

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA
ASSOCIADA A DUAS MASSAS MADRES COM DIFERENTES
SUBSTRATOS

ANDRÉ SIZER

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA
ASSOCIADA A DUAS MASSAS MADRES COM DIFERENTES
SUBSTRATOS

ANDRÉ SIZER

Orientador: Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Co-orientadora: Alessandra Danile Lira

AGRADECIMENTOS:

Foi uma longa jornada que enfim está terminando. Esse trabalho representa uma etapa muito importante em minha vida que demorou para encerrar e, em muitas ocasiões eu achei que isso nunca ia acontecer. Em todos os lugares que passei durante a graduação fiz amizades, aprendi de pessoas maravilhosas com estilos completamente diferentes. Já trabalhei com planta, com crustáceos, com rato, com gente, em cargo administrativo, em unidade de conservação. Tem muitos nomes que poderiam estar aqui sendo citados, meus amigos da PUCRS e a galera do DAIB, as famílias que já tive e seguem no meu coração, apesar da distância. Mas com certeza, quem esteve do meu lado durante esse período de elaboração do trabalho de conclusão, em cada momento de frustração, desespero, impotência, superação e alegrias, sabe o quão importante isso foi para mim. O apoio de amigos e família é extremamente necessário em um período de estresse e fragilidade como esse, e se eu consegui terminar, foi porque tive suporte emocional, incomodei e irritei quem estava passando por isso junto comigo. Portanto, eu devo esse agradecimento a minha família, sem dúvida de que sem vocês eu não teria conseguido. Muito obrigado, de coração! Nath, mãe, mano, Kamile e Sophia. À espera de Luz Creme.

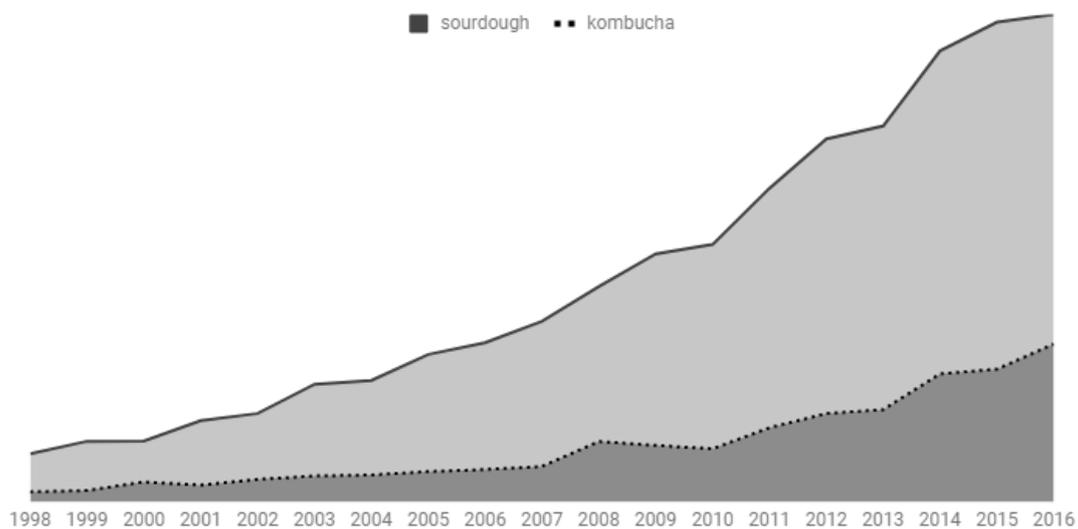
Agradecimento especial a doutoranda do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, Alessandra Danile Lira, sem sua ajuda este trabalho não teria sido realizado.

Este trabalho foi escrito seguindo as diretrizes de publicação do periódico **Ciência e Tecnologia de Alimentos** da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (sbCTA), de acordo com as normas descritas no link:

<http://www.scielo.br/img/fbpe/cta/pinstruc.htm>

1 **Relevância do trabalho:** Este trabalho é fundamental para promover uma linha de pesquisa
2 que está em plena ascensão no mundo e ainda muito pouco valorizada no Brasil. Os dados
3 existentes na literatura serão complementados com os resultados deste e outros trabalhos nesta
4 área. A caracterização de microbiota em massas madres auxilia no entendimento da utilização
5 das mesmas pelas padarias, algo que está muito difundido no mundo todo.

6 O gráfico abaixo foi elaborado para demonstrar o crescente aumento do número de
7 publicações contendo as palavras sourdough e kombucha. Nota-se que o empenho da ciência
8 em estudar o funcionamento do sourdough está em pleno crescimento.



9

10

11 **Títulos do trabalho:**

12 ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MICROBIOTA ASSOCIATED WITH TWO
13 SOURDOUGHS WITH DIFFERENT SUBSTRATES

14 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A DUAS MASSAS
15 MADRES COM DIFERENTES SUBSTRATOS

16

17 Informações para correspondência do autor:

18 Nome: André Sizer

19 E-mail: andresizer@hotmail.com

20

21 Nome completo dos autores:

22 André Sizer

23 Alessandra Danile de Lira

24 Jeverson Frazzon

25

26 O trabalho foi desenvolvido inteiramente no ICTA, Instituto de Ciência e Tecnologia de

27 Alimentos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37 **Resumo**

38 O pão é um dos alimentos mais consumidos pela humanidade, acima de restrições étnicas,
39 geográficas ou ideológicas, ele se tornou uma das bases da alimentação. Resgatando os
40 costumes tradicionais da preparação do pão, atualmente, as pessoas estão progressivamente
41 voltando a se interessar pelo natural, escapando do modo industrial de produzir tudo o que se
42 usa, se veste e se come. Assim sendo, a massa madre está retornando às padarias artesanais e
43 agora aos laboratórios, intrigando a ciência. Esse trabalho analisou fenotípica e genotipicamente
44 os micro-organismos de duas massas madres com origens diferentes. Uma a partir de um caldo
45 fermentado de casca de banana, e a outra a partir da Kombucha, uma cultura líquida de
46 probióticos. O objetivo do estudo foi caracterizar a microbiota das duas massas e identificar as
47 espécies de bactérias e leveduras presentes. Foram sequenciados micro-organismos muito
48 citados em microbiota de massa madre, como *Lactobacillus brevis*, *Acetobacter tropicalis*,
49 *Saccharomyces* sp., bem como espécies que nunca haviam sido descritas na literatura de massa
50 madre, as bactérias do gênero *Aneurinibacillus*. Os resultados obtidos são preliminares para
51 englobar o entendimento do assunto e mais estudos são necessários para dar prosseguimento a
52 este trabalho.

53

54 **Palavras-chave:** fermentação natural, microbiota, kombucha, sourdough

55

56

57

58

59

60 **Abstract**

61 Bread is one of the most consumed foods by humanity, above ethnic, geographical or
62 ideological constraints, it has become one of the major staples food. Rescuing traditional
63 customs from the bread preparation, today, people are progressively becoming interested in the
64 natural, escaping from the industrial way of producing everything that is used, dressed and
65 eaten. Thus, the sourdough is returning to the artisan bakeries and now to the laboratories,
66 intriguing the science. This work analyzed phenotypically and genotypically the
67 microorganisms of two different sourdoughs with different starters culture. One from a
68 fermented broth of banana peel, and the other from Kombucha, a liquid culture of probiotics.
69 The goal of the study was to characterize the microbiota of the two doughs and identify the
70 species of bacteria and yeasts present them. After DNA sequence several microorganisms
71 mentioned in the literature were presented, such as *Lactobacillus brevis*, *Acetobacter tropicalis*,
72 *Saccharomyces sp.*, as well as species that had never been described in the literature for
73 sourdough, the bacteria of the genus *Aneurinibacillus*. The results obtained are preliminary to
74 encompass the understanding of the subject and further studies are necessary to continue this
75 work.

76

77 **Keywords:** sourdough, natural fermentation, kombucha, microbiome

78

79

80

81

82

83 1. Introdução

84 O pão é um alimento de extrema importância na dieta dos seres humanos. Nas mais
85 distintas culturas, dentre as diversas significações do comer, com formas de preparo, aparência
86 e sabores bem singulares, ele está presente e há pelo menos quatro mil anos é consumido pela
87 humanidade (SAMUEL, 2000). Assim como bebidas alcoólicas, conservas e iogurtes, o pão é
88 um alimento fermentado. A fermentação é um processo biológico de obtenção de energia
89 através da transformação de carboidratos, executado por micro-organismos. É a partir disso
90 que se obtém o crescimento dos pães, o álcool das bebidas, o iogurte do leite, além de outros
91 alimentos fermentados (PARVEZ et al, 2006). A massa madre é uma mistura de farinha com
92 água, a qual passa pelo processo de fermentação por bactérias ácido-láticas (BAL) e leveduras
93 (DE VUYST; VANCANNEYT, 2007). Os micro-organismos responsáveis pela fermentação
94 da massa madre podem ser obtidos espontaneamente (presentes na farinha e/ou no ambiente),
95 por meio de algum alimento previamente fermentado (starter) ou até pela seleção de espécies
96 específicas para esse fim (DE VUYST; NEYSENS, 2005). Quando utilizada para fermentar o
97 pão, ela fornece características únicas de aroma, sabor, consistência de miolo e casca baseados
98 na sua composição biótica (GOBBETTI, 1998). Este foi o método utilizado para fermentar
99 pães durante quase toda a história humana, podendo ser considerado um dos mais antigos
100 processos de biotecnologia em produção de alimentos (ARENDRT et al., 2007). Porém, a partir
101 do século XIX, a panificação passou a utilizar o fermento biológico no lugar da massa madre
102 (CORSETTI; SETTANNI, 2007).

103 A espécie de levedura que é utilizada na fermentação de bebidas alcoólicas como,
104 vinhos, espumantes, cerveja e destilados, e na panificação que é conhecida como fermento
105 biológico, é a *Saccharomyces cerevisiae*. Dezenas de cepas dela foram selecionadas até os dias
106 de hoje, e são utilizadas tanto na indústria quanto dentro de nossas casas, cada uma adaptada
107 para fermentar um certo substrato (LEGRAS et al, 2007). Estas mudanças na indústria da

108 panificação aconteceram devido a imposição do mercado em assumir altas demandas e,
109 consequentemente, priorizar quantidade a qualidade, além da necessidade de produção ágil,
110 sendo inevitável empregar o uso de aditivos e reduzir o tempo de fermentação (DE VUYST;
111 NEYSENS, 2005). Um pão de forma comprado no mercado é fermentado na indústria por
112 aproximadamente 40 minutos e sua fórmula é composta por uma série de aditivos conhecidos
113 como melhoradores ou reforçadores de farinha (KATINA et al, 2005), enquanto um pão de
114 massa madre pode fermentar por 24h ou mais, dependendo de fatores como tipo de produto
115 final desejado e temperatura de fermentação (DE VUYST; NEYSENS, 2005). Durante a
116 fermentação natural, ocorre o que é conhecido por pré-digestão, na qual a microbiota presente
117 na massa do pão degrada o amido da farinha (CORSETTI; SETTANNI, 2007) e o glúten,
118 favorecendo a digestão que vai ocorrer no nosso corpo, inclusive para aquelas pessoas com
119 sensibilidade ao glúten (GEREZ; ROLLÁN; DE VALDEZ, 2006). O crescente interesse em
120 cuidar da alimentação, aliado a um resgate histórico de hábitos saudáveis está trazendo à tona
121 novamente a utilização da massa madre na panificação (KATINA et al, 2005). E o interesse
122 das padarias, dos consumidores, dos artesãos dos pães, traz junto um empenho da ciência em
123 investigar o assunto. No ano de 1998 a palavra “sourdough” apareceu em 186 trabalhos
124 acadêmicos, em 2016 o número subiu para 1780 publicações.

125 A Kombucha é uma bebida obtida através da fermentação do chá de *Camellia sinensis*
126 (chá preto ou chá verde) com sacarose (10 a 15%). Este preparado caseiro tradicional existe
127 graças a uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras, as quais dão origem a uma bebida um
128 pouco doce, carbonatada e ácida. É uma bebida consumida historicamente na China, Rússia e
129 Alemanha, porém recente a popularização nos Estados Unidos trouxe a fama atual de
130 benefícios para a saúde, como aumento de imunidade, redução de pressão sanguínea e até cura
131 de câncer (GREENWALT; STEINKRAUS; LEDFORD, 2000). Estes supostos efeitos
132 saudáveis da Kombucha criaram um crescente interesse da ciência por essa bebida.

133 Para o presente estudo, uma massa madre foi desenvolvida utilizando a Kombucha
134 como cultura starter e outra a partir de água fermentada com casca de banana. O foco do
135 trabalho foi investigar a microbiota das duas massas madres, através de sequenciamento de
136 colônias isoladas de meios de cultura específicos a fim de conhecer as espécies de bactérias e
137 leveduras presentes. Os conhecimentos adquiridos, em complemento àqueles já citados na
138 literatura, são fundamentais para compreender o papel da microbiota em cada processo de
139 produção do pão.

140

141 2. Materiais e Métodos

142 2.1 Preparação das massas madres:

143 Durante todo o processo de preparação das massas madres, foi adicionado água filtrada
144 e farinha de trigo branca comercial. As massas e as culturas *starters* foram armazenadas em
145 recipientes de vidro, coberto com plástico PVC com furos apenas para passagem de ar, em
146 temperatura ambiente, em um armário (escuro), separados, para evitar a contaminação entre
147 elas.

148 Para cada massa madre foi utilizado um *starter* diferente. Para a primeira, identificada
149 como SP, a casca de uma banana foi deixada submersa em água filtrada em um recipiente de
150 vidro por 48h. Ao final desse período, a água estava um pouco turva e com bolhas (Figura 1a),
151 indicando presença de micro-organismos. A segunda massa, chamada de K, foi iniciada a partir
152 do líquido de uma Kombucha preparada *in house* com mais de um ano de idade (Figura 1b).

153 (FIGURA 1)

154 Após a obtenção dos *starters* o processo de criação, alimentação e reprodução das
155 massas foi igual para as duas: No primeiro dia (dia 1), 10 mL do líquido “contaminado” (*starter*)
156 foi adicionado a 20 g de farinha, misturado até a obtenção de uma massa homogênea e

157 reservado. No segundo dia (dia 2), a massa foi refrescada, ou seja, adicionado 10 mL de água e
158 20 g de farinha. A mistura, que pesava 60 g, foi homogeneizada e reservada. Nos próximos
159 dias, a fim de consolidar a microbiota e evitar o acúmulo desnecessário da massa, antes de cada
160 refresco diário, a mesma quantidade a ser adicionada, foi descartada, isto é, 30 g de massa
161 retirado e 10 mL de água e 20 g de farinha adicionado diariamente. Esse processo se repetiu
162 por oito dias, até que as massas começaram a dobrar de volume de um dia para o outro,
163 indicando intensa atividade biótica. Após esse período, as massas foram refrescadas a cada 48
164 h.

165 Para a fabricação dos pães foram utilizadas grandes quantidades das massas, para tal, os
166 refrescos foram feitos sem descarte da massa, assim, possibilitando o crescimento da mesma e
167 utilização da quantidade necessária. Sempre que se retira a massa madre para utilização, deve-
168 se deixar uma quantidade para dar continuidade, desse modo, ela nunca vai terminar.

169

170 2.2 Isolamento e identificação microbiana

171 2.2.1 Isolamento em meios específicos

172 Foi colocado 25 g de cada uma das massas madres em diferentes Erlenmeyer (225 mL)
173 contendo água peptonada a 1%. Esta suspensão foi homogeneizada num *stomacher* durante 30
174 minutos a temperatura ambiente. Dessa mistura foram retirados 100 µL, os quais foram
175 pipetados em três meios líquidos diferentes: YP (extrato de levedura 1%, peptona 1%), MRS
176 broth (peptona de caseína 10 g/L, extrato de carne 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, Dextrose
177 20 g/L, Polisorbato-80 1 g/L, citrato de amônio 2 g/L, acetato de sódio 5 g/L, sulfato de
178 magnésio 0,1 g/L, sulfato de manganês 0,05 g/L, fosfato dipotássico 2 g/L) e TSB (triptona de
179 caseína 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, glicose 2,5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, fosfato dipotássico
180 2,5 g/L). Em seguida foram colocados em estufa a 37°C por 24 a 48h. Após esse período,

181 retirou-se, 100 µL de cada um dos meios líquidos e espalhou-se com uma alça de *Drigalski* em
182 placas de *Petry* com os respectivos meios sólidos (mesma composição dos líquidos adicionado
183 ágar a 2%) deixando-se novamente em estufa a 37°C por 24 a 48 h. Foi realizado o isolamento
184 de todas as colônias que cresceram em novas placas pelo método de esgotamento por estrias,
185 estas, colocadas novamente na estufa, na mesma temperatura.

186

187 2.2.2 Identificação fenotípica de isolados

188 O método de coloração de Gram possibilita a visualização de micro-organismos em
189 microscopia óptica para reconhecimento fenotípico e identificação de tipo celular. Para a
190 realização deste procedimento, é necessário fixar a amostra na lâmina seguindo os seguintes
191 passos:

- 192 1. Flambar rapidamente na chama do bico de Bunsen uma lâmina limpa;
- 193 2. Identificar com o nome da amostra o lado da lâmina onde será feito o esfregaço;
- 194 3. Flambar a alça de platina, deixá-la esfriar e colocar na lâmina uma gota de solução salina
195 fisiológica;
- 196 4. Flambar novamente a alça de platina, deixar esfriar próximo a chama, abrir a placa com
197 a cultura teste e tocar cuidadosamente a colônia escolhida para retirada da amostra;
- 198 5. Esfregar o material com movimentos de rotação da alça de platina, para se obter um
199 esfregaço de forma oval, bem fino e uniforme;
- 200 6. Deixar secar nas proximidades da chama;
- 201 7. Fixar o esfregaço passando a lâmina (lado oposto ao esfregaço) cinco vezes na chama
202 do bico de Bunsen (rapidamente).

203 Feito isso, segue-se a coloração de Gram:

- 204 1. Cobrir toda a lâmina com solução cristal violeta (corante roxo), aguardar um minuto;
- 205 2. Lavar rapidamente em água destilada;

- 206 3. Cobrir a lâmina com solução de Lugol (mordente) por um minuto;
- 207 4. Lavar em água destilada;
- 208 5. Inclinar a lâmina e gotejar álcool-acetona ou álcool absoluto (cerca de 15 segundos);
- 209 6. Lavar a lâmina rapidamente em água corrente;
- 210 7. Cobrir com fucsina e aguardar 30 segundos;
- 211 8. Lavar a lâmina em água destilada e secar (sem esfregar);
- 212 9. Colocar uma gota de óleo de cedro sobre a lâmina e observar em objetiva de imersão
- 213 (100X).

214

215 Este procedimento foi executado após três passos do estudo:

- 216 • Espalhamento com alça de *Drigaslki*;
- 217 • Esgotamento com alça de platina.

218

219 2.3 Extração e quantificação de DNA

220 A extração de DNA seguiu dois protocolos distintos, um para as culturas de bactérias,

221 utilizando o kit PureLink Genomic DNA K1820-01 e seguindo as instruções do fabricante,

222 outro para leveduras, seguindo o método descrito por PAGANI et al. (2016). Apenas as colônias

223 obtidas no meio YP passaram por ambas extrações. Nas demais colônias apenas DNA

224 procariótico foi extraído. A qualidade da extração do DNA foi analisada em um gel de agarose

225 a 1%, corado com brometo de etídio. A voltagem foi ajustada para 70 V (PowerPac™ Basic

226 Power Supply, Bio-Rad). Após a corrida, o gel foi analisado sob radiação ultravioleta no

227 aparelho Gel Dot 1000 Fluorescent Imaging System, Bio-Rad, número 170-7520, utilizando

228 óculos de proteção. Todas as amostras de DNA foram quantificadas através do fluorímetro

229 Qubit® 3.0 (Invitrogen, California, USA), que foi calibrado para quantificar amostras de DNA
230 dupla fita. A quantificação foi realizada de acordo com recomendações do fabricante.

231

232 2.4 Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

233 2.4.1 Oligonucleotídeos

234 2.4.1.1 Oligonucleotídeo 16S do rRNA:

235 Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram 515F e 806R (Tabela 1). A
236 reação de amplificação do DNA para as colônias isoladas de bactérias foi feita em um volume
237 de 25 µL. A mistura para uma reação foi de 18,8 µL de H₂O Milli-Q, 2,5 µL de 10X PCR Buffer
238 (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1 µL de MgCl₂ (1mM de concentração final), 0,5
239 µL de dNTP, 0,5 µL de cada primer, 0,2 de µL de Taq DNA Polimerase e 1 µL do DNA
240 genômico purificado. A reação foi incubada no termociclador de DNA (modelo 170-9703,
241 MyCycler™, Termal Cycler, Bio-Rad). A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial
242 por 3 minutos a 95°C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30
243 segundos a 72°C, e um passo final de 5 minutos a 72°C.

244

245 2.4.1.2 Oligonucleotídeo 5.8S do rRNA:

246 Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram o ITS1 e ITS4 (Tabela 1).
247 A PCR para identificação das leveduras foi feita em um volume de 25 µL. A mistura para cada
248 reação foi de 19,05 de H₂O Milli-Q, 2,5 µL de 10X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500
249 mM KCl), 0,75 µL de MgCl₂ (1mM de concentração final), 0,5 µL de dNTP, 0,5 µL de cada
250 primer, 0,2 de µL de Taq DNA Polimerase e 1 µL do DNA genômico purificado. A mistura foi

251 submetida a uma desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, seguido de 33 ciclos de 45 segundos
252 a 95°C, 30 segundos a 55°C e 45 segundos a 72°C, e um passo final de 7 minutos a 72°C.

253 (TABELA 1)

254 2.4.2 Análise do produto do PCR:

255 O produto da PCR foi carregado dentro de poços em um gel de agarose a 1%, corado
256 com brometo de etídio. A voltagem foi ajustada para 80 V no aparelho PowerPac™ Basic
257 Power Supply, Bio-Rad. Após a corrida, o gel foi analisado sob radiação ultravioleta no
258 aparelho Gel Dot 1000 Fluorescent Imaging System, Bio-Rad, número 170-7520, utilizando
259 óculos de proteção. O tamanho das bandas foi estimado utilizando marcador de peso molecular
260 1kb (Promega).

261 2.5 Sequenciamento e identificação genotípica

262 Todas as amostras foram sequenciadas no equipamento ABI-Prism 3500 Genetic
263 Analyzer (Applied Biosystems). O resultado do sequenciamento, obtido na forma de
264 eletroferograma foi analisado com o programa Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit
265 e as sequências obtidas, comparadas com as existentes no banco de dados do NCBI.

266

267 3. Resultados e Discussão

268 3.1. Preparação das massas madres

269 O método de preparo das massas madres utilizadas no estudo obteve sucesso, visto que
270 ambas as massas foram testadas e estão fermentando pães corretamente. Elas são mantidas em
271 uma proporção de 150 (massa total / farinha total x 100), ou seja, em uma massa de 60 g, 40 g
272 são de farinha e 20 g de água. GOBETTI et al. (1994), evidenciaram que a variabilidade de
273 espécies encontradas na massa madre proporção depende de fatores como o grau de hidratação

274 da massa, o tipo de cereal usado e a temperatura de fermentação e manutenção da mesma. Do
275 mesmo modo, segundo DE VUYST; NEYSENS (2005), as massas madres deste estudo são
276 classificadas no tipo 1a, as quais são derivadas de um composto fermentado naturalmente, e são
277 compostas por uma microbiota bem adaptada, com alta acidez e resistente a contaminação.
278 Além disso, eles alegam que a microbiota apresenta um papel importante na acidificação,
279 fermentação da massa e na formação de aroma. Esses dados, estão de acordo com as
280 características das nossas massas. As duas massas madres utilizadas nesse estudo possuem os
281 mesmos atributos, foram desenvolvidas e são mantidas sob as mesmas condições, sendo a única
282 modificação na composição delas, os micro-organismos que as originaram e as cultivaram.
283 Assim sendo, antes de qualquer resultado científico de identificação da microbiota, a análise
284 das duas massas, permite notar diferenças claras. Em temperatura ambiente, a massa SP leva
285 de 24 a 30 horas para dobrar de tamanho, enquanto a K em no máximo 8 horas está com o dobro
286 de volume após ser refrescada. É relevante ressaltar também, que, se mantidas a 4°C, a SP
287 conserva a mesma aparência do primeiro dia mesmo ao longo de vários dias, já na K nota-se
288 um metabolismo reduzido, crescendo mais lentamente do que se dá em temperatura ambiente,
289 mas atingindo o mesmo crescimento no decorrer de alguns dias. Além da velocidade de
290 reprodução e fermentação, percebida visualmente pela presença de bolhas de ar e um tamanho
291 muito maior, o aroma característico da fermentação foi muito presente durante o processo, a
292 massa K apresentou um “cheiro de leite”, provavelmente resultante da fermentação láctica, já na
293 massa SP, o odor marcante da cetona se mostrou presente, oriundo da fermentação acética. De
294 acordo com DAMIANI et al. (1995) e DE VUYST; NEYSENS (2005), a microbiota das massas
295 madres é caracterizada pela presença predominante de bactérias heterofermentativas, em
296 contraste com outros alimentos fermentados. Estas têm como produtos tanto ácido lático quanto
297 o ácido acético, além de álcoois e aldeídos, o que é determinante na formação do aroma.

298

299 3.2 Isolamento e identificação microbiana

300 3.2.1 Isolamento em meios específicos

301 Todos os meios de cultura obtiveram sucesso na proliferação de micro-organismos,
302 tanto na fase líquida quanto nas placas. Após o espalhamento com alça de *Drigalsky* (Tabela 2)
303 a maioria das placas demonstrou crescimento de mais de uma colônia, já as placas que passaram
304 pelo esgotamento por estrias, foi possível isolar colônias separadamente. Os meios de cultura
305 utilizados no nosso estudo vão de acordo com os citados na literatura, DE VUYST;
306 VANCANNEYT em uma revisão publicada em 2007 dizem que o sucesso no isolamento
307 depende de alguns fatores, sendo o meio utilizado o primeiro deles. O meio MRS é correto para
308 lactobacilos. Porém, eles mostram também que condições do meio como temperatura, pH,
309 aeróbico/anaeróbico podem selecionar espécies diferentes, além disso, disponibilidade de
310 aminoácidos e/ou vitaminas específicos também são fatores limitantes.

311 MEROTH et al. (2002, 2003) e VRANCKEN et al. (2011) utilizaram o meio MRS5, o
312 qual é modificado do MRS tradicional, com a adição de vitaminas e, além disso, contém
313 cicloheximida (VERA; RIGOBELLO; DEMARIGNY, 2009), um inibidor de síntese proteica
314 para eucariotos, a fim de evitar o crescimento de leveduras. O meio YP também é bastante
315 utilizado para crescimento de leveduras, porém obter sucesso no desenvolvimento de leveduras
316 nos meios de cultura não é fácil, visto que a densidade de BAL é pelo menos 100 vezes maior
317 (OTTOGALLI; GALLI; FOSCHINO, 1996) (DE VUYST; NEYSENS, 2005) (VRANCKEN et
318 al, 2011). Portanto, VRANCKEN et al. (2011) adicionaram cloranfenicol a 0,1g/L, um
319 antibiótico de amplo espectro e além disso, eles testaram o crescimento de BAL e leveduras a
320 23°C, 30°C e 37°C e a única temperatura que não cresceu leveduras foi a 37°C. Ainda, VERA;
321 RIGOBELLO; DEMARIGNY (2009) testaram 11 meios de cultura diferentes para lactobacilos
322 e concluíram que não há um meio específico para identificar a complexidade da microbiota de

323 uma massa madre, contudo, a combinação do MRS-maltose (maltose ao invés de glicose) com
324 MRS5 seria o mais apropriado, apesar disso, o meio MRS apresentou resultados muito
325 satisfatórios para o crescimento de micro-organismos.

326

327 3.2.2 Identificação fenotípica de isolados

328 Utilizamos o método de coloração de GRAM para visualizar em microscopia óptica as
329 bactérias e leveduras após os isolamentos e assim caracterizar fenotipicamente a microbiota de
330 cada meio de cultura. Todos os meios apresentaram crescimento de micro-organismos e foi
331 possível sua visualização. Em alguns meios, mesmo com um processo cuidadoso de retirar uma
332 pequena parte do material isolado (encostando levemente), as lâminas ficaram bastante densas,
333 demonstrando que ainda havia uma microbiota muito populosa, com cocos e bacilos GRAM
334 positivos e GRAM negativos. Houve também um padrão em algumas lâminas de um “tapete”
335 de cocos GRAM negativos com aparecimento de bacilos GRAM positivos espaçadamente
336 sobre os mesmos.

337 (TABELA 2)

338 Após um ou dois isolamentos, ainda assim alguns meios apresentavam mais de uma
339 espécie dentro de uma colônia aparentemente isolada. A figura 2, de uma colônia obtida da
340 massa madre de kombucha, retirada do meio MRS representa claramente esse padrão, todas as
341 imagens são de ‘uma mesma colônia’, apesar de claramente não ser apenas uma colônia.
342 Apesar de todas as placas apresentarem crescimento, no meio YP, o qual seria para selecionar
343 leveduras, não foi possível a visualização das mesmas no microscópio, estando as lâminas
344 tomadas por bactérias. As possíveis razões para tal foram discutidas no tópico do meio de
345 cultura. Tanto as bactérias Gram positivas quanto as Gram negativas foram identificadas na
346 maior parte das colônias isoladas.

347 (FIGURA 2)

348

349 3.4 Amplificação do DNA por PCR

350 A amplificação do gene 16S rRNA obteve resultado positivo para todas as amostras, ou
351 seja, DNA procariótico foi amplificado com sucesso, o que foi visualizado na análise do produto
352 do PCR em gel de agarose. Os *primers* utilizados, 515F e 806R, para amplificar a região
353 hipervariável V4 do gene foram desenhados pela primeira vez por CAPORASO et al. (2011)
354 para utilização no sequenciador MiSeq. Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos
355 utilizando esses *primers* (TREMBLAY et al, 2015) (WALTERS et al, 2016) para identificação
356 de microbiota bacteriana, de sementes (BARRET et al, 2015) a intestino de ratos (CHOO et al,
357 2017). Esses *primers* são universais, visto que amplificam um fragmento conservado nas
358 bactérias, uma pequena região do gene 16S do RNA ribossômico, assim, possuem um
359 rendimento muito satisfatório. MICHEL et al. (2016) caracterizaram a microbiota de 16 massas
360 madres orgânicas na França, e também utilizaram em sua pesquisa os mesmos *primers* do nosso
361 estudo. DE VUYST; VANCANNEYT (2007) elucidaram que a amplificação parcial do gene
362 16S rRNA é uma boa abordagem independente de cultura para estudar a biodiversidade de
363 ecossistemas microbiológicos.

364 A PCR para o gene 5.8S rRNA teve apenas duas amostras com o DNA eucariótico
365 amplificado com sucesso. Os primers ITS1 - ITS4 amplificam o espaço entre subunidades, a
366 região chamada 5.8S do RNA ribossômico de leveduras (YAĞMUR et al., 2016). No
367 cromossomo, esses genes estão em sequência, a subunidade pequena, a região ITS e a
368 subunidade grande (ESTEVE-ZARSOZO et al, 1999). Segundo VALENTE et al. (1996) essa
369 tem se mostrado uma das melhores maneiras de identificar leveduras, visto que as regiões

370 ribossômicas apresentam baixo polimorfismo intraespecífico e alta variabilidade
371 interespecífica.

372

373 3.5 Sequenciamento e identificação genotípica

374 As amostras amplificadas foram sequenciadas pelo método de Sanger (SANGER;
375 NICKLEN; COULSON, 1977). Das 12 amostras, uma (8,33%) se mostrou inconclusiva e cinco
376 (41,66%) apresentaram identidade inferior a 97%. Assim sendo, seis (50%) amostras foram
377 corretamente identificadas. Dessas, metade (três) de cada massa madre, mas apenas uma do
378 meio MRS (Tabela 3). Contudo, o meio YP não selecionou apenas leveduras, bactérias também
379 foram identificadas nesse meio, as prováveis razões já foram discutidas nos tópicos anteriores.
380 As amostras, apresentam resultados bem característicos e vão de acordo com o que está
381 publicado na literatura. A levedura *Saccharomyces sp.* está presente na microbiota da
382 Kombucha (JAYABALAN et al, 2014), assim como *Lb. brevis* é uma bactéria muito comum
383 em massas madres (GOBBETTI, 1998) (DE VUYST; NEYSENS, 2005) (CORSETTI;
384 SETTANNI, 2006) (DE VUYST; VANCANNEYT, 2007). MINERVINI et al. (2012)
385 utilizaram sete massas madres diferentes padarias artesanais do sul da Itália para caracterizar a
386 microbiota, nelas foram identificados diversos gêneros, incluindo *Lactobacillus* e *Acetobacter*.
387 Este último, entretanto, é pouco influente no aroma e sabor ácido das massas madres, sendo as
388 próprias lactobacilos heterofermentativas as responsáveis por tal função (DE VUYST;
389 NEYSENS, 2005).

390 Um resultado intrigante que necessita maiores estudos para o seu entendimento é o
391 aparecimento de duas espécies do gênero *Aneurinibacillus*, *A. aneurinilyticus* e *A. migulanus*
392 na massa madre obtida a partir da Kombucha. Ambas espécies, recentemente descritas por
393 HEYNDRICKX et al. (1997), anteriormente eram classificadas como cepas de *Bacillus brevis*.

394 Estas bactérias são bacilos GRAM positivo, estritamente aeróbicas e apresentam crescimento
395 ótimo na temperatura de 37°C, a mesma temperatura utilizada para crescimento de micro-
396 organismos nos meios de cultura neste estudo. Até hoje, elas nunca foram encontradas em
397 microbiota de massa madre, fato que alimenta o questionamento acerca de sua presença nesta.
398 Além disso, elas são citadas como bactérias presentes no solo. ALENEZI et al. (2017)
399 demonstraram que *A. migulanus* pode ser utilizado como agente de biocontrole contra uma série
400 de patógenos conhecidos por atacar vegetais, eles conseguiram, por exemplo, impedir a
401 infecção de plantas de tomate pelo fungo *Botrytis cinerea*, conhecido por causar necrose,
402 inoculando *A. migulanus* no meio de cultura contaminado com o fungo. Já AGUIAR;
403 CASTRO-SILVA (2010) investigaram a possível utilização desta espécie como
404 biorremediadora de solos contaminados com carvão e metais pesados. Eles confirmaram a
405 resistência dessas bactérias em meios com zinco, cádmio, cobre, selênio, níquel e chumbo e a
406 formação de sideróforos pelas mesmas, isto é, elas metabolizam os metais, formando proteínas
407 que quelam o ferro, presente no solo de forma oxidada, deixando-o disponível para as raízes
408 das plantas absorverem esse nutriente (BENITE et al, 2002). Uma investigação da microbiota
409 presente na Kombucha pode esclarecer o aparecimento dessas bactérias na massa madre.

410 GÄNZLE; RIPARI (2016) publicaram uma revisão que vai muito de acordo com o
411 presente estudo. Nela, eles decorrem sobre a importância de analisar diversos fatores para
412 entender a composição da microbiota, como o ambiente de preparo, a farinha, os utensílios e
413 inclusive a microbiota das pessoas que manipulam as massas. Eles ainda complementam
414 comparando a influência do tempo de fermentação com as espécies dominantes da massa
415 madre. *Lactobacillus sanfranciscensis* é a espécie mais citada em estudos de microbiota de
416 massa madre em todo o mundo, contudo, em massas com fermentação longa (48h) em
417 temperaturas altas ela não aparece com frequência, provavelmente pela competitividade em
418 ambientes mais restritivos. Neste estudo, *Lb. sanfranciscensis* não foi identificada, mas a

419 presença de *Lb. brevis*, segundo DE VUYST et al. (2014), demonstra a importância do inóculo
420 inicial para a colonização da massa madre, visto que *Lb. brevis* é associada a origens botânicas
421 e a identificação dessa bactéria se deu na massa madre originada pela casca de banana.

422 O método de identificação de microbiota independente de cultura, que é o caso do
423 processo molecular de PCR e sequenciamento de DNA pode se dar de diversas maneiras. Neste
424 trabalho, foi amplificado um fragmento do gene 16S rRNA universal para bactérias, o que não
425 é o mais usual em pesquisas de microbiota de massa madre. MICHEL et al. (2016), por
426 exemplo, amplificaram o gene rRNA 16S completo (aprox. 1500 pb) e, além disso, elas
427 utilizaram três primers para discriminar *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*
428 e *Lactobacillus pentosus* em um PCR multiplex, alegando que as BAL são difíceis de distinguir
429 utilizando *primers* comuns a todas as bactérias.

430 Isto demonstra que a identificação de lactobacilos é uma tarefa complexa e utiliza
431 metodologias específicas voltadas para tal fim. Um método de amplificação de DNA muito
432 utilizado por pesquisadores para caracterizar microbiota de massa madre é o RAPD-PCR (DNA
433 polimórfico amplificado randomicamente), o qual permite a identificação de DNA em amostras
434 com espécies diferentes e/ou desconhecidas (MEROOTH et al, 2003) (MINERVINI et al, 2012)
435 (VENTURINI et al, 2012). Segundo VOGEL; EHRMANN (2008), esse método é considerado
436 o mais rápido e mais barato para detectar polimorfismos genéticos.

437 Por fim, é importante destacar que a metodologia de trabalho durante o processo de
438 cultura em laboratório, utilizando diferentes condições de cultivo, é um fator que influencia na
439 seleção e por consequência identificação molecular de determinadas espécies, como citado
440 anteriormente no tópico 3.2.

441 (TABELA 3)

442

443 4. Conclusão

444 Conforme a metodologia utilizada neste trabalho, não foi possível concluir a microbiota
445 predominante nas massas madres estudadas. Entretanto, houve identificação de espécies
446 sequenciadas, podendo ser feito um quadro de dominância. Na massa madre preparada com o
447 substrato “casca de banana”, a microbiota encontrada é bacteriana, composta por *Acetobacter*
448 sp. e *Lb. brevis*, entre outros. Já a microbiota associada à massa madre obtida a partir do
449 substrato “kombucha” apresentou uma composição heterogênea de bacilos como
450 *Aneurinibacillus* sp. e *Bacillus* sp, além de leveduras como *Saccharomyces* sp.

451

452 5. Considerações Finais

453 O estudo de massas madres ao redor do mundo está em plena ascensão, ainda que no
454 Brasil haja pouca literatura publicada sobre o assunto. Por isso, esta e outras pesquisas nesta
455 área podem ser consideradas novidades científicas e, com o avanço dos estudos da ciência dos
456 alimentos, vem à tona a sua complexidade e a necessidade de conhecimento das variadas
457 técnicas metodológicas que ela requer. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a microbiota
458 presente em duas massas madres obtidas a partir de origens diferentes. Para tanto, efetuou-se
459 cultivo e isolamento de colônias em diferentes meios de cultura e amplificação e
460 sequenciamento de DNA, métodos dependentes e independentes de cultura, respectivamente.
461 Os resultados obtidos, no entanto, apenas abriram as portas da compreensão do papel da
462 microbiota das massas madres e, conseqüentemente, a sua influência nos pães. Vale ressaltar
463 que simples mudanças no desenho experimental podem gerar resultados mais satisfatórios, são
464 elas: meios de cultura específicos (MRS5, YP + antibiótico), variação na temperatura de
465 cultivo, utilização de câmara anaeróbica para crescimento de BAL, *primers* específicos de
466 BAL, diferentes temperaturas de anelamento na PCR. Contudo, esse é um trabalho que requer

467 mais tempo e recursos para ser elaborado com a devida atenção que sua complexidade requer.
468 Com isso, ainda que esta pesquisa tenha sido importante para incrementar a discussão, fica a
469 necessidade de continuar os estudos para obter respostas mais conclusivas e esclarecedoras.

470

471 6. Referências Bibliográficas

472 AGUIAR, B. P.; CASTRO-SILVA, M. Rizobactérias formadoras de endósporos associadas a
473 *Tibouchina urvilleana* de áreas impactadas por rejeitos da mineração do carvão. **Revista**
474 **Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, 2010.

475 ALENEZI, F. N.; REKIK, I.; BOUKET, A. C.; LUPTAKOVA, L.; WEITZ, H. J.; RATEB, M.
476 E.; JASPARS, M.; WOODWARD, S.; BELBAHRI, L. Increased biological activity of
477 *Aneurinibacillus migulanus* strains correlates with the production of new gramicidin secondary
478 metabolites. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

479 ARENDT, E. K.; RYAN, A. M. L.; DAL BELLO, F. Impact of sourdough on the texture of
480 bread. **Food microbiology**, v. 24, n. 2, p. 165-174, 2007.

481 BARRET, M.; BRIAND, M.; BONNEAU, S.; PRÉVEAX, A.; VALIÈRE, S.; BOUCHEZ, O.;
482 HUNAULT, G.; SIMONEAU, P.; JACQUES, M. Emergence shapes the structure of the seed
483 microbiota. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 4, p. 1257-1266, 2015.

484 BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideroforos: "Uma Resposta dos
485 Microorganismos". **Química nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1155-1164, 2002.

486 CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE,
487 C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity
488 at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of**
489 **Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4516-4522, 2011.

490 CHOO, J. M.; TRIM, P. J.; LEONG, L. E. X.; ABELL, G. C. J.; BRUNE, C.; JEFFRIES, N.;
491 WESSELINGH, S.; DEAR, T. N.; SNEL, M. F.; ROGERS, G. B. Inbred Mouse Populations
492 Exhibit Intergenerational Changes in Intestinal Microbiota Composition and Function
493 Following Introduction to a Facility. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 608, 2017.

494 CORSETTI, A.; SETTANNI, L. Lactobacilli in sourdough fermentation. **Food Research**
495 **International**, v. 40, n. 5, p. 539-558, 2007.

496 DAMIANI, P.; GOBBETTI, M.; COSSIGNANI, L.; CORSETTI, A.; SIMONETTI, M. S.;
497 ROSSI, J. The sourdough microflora. Characterization of hetero- and homofermentative lactic
498 acid bacteria, yeasts and their interactions on the basis of the volatile compounds produced.
499 **LWT-food science and technology**, v. 29, n. 1-2, p. 63-70, 1996.

500 DE VUYST, L.; KERREBROECK, S. V.; HARTH, H.; HUYS, G.; DANIEL, H. M.; WECKX,
501 S. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? **Food microbiology**, v.
502 37, p. 11-29, 2014.

503 DE VUYST, Luc; VANCANNEYT, Marc. Biodiversity and identification of sourdough lactic
504 acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 120-127, 2007.

505 DE VUYST, Luc; NEYSENS, Patricia. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic
506 interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1, p. 43-56, 2005.

507 ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of
508 yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed
509 spacers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 1, p.
510 329-337, 1999.

511 GÄNZLE, M.; RIPARI, V. Composition and function of sourdough microbiota: From
512 ecological theory to bread quality. **International journal of food microbiology**, v. 239, p. 19-
513 25, 2016.

514 GEREZ, C. L.; ROLLAN, G. C.; VALDEZ, GF de. Gluten breakdown by lactobacilli and
515 pediococci strains isolated from sourdough. **Letters in applied microbiology**, v. 42, n. 5, p.
516 459-464, 2006.

517 GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the
518 PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental**
519 **Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

520 GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J.; ROSA, F. LA. Identification and clustering of
521 lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy [for breadmaking,
522 Umbria]. **Italian Journal of Food Science (Italy)**, 1994.

523 GOBBETTI, M. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts.
524 **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 7, p. 267-274, 1998.

525 GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the fermented tea:
526 microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of Food Protection**, v. 63, n.
527 7, p. 976-981, 2000.

528 HEYNDRIKX, M.; LEBBE, L.; VANCANNEYT, K.; KERSTERS, P DE VOS.; LOGAN,
529 N. A.; FORSYTH, G.; NAZLI, S.; ALI, N.; BERKELEY, R. C. W. A Polyphasic Reassessment
530 of the Genus *Aneurinibacillus*, Reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Stauffer
531 et al. 1996) as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* comb. nov., and Emended Descriptions of *A.*
532 *aneurinilyticus* corrig., *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. **International Journal of**
533 **Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 808-817, 1997.

534 JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR,
535 M. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects,
536 toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13,
537 n. 4, p. 538-550, 2014.

538 KATINA, K.; ARENDT, E.; LIUKKONEN, K. -H.; AUTIO, K.; FLANDER, L.; POUTAKEN,
539 K. Potential of sourdough for healthier cereal products. **Trends in Food Science &
540 Technology**, v. 16, n. 1, p. 104-112, 2005.

541 KOZICH, J. J.; WESTCOTT, S. L.; BAXTER, N. T.; HIGHLANDER, S. K.; SCHLOSS, P.
542 D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing
543 amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and
544 environmental microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112-5120, 2013.

545 LEGRAS, J. -L.; MERDINOGLU, D.; CORNUET, J. -M.; KARST, F. Bread, beer and wine:
546 *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular ecology**, v. 16, n. 10, p.
547 2091-2102, 2007.

548 MEROTH, C. B.; HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Identification and population dynamics of
549 yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis.
550 **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7453-7461, 2003.

551 MEROTH, C. B.; WALTER, J.; HERTEL, C.; BRANDT, M. J.; HAMMES, W. P. Monitoring
552 the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-
553 denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.
554 1, p. 475-482, 2003.

555 MICHEL, E.; MONFORT, C.; DEFRASSNES, M.; GUEZENEC, S.; LHOMME, E.;
556 BARRET, M.; SICARD, D.; DOUSSET, X.; ONNO, B. Characterization of relative
557 abundance of lactic acid bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and

558 MiSeq high-throughput sequencing methods. **International journal of food microbiology**, v.
559 239, p. 35-43, 2016.

560 MINERVINI, F.; LATTANZI, A.; DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; GOBBETTI, M.
561 Influence of artisan bakery-or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid
562 bacterium and yeast microbiotas. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 15, p.
563 5328-5340, 2012.

564 OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M. Unipro UGENE: a unified
565 bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, v. 28, n. 8, p. 1166-1167, 2012.

566 OTTOGALLI, Giorgo; GALLI, Antonietta; FOSCHINO, Roberto. Italian bakery products
567 obtained with sour dough: characterization of the typical microflora. **Advances in food**
568 **sciences**, v. 18, n. 5-6, p. 131-144, 1996.

569 PAGANI, D. M.; HEIDRICH, D.; PAULINO, G. V.; DE OLIVEIRA, K. A.; DALBEM, P. T.
570 Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and
571 *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs. **Archives of**
572 **microbiology**, v. 198, n. 10, p. 963-971, 2016.

573 PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; AH KANG, S.; KIM, H. -Y. Probiotics and their fermented food
574 products are beneficial for health. **Journal of applied microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1171-1185,
575 2006.

576 SAMUEL, D. 2000. Brewing and baking In: NICHOLSON, P. T.; SHAW, I. (Ed.) **Ancient**
577 **Egyptian materials and technology**. Cambridge: Cambridge University Press. p. 537-576.

578 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating
579 inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

580 SIRAGUSA, S.; DI CAGNO, R.; ERCOLINI, D.; MINERVINI, F.; GOBBETTI, M.; DE
581 ANGELIS, M. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid
582 bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis*
583 starters. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1099-1109, 2009.

584 TREMBLAY, J.; SINGH, K.; FERN, A.; KIRTON, E. S.; HE, S.; WOYKE, T.; LEE, J.;
585 CHEN, F.; DANGL, J. L.; TRNGE, S. G. Primer and platform effects on 16S rRNA tag
586 sequencing. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

587 VALENTE, P.; GOUVEIA, F. C.; DE LEMOS, G. A.; PIMENTEL, D.; ELSAS, J. D. V.;
588 MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. PCR amplification of the rDNA internal
589 transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. **FEMS Microbiology**
590 **letters**, v. 137, n. 2-3, p. 253-256, 1996.

591 VENTURI, M.; GUERRINI, S.; GRANCHI, L.; VINCENZINI, M. Typing of *Lactobacillus*
592 *sanfranciscensis* isolates from traditional sourdoughs by combining conventional and multiplex
593 RAPD-PCR profiles. **International journal of food microbiology**, v. 156, n. 2, p. 122-126,
594 2012.

595 VERA, A.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Comparative study of culture media used for
596 sourdough lactobacilli. **Food microbiology**, v. 26, n. 7, p. 728-733, 2009.

597 VOGEL, R. F.; EHRMANN, M. A. Sourdough fermentations. **Molecular techniques in the**
598 **microbial ecology of fermented foods**, p. 119-144, 2008.

599 VRANCKEN, G.; RIMAUX, T.; WECKX, S.; LEROY, F.; DE VUYST, L. Influence of
600 temperature and backslopping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat
601 sourdough fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 8, p. 2716-2726,
602 2011.

603 WALTERS, W.; HYDE, E. R.; BERG-LYONS, D.; ACKERMANN, G.; HUMPHREY, G.;
604 PARADA, A.; GILBERT, J. A.; JANSSON, J. K.; CAPORASO, J. G.; FUHRMAN, J. A.;
605 APPRILL, A.; KNIGHT, R. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal
606 internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. **mSystems**,
607 v. 1, n. 1, p. e00009-15, 2016.

608 WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of
609 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: INNIS, M.A.; GELFAMD, D. H.;
610 SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.) **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**.
611 Academic Press, Inc., New York. 1990. p. 315-322.

612 YAĞMUR, G.; TANGULER, H.; LEVENTDURUR, S.; ELMALCI, S. B.; TURHAN, E. Ü.;
613 FRANCESCA, N.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G.; ERTEN, H. Identification of
614 Predominant Lactic Acid Bacteria and Yeasts of Turkish Sourdoughs and Selection of Starter
615 Cultures for Liquid Sourdough Production Using Different Flours and Dough Yields. **Polish**
616 **Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 66, n. 2, p. 99-108, 2016.

617

618

619

620

621

622

623

624

625 **Tabelas:**

626 **Tabela 1.** Informações detalhadas dos primers utilizados neste estudo.

Primer	Gene alvo	TA ^a	Tamanho (pb) ^b	Sequência (5' - 3')	Referência
515-F ^c 806-R ^d	16S	55°C	300	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA GGGACTACHVGGGTWTCTAAT	CAPORASO et al. (2011)
ITS1-F ^c ITS4-R ^d	5.8S		800	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATATGC	WHITE et al. (1990)

627 **a:** Temperatura de Anelamento; **b:** Tamanho do fragmento em pares de base; **c:** Primer Forward; **d:** Primer Reverse.

628

629

630

631

632 **Tabela 2.** Identificação dos isolados obtidos de duas massas madres de diferentes substratos.

Substrato	Isolado	Origem do isolamento	Coloração da colônia
Casca de banana (SP)	1	Agar MRS	Bege
	2		Branca
	3	Agar YP	Bege
	4		Branca
	5		Incolor
Kombucha (K)	6	Agar MRS	Incolor
	7	Agar YP	Branca
	8		Bege
	9	Agar TSB	Branca
	10		Bege

633

634

635

636

637

638 **Tabela 3.** Identificação dos isolados pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e 5.8S
 639 rRNA.

Substrato	Isolado	Origem de isolamento	Espécie	Identidade	GenBank n° acesso
Casca de banana	3	Agar YP	<i>Acetobacter tropicalis</i>	98,90%	WS9
	2	Agar MRS	<i>Acetobacter tropicalis</i>	98,90%	WS9
	4	Agar YP	<i>Lactobacillus brevis</i>	98,55%	OTG001
	1	Agar MRS	<i>Acetobacter tropicalis</i>	94,16%*	1Mc
	5	Agar TSB	Uncultured bacterium clone	89,74%*	saliva293
Kombucha	10	Agar TSB	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	98,17%	NHCE-VL8
	8	Agar YP	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	98,17%	O11-12
	8	Agar YP	<i>Saccharomyces</i> sp.	98,39%	ESA 47
	7	Agar YP	<i>Saccharomyces</i> sp.	96,47%*	MVCH-J15
	7	Agar YP	<i>Bacillus cereus</i>	93,09%*	KS12A_2
	9	Agar TSB	<i>Bacillus thuringiensis</i>	93,80%*	R-4

* Identidade inferior a 97%.

640

641

642

643

644

645

646

647

648 **Figuras:**

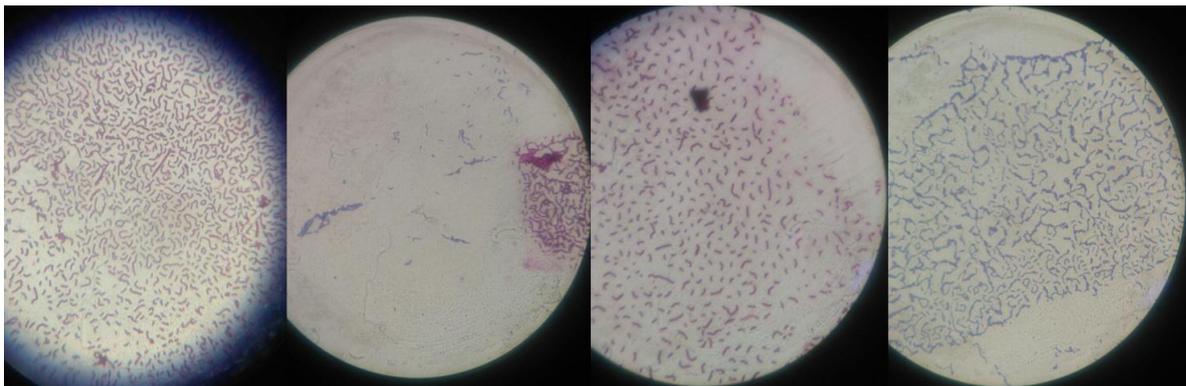
649 **Figura 1:**



650

651 **Figura 1: Produção de substratos (cultura starter) para duas massas madre. a.** caldo
652 **fermentado com casca de banana por 48h; b.** Caldo da kombucha.

653 **Figura 2:**



654

655 **Figura 2: Fotografias tiradas do microscópio na lente de 100x de uma colônia supostamente**
656 **isolada. Nota-se a presença de bactérias gram positivo e gram negativo. Origem: Kombucha;**
657 **Meio: MRS. Isolado nº 6.**