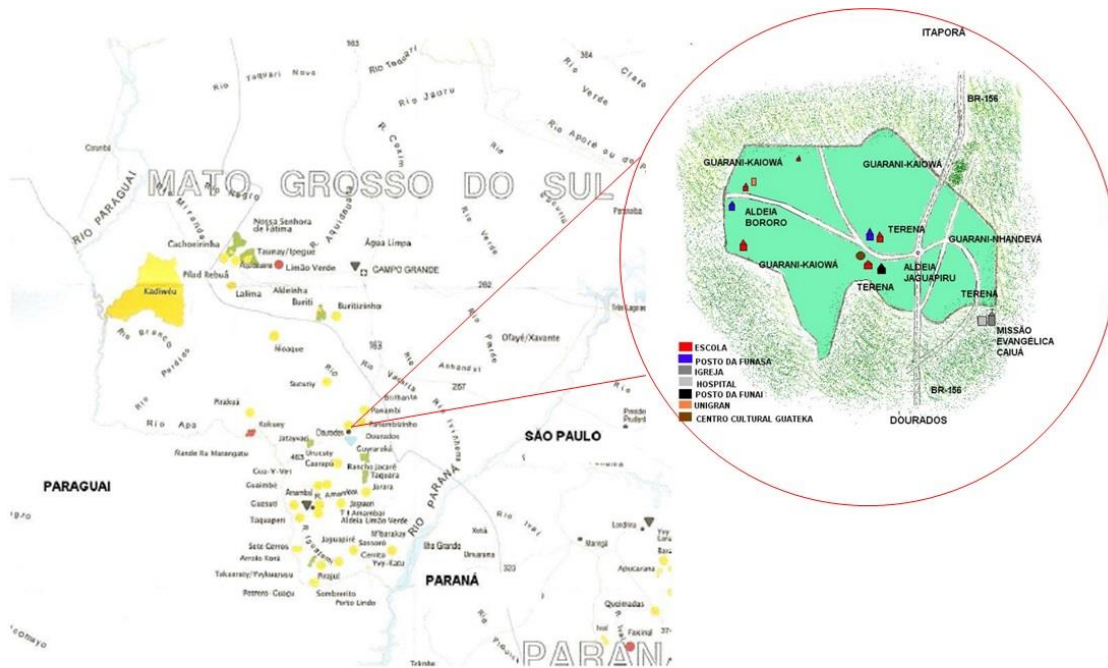


Fig. 1. Mapa de localização da aldeia Jaguapiru, na região de Dourados-MS.



Fig. 2. Processo fermentativo da bebida tradicional indígena – Chicha.

2.2. Identificação microbiana por método dependente de cultivo

2.2.1. Contagem dos micro-organismos

As amostras foram homogeneizadas e as diluições decimais seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} realizadas, onde uma alíquota de 0,1 ml de cada diluição foi plaqueada em triplicata em quatro meios de cultura diferentes: Ágar nutriente (AN) pH 6,8 (em m/v: extrato de carne 0,3%, peptona 0,5% e ágar 1,5%) para contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais (BAM); De Man Rogosa Sharpe (MRS) pH 6,0 (em m/v: peptona bacteriológica 1%, extrato de carne 0,8%, extrato de levedura 0,4%, glicose 2%, Tween 80 0,1%, K_2HPO_4 0,2%, acetato de sódio 0,3%, citrato de amônia 0,2%, sulfato de magnésio 0,001%, sulfato de manganês 0,0036%) para contagem de bactérias do ácido láctico (BAL); Extrato de levedura, peptona, glicose e ágar (YEPG) pH 3,5 (em m/v: extrato de levedura 1%, peptona 1%, glicose 2% e ágar 1,3%) para contagem de leveduras e Dichloran 18% glicerol (DG18) (em m/v: glicose 0,8%, peptona bacteriológica 0,4%, K_2HPO_4 0,08%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,04%, glicerol 17,6% e ágar 1,5%) também para contagem de leveduras. Após o plaqueamento as placas foram incubadas a 30°C por 24 a 48h para o crescimento das bactérias e por no mínimo 72h para o crescimento de leveduras. Após a incubação, a contagem foi realizada e a população calculada em UFC/ml.

2.2.2. Isolamento e purificação dos micro-organismos

A partir da contagem total dos micro-organismos foi selecionada, para análise morfológica das colônias, uma placa de cada meio de cultivo e diluição contendo entre 30 e 300 colônias. O número de isolados selecionados para identificação foi determinado pela raiz quadrada do número total de isolados encontrados, seguindo a metodologia do Bacteriological Manual for Foods (Food Drugs Administration - FDA, 1972). Quanto à morfologia das colônias, foram analisados os seguintes atributos: cor da colônia, forma, elevação e margem. Os isolados selecionados foram submetidos à repicagens sucessivas até que estivessem purificados, o que foi confirmado por análises em microscópio.

Os isolados bacterianos purificados foram submetidos a testes de coloração diferencial de Gram a fim de separá-los nos dois grupos: Gram positivos e Gram

negativos, e analisados em microscópio ótico. Os isolados leveduriformes purificados foram submetidos à coloração de Azul de metileno.

2.2.3. Identificação dos micro-organismos

A identificação foi realizada por agrupamento pela técnica de Maldi-Tof, equipamento de espectrometria de massa que analisa as amostras por padrões de proteínas detectadas nos micro-organismos. Os isolados foram reativados em seus meios de origem com 18h de crescimento e então preparados com soluções específicas, sendo solução orgânica (TFA 2,5%, ácido trifluoroacético 47,5% e solução de H₂O 50%) para bactérias e solução de ácido fórmico (ácido fórmico 25% e H₂O ultrapura 75%) para leveduras, sendo posteriormente levados ao vórtex (1min) e ao sonicador (10min), colocados na placa MALDI e dissolvidos em uma matriz de leitura diluída em solução orgânica, sendo que após a evaporação desses compostos, a placa foi introduzida na fonte, onde os cristais amostra-matriz foram irradiados por um feixe laser.

Após o agrupamento, um Cluster foi gerado, e aqueles isolados que não foram identificados por esta técnica foram encaminhados para sequenciamento. Alguns isolados de cada agrupamento do resultado obtido no Cluster também foram sequenciados para confirmação. Após o sequenciamento, os resultados foram comparados em um banco de dados (Genbank) para confirmar a identificação dos isolados.

2.2.4. Extração de DNA dos isolados

O DNA dos isolados que foram amplificados e posteriormente sequenciados foi extraído com o kit de extração de DNA InstaGene Matrix (Bio-Rad). Os primers utilizados foram ITS1f/ITS4r para leveduras (White et al.,1990), e 27f/1512r para bactérias (Devereux et al., 2004). A Tabela 1 apresenta informações sobre os primers e as condições utilizadas na PCR, que foram determinadas de acordo com o kit de PCR, AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix UP (2X).

A eletroforese foi realizada em uma tensão constante de 40 V por 30 minutos com uma temperatura constante de 60°C. Após a eletroforese, a imagem foi capturada por varredura.

Tabela 1.

Primers usados na PCR enviada para sequenciamento dos microrganismos encontrados na Chicha.

Primer	Sequência (5' – 3')	Comunidade	Alvo	Condições da PCR
ITS1f	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Levedura	Região ITS1- 5.8S rDNA	1
ITS4r	TCCTCCGCTTATTGATATGC			1
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Bactéria	Gene 16S rDNA	1
1512r	ACGGCTACCTGTTACGACT			1

f forward primer; r reverse primer.

1- Condição de PCR – desnaturação por 3 segundos a 96°C; anelamento por 3 segundos a 55°C e extensão por 10 segundos a 68°C; 35 ciclos.

2.3. Composição físico-química e nutricional

Os valores de pH e sólidos solúveis foram mensurados durante a amostragem de acordo com a metodologia proposta pela Associação Oficial de Químicos Analíticos Internacionais (AOAC, 2000). O pH foi medido à temperatura ambiente utilizando-se um medidor de pH digital (ION pH 500). Os sólidos solúveis foram determinados utilizando-se um refratômetro digital (ATC- Portable Refractomer) e os resultados expressos em graus Brix (°B).

Teores de umidade, matéria seca, gordura e cinzas foram determinados de acordo com AOAC (2000) nos diferentes tempos de fermentação. O teor de nitrogênio foi determinado de acordo com o método Kjeldahl, e o teor de proteína bruta foi calculado utilizando o fator de conversão de 5.95 para milho (Greenfield and Southgate, 1992). A concentração de carboidratos foi determinada pela diferença de teores: 100 - (% umidade + % proteína + % gordura + % cinzas) (Wisker and Feldheim, 1990).

2.4. Quantificação de ácidos, açúcares e álcoois por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Carboidratos (frutose, glicose, maltose), ácidos orgânicos (ácidos oxálico, cítrico, tartárico, succínico, málico, propiônico, láctico, acético, butírico) e álcoois (etanol e glicerol) foram analisados por um sistema Shimadzu de cromatografia

líquida (Shimadzu, Japão), equipado com um sistema de dupla detecção consistindo em um detector UV-vis (SPD 10A \hat{i}) e um detector de índice de refração (RID-10A \hat{i}). Uma coluna de íon de exclusão Shim-pack SCR-101 H (7.9 mmx30 cm) foi utilizada, operando a temperatura de 50°C para análise dos ácidos e de 30°C para carboidratos, etanol e glicerol. Ácido perclórico (100 mM) foi utilizado como efluente em uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. Os ácidos foram detectados através da absorvância de UV (210 nm), enquanto os alcoois e carboidratos foram detectados via RID. Compostos individuais foram identificados por comparação de seu tempo de retenção com o tempo de retenção de padrões de análise e as concentrações foram determinadas de acordo com método de calibração externa (Miguel et al., 2012). As análises foram realizadas em todos os tempos de fermentação.

2.5. Avaliação da comunidade microbiana por método independente de cultivo

2.5.1. Extração DNA total das amostras

A extração de DNA total das amostras de todos os tempos de fermentação foram realizadas utilizando o Soil DNA Isolation Kit (Norgen Biotek). O DNA extraído foi quantificado em NanoDrop Lite – spectrophotometer. A partir da quantificação do material genético extraído, foi determinado o uso de 10uL de DNA para cada reação de PCR-DGGE.

2.5.2. Eletroforese em gel de agarose com gradiente desnaturante (DGGE)

As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida 8% (m/v) em tampão TAE 1X com gradiente de desnaturação variando de 15 a 55%. A eletroforese foi realizada em uma tensão constante de 200 V por 4h com uma temperatura constante de 60°C. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo por 30 min e a imagem capturada por varredura. As bandas foram recortadas e amplificadas, e posteriormente enviadas para sequenciamento.

Para amplificação dessas bandas, a reação de PCR foi realizada utilizando os primers 338f/518r para procaríotos (Cocolin et al., 2001), e NS3/ YM951r foram

usados para leveduras (Haruta et al., 2006). A Tabela 2 apresenta informações sobre os primers e as condições utilizadas na PCR-DGGE, que foram determinadas de acordo com o kit de PCR, AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix UP (2X).

Tabela 2.
Primers usados no PCR-DGGE para detectar os microrganismos na chicha.

Primer	Sequência (5' – 3')	Comunidade	Alvo	Condições da PCR
NS3f	CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGC ACGGGGGGGCAAGT CTGGTGCCAGCAGCC	Levedura	Região 18S do rDNA	1
YM951r	TTGGCAAATGCTTTTCGC			1
338f	CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGC ACGGGGGGACTCCT ACGGGAGGCAGCAG	Bactéria	Região V3 do gene 16S rDNA	1
518r	ATTACCGCGGCTGCTGG			1

f forward primer; r reverse primer.

1- Condição de PCR – desnaturação por 3 segundos a 96°C; anelamento por 3 segundos a 55°C e extensão por 10 segundos a 68°C; 35 ciclos.

3. RESULTADOS

3.1. Identificação microbiana por métodos dependente/independente de cultivo

Após o plaqueamento das amostras foram obtidos 223 isolados, que foram divididos em três grupos: BAM (35,8%), BAL (21,52%) e leveduras (42,6%). A Figura 3 mostra as contagens populacionais durante o processo de fermentação por método dependente de cultivo. As bactérias totais aeróbicas mesofílicas estão presentes no substrato desde o início (6,5 Log UFC.mL⁻¹), ocorrendo uma queda na população em 18h de fermentação, e estabilizando a partir de 24h de fermentação (6,1 Log UFC.mL⁻¹). Diferentemente das bactérias totais, as bactérias ácido-láticas apresentaram um comportamento mais estável, iniciando o processo fermentativo em 6,0 Log UFC mL⁻¹, sofrendo uma leve queda em 6h de fermentação e predominando durante o restante do processo (6,6 Log UFC.mL⁻¹).

As leveduras apresentaram contagens populacionais na ordem de 4 Log UFC.mL⁻¹, em média, durante todo o processo de fermentação da chicha, apresentando picos de crescimento com 6 e 30 h de fermentação (5,5 e 6,1 UFC.mL⁻¹, respectivamente). Dentre os grupos de micro-organismos analisados as leveduras apresentaram contagens populacionais inferiores em quase todos os tempos de fermentação.

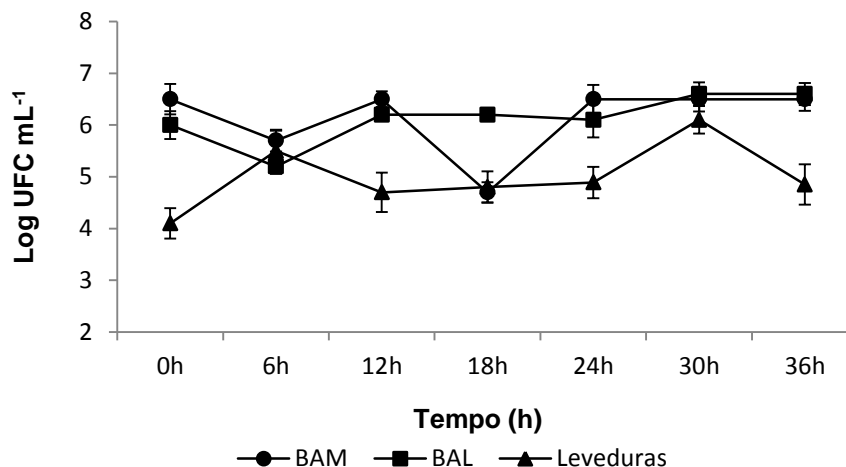


Fig. 3. Distribuição dos micro-organismos em diferentes tempos durante a fermentação da Chicha.

3.1.2. Agrupamento dos micro-organismos por Maldi-tof e sequenciamento dos isolados

Após a análise por Maldi-tof um dendograma (cluster) de agrupamento foi gerado para cada grupo de micro-organismos analisado: BAM (Fig. 4), BAL (Fig. 5) e leveduras (Fig. 6). A partir deste agrupamento, os micro-organismos foram separados em grupos de isolados semelhantes entre si. Alguns destes micro-organismos foram selecionados e sequenciados, tanto para confirmação da identificação encontrada na análise do Maldi-tof, quanto para identificação daqueles que não foram agrupados/identificados por essa técnica. Após o sequenciamento os isolados foram comparados no genbank para identificação.

No grupo BAM (bactérias aeróbicas mesofílicas) houve a prevalência de bactérias da espécie *Klebsiella pneumoniae*, seguido por *Micrococcus luteus*. Dentre as BAL houve a prevalência das bactérias do gênero *Weissella*, sendo encontradas duas espécies diferentes, *Weissella cibaria* II-I-59 e *Weissella confusa* JCM 1093. No grupo das leveduras a espécie predominante foi a *Lodderomyces elongisporus*, sendo encontradas cinco cepas diferentes, *Lodderomyces elongisporus* CBS 5301, *Lodderomyces elongisporus* ZA013a, *Lodderomyces elongisporus* UZ174_14, *Lodderomyces elongisporus* L7625A e *Lodderomyces elongisporus* ZA035.

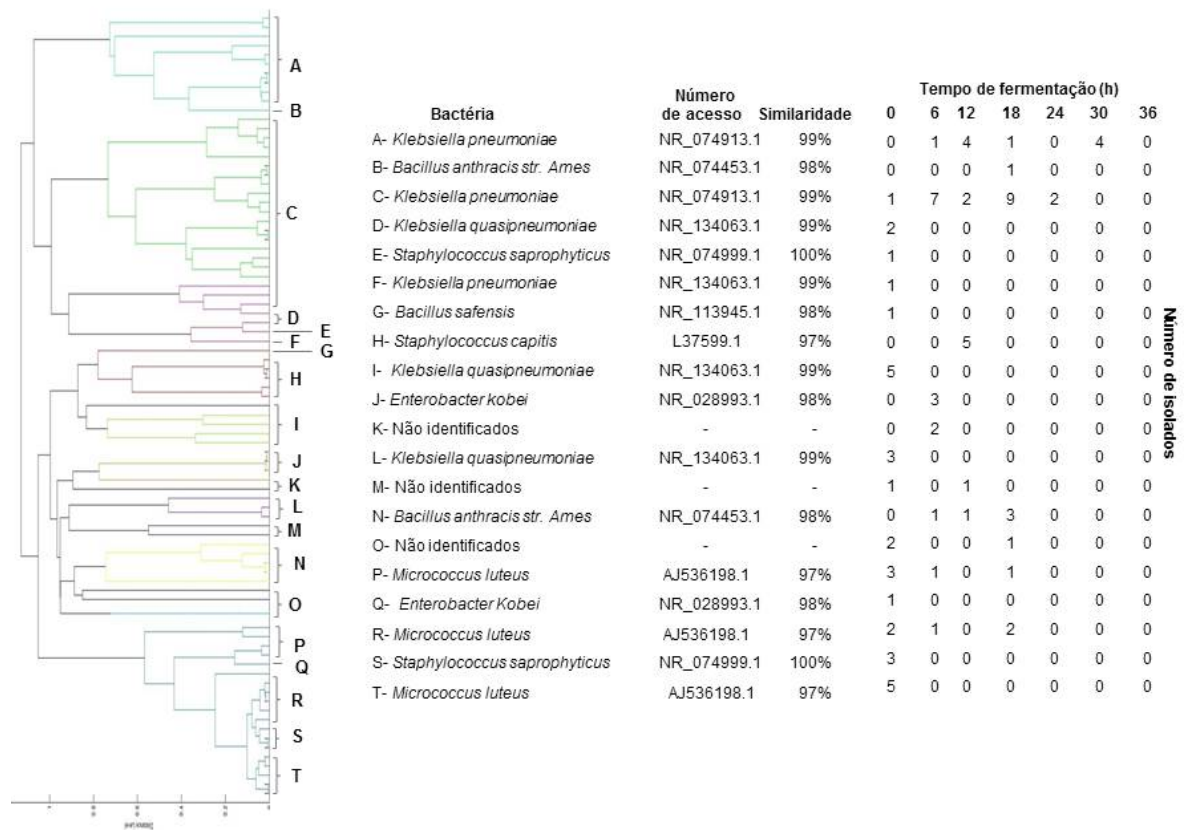


Figura 4. Dendrograma de agrupamento gerado por Maldi-tof e identificação das bactérias totais isoladas em diferentes tempos de fermentação da chicha.



Figura 5. Dendrograma de agrupamento gerado por Maldi-tof e identificação das bactérias ácido-láticas isoladas em diferentes tempos de fermentação da chicha.

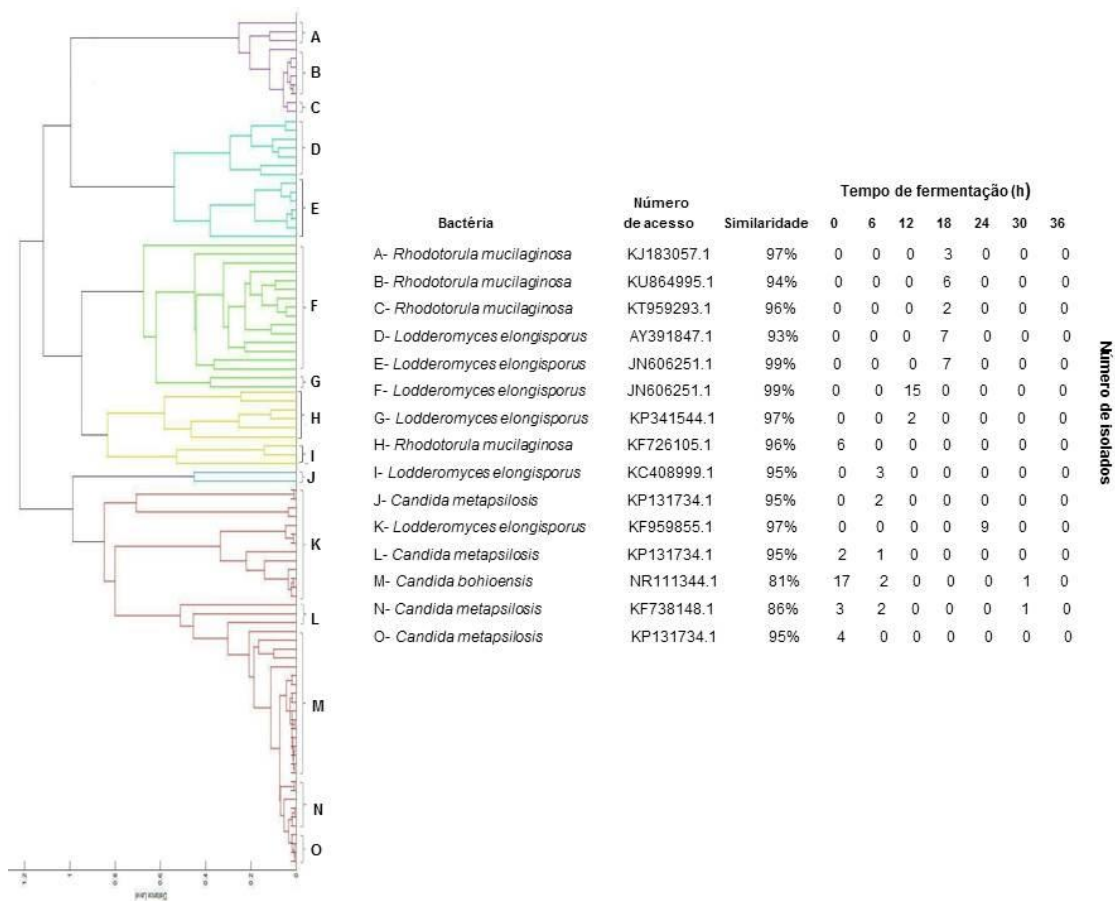


Figura 6. Dendrograma de agrupamento gerado por Maldit-of e identificação das leveduras isoladas em diferentes tempos de fermentação da chicha.

No grupo das BAM o gênero *Klebsiella* apresentou o maior número de isolados durante toda a fermentação, com exceção do tempo 36h no qual nenhum isolado foi encontrado. Os gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* e *Micrococcus* foram identificados apenas nos primeiros tempos de fermentação.

Dentre as BAL o gênero *Weisella* foi o que apresentou o maior número de isolados em todos os tempos de fermentação da chicha. No tempo 0h de fermentação foi identificado apenas um isolado de BAL identificada como *Staphylococcus hominis*.

As espécies do gênero *Lodderomyces* foram predominantes entre as leveduras, estando presentes na maioria dos tempos de fermentação (6h, 12h, 18h e 24h). Outros gêneros também foram identificados, tais como *Rhodotorula*, apenas em 0h e 18h de fermentação, e *Candida* encontrada no início e no final do processo fermentativo (0h, 6h e 30h).

3.1.3. Eletroforese em gel de agarose com gradiente desnaturante (DGGE)

A diversidade bacteriana durante a fermentação da chicha foi identificada por método independente de cultivo (PCR-DGGE) (Fig. 7). As bandas selecionadas para sequenciamento a partir da PCR-DGGE de DNA total bacteriano foram as numeradas de a1 à a13. As bandas sequenciadas da PCR-DGGE de procariotos confirmaram a presença de algumas espécies encontradas pelas técnicas dependentes de cultivo, tais como *Weissella confusa* e *Klebsiella pneumoniae*. No entanto, algumas espécies detectadas pela técnica de PCR-DGGE que não haviam sido isoladas pelo cultivo, são elas: *Chroococcidiopsis thermalis*, *Nostoc punctiforme*, *Weissella cibaria*, *Pectobacterium wasabiae*, *Shimwellia blattae*, *Leuconostoc lactis*, *Vibrio campbellii*, *Erwinia toletana* e *Citrobacter koseri*. Outras espécies, incluindo *Enterobacter kobei*, *Staphylococcus hominis*, *Bacillus safensis* e *Bacillus anthracis*, não foram detectadas por PCR-DGGE, sendo encontradas apenas nas técnicas dependente de cultivo.

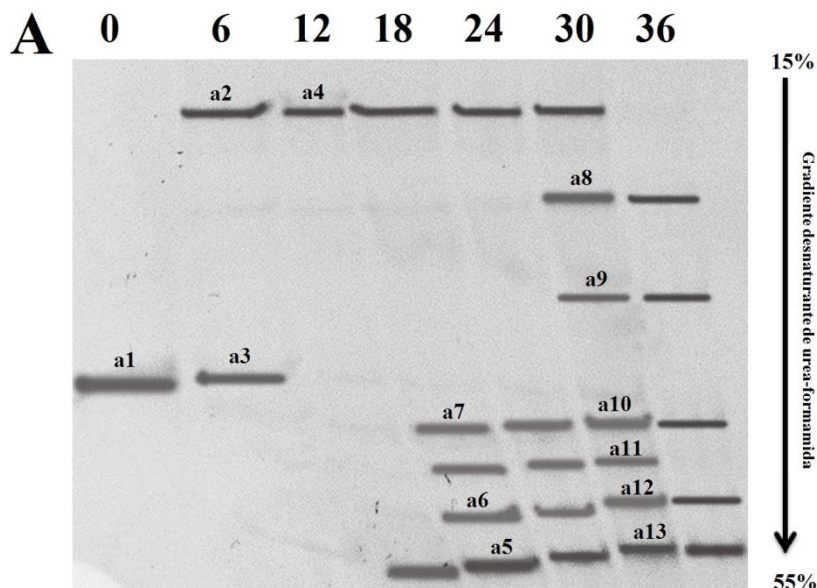


Fig. 7. Perfis das bactérias do PCR-DGGE em chicha de milho durante 36h de fermentação. Os micro-organismos mais semelhantes aos fragmentos identificados, com base em pesquisa no GenBank, foram as bandas a1 - *Chroococcidiopsis thermalis* (similaridade 87%; número de acesso: NR_102464.1); a2 - *Weissella confusa* (similaridade 99%; número de acesso: NR_113258.1); a3 - *Nostoc punctiforme* (similaridade 83%; número de acesso: NR_074317.1); a4 - *Weissella cibaria* (similaridade 99%; número de acesso: NR_036924.1); a5 - *Pectobacterium wasabiae* (similaridade 96%; número de acesso: NR_074764.1); a6 - *Klebsiella pneumoniae* (similaridade 99%; número de acesso: NR_074913.1); a7 - *Shimwellia blattae* (similaridade 96%; número de acesso: NR_074908.1); a8 - *Leuconostoc lactis* (similaridade 98%; número de acesso: NR_113255.1); a9 - *Vibrio campbellii* (similaridade 98%; número de acesso: NR_121755.1); a10 - *Erwinia toletana* (similaridade 93%; número de acesso: NR_104828.1); a11 - *Citrobacter koseri* (similaridade 96%; número de acesso: NR_117751.1); a12 - *Klebsiella pneumoniae* (similaridade 98%, número de acesso: NR_074913.1) e a13 - *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (similaridade 98%, número de acesso: NR_074913.1).

3.2. Composição físico-química da bebida chicha

A composição de metabólitos e macronutrientes durante a fermentação espontânea da chicha foram analisadas (Tabela 4). O valor de pH diminuiu gradativamente durante o processo fermentativo da chicha, iniciando a fermentação com 6,95 e chegando a 3,7 com 36 h de fermentação (Fig 8). O total de sólidos solúveis totais diminuiu de 7,7 (0h de fermentação) para 5,2 °Brix (36h de fermentação).

A chicha apresentou valor energético de 20.36 Kcal.100ml⁻¹, teor de matéria seca variando de 7,49 g.100 g⁻¹ no início da fermentação para 7,23 g.100 g⁻¹ no final (36h). O teor de gordura não sofreu muita variação durante o processo de fermentação, iniciando em 0,02 g.100 g⁻¹ e terminando em 0,023 g.100 g⁻¹. O teor de proteína permaneceu praticamente constante durante todo o processo fermentativo (0,5 g.100 g⁻¹ em média), e o teor de carboidrato de 6,79 g.100 g⁻¹ (0h) para 4,54 g.100 g⁻¹ (36h). Os valores de cinzas e umidade permaneceram praticamente constantes durante toda a fermentação, entre 0,040 g.100 g⁻¹ e 92 g.100 g⁻¹, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Composição nutricional e mudanças físico-químicas nos diferentes tempos de fermentação da chicha.

Amostras	Umidade	Matéria seca	Cinzas	Gordura	Proteína bruta (n x 5,95)	Carboidratos	°Brix
0h	92,38 ± 0,1	7,49 ± 0,3	0,041 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,53 ± 0,02	6,79 ± 0,023	7,7
6h	92,12 ± 0,03	7,55 ± 0,16	0,044 ± 0,0	0,018 ± 0,0	0,56 ± 0,02	6,74 ± 0,016	7,2
12h	92,63 ± 0,2	7,34 ± 0,34	0,04 ± 0,0	0,021 ± 0,0	0,49 ± 0,02	5,24 ± 0,031	6,8
18h	91,99 ± 0,06	7,81 ± 0,09	0,039 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,50 ± 0,02	5,36 ± 0,019	7
24h	92,48 ± 0,18	7,44 ± 0,29	0,046 ± 0,0	0,018 ± 0,0	0,47 ± 0,02	4,89 ± 0,059	6,6
30h	92,04 ± 0,36	7,44 ± 0,18	0,037 ± 0,0	0,023 ± 0,0	0,49 ± 0,02	4,93 ± 0,04	5,9
36h	92,8 ± 0,09	7,23 ± 0,07	0,045 ± 0,0	0,023 ± 0,0	0,5 ± 0,02	4,54 ± 0,062	5,2

Unidade: G 100 mL⁻¹ matéria fresca. Os resultados são seguidos pelo desvio padrão.

Carboidratos, ácidos orgânicos e álcoois (etanol e glicerol) foram analisados por HPLC (Figs. 8 e 9). No decorrer da fermentação a concentração de ácido láctico aumentou rapidamente atingindo o maior teor com 36h (1,2 g.L⁻¹) (Fig. 8). A concentração de ácido cítrico aumentou gradativamente após 12h de fermentação e permaneceu praticamente constante até o fim da fermentação, apresentando valor médio de 0,093 g.L⁻¹. Os demais ácidos analisados (acético, succínico, málico,

tartárico, oxálico, propiônico e butírico) apresentaram concentrações insignificantes, abaixo de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$, durante toda a fermentação. O teor médio de glicerol na bebida foi de $0,224 \text{ g.L}^{-1}$, e de etanol foi de $0,181 \text{ g.L}^{-1}$.

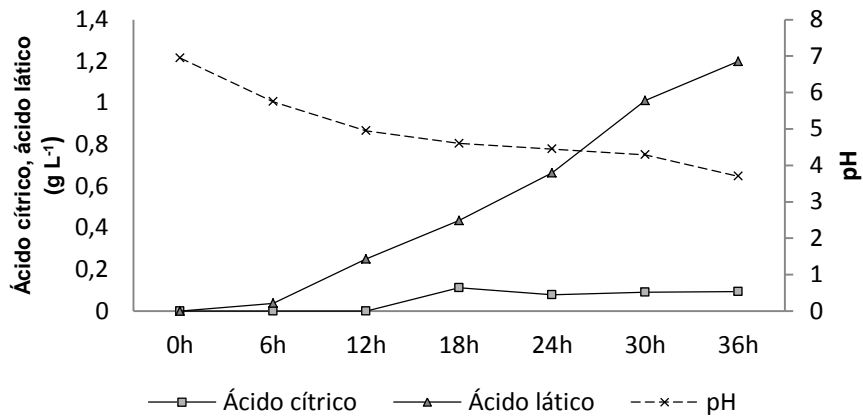


Figura 8. Tendências de ácidos orgânicos e pH durante a fermentação da chicha

Os monossacarídeos glicose e frutose tiveram suas concentrações drasticamente reduzidas durante o processo fermentativo, iniciando suas concentrações em 0 g.L^{-1} , sendo a glicose totalmente consumida com 18 h de fermentação. A maltose foi o carboidrato mais abundante durante a fermentação, e sua concentração variou de um pico de $9,76 \text{ g.L}^{-1}$ (0h) para $7,02 \text{ g.L}^{-1}$ (36h). As máximas concentrações de etanol ($0,47 \text{ g.L}^{-1}$) e glicerol ($0,42 \text{ g.L}^{-1}$) foram encontradas nos tempos 24h e 36h, respectivamente (Fig. 9).

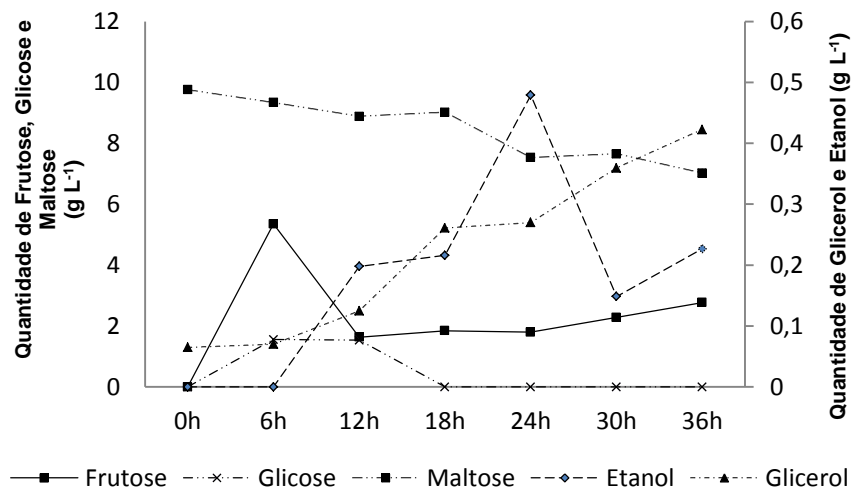


Fig. 9. Dinâmica de açúcares, etanol e glicerol durante a fermentação da Chicha.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada a caracterização físico-química e microbiológica da bebida fermentada a base de milho – chicha, produzida pelos índios da etnia Guarani-Kaiwoá, da aldeia Jaguapiru (Dourados-MS, Brasil). Durante o processo fermentativo da chicha houve a predominância bactérias ácido lácticas, o que também foi encontrado por outros autores que analisaram bebidas fermentadas à base de cereais (Miguel et al. 2012, Puerari et al. 2015, Ramos et al. 2010) Puerari et al. (2015) associaram a predominância de BAL sobre os demais grupos de microorganismos pelo modo de preparo do substrato, uma vez que há a imersão dos cereais em água, seguida pela fermentação, o que facilita o acesso aos monossacarídeos e oligossacarídeos do meio pelas BAL e conseqüentemente seu crescimento mais intenso.

Essa predominância em fermentados também pode ser explicada por sua tolerância a baixos índices de pH (Ramos et al., 2010), além da sua capacidade de transportar e metabolizar diferentes tipos de carboidratos (McDonald et al., 1990). Devido as grandes quantidades de BAL presentes no fermentado, como a espécie *Weissella confusa*, BAL predominante durante a fermentação, há elevada produção de ácido-lático, um dos ácidos responsáveis pela diminuição do pH no decorrer da fermentação. Assim como observado por Puerari et al. (2015), elevadas quantidades de ácido láctico no substrato inibem o crescimento e inativam as *Enterobacteriaceae*, como no caso dos gêneros de *Klebsiella* e *Enterobacter* identificadas na chicha à base de milho, que tiveram seu crescimento interrompido simultaneamente ao aumento da acidez do substrato.

A bactéria ácido láctica *Weissella confusa* já foi relatada anteriormente no alimento Attiéké, um prato tradicional da Costa do Marfim a base de mandioca semelhante ao cuscuz, relatado por Coulin et al. (2006). *Weissella confusa* e *Weissella cibaria* foram detectadas no presente estudo tanto nos métodos dependentes quanto nos independentes de cultivo. A presença de *Weissella cibaria* não havia sido relatada em alimentos fermentados indígenas até o estudo de Freire et al. (2014), que a encontrou em uma bebida fermentada a base de mandioca, a Yakupa. Além disso, alguns estudos indicam o potencial de aplicação biotecnológica

dessa bactéria para uso em probióticos (Fusco et al., 2015).

A prevalência de *Weissella* na bebida fermentada, bactéria láctica de elevado potencial probiótico, associada a um valor energético de 20,36 Kcal/100ml, indicam a possibilidade de produção de um alimento fermentado probiótico após padronização do processo de produção da bebida.

Além da população de BAL, leveduras também foram encontradas no processo de fermentação da chicha. O crescimento simultâneo de BAL e leveduras são favoráveis em bebidas e alimentos fermentados, uma vez que as mesmas são favorecidas pela acidificação criada pelas bactérias, e o crescimento das bactérias é estimulado pela presença de leveduras, que fornecem fatores de crescimento, como vitaminas e componentes de nitrogênio solúvel (Miguel et al., 2015).

A presença de bactérias do gênero *Bacillus*, como as espécies *Bacillus anthracis* e *Bacillus safensis* encontradas neste trabalho durante a fermentação da chicha, também são relatadas em solos e podem ser nocivas se detectadas em populações elevadas. Porém, elas podem ser benéficas quando secretam uma ampla quantidade de enzimas degradativas, incluindo amilases e proteases, que podem ser importantes ao processo fermentativo, principalmente, no caso deste estudo, onde a presença de amilase auxilia na degradação do amido do milho (Miguel et al., 2012).

Saccharomyces cerevisiae foi a levedura dominante em diversos estudos de fermentados indígenas, como observado por Freire et al. (2014), no entanto, ela não foi detectada na chicha. As espécies de leveduras predominantes neste estudo foram *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida* sp. e *Lodderomyces* sp., as quais são frequentemente isoladas de diferentes ambientes, dentre eles, uma ampla variedade de alimentos, incluindo bebidas fermentadas (Miguel et al., 2015).

O decréscimo dos valores de pH (4,5-3,0) coincidiu com o aumento da população de BAL e com o aumento na produção de ácido láctico, o principal metabólito detectado durante a fermentação. Outros ácidos orgânicos também foram identificados, como o ácido cítrico com uma concentração baixa em relação ao ácido láctico, e ainda os ácidos acético, málico e succínico, em concentrações abaixo de 0,05 g L⁻¹, sendo consideradas insignificantes. Esse resultado pode ser explicado pelo metabolismo heterolático das espécies de BAL, produzindo outros ácidos orgânicos, em menores concentrações, além do ácido láctico (Freire et al. 2014). A

produção de ácidos que reduzem o valor de pH abaixo de 4,0 e a presença de outros componentes antimicrobianos durante a fermentação podem promover a segurança e estabilidade do produto final, uma vez que alguns patógenos não sobrevivem em pH baixo (Blandino et al., 2003).

Os substratos para fermentação encontrados na chicha de milho foram, principalmente, glicose, frutose e maltose (Fig. 9). Glicose e frutose são monossacarídeos abundantemente encontrados em grãos e cereais, além disso, representam fontes primárias de carbono para a grande maioria dos micro-organismos. Maltose é produto da hidrólise do amido, que é o principal polissacarídeo de reserva no milho. Os teores dos monossacarídeos glicose e frutose foram drasticamente reduzidos durante o processo fermentativo, o que pode ser explicado pelo rápido consumo dos mesmos pelos micro-organismos presentes na bebida, uma vez que estes carboidratos são fontes primárias de energia devido à facilidade de absorção. A maltose foi o oligossacarídeo mais encontrado, estando presente durante todo o processo fermentativo, sendo produzida a partir da hidrólise do amido pela ação enzimática de amilases, comumente produzidas por micro-organismos como os do gênero *Bacillus* (Miguel et al., 2012). Neste estudo, espécies como os *Bacillus anthracis* e *Bacillus safensis*, capazes de hidrolisar amido, foram encontradas. A concentração de maltose diminuiu durante a fermentação, provavelmente devido ao consumo e a atividade amilolítica microbiana (Almeida et al., 2007).

O etanol foi identificado em baixas concentrações, portando, a chicha de milho pode ser considerada uma bebida não alcoólica. A baixa concentração de etanol também pode ser atribuída à ausência de leveduras alcoólicas durante o processo de fermentação da chicha, tais como a espécie *S. cerevisiae*. Além do etanol, o glicerol também é um dos principais produtos da fermentação por leveduras, podendo ter seu aumento durante o processo fermentativo associado ao aumento da população de leveduras (0,4 g.L⁻¹ em 36h) (Miguel et al. 2012).

A diminuição do valor de sólidos solúveis totais na bebida está diretamente relacionada ao consumo de açúcar pelos micro-organismos. Apesar deste rápido consumo, no final do processo fermentativo a chicha ainda apresentava 5,2 °Brix, característico de bebidas fermentadas não alcoólicas, no caso a chicha.

Algumas bactérias detectadas por PCR-DGGE neste trabalho já haviam sido

previamente relatadas em bebidas indígenas fermentadas, tais como as dos gêneros *Leuconostoc*, *Klebsiella* e *Weissella* (Puerari et al., 2015; Miguel et al., 2012; Freire et al., 2014; Ramos et al., 2010).

Choococidiopsis thermalis, *Nostoc punctiforme*, *Pectobacterium wasabiae*, *Leuconostoc lactis*, *Vibrio campbellii*, *Citrobacter koseri*, *Shimwellia blattae* e *Erwinia toletana* foram detectados apenas pela técnica de PCR-DGGE, o que pode ser atribuído ao fato dessas espécies não serem cultiváveis ou apresentarem populações abaixo de $1 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ durante a fermentação da chicha.

Enterobacter kobei, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus anthracis* e *Micrococcus luteus* foram detectados apenas por métodos dependentes de cultivo, o que reforça a necessidade de métodos moleculares serem usados em conjunto com métodos tradicionais para o estudo de diversidade microbiana em fermentações naturais, que é o caso da chicha.

5. CONCLUSÃO

Este estudo analisou a microbiota envolvida na produção da bebida tradicional indígena chicha, um fermentado não alcoólico a base de milho produzido pelos índios Guarani-Kawioa na região Centro-oeste do Brasil, sendo a primeira pesquisa envolvendo chicha de milho. O estudo indica que a associação de métodos dependente e independente de cultivo são eficazes na descrição da diversidade microbiana da bebida. Os resultados obtidos sugerem que os métodos utilizados permitiram uma boa caracterização físico-química e microbiológica do fermentado. Outros estudos devem ser realizados para melhor conhecimento dos efeitos da microbiota predominante sob o processo fermentativo da chicha, possibilitando o desenvolvimento de um processo controlado utilizando culturas iniciadoras para obtenção de um produto final mais estável, como por exemplo, a bactéria ácido-lática do gênero *Weissella* que apresenta potencial probiótico. A importância deste estudo está não apenas na melhor compreensão do processo fermentativo de bebidas indígenas, mas também no incentivo a apreciação da cultura indígena brasileira.

REFERÊNCIAS

Almeida, E. G.; Rachid, C. C.T.C.; Schwan, R. F. (2007) Microbial population presente in fermented beverage "cauim" produced by Brazilian Amerindians. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 146-151.

AOAC e Association of Official Analytical Chemist, 2000. In: AOAC (Ed.), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*, seventeenth ed. Washington.

Blandino, A.; Al-Aseeri, M. E.; Pandiella, S. S.; Cantero, D.; Webb, C. (2003). Review: Cereal-based fermented foods and beverages. *Food. Res. Int.*, 36, 527–543.

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., Veterinaria, M., 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian Sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (11), 5113e5121.

Coulin, P.; Farah, Z.; Assanvo, J.; Spillmann, H.; Puhan, Z. (2006) Characterization of the microflora of attie´ke´, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *Int. J. Food Microbiol.* 106:131–136.

Devereux, R.; Wilkinson, S. S. Amplification of ribosomal RNA sequences. In: KOWALCHUK, G. A.; BRUJIN, F. J. de; HEAD, I. M.; AKKERMANS, A. D. L.; ELSAS, J. D. van (Ed). *Molecular microbial ecology manual*. 2. Ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. P. 509-522

Freire, A. L.; Ramos, C. L.; De Almeida, E. G.; Duarte, W. F.; Schwan, R. F. 2013. Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of yakupa, an indigenous beverage produced by Brazilian Amerindians. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 567, 577.

Fusco, V.; Quero, G. M.; Cho, G. S.; Kabisch, J.; Meske, D.; Neve, H.; Bockelmann, W.; Franz, C. M. A. P. (2015) The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front. Microbiol.* 6:155.

Greenfield, H.; Southgate, D. A. T., 1992. Food Composition Data. Springer US, Boston, MA. v.79, p.2079, 1999.

Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 109 (1e2), 79, 87.

McDonald, L.C., Fleming, H.P., Hassan, H.M., 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (7), 2120, 2124.

Miguel, M. G. C. P.; Collela, C. F.; Almeida, E. G. de; Dias, D. R. & Schwan, R. F. (2015) Physicochemical and microbiological description of Caxiri – a cassava and corn alcoholic beverage. *Int. J. Food Sc Technol.*, 50, 2537-2544.

Miguel, M. G. C. P.; Santos, M. R. R. M.; Duarte, W. F.; Almeida, E. G.; Schwan, R. F. (2012). Physico chemical and microbiological characterization of corn and rice 'calugi' produced by Brazilian Amerindian people. *Food Res. Int.*, 49, 524–532.

Puerari, C.; Guedes, K. T. M.; Schwan, R. F. Physicochemical and microbiological characterization of chicha, a rice-based fermented beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians. (2015) *Food Microbiol*, 46, 210-217.

Ramos, C.L.; De Almeida, E.G.; Freire, A.L.; Schwan, R.F. (2011). Diversity of bacteria and yeast in the naturally fermented cotton seed and rice beverage produced by Brazilian Amerindians. *Food Microbiol.* 28 (7), 1380, 1386.

Ramos, C.L.; De Almeida, E.G.; Pereira, G.V.D.M.; Cardoso, P.G.; Dias, E.S.; Schwan, R.F. (2010). 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 (2 e 3), 225, 231.

Steinkraus, K. H. Introduction to indigenous fermented foods. In: Handbook of indigenous fermented foods. 2. ed. New York: M. Dekker, 1998.

Wisker, E.; Feldheim, W.; 1990. Carbohydrate and fiber metabolizable energy of diets low or high in dietary fiber from fruits and vegetables when consumed by humans. J. Nutr. 120, 1331, 1337.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S.; Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols : A guide to Methods and Applications (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 315±322. Academic Press : San Diego, U.S.A.