

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JEAN AQUINO DE ARAÚJO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA FERMENTAÇÃO
DE CACAU NA AMAZÔNIA

BELÉM, PA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JEAN AQUINO DE ARAÚJO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA FERMENTAÇÃO
DE CACAU NA AMAZÔNIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORES:

Prof.^a Dra. Alessandra Santos Lopes

Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira

BELÉM, PA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Araújo, Jean Aquino, 1993-

Identificação molecular e potencial enzimático de fungos filamentosos isolados da fermentação de cacau na Amazônia / Jean Aquino de Araújo. - 2017.

Orientadora: Alessandra Santos Lopes,
Coorientador: Nelson Rosa Ferreira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2017

1. Fermentação- Alimentos 2. Cacau- Amazônia 3. Enzimas
4. Tecnologia de alimentos I. Título

CDD 22. ed. 664.024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JEAN AQUINO DE ARAÚJO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA FERMENTAÇÃO
DE CACAU NA AMAZÔNIA

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Alessandra Santos Lopes
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientadora)

Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira
(FEA/ITEC/UFPA – Coorientador)

Profa. Dra. Luiza Helena Meller da Silva
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

Profa. Dra. Silvia Helena Marques da Silva
(IEC – Membro Externo)

Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo
(FEA/ITEC/UFPA – Membro Externo)

Profa. Dra. Consuelo Lucia Sousa de Lima
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Suplente)

Belém (PA), 20 de fevereiro de 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos na minha vida e por mais essa vitória concedida, pois se não fosse por Ele, nada disso teria acontecido.

À minha mãe, Gildete, por sempre ter me incentivado a estudar e ao meu pai, José Tobias, por todo apoio e incentivo. Obrigado também, por serem estes pais maravilhosos. E aos meus irmãos, Josimar, Jeovan, Janison e Gislaine, por todo companheirismo e carinho.

Aos meus orientadores Profa. Dra. Alessandra Lopes e Prof. Dr. Nelson Rosa, por todo o conhecimento repassado durante esses dois anos, pelas palavras de incentivo, pelo apoio e principalmente por sempre terem acreditado na minha competência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos. Ao Instituto Vale Tecnológico (ITV) por todo suporte. Ao Instituto Evandro Chagas (IEC) pelo apoio nas análises de biologia molecular.

À Profa. Dra. Sílvia Marques e ao Ruan Monteiro por toda paciência que tiveram comigo durante as análises de extração e amplificação de DNA, agradeço também por toda ajuda e principalmente pelos ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC) em particular agradeço ao meu bolsista Alan e minha querida amiga Yamila que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também aos meus colegas e companheiros de turma Adriane, Adriano, Berny, Joseane, Lorena, Renan, Wagner e Yasmin que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação.

Aos meus grandes amigos Raiane e Victor pela amizade, brincadeiras, brigas e pelos vários e inesquecíveis momentos vividos durante essa trajetória. Agradeço em especial ao Bruno, por todo o incentivo, apoio, companheirismo e pela ajuda incondicional que recebi durante essa etapa tão importante da minha vida.

A todos, meu muito obrigado!!!

***“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele,
mas sim aquilo em que ele nos transforma” (John Ruskin).***

RESUMO

Os fungos filamentosos estão presentes na fermentação do cacau, no entanto sua atuação não foi esclarecida até o momento, por isso tornam-se indispensáveis estudos que visem identificar as espécies atuantes na fermentação do cacau, bem como selecionar potenciais produtores de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico. O presente estudo teve por objetivo identificar fungos filamentosos com potencial enzimático isolados da fermentação natural do cacau no Município de Tucumã, Pará. A identificação dos fungos foi realizada por meio de técnicas moleculares (extração, amplificação e sequenciamento de DNA). O potencial enzimático de cada fungo isolado foi avaliado na produção de amilases, pectinases, celulases e xilanases. Com os resultados obtidos verificou-se que dos 25 fungos filamentosos isolados da fermentação de cacau realizada no Município de Tucumã, Pará estão presentes 21 espécies, sendo que 18 delas nunca haviam sido relatadas em fermentações de cacau, fato esse caracteriza que a fermentação desse município apresenta uma ampla diversidade fúngica. A maioria dos fungos filamentosos isolados e avaliados possuem capacidade de secretar enzimas amilolíticas, pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas que atuam na hidrólise da polpa do cacau proporcionando a aeração da massa e a síntese de açúcares redutores, contribuindo para a formação dos precursores do aroma e sabor do chocolate. A presença dos fungos filamentosos *Talaromyces minioluteus*, *Fomitopsis subtropica* v. Cui, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium pimateouiense*, *Neonothopanus nambi*, *Phanerochaete australis*, *Aspergillus parasiticus* e *Cladosporium cladosporioides* pode ser um possível indicador de qualidade para a fermentação de cacau, visto que esses fungos apresentaram potencial na secreção de amilases, pectinases, celulases e/ou xilanases.

ABSTRACT

The filamentous fungi are present in the fermentation of cocoa, however your performance was not clarified until the moment, therefore become indispensable studies aimed at identifying the species active in the fermentation of cocoa, as well as select potential producers of hydrolytic enzymes of biotechnological interest. The present study aimed to identify potential enzymatic filamentous fungi isolated from natural fermentation of cocoa in the municipality of Tucumã, Pará. The identification of fungi was performed by means of molecular techniques (extraction, amplification and DNA sequencing). The enzymatic potential of each isolated fungus was evaluated on production of amylases, pectinases, cellulase and xylanase. It was found that 25 of filamentous fungi isolated from fermentation of cocoa in Tucumã 21 species are present, and that 18 of them had never before been reported in cocoa fermentations. This result characterizes that the fermentation of this municipality presents a broad fungal diversity. The majority of filamentous fungi isolated and valued feature have the ability to secrete amylolytic enzymes, pectinolytic, cellulolytic and xylanolytic working in the hydrolysis of the cacao pulp providing aeration of the mass and the synthesis of reducing sugars, contributing to the formation of precursors of aroma and flavor of chocolate. The presence of filamentous fungi , *Talaromyces minioluteus* *Fomitopsis subtropica* v. Cui, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium pimiteouiense*, *Neonothopanus nambi*, *Phanerochaete australis*, *Aspergillus parasiticus* and *Cladosporium cladosporioides* can be a possible indicator of quality for the fermentation of cocoa, since these fungi showed potential on secretion of amylases, pectinases, cellulase and/or xylanase.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	08
2	OBJETIVOS	10
2.1	Geral	10
2.2	Específicos.....	10
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1	Cacau e seu processo fermentativo.....	11
3.2	Fungos filamentosos da fermentação do cacau.....	12
3.3	Enzimas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas.....	13
3.3.1	<i>Amilases</i>	14
3.3.2	<i>Pectinases</i>	15
3.3.3	<i>Celulases</i>	16
3.3.4	<i>Xilanases</i>	16
3.4	Técnicas moleculares para identificação de fungos filamentosos	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Coleta das sementes de cacau	20
4.2	Acompanhamento da fermentação das sementes de cacau.....	20
4.3	Isolamento e conservação dos fungos filamentosos	21
4.4	Identificação molecular dos fungos filamentosos isolados	21
4.4.1	<i>Extração do DNA genômico</i>	21
4.4.2	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR)</i>	22
4.4.3	<i>Eletroforese em gel de agarose</i>	23
4.4.4	<i>Purificação e sequenciamento do DNA amplificado</i>	23
4.4.5	<i>Alinhamento e comparação das sequências</i>	24
4.5	Potencial enzimático dos fungos filamentosos	24
4.5.1	<i>Potencial amilolítico</i>	24
4.5.2	<i>Potencial pectinolítico</i>	25
4.5.3	<i>Potencial celulolítico</i>	25
4.5.4	<i>Potencial xilanolítico</i>	26
4.5.5	<i>Determinação do Índice Enzimático (IE)</i>	26
4.5.6	<i>Índice de velocidade de crescimento (IVC)</i>	26
4.6	Análise estatística	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1	Acompanhamento da fermentação das sementes de cacau e isolamento dos fungos... 27	
5.2	Identificação molecular dos fungos filamentosos isolados	28
5.3	Potencial enzimático dos fungos filamentosos	31
6	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	ANEXOS.....	48
	APÊNDICES	49

1 INTRODUÇÃO

A fermentação é uma das etapas do processamento do cacau, ocorre de forma espontânea, é iniciada logo após a colheita e quebra dos frutos e é aplicada pelos cacaucultores a fim de desenvolver o sabor de chocolate (SANTOS, 2010). Nesta etapa, a polpa envoltória das sementes é degradada pela ação dos micro-organismos (fungos e bactérias) e este processo causa elevação na temperatura, que pode alcançar valores próximos de 50 °C (LOPEZ, 1986).

Os micro-organismos presentes no processo fermentativo do cacau atuam nos açúcares e ácidos orgânicos da polpa, que são transformados em etanol, ácido láctico e ácido acético (SCHWAN e WHEALS, 2004), esses ácidos gerados penetram nas sementes, e juntamente com a elevação da temperatura, ocasionam a morte do embrião, fato esse, desejável no processo de fermentação do cacau (MACEDO et al., 2013).

Dentre os micro-organismos atuantes na fermentação do cacau, os fungos filamentosos merecem destaque, pois esses crescem abundantemente em “habitats” onde há a presença de açúcares, como é o caso da polpa do cacau e possuem algumas vantagens tecnológicas em relação a outros micro-organismos, como por exemplo a capacidade de assimilar uma grande variedade de substratos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Os fungos filamentosos são encontrados durante toda as etapas do processamento primário das sementes de cacau (fermentação, secagem e armazenamento) (MOUNJOUEPOU et al., 2008), no entanto, sua atividade durante a fermentação do cacau ainda não é conhecida (COPETTI et al., 2011b), por isso é de suma importância identificar os fungos filamentosos e caracterizar os compostos gerados por esses, especialmente àqueles que produzam enzimas de interesse industrial e que atuam na fermentação do cacau (SCHWAN, 1996; SANTOS, 2010).

Fungos filamentosos são identificados por técnicas de biologia molecular (LARONE, 2002; WATANABE, 2002), essas técnicas utilizam na identificação marcadores moleculares específicos, no caso de fungos esse marcador é o gene 18S do rDNA. Para a identificação de fungos são empregadas várias técnicas, entre as quais: extração de DNA, eletroforese em gel de agarose (COCOLIN e ERCOLINI, 2008; JUSTÉ; THOMMAD; LIEVENS, 2008), reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) e sequenciamento genético (GODET e MUNAUT, 2009), são comumente utilizadas.

Na fermentação do cacau são encontrados fungos filamentosos de diversas espécies (MOUNJOUNENPOU et al., 2008; COPETTI et al., 2011b), sendo que algumas possuem ampla distribuição mundial, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical e estão associadas com a deterioração de materiais vegetais. De modo geral, fungos filamentosos possuem a capacidade de produzir enzimas extracelulares que podem ser utilizadas nas indústrias alimentares, químicas e farmacêuticas (ROSA; CAMPOS; BARONI, 2002).

Os fungos filamentosos estão presentes na fermentação do cacau, independentemente do local que seja realizada, no entanto, a atuação desse grupo de micro-organismos nesta etapa do processamento do cacau não foi esclarecida até o momento. Por isso tornam-se indispensáveis estudos que visem identificar as espécies atuantes na fermentação do cacau no Estado do Pará, Brasil, bem como avaliar o potencial desses fungos na produção de enzimas hidrolíticas de interesse para a fermentação do cacau e para aplicação biotecnológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar fungos filamentosos isolados da fermentação natural do cacau no Município de Tucumã (PA) e avaliar o potencial na produção/secreção de enzimas hidrolíticas.

2.2 Específicos

- a) Isolar os fungos filamentosos presentes no processo fermentativo natural do cacau do Município de Tucumã (PA);
- b) Identificar os fungos filamentosos isolados por meio de técnicas moleculares (extração, amplificação e sequenciamento de DNA);
- c) Avaliar o potencial enzimático dos fungos filamentosos isolados para atividade amilolítica, pectinolítica, celulolítica e xilanolítica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cacau e seu processo fermentativo

O cacauzeiro é originário da floresta amazônica e suas sementes são utilizadas como ingrediente principal para fabricação do chocolate (LOPES et al., 2011) e de acordo com o Anuário Brasileiro do Cacau, o Estado do Pará é o segundo maior produtor do Brasil, em 2015 produziu 106.003 mil toneladas de cacau, volume que representou 40,8% da produção total do País. A variedade de cacau comumente cultivada no Pará é a *Forastero*, conforme Copetti (2009) os frutos dessa variedade são menos aromático e necessitam de 5 a 7 dias para serem fermentados, no entanto são os mais comercializados mundialmente.

As sementes do cacau apresentam polpa, testa e cotilédones (URBANSKI, 1992). A polpa é um ambiente rico para desenvolvimento microbiano, consistindo de 82 a 87% de água, 10 a 15% de açúcar, 2 a 3% de pentosanas, 1 a 3% de ácido cítrico e 1 a 1,5% de pectina. Proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais também são encontrados. A polpa apresenta tonalidade branca e seu pH é baixo (entre 3.3 e 4.0) devido principalmente ao alto teor de ácido cítrico e sua viscosidade é conferida pelo alto teor de pectina (FERRÃO, 2002; NIELSEN, 2006).

O processo fermentativo das sementes de cacau é iniciado logo após a quebra dos frutos, geralmente é realizado em grandes caixas de madeira perfuradas que permitem a drenagem da polpa e aeração, e cobertas com folhas de bananeira e sacos de aniagem para conservar o calor durante o processo, que tem duração de 6 a 7 dias (FERRÃO, 2002). Nas primeiras 24 horas de fermentação a massa cacaueira apresenta pH ácido (3,6). Neste período a baixa concentração de oxigênio e a presença de ácido cítrico (ARDHANA, 2003) favorecem o crescimento de leveduras e bactérias lácticas.

Os micro-organismos que atuam no processo de fermentação do cacau se originam principalmente das folhas de bananeiras, das mãos dos trabalhadores, facas, cestos utilizados para transporte das sementes e mucilagem seca presente nas caixas remanescente de fermentações anteriores (NIELSEN, 2006; SCHWAN e WHEALS, 2004). Leveduras se proliferam na polpa do cacau levando à produção de etanol. As bactérias lácticas promovem a assimilação de ácido cítrico fazendo com que o pH aumente. Esse aumento favorece o

crescimento de bactérias acéticas, essas por sua vez, metabolizam o etanol para ácido acético por meio de um processo exotérmico (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001).

O etanol e o ácido acético produzidos por esses micro-organismos migram para dentro da semente, acidificando a mesma, a combinação da acidificação com a ação do calor promove a lise das paredes celulares da semente, eliminando assim a capacidade germinativa do embrião. Estas alterações induzem reações bioquímicas que degradam as proteínas de reserva e hidratos de carbono produzindo peptídeos, aminoácidos livres e açúcares redutores dentro da amêndoa que conduzem a grãos de cacau bem fermentados, gerando assim os precursores químicos do sabor e cor do chocolate (LOPEZ e DIMICK, 1995; NIELSEN, 2006; SCHWAN e WHEALS, 2004; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001).

A microflora na fermentação do cacau varia de acordo com as condições ambientais, disponibilidade de nutrientes, localização geográfica, dentre outros (CAMU et al., 2007; NIELSEN et al., 2007). De acordo com Nielsen et al. (2005) para se obter amêndoas de cacau bem fermentadas é importante conhecer a diversidade microbiana que ocorre naturalmente nas fermentações. Descobrir o papel de cada uma gera a possibilidade da produção de inóculos que propiciem a garantia da qualidade do processo fermentativo.

3.2 Fungos filamentosos da fermentação do cacau

Os fungos pertencem ao Reino Fungi que compreende quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota. A reprodução sexuada é característica específica de filos mais desenvolvidos, como Ascomycota e Basidiomycota. Nestes dois filos, a reprodução sexuada ocorre através de ascósporos, produzidos em ascos (Ascomycota) e basidiosporos, produzidos em basídios (Basidiomycota) (FAIA, 2011). Paralelamente à reprodução sexuada, pode também ocorrer reprodução assexuada, com produção de esporos assexuados, denominados conídios (CROUS et al., 2009; PITT, 2009).

Os fungos filamentosos se desenvolverem em materiais de origem vegetal e exercem na natureza a função de hidrolisar compostos orgânicos (MAHESHWARI et al., 2000). Esta atividade ocorre, sobretudo, por meio de sua fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes de substratos, principalmente lignocelulose (VELÁZQUEZ-CEDENO; MATA; SAVOIE, 2002).

Pesquisas demonstram que na fermentação natural das sementes de cacau são encontrados fungos unicelulares (leveduras) e pluricelulares (fungos filamentosos). Os fungos filamentosos são geralmente encontrados em maior número nos últimos dias da fermentação sobre a superfície das amêndoas de cacau (SCHWAN e WHEALS, 2004), no entanto sua atuação no processo fermentativo do cacau ainda não é conhecida.

Estudo realizado por Mounjounenpou et al. (2008) relatou a ocorrência de fungos filamentosos no processo fermentativo do cacau, os autores identificaram espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Estudo mais recente realizado por Copetti et al. (2011b) sobre a presença de fungos filamentosos no cacau fermentado em fazendas do Município de Ilhéus (BA), identificaram a presença das espécies *Absidia corymbifera*, *Aspergillus candidus*, *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *Eurotium amstelodami*, *Geotrichum candidum*, *Monascus rube*, *Mucor* sp., *Paecilomyces variotii*, *Penicillium paneum*, *Rhizopus* sp. e *Syncephalastrum* sp.

Os fungos filamentosos possuem importante função na decomposição de matéria orgânica no meio ambiente, pois são capazes de sintetizar uma ampla faixa de enzimas a partir de um grande número de materiais (SLIVINSKI, 2007). O uso de algumas espécies de fungos filamentosos em processos fermentativos apresenta algumas vantagens, como facilidade de manipulação, habilidade em fermentar uma variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (SPIER, 2005).

3.3 Enzimas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas

São obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, e são empregadas em processos industriais visando o aumento da produção e qualidade (SOUZA e SOMMER, 2002). Enzimas produzidas por micro-organismos são mais utilizadas que as de plantas e animais, pois apresentam características desejáveis como maior rendimento, uma melhor estabilidade e uma elevada atividade catalítica (COELHO e NASCIMENTO, 2008; RAO et al., 1998). Cerca de 60% das enzimas utilizadas em indústrias são de origem fúngica (OSTERGAARD e OLSEN, 2010).

Fungos filamentosos são potenciais produtores de enzimas extracelulares, esses representam a maior classe de enzimas aplicadas no ramo da biotecnologia (MORENO et al., 2013). Estudos relatam que os principais fungos produtores de enzimas extracelulares de

interesse biotecnológico são os dos gêneros: *Aspergillus*, *Humicola*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* (FONSECA et al., 2007; DESAI e NITYANAND, 2011).

Os fungos filamentosos podem produzir diversas enzimas extracelulares, como as amilases, celulasas, pectinases e xilanases que são usadas para hidrolisar polissacarídeos complexos em açúcares simples para ser assimilado e utilizado para seu crescimento e reprodução. Estas enzimas são úteis aplicações industriais, tais como processamento de alimentos, cervejaria, biocombustíveis, biorremediação etc. Para essas aplicações, torna-se necessário a exploração de novas fontes úteis de enzimas extracelulares fúngicas (REDDY e SREERAMULU, 2012).

A produção de enzimas, nos últimos anos, tem sido considerada um negócio altamente rentável na ordem de bilhões de dólares por ano e as enzimas produzidas principalmente por fungos filamentosos tem sido bastante explorada comercialmente, pois essas enzimas apresentam vantagens por serem menos prejudiciais ao meio ambiente, quando comparadas ao uso de produtos químicos na indústria (PEREIRA, 2012).

O isolamento e seleção de micro-organismos pode facilitar a descoberta de novas enzimas com características desejáveis (estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH). Além disso, podem abrir promissoras perspectivas científicas e comerciais. Inúmeras metodologias podem ser usadas para seleção de micro-organismos por meio da determinação da presença de enzimas extracelular. Dentre estas, está incluída a utilização de meio sólido com presença de substratos indutores que possibilitam a maior visualização da reação de hidrólise (DAMASO et al., 2012).

Um dos parâmetros semiquantitativos usado para determinar a capacidade de produção de enzimas por micro-organismos é o índice enzimático (IE), que correlaciona o halo de degradação do substrato com o crescimento do micro-organismo testado (LIN et al., 1991). Para avaliação do potencial enzimático de fungos é recomendado que o valor de IE seja maior ou igual a 2 (STAMFORD; ARAÚJO e STAMFORD, 1998), ou seja, quanto maior for o IE de um fungo, maior será sua atividade enzimática extracelular (OLIVEIRA et al., 2006).

3.3.1 Amilases

Amilases são carboidrases e tem a função de hidrolisar ligações glicosídicas presentes nas cadeias de amilose e amilopectina, atuam sobre as ligações α -1,4 e α -1,6 que estão

presentes no amido (GUPTA et al., 2003; KOBLITZ, 2008). São classificadas em várias formas, dependendo de como atuam sobre as moléculas de amido (PATHAK e NARULA, 2013; GUIMARÃES et al., 2006).

As enzimas amilolíticas apresentam grande importância biotecnológica e formam o principal grupo de enzimas utilizado na indústria de alimentos, são aplicadas nas indústrias de cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, além de aplicações em indústrias químicas, têxteis e farmacêuticas (DEB et al., 2013; GUPTA et al., 2003). Na fermentação das sementes do cacau as amilases proporcionam o aumento da concentração de açúcares redutores pela hidrólise do amido presente na polpa do cacau (AMIN et al., 1998).

As amilases mais utilizadas em processos industriais são as obtidas por fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*, devido seu grande potencial para secreção extracelular desta enzima (MERTENS e SKORY 2007; ZAMBARE, 2010). A procura industrial de enzimas é limitada a aplicações específicas na indústria alimentar, onde as amilases extraídas de fungos filamentosos são preferidas em relação a outros micro-organismos, principalmente por seu elevado *status* GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro) (PRAKASHAM et al., 2006).

3.3.2 *Pectinases*

A pectina é um polímero de ácido galacturônico, é um importante componente da parede celular vegetal e está presente em maior concentração na lamela média, onde exerce cimentação entre as células adjacentes (JAYANI; SAXENA e GUPTA, 2005). As pectinases são enzimas que hidrolisam moléculas de pectina. São geralmente divididas em dois grupos: pectinesterases e depolimerases, essa divisão ocorre com base nos produtos de mecanismo de ação e substrato primário e de hidrólise (LARA-MARQUEZ et al., 2011).

As pectinases desempenham papéis importantes em diversas indústrias (SEMENOVA et al., 2006), são produzidas em diferentes combinações e são muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade; na fermentação de chá, café e cacau; para melhorar a extração de óleos vegetais; e na degomagem de fibras naturais para indústrias têxtil e de papel (KUMAR e SUNEETHA, 2014). Na fermentação do cacau as pectinases quando degradam a pectina presente na polpa, melhoraram a aeração da massa, possibilitando assim o crescimento de microrganismos aeróbios (AMIN et al., 1998).

As pectinases são obtidas principalmente de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (OLIVEIRA et al., 2006; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000), são comumente utilizadas em processos biotecnológicos e são obtidas de *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans* (SANDRI et al., 2011; ZHAO et al., 2007), sendo as pectinases do fungo *A. niger* consideradas as mais seguras a nível mundial (XU et al., 2014).

3.3.3 Celulases

A celulose representa um dos maiores complexos naturais de carbono orgânico presente na estrutura da parede celular de plantas (BADHAN et al., 2007), é um polímero da glicose formado por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, sua hidrólise desse é de grande interesse biotecnológico e possui utilização industrial (PETZOLD; SCHWIKAL; HEINZE, 2006). As celulases atuam na hidrólise de substratos celulósicos e compreendem um complexo de enzimas celulolíticas compostas por endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase, β -glucosidase e exo-1,4- β -glucosidase (SADHU e MAITI, 2013).

As celulases produzidas por fungos filamentosos atuam na degradação das fibras de celulose aos açúcares solúveis em água tais como a glicose, celobiose e outros oligômeros (ZHANG et al., 2006), são aplicadas em etapas de processos de produção industrial e biotecnológicos em diversas áreas, incluindo biocombustíveis, produtos químicos, alimentos, bebidas, rações para animais, gêneros têxteis, papel e agricultura (PETZOLD; SCHWIKAL; HEINZE, 2006).

A maioria das celulases comerciais são produzidas por fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (RUEGGER e TANKTORNISIELO, 2004), sendo o fungo *Trichoderma reesei* um dos micro-organismos com maiores potenciais para a produção de celulases, além de ser o mais detalhadamente estudado (MARGEOT et al., 2009). Espécies do gênero *Aspergillus* produzem altas concentrações de β -glicosidases, o que representa uma vantagem no processo de sacarificação da biomassa (CASTRO et al., 2010).

3.3.4 Xilanases

A xilana é o principal componente da hemicelulose e o segundo mais abundante polissacarídeo natural existente (SARATALE et al., 2012), compreende cerca de 25 a 30 % das massas de plantas vasculares (GOMEZ et al., 2008). É encontrada entre a molécula de

lignina e o conjunto de fibras de celulose e é um polímero linear com a cadeia principal composta por resíduos de β -xilopirranose unidos por ligação glicosídica do tipo β (1-4), podendo apresentar várias substituições (POLIZELI et al., 2005).

As xilanases são as principais enzimas no processo de despolimerização da xilana, estas hidrolisam as ligações glicosídicas internas ao longo da cadeia da xilana, promovendo a liberação de xilo-oligossacarídeos, podem ser aplicadas na conversão de materiais lignocelulósicos em produtos químicos e combustíveis, nas indústrias de alimentos, têxteis, no branqueamento da celulose e do papel, etc. (POLIZELLI et al., 2005; MOURE et al., 2006; KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010). Na indústria de alimentos as xilanases têm uma variedade de aplicações, tais como branqueamento de suco e vinho, separação do amido e produção de ingredientes alimentares funcionais, melhoria nos produtos da panificação, preparação de bebidas, convertendo substâncias lignocelulósicas a matéria-prima (BHAT, 2000; JA'AFARU, 2013).

Os fungos filamentosos possuem grande capacidade de secretar uma elevada variedade de enzimas que atuam na hidrólise da xilana (COLLINS; GERDAY e FELLER, 2005), sendo os principais fungos filamentosos produtores de xilanases industriais o *Trichoderma reesei* e o *Aspergillus niger*, devido às suas capacidades para secretar quantidades elevadas de enzimas hidrolíticas. No entanto, recentemente os fungos *Aspergillus uvarum* e *Aspergillus ibericus* foram identificados como potenciais produtores de xilanases (SALGADO et al. , 2014).

3.4 Técnicas moleculares para identificação de fungos filamentosos

Fungos que possuem a capacidade de se reproduzirem de forma sexuada e assexuada, são denominados holomorfos. Já os fungos que apresentam apenas um tipo de reprodução são classificados como anamorfos (reprodução assexuada) e teleomorfos (reprodução sexuada). Um exemplo desse fato é o fungo *Aspergillus fischerianus*, espécie anamorfa de *Neosartorya fischeri* (CROUS et al., 2009; PITT, 2009). Por meio de técnicas microscópicas, torna-se difícil verificar numa mesma preparação estruturas de ambas as formas de reprodução (KANAMARU, 2011), dificultando assim a identificação dos fungos. Com isso torna-se necessário a aplicação de técnicas mais eficazes para identificação de fungos com essas características de reprodução, neste contexto destacam-se as técnicas moleculares.

As técnicas moleculares são utilizadas na detecção, caracterização e identificação de micro-organismos e são fundamentadas na extração, amplificação e sequenciamento de DNA

(GANDRA et al., 2008). Para fungos filamentosos geralmente utiliza-se a região nuclear ribossomal *Internal Transcribed Spacer* (ITS) para amplificação e posterior sequenciamento, visto que essa é a região mais conservada do DNA fúngico. Por esse e outros motivos a região ITS é considerada o marcador molecular oficial para a identificação em nível de espécie em estudos ecológicos e taxonômicos de fungos (HIBBETT et al., 2011). Quando comparado com outros marcadores, o ITS oferece vantagens como: alto conteúdo de informação e facilidade de amplificação (SCHÖCH et al., 2012).

A amplificação do DNA é realizada por meio da PCR, técnica altamente sensível, onde são obtidas milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (KONEMAN et al., 2001).

Esta reação consiste em três passos chave: desnaturação da dupla fita de DNA em temperaturas de 95 °C; anelamento, onde o par de *primers* se ligam à sequência complementar na fita de DNA em temperatura de 55 °C; e extensão da fita de DNA a temperaturas próximas de 72 °C (CHEN e JANES, 2002). A PCR apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade e potencial para automação (BUSH e NITSCHKO, 1999).

O sequenciamento de DNA é outra técnica da biologia molecular que oferece uma separação mais objetiva das espécies dos micro-organismos em comparação as técnicas convencionais (HALL, WOHLFIEL e ROBERTS 2003). Em relação aos fungos a técnica de sequenciamento é relatada por identifica-los de uma maneira rápida, mostrando ser uma grande promessa e na última década, desenvolveu-se principalmente em aplicações de pesquisas tornando-se uma ferramenta de diagnóstico clínico valiosa (PRYCE et al., 2004; WENGENACK e BINNICKER 2009).

O sequenciamento de DNA basicamente envolve cinco passos: preparação das amostras de DNA; geração dos fragmentos complementares à fita molde do DNA, normalmente por meio dos protocolos de Sanger de terminação de cadeia; separação destes fragmentos por uma técnica de eletroforese em gel; detecção dos fragmentos; e análise de

dados (SOPER et al., 1998). Vários softwares estão disponíveis para supervisionar o procedimento de análise, agrupar as sequências e atribuir a taxonomia, entretanto, a identificação de uma taxonomia satisfatória mantém problemática no reino fungi, devido a uma grande diversidade de fungos não explorada e a falta de sequências de referências (KÖLJALG et al., 2013).

Além das vantagens apresentadas: separação mais objetiva do gênero e espécies dos microrganismos do que as técnicas convencionais; rápida e utilização em pesquisas, essa técnica também apresenta outras vantagens como: ser considerada o padrão ouro para identificação de fungos, e necessitar de profissionais com uma experiência mínima em tecnologia, em contraste aos métodos morfológicos tradicionais que necessitam de profissionais com uma vasta experiência (BALAJEE et al., 2009; TURENNE et al., 1999).

Nielsen et al. (2007) e Pereira et al. (2013) em suas pesquisas avaliaram a dinâmica microbiana envolvida na fermentação de cacau utilizando técnicas moleculares. Os autores evidenciaram que técnicas moleculares são relativamente rápidas e confiável para identificação de comunidades microbianas durante a fermentação das sementes de cacau. As técnicas moleculares são eficazes na identificação das espécies microbianas nos mais variados ambientes, no entanto, as técnicas tradicionais de cultivo também são essenciais para a informação das particularidades fenotípicas e capacidades metabólicas dos micro-organismos, como a produção de enzimas (MUYZER e SMALLA 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das sementes de cacau

As sementes fermentadas de cacau foram coletadas durante a primeira semana do mês de julho (2015) em Tucumã, município brasileiro do interior do estado do Pará, localizado na Microrregião de São Félix do Xingu, região sul do estado, com as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 06° 44' 51" S e Longitude: 51° 09' 40" W. A coleta das sementes para avaliação do pH foi realizada em três cochos fermentadores (A1, A2 e A3), durante os sete dias de fermentação. De cada cocho fermentador foram coletadas amostras em intervalos de 24 horas (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas), totalizando oito tempos de fermentação. Em cada tempo de fermentação foram coletadas porções de sementes em diferentes pontos dos cochos (superfície, meio e fundo), para obtenção de uma amostra homogênea. Essas porções coletadas totalizaram 200 g (amostra final). Assim, 24 ensaios experimentais (3 cochos x 8 tempos de fermentação = 24 amostras) com peso total de 4,8 kg foram coletados durante os sete dias de fermentação. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno estéreis e armazenadas sob congelamento (-18 °C) durante o período de coleta. A coleta das amostras para realização das análises microbiológicas foi realizada do mesmo modo que as coletadas para a avaliação do pH, com mudança apenas no armazenamento (refrigeração à 4 °C). Ao término da coleta, todas as amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo para os Laboratórios de Microbiologia e Processos Biotecnológicos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Tecnologia de Alimentos da UFPA. As amostras foram armazenadas novamente sob refrigeração (4 °C) e congelamento (-18 °C).

4.2 Acompanhamento da fermentação das sementes de cacau

Foram realizadas análises de temperatura e pH em todos os tempos de fermentação. A temperatura foi aferida *in loco* nos oito tempos de fermentação (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas) com um termômetro digital (Instruthemp®, Mod. HT-600) devidamente calibrado. Foi aferida por imersão direta na polpa, em cinco pontos aleatórios da superfície, meio e fundo de cada cocho fermentador, para a obtenção da temperatura média e os resultados foram expressos em °C. O potencial hidrogeniônico (pH) foi aferido em laboratório, utilizando pHmêtro digital previamente calibrado com soluções tampões pH 4,0 e pH 7,0. Foi

aferido o pH das 24 amostras correspondentes aos oito tempos de fermentação, por meio do método 970.21 da AOAC (2006). Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

4.3 Isolamento e conservação dos fungos filamentosos

Foram realizadas diluições decimais (10^{-1} a 10^{-7}) seriadas de alíquotas das amostras de cacau em água peptonada tamponada à 1% (Himedia®). A partir das diluições foi realizado um plaqueamento pela técnica inoculação em superfície (*spread-plate*) em *Potato Dextrose Agar* (PDA) suplementado com cloranfenicol 100 mg/L (Sigma®). As placas foram incubadas a 30 °C em estufa de incubação durante sete dias (APHA, 2001). Após o período de incubação, os fungos filamentosos que apresentaram características morfológicas macroscópicas (cor, tamanho da colônia e produção de esporos) diferentes foram isolados. O isolamento de cada fungo foi realizado com o auxílio de um bisturi estéril, cortando-se fragmentos de aproximadamente 5 mm² da colônia do fungo e transferindo-os para o centro de placas contendo meio PDA. As placas contendo os fragmentos de cada fungo isolado foram incubados nas mesmas condições do cultivo inicial. O procedimento de isolamento foi repetido até obtenção de uma única colônia por placa com característica morfológica macroscópica igual do fungo filamentoso inicialmente isolado. A conservação das colônias de fungos filamentosos previamente isolados foi realizada em água glicerinada a 15%. Três fragmentos de aproximadamente 5 mm² de diferentes partes da colônia de cada fungo filamentoso isolado foram transferidos para tubos de 2 mL do tipo *eppendorf* contendo 1,5 mL de água glicerinada (Sigma®) e armazenados sob congelamento (-18 °C).

4.4 Identificação molecular dos fungos filamentosos isolados

A extração do DNA, PCR e eletroforese foram realizadas no Laboratório de Micologia do Instituto Evandro Chagas (IEC). Já a purificação dos produtos da PCR e o sequenciamento foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Tecnológico Vale (ITV).

4.4.1 Extração do DNA genômico

Utilizou-se a metodologia descrita por Najafzadeh et al. (2010) com adaptações. O cultivo dos fungos filamentosos isolados foi realizado em meio líquido Czapek (Sigma®)

adicionado de 10% extrato levedura (Sigma®). Cada isolado foi inoculado em tubo plástico graduado contendo 5 mL do meio com posterior incubação em incubadora *shaker* (Lucadema®, Mod. Luca-223) durante 10 dias a uma temperatura de 30 °C. Após o período de incubação foram adicionadas seis esferas de vidro (3 mm) em cada tubo e agitados em equipamento tipo *vortex* (Phoenix®, Mod. AP56) por 1 min, logo após os tubos foram centrifugados (Excelsa® 4, Mod. 280-R) a 3.500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e adicionado 400 µL de T.E. (Tris-EDTA pH 9.0). Os tubos foram novamente agitados por 1 min e posteriormente foram adicionados 120 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma®) a 10% e 10 µL de Proteinase K e incubada a 55 °C por 30 min. A mistura foi agitada por 3 min e logo após foram adicionados 120 µL de NaCl (Sigma®) (5M) e incubada a 55°C por 60 min. A mistura foi agitada por 3 min e transferida para tubos de 2 mL do tipo *eppendorf*, com posterior adição de 700 µL de fenol-clorofórmio álcool-isoamílico (25:24:1 v³) e seguida de homogeneização (Dellta®, Mod. CM II) por 5 min. A mistura foi centrifugada (Novatecnica®, Mod. NR 805) a 13.000 rpm por 5 min a 4 °C, posteriormente foi transferido o sobrenadante para outro tubo de 2 mL do tipo *eppendorf* contendo 225 µL de Acetato de Amônio (5M) e homogeneizado cuidadosamente. A nova mistura foi incubada em gelo por 30 min, logo após os tubos foram centrifugados novamente a 13.000 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente com auxílio de uma pipeta. Foram adicionados 1000 µL de Etanol a 70% resfriado e centrifugado a 13.000 rpm por 5 min a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi seco a temperatura ambiente. Finalmente o *pellet* de DNA foi suspenso em 80 µL de TE (pH 6.0-7.0) e conservado a uma temperatura de 3 °C.

4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR)

A reação de amplificação da região *Internal Transcribed Spacers* - ITS foi realizada seguindo a metodologia descrita por Chen et al. (2001). Para a amplificação da região ITS foi preparado um *mix* para cada amostra. Neste *mix* foram adicionados os seguintes reagentes: 11,4 µL de água milliQ (Qiagen®); 5,0 µL de betaína (Invitrogen®); 2,5 µL de tampão da Taq 10X (Invitrogen®); 1,0 µL de dNTP (desoxinucleotídeo trifosfato, 10 mM, Bioron®); 0,5 µL de cada um dos *primers* (Invitrogen®, 10 pmoles/µL); 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM - Invitrogen®); 0,1 de Taq DNA Polimerase (5U/µL - Platinum Taq, Invitrogen®); e 2,0 µL de DNA, totalizando 25 µL de Mix por amostra. Foram empregados os oligonucleotídeos

iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificação a região ITS. Esses oligonucleotídeos são complementares às regiões do rDNA 18S e 28S e permitem amplificar parcialmente o rDNA 18S, completamente as regiões ITS1, rDNA 5.8S e ITS2 e o início do rDNA 28S. As reações de PCR foram realizadas em termociclador (PX2 Thermo Hybaid, RU) da seguinte forma: Desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1min (desnaturação), 55,5 °C por 2 min (anelamento), 72 °C por 2 min (extensão) e extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos da PCR foram conservados a -20 °C até a etapa do sequenciamento.

4.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Para estimativa do peso molecular e revelação dos produtos da PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose (Argagen®) a 2% (m/v) adicionando-se aos poços do gel 5,0 µL do DNA amplificado de cada isolado e corado com SyBR® Safe, em tampão TBE 1X (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3), a 69 volts, 60 miliamperes, por 60 min usando marcador de peso molecular (*ladder*) de 1 kb (Invitrogen®). A visualização do DNA amplificado foi realizada com um transiluminador UV (UVP Bioimaging Systems®).

4.4.4 Purificação e sequenciamento do DNA amplificado

A purificação dos produtos da PCR foi realizada com kit comercial da Big Dye vs. 3 e o procedimento da purificação foi seguido conforme o protocolo do fabricante. Para tanto, 20 µL do DNA amplificado de cada isolado foi transferido para uma placa de PCR e logo após foram adicionados 100 µL de isopropanol a 65% (Sigma®). A mistura ficou em repouso ao abrigo de luz por 15 min a 25 °C. Após o tempo de repouso a placa contendo a mistura foi centrifugada (Eppendorf®, Mod. 5810 R) a 4.000 rpm a 10 °C por 45 min, após isso, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e adicionado 125 µL de etanol 70% refrigerado ao precipitado. A mistura novamente foi centrifugada a 4.000 rpm a 10 °C por 45 min com posterior descarte do sobrenadante. Para secagem completa, a placa foi invertida em papel toalha, submetida a um “*spin*” de 200 rpm por 30 segundos e posteriormente foi armazenada em local arejado e ao abrigo de luz por 60 min. Após a secagem, o DNA foi ressuspendido em 20 µL de água ultrapura e seguiu-se para a etapa do sequenciamento. O sequenciamento foi realizado em sequenciador eletrônico (Applied Biosystems®, Mod. 3730) e o procedimento

foi seguido conforme o protocolo do fabricante (ANEXO 1). Foram empregados os mesmos oligonucleotídeos iniciadores (0,5 pmol) utilizados na PCR (ITS1 - 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; e ITS4 - 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para reação do sequenciamento da região ITS.

4.4.5 Alinhamento e comparação das sequências

O alinhamento das sequências obtidas foi realizado com o auxílio do programa Geneious® (versão 9.1.5). Por meio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) foi realizada a identificação em nível de gênero e espécies dos fungos filamentosos. O BLAST forneceu a porcentagem de similaridade das sequências correspondentes à região ITS dos isolados estudados em relação às sequências já depositadas no Genbank.

4.5 Potencial enzimático dos fungos filamentosos

Foram repicados fragmentos de meio PDA contendo colônia de cada fungo isolado para o centro de placas de petri com meio sólido específico para a indução da bioprodução de amilase, celulase, pectinase e xilanase. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.5.1 Potencial amilolítico

Para avaliar o potencial de produção de amilase foi utilizada a metodologia de Khokhar, Mukhtar e Mushtaq (2011) com algumas adaptações. O meio ágar sal mineral preparado com 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O); 1,0 g.L⁻¹ de nitrato de sódio (NaNO₃); 1,0 g.L⁻¹ de fosfato de potássio dibásico (KH₂PO₄); 0,01 g.L⁻¹ de sulfato de ferro (Fe₂SO₄); 20 g.L⁻¹ de ágar; e como fonte de carbono utilizou-se amido solúvel (20,0 g.L⁻¹). O pH inicial do meio foi ajustado para 6.0 e posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Foram distribuídos 20 mL de meio em placas estéreis. Cada fungo filamentoso previamente isolado foi recultivado para uma placa contendo o meio ágar sal mineral solidificado. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante três dias. Percorrido o período de incubação foi realizada a revelação do halo de degradação do amido com solução de lugol. Para isso, foram vertidos 15 mL da solução sobre a superfície das placas e descartados logo após. Posteriormente as placas foram incubadas

durante 10 minutos a 30 °C em estufa. A atividade amilolítica foi detectada pela formação de um halo claro circundado por uma zona azulada (DEB et al., 2013).

4.5.2 *Potencial pectinolítico*

O potencial pectinolítico dos fungos filamentosos isolados foi avaliado por crescimento em meio ágar sal mineral composto de 2,0 g.L⁻¹ de nitrato de sódio (NaNO₃); 1,0 g.L⁻¹ de fosfato de potássio dibásico (KH₂PO₄); 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O); 0,5 g.L⁻¹ de cloreto de potássio (KCl); 0,01 g.L⁻¹ de sulfato de ferro (Fe₂SO₄); 20,0 g.L⁻¹ de ágar suplementado com pectina cítrica (10,0 g.L⁻¹), conforme metodologia adaptada de Reddy e Sreeramulu, (2012). O pH inicial do meio foi ajustado para 7.0 e posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Foram distribuídos 20 mL de meio em placas estéreis. As placas contendo os fragmentos de cada fungo isolado foram incubadas em estufa a 30 °C durante três dias. O halo de degradação da pectina foi observado por meio da adição de 15 mL de solução lugol com posterior descarte. Após o descarte da solução deve-se detectar a formação de zonas claras ou amareladas ao redor da colônia, evidenciando assim a atividade pectinolítica.

4.5.3 *Potencial celulolítico*

O potencial celulolítico dos fungos isolados foi avaliado de acordo com a metodologia de Teather e Wood (1982) com modificações. O meio ágar sal mineral preparado com 2,0 g.L⁻¹ de nitrato de sódio (NaNO₃); 1,0 g.L⁻¹ de fosfato de potássio dibásico (KH₂PO₄); 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O); 0,5 g.L⁻¹ de cloreto de potássio (KCl); 0,01 g.L⁻¹ de sulfato de ferro (Fe₂SO₄); 15,0 g.L⁻¹ de ágar; como única fonte de carbono foi utilizado 10,0 g.L⁻¹ de carboximetilcelulose. O pH inicial do meio foi ajustado para 5.0 e posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Foram distribuídos 20 mL de meio em placas estéreis. Cada fungo filamentoso isolado foi recultivado para uma placa contendo o meio ágar sal mineral. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante três dias. Após a incubação foi adicionado 15 mL de solução de vermelho congo a 0,1% na superfície das placas onde permaneceu durante 30 minutos. Logo após, a solução de vermelho congo foi descartada e adicionada em cada placa 15 mL de solução hidróxido de sódio (NaOH) 1 N por 10 minutos. Finalmente, a solução de NaOH 1 N

foi também descartada e a coloração das placas foi analisada observando a formação de zonas claras ou amareladas/avermelhadas em torno dos fungos inoculados.

4.5.4 *Potencial xilanolítico*

O potencial xilanolítico foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Alvarez-Navarrete et al. (2015) com alterações. Foi preparado um meio composto de 2,5 g.L⁻¹ de peptona; 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura; e como fonte de carbono utilizou-se 1,0 g.L⁻¹ de xilano. O pH do meio foi ajustado para 5.0 e posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Foram distribuídos 20 mL de meio em placas estéreis. As placas foram incubadas em estufa de incubação durante três dias a 30 °C. Após a adição e descarte de 15 mL de solução de lugol nas placas, é possível observar em volta da colônia a formação de um halo amarelo ou alaranjado, demonstrando assim a produção de xilanases.

4.5.5 *Determinação do Índice Enzimático (IE)*

Foi obtido mediante a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia do fungo filamentoso. Os isolados que apresentaram IE igual ou superior a 2 foram considerados como bons produtores de enzimas extracelulares (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

4.5.6 *Índice de velocidade de crescimento (IVC)*

Foi obtido por meio da relação entre o tamanho final da colônia e o tempo de incubação (72 horas). Os resultados obtidos foram expressos em milímetros por hora (mm\h) (OLIVEIRA, 1991).

4.6 Análises estatísticas

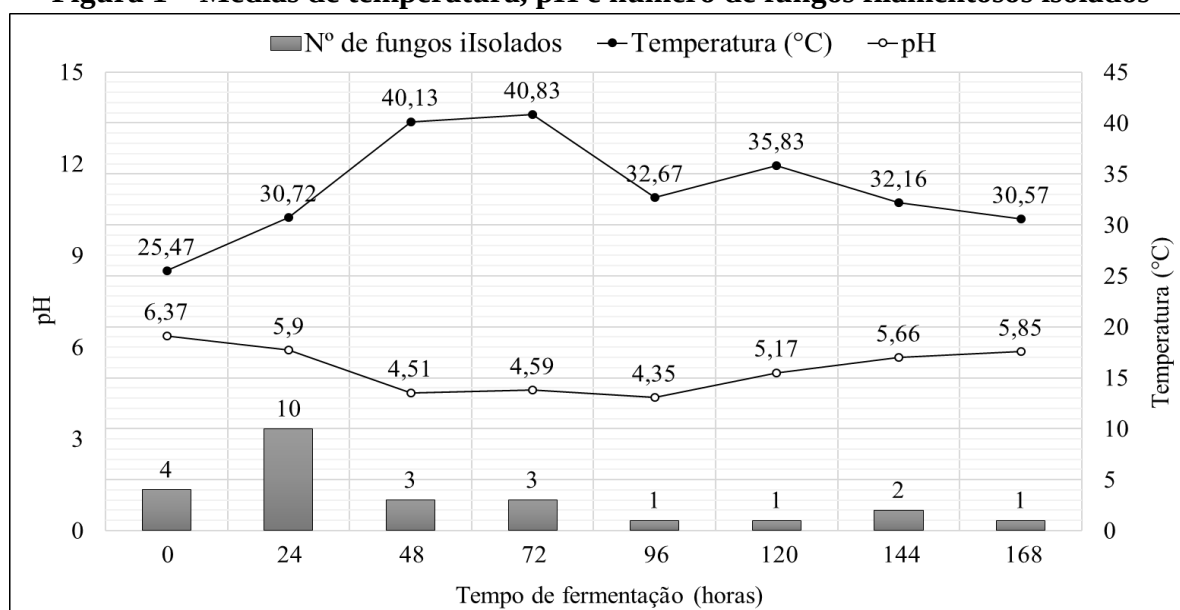
As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* Statistica® versão 10.0. Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado para os resultados obtidos. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de comparação múltipla de *Tukey* ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Acompanhamento da fermentação das sementes de cacau e isolamento dos fungos

Na Figura 1 estão apresentados os valores médios da temperatura e pH do processo de fermentação e o número de fungos filamentosos isolados em cada tempo da fermentação do cacau no município de Tucumã, Pará.

Figura 1 – Médias de temperatura, pH e número de fungos filamentosos isolados



Fungos filamentosos isolados por tempo de fermentação: **0 h** (FF13, FF14, FF16 e FF24); **24 h** (FF01, FF05, FF09, FF12, FF15, FF16, FF17, FF18, FF20 e FF21); **48 h** (FF02, FF07 e FF22); **72 h** (FF06, FF10 e FF23); **96 h** (FF11); **120 h** (FF25); **144 h** (FF03 e FF08); e **168 h** (FF04)

Os resultados demonstram que os valores médios da temperatura durante a fermentação apresentaram diferenças da temperatura inicial (0 horas). Os maiores picos de temperatura foram observados nos tempos 48 e 72 horas. Esse aumento da temperatura é justificado pela presença de micro-organismos como leveduras e bactérias acéticas que metabolizam de forma exotérmica os açúcares fermentáveis da polpa do cacau a etanol e ácido acético respectivamente. Visintin et al. (2016) em seus estudos demonstraram que a temperatura da fermentação das sementes de cacau na África Ocidental aumentou de 29,5 °C (zero horas) para 39,7 °C (144 horas) ($\Delta T = 10,2$ °C). Com isso, observa-se que esse aumento da temperatura é peculiar em fermentações de cacau.

No tempo 0 horas foi observado o maior valor de pH, diferindo esse dos demais tempos de fermentação. Observou-se um decréscimo nos valores médios de pH até as 96

horas do processo fermentativo das sementes de cacau. Essa redução no pH pode ser relacionada a bactérias lácticas e acéticas que habitualmente estão presentes no processo fermentativo, essas bactérias produzem ácidos orgânicos que permeiam para a semente do cacau, diminuindo assim os valores de pH.

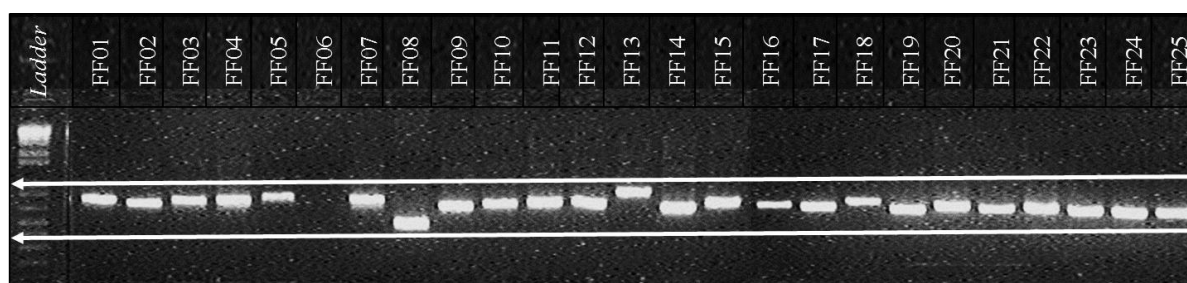
Foram isolados um total de 25 fungos filamentosos com diferentes características morfológicas macroscópicas (APÊNDICE A). A maior diversidade de isolados foi encontrada nos tempos 0 e 24 horas. Isso pode ser justificado pelo fato das sementes de cacau nos primeiros dias de fermentação ainda apresentarem uma quantidade considerável de polpa, sendo esta a principal fonte de energia para os fungos filamentosos na fermentação.

Outro fato que pode justificar o decréscimo no número de fungos filamentosos isolados a partir do tempo 48 horas de fermentação é o aumento considerável da temperatura observado entre o tempo de 24 (30,72 °C) e 72 horas (40,83 °C) ($\Delta T = 10,1$ °C). Acredita-se que esse aumento de temperatura possa ter inibido o crescimento de algumas espécies. A variação nos valores de pH durante a fermentação possivelmente não interferiu no crescimento dos fungos, visto que, de modo geral fungos filamentosos podem tolerar baixos valores de pH como os encontrados no presente estudo.

5.2 Identificação molecular dos fungos filamentosos isolados

Por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose, pôde-se estimar os pares de bases (pb) do DNA extraído e amplificado pela técnica da PCR de cada fungo filamentoso isolado (Figura 2).

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR



Observou-se que todos os isolados, com exceção do FF06, apresentaram bandas bem definidas, com pares de bases (pb) variando entre 500 e 700, caracterizando assim que o DNA extraído e amplificado apresentou um bom grau de pureza, livre de contaminantes.

O isolado FF06 não apresentou bandas de DNA na corrida eletroforética, esse fato pode estar relacionado com a capacidade que o isolado possui de produzir pigmentos escuros (melanina) no meio de cultivo, pigmentos estes que podem ter interferido na visualização do DNA, já que o mesmo ainda não havia sido purificado. Os fragmentos de DNA amplificados que apresentam visível diferença de pares de bases na mesma corrida eletroforética com as mesmas condições reacionais podem indicar diferentes espécies de micro-organismos, como pode ser observado em FF07, FF08 e FF13. Já fragmentos que apresentam visualmente os mesmos números de pb não podem ser inicialmente considerados da mesma espécie.

Na Tabela 1 estão apresentados os fungos filamentosos identificados por comparação pela região ITS do rDNA com as sequências do GenBank.

Tabela 1 - Identificação molecular dos fungos filamentosos (n=25) isolados da fermentação do cacau em Tucumã, PA

Fungo/código	Espécie	Similaridade (%)¹
FF01	<i>Talaromyces minioluteus</i>	95
FF02	<i>Talaromyces macrosporus</i> voucher	100
FF03	<i>Fomitopsis subtropica</i> voucher Cui	100
FF04	<i>Penicillium paneum</i>	100
FF05	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
FF06	<i>Penicillium rubidurum</i>	99
FF07	<i>Talaromyces radicus</i>	100
FF08	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	99
FF09	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	100
FF10	<i>Penicillium pimiteouiense</i>	99
FF11	<i>Phanerochaete australis</i>	100
FF12	<i>Pleosporales</i> ssp.	95
FF13	<i>Perenniporia tephropora</i>	99
FF14	<i>Neonothopanus nambi</i>	99
FF15	<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. meridionalis	100
FF16	<i>Aspergillus parasiticus</i>	98
FF17	<i>Marasmius cladophyllus</i>	100
FF18	<i>Pleosporales</i> ssp.	95
FF19	<i>Penicillium canescens</i>	100
FF20	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	100
FF21	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
FF22	<i>Diaporthe tectonae</i> voucher	100
FF23	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99
FF24	<i>Diaporthe tectonae</i> voucher	100
FF25	<i>Diaporthe lithocarpus</i>	95

(¹) Porcentagem de similaridade com fungos filamentosos disponíveis no GenBank®;

Foram identificados 13 gêneros com 21 espécies. Observou-se que os isolados FF22 e FF24 apesar de apresentarem características morfológicas macroscópicas diferentes eram da mesma espécie (*Diaporthe tectonae* voucher). Isso pode ser justificado pelo fato desses fungos terem sido isolados em diferentes tempos da fermentação (0 e 48 horas), o que possivelmente pode ter modificado suas características morfológicas, uma vez que a fermentação apresenta variação na temperatura e pH nestes tempos (Figura 1). Os resultados obtidos na identificação molecular evidenciam que na fermentação do cacau em Tucumã, PA, há uma ampla variedade de espécies de fungos filamentosos.

A partir da identificação de cada linhagem foi realizada uma busca de trabalhos na literatura nos últimos 10 anos que associassem a presença desses fungos com a fermentação do cacau. Copetti et al. (2011b) ao realizarem um estudo da micobiota presente no processamento do cacau em Ilhéus, BA, identificaram 10 gêneros e 18 espécies de fungos filamentosos. No processo de fermentação também evidenciaram a presença das espécies *A. versicolor*, *A. parasiticus* e *Penicillium paneum*.

Rubini et al. (2005) identificaram por meio de técnicas moleculares a diversidade de fungos endofíticos em folhas de cacaueiros em Itabuna (BA) e verificaram a presença de 31 espécies. Dois gêneros (*Diaporthe* e *Cladosporium*) relatados por esses autores foram encontrados neste estudo. O fato desses fungos estarem presentes em folhas de cacaueiro pode justificar o isolamento dos mesmos na etapa da fermentação das sementes, uma vez que as folhas do cacaueiro estão em contato com os frutos.

Das espécies de fungos filamentosos identificadas (n=21) neste estudo, 18 delas até o momento não haviam sido relatadas durante a fermentação do cacau. Esse fato evidencia a grande diversidade fúngica que está presente no processo fermentativo do cacau no Município de Tucumã (PA) ainda não relatada na literatura, o que demonstra a necessidade de estudos que visem identificar os fungos filamentosos em outros municípios da Amazônia Brasileira.

Alguns desses fungos podem ser encontrados no solo, como é o caso de algumas espécies do gênero *Talaromyces*, que de acordo com Adhikari et al. (2015) os fungos desse gênero têm uma distribuição mundial e são isolados principalmente do solo. Lucheta et al. (2016) em seus estudos verificaram a presença de fungos do gênero *Fomitopsis* em amostras de solos da Amazônia, o que pode justificar a presença da espécie *Fomitopsis subtropica* voucher Cui encontrada neste estudo.

O fato de alguns gêneros de fungos filamentosos serem isolados do solo, possivelmente justifica a presença de algumas das espécies encontradas, já que, após a colheita os frutos de cacau entram em contato com o solo, quando são deixados por 24/48 horas em repouso antes da quebra dos frutos para posterior fermentação. De modo geral, a ocorrência natural dos fungos filamentosos encontrados na fermentação do cacau em Tucumã, PA é no solo, água, plantas e em matéria orgânica em decomposição.

Foi verificado neste estudo a presença de *A. parasiticus*, fungo toxigênico que apresenta grande potencial na produção de aflatoxinas. Acredita-se que a ocorrência deste micro-organismo na etapa de fermentação do cacau não seja preocupante, pois de acordo com Bouras et al. (2009) e Garcia et al. (2011) a produção de micotoxinas são influenciadas por complexas interações entre fatores abióticos e bióticos (atividade de água, temperatura, pH, umidade, concentração de soluto, composição química do alimento e tempo de armazenamento).

Copetti et al. (2011a) avaliaram a ocorrência e distribuição de espécies aflatoxigênicas, bem como a ocorrência de aflatoxinas durante o processamento do cacau na Bahia (BR) e verificaram que apesar da elevada ocorrência de fungos aflatoxigênicos (*A. flavus* e *A. parasiticus*) os níveis de aflatoxinas encontrados nas amostras foram baixos, principalmente as da etapa da fermentação, sugerindo-se que no cacau há compostos que apresentam propriedades antitoxigênicas.

5.3 Potencial enzimático dos fungos filamentosos

Na Tabela 2 encontram-se os resultados do índice enzimático (IE) dos fungos filamentosos na atividade extracelular de amilase, pectinase, celulase e xilanase. Os resultados demonstraram que no teste de amilase os fungos filamentosos isolados apresentaram IE variados, sendo que 16% dos isolados não apresentaram potencial enzimático na atividade amilolítica (FF04 – *P. paneum*, FF11 – *P. australis*, FF17 – *M. cladophyllus* e FF20 – *P. capitalensis*).

Um fungo filamentoso para ser considerado um potencial produtor de uma determinada enzima extracelular ele deve apresentar IE igual ou superior a 2 (STAMFORD; ARAÚJO e STAMFORD 1998), com isso, no teste de amilase apenas os isolados FF05 (*A. versicolor*) e FF16 (*A. parasiticus*) foram considerados potenciais produtores de amilase, sendo o isolado FF16 o que apresentou maior IE (2,3) de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 2 – Potencial enzimático de fungos filamentosos na atividade amilolítica, pectinolítica, celulolítica e xilanolítica

Fungo/ código	Índice Enzimático (IE)			
	Amilase	Pectinase	Celulase	Xilanase
FF01	1,5 ^{d*} ±0,1	2,2^a ±0,1	1,1 ^{lm} ±0,1	2,0^b ±0,1
FF02	1,1 ^f ±0,1	0,9 ^g ±0,0	1,7 ^e ±0,0	1,0 ^{ij} ±0,0
FF03	1,0 ^{fg} ±0,0	2,0^{ab} ±0,0	3,0^c ±0,0	1,6 ^d ±0,0
FF04	0,0 ^k ±0,0	0,0 ^h ±0,0	0,0 ⁿ ±0,0	1,1 ^{ghi} ±0,0
FF05	2,1^b ±0,2	1,9^b ±0,1	3,7^b ±0,0	2,6^a ±0,0
FF06	1,0 ^{fg} ±0,0	1,1 ^{efg} ±0,0	1,6 ^{efg} ±0,1	1,2 ^{hij} ±0,0
FF07	1,5 ^d ±0,1	1,1 ^{ef} ±0,2	1,5 ^{hi} ±0,0	1,2 ^{fgh} ±0,1
FF08	1,0 ^{fg} ±0,0	1,0 ^{efg} ±0,0	1,5 ^k ±0,0	1,6 ^d ±0,0
FF09	0,9 ^g ±0,0	0,0 ^h ±0,0	1,2 ^{kl} ±0,0	0,9 ^l ±0,0
FF10	1,8 ^c ±0,0	1,4 ^{cd} ±0,1	2,1^d ±0,0	1,1 ^{ghij} ±0,1
FF11	0,0 ^k ±0,0	1,0 ^{efg} ±0,0	0,0 ⁿ ±0,0	1,0 ^{jk} ±0,0
FF12	1,5 ^d ±0,0	1,5 ^c ±0,1	1,7 ^{ef} ±0,0	1,4 ^e ±0,0
FF13	0,5 ^{hi} ±0,0	1,0 ^{efg} ±0,0	0,0 ⁿ ±0,0	1,1 ^{hij} ±0,0
FF14	1,0 ^{fg} ±0,0	1,4 ^{cd} ±0,0	1,3 ^{jk} ±0,1	2,1^b ±0,1
FF15	0,6 ^h ±0,0	0,0 ^h ±0,0	1,5 ^{fgh} ±0,0	0,0 ^m ±0,0
FF16	2,3^a ±0,0	1,2 ^{de} ±0,0	1,5 ^{gh} ±0,0	1,2 ^{fg} ±0,0
FF17	0,0 ^k ±0,0	0,9 ^{fg} ±0,0	1,0 ^m ±0,0	1,1 ^{ij} ±0,0
FF18	1,0 ^{fg} ±0,0	1,0 ^{efg} ±0,0	0,0 ⁿ ±0,0	1,3 ^{ef} ±0,1
FF19	1,0 ^{fg} ±0,0	1,0 ^{efg} ±0,1	1,2 ^{kl} ±0,1	1,0 ^{ij} ±0,0
FF20	0,0 ^k ±0,0	1,0 ^{efg} ±0,0	1,7 ^e ±0,0	1,8 ^c ±0,0
FF21	1,2 ^e ±0,0	2,1^{ab} ±0,1	4,0^a ±0,0	2,5^a ±0,0
FF22	0,4 ^{ij} ±0,0	1,2 ^d ±0,0	1,3 ^k ±0,0	0,9 ^l ±0,0
FF23	0,6 ^h ±0,1	0,0 ^h ±0,0	1,2 ^k ±0,0	0,8 ^l ±0,0
FF24	0,2 ^j ±0,0	1,1 ^{efg} ±0,0	1,3 ^{ijk} ±0,1	0,9 ^l ±0,0
FF25	0,4 ^{ij} ±0,0	0,0 ^h ±0,0	1,0 ^m ±0,1	0,8 ^l ±0,0

(*) Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferiram estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey;

Os halos gerados pelos isolados FF05 e FF16 apresentaram as características esperadas (cor branca ou azul clara) (APÊNDICE B). O fungo filamentoso FF16 se destacou na produção de amilase, visto que após 72 horas de incubação houve degradação de todo o amido presente no meio de cultivo. Fungos filamentosos são frequentemente utilizados para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, pois as produzem em elevados níveis.

As amilases apresentam grande importância tecnológica, uma vez que são empregadas na sacarificação do amido, obtendo assim, açúcares simples de interesse para a indústria de alimentos (KHOKHAR, MUKHTAR e MUSHTAQ 2011). Conforme Deb et al. (2013) e

Gupta et al. (2003) as amilases possuem grande aplicação nas indústrias de panificação, cereais para alimentação infantil, cervejas, bebidas destiladas, além de aplicações em indústrias químicas, têxteis e farmacêuticas.

Já para a fermentação do cacau todos os fungos filamentosos que se apresentaram positivos (84%) na produção de amilase são importantes nesta etapa do processamento do cacau, pois as amilases são requeridas na fermentação para disponibilizar açúcares redutores, açúcares estes que na etapa de torração das amêndoas irão gerar juntamente com aminoácidos por meio da Reação de *Maillard* os compostos precursores do sabor e aroma de chocolate.

Conforme os dados apresentados na Tabela 2, verificou-se para o teste de pectinase que 20% dos isolados (FF04, FF09, FF15, FF23 e FF25) não apresentaram potencial enzimático. Os fungos *T. minioluteus* (FF01), *F. subtropica* v. Cui (FF03) e *C. cladosporioides* (FF21) apresentaram os maiores índices enzimáticos obtidos no presente estudo para pectinase. O fungo *A. versicolor* (FF05) não apresentou IE igual a 2 no entanto o valor obtido não diferiu estatisticamente dos valores obtidos pelos isolados FF03 e FF21, com isso, o FF05 também foi considerado como um bom produtor de pectinase. Os halos formados apresentam coloração amarelada ou claras (APÊNDICE C) evidenciando assim que o teste foi positivo. Os demais isolados não apresentam valores significativos de IE.

Estudos realizados nos últimos anos têm relatado que fungos do gênero *Cladosporium* apresentam bom potencial na atividade extracelular de diversas enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico. Fernandes (2009) analisou o potencial enzimático de diferentes espécies de fungos desse mesmo gênero e obteve melhores resultados para a espécie *C. cladosporioides*. Oliveira et al. (2011) realizou em seu estudo fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais para produção de pectinase por isolados de *C. cladosporioides* e obteve resultados satisfatórios. Os resultados encontrados por esses autores corroboram com resultados obtidos no teste semiquantitativo de pectinase para o fungo *C. cladosporioides* no presente estudo.

Os fungos *T. minioluteus*, *F. subtropica* v. Cui e *C. cladosporioides* encontrados na fermentação do cacau no Município de Tucumã (PA) nunca haviam sido relatados em fermentações de cacau e não foi verificado em artigos científicos publicados na última década relatos sobre potencial pectinolítico de *T. minioluteus*, *A. versicolor* e *F. subtropica* v. Cui. Visto que as indústrias estão em constante busca de novas fontes de pectinases para aplicações na fermentação de chá, café e cacau e em sucos de frutas para reduzir viscosidade

(KUMAR e SUNEETHA, 2014), é importante realizar estudos quantitativos dessas espécies, visando comprovar efetivamente a atividade enzimática extracelular de pectinase, sendo possível deste modo utilizar esses fungos em aplicações biotecnológicas ou até mesmo no próprio processo fermentativo do cacau.

Dos 25 fungos filamentosos avaliados no teste de pectinase 76% mostraram-se positivos quanto a produção dessa enzima. Na literatura não existe relatos da atuação dos fungos filamentosos na fermentação do cacau, com isso, esses fungos que apresentaram capacidade de produzir pectinase podem contribuir positivamente para a fermentação do cacau, uma vez que as pectinases são requeridas na fermentação do cacau, pois além de proporcionarem uma maior disponibilidade de açúcares redutores elas melhoram a aeração da massa por meio da hidrólise da pectina que tem a função de cimentação na polpa, o que a torna mais viscosa e impede o fluxo de ar. Esse processo de aeração da massa proporciona o crescimento de micro-organismos aeróbicos que também atuam na fermentação.

Para o teste de celulase (Tabela 2), apenas os isolados FF04, FF11, FF13 e FF18 não apresentaram atividade celulolítica. Dos fungos filamentosos isolados, 68% apresentaram IE entre 1,0 e 1,7, não sendo considerados bons produtores de celulase pela metodologia adotada. No entanto, esses fungos quando estão presentes na fermentação do cacau podem contribuir beneficemente nesta etapa, pois a polpa apresenta uma quantidade de celulose que necessita ser hidrolisada em moléculas de glicose que poderão ser consumidas por outros micro-organismos presentes na fermentação, além de serem essenciais para Reação de *Maillard*.

Os isolados FF03 – *F. subtropica* v. Cui, FF05 – *A. versicolor*, FF10 – *P. pimentouense* e FF21 – *C. cladosporioides* se destacaram na produção extracelular de celulase, apresentando os maiores índices enzimáticos. Com isso, além desses fungos serem desejáveis na fermentação do cacau, também são desejáveis em indústrias de alimentos e bebidas, biocombustíveis e de produtos químicos, uma vez que apresentaram bom potencial enzimático na produção de celulasas. No Apêndice D encontram-se os halos (com zonas claras ou amareladas/avermelhadas) de degradação da celulose gerados por esses fungos.

Existem vários estudos que avaliaram e comprovaram a atividade celulolítica de *A. versicolor*, no entanto, não foram encontrados relatos científicos que descrevessem o potencial enzimático na atividade celulolítica dos fungos *F. subtropica* v. Cui e *P. pimentouense*, no entanto, vários estudos relatam o potencial enzimático de outras espécies dos gêneros *Fomitopsis* e *Penicillium* (DESWAL, KHASA E KUHAD, 2011; PEREIRA,

2012). O fungo *C. cladosporioides* foi o isolado que apresentou melhor índice enzimático (4,0) no teste de celulase. Bezerra et al. (2012) realizaram uma seleção de fungos endofíticos isolados da Figueira-da-índia e verificaram que o fungo *C. cladosporioides* apresentou baixo potencial celulolítico, sendo estes resultados diferentes dos encontrados neste estudo.

Para o teste de xilanase (Tabela 2), observou-se que somente o isolado FF15 não apresentou potencial enzimático. Os fungos *T. minioluteus*, *A. versicolor*, *N. nambi* e *C. cladosporioides* apresentaram halos de degradação da xilana característicos (APÊNDICE E), obtendo IE superior a 2 sendo considerados como potenciais produtores de xilanases. A xilana é um dos componentes majoritários das hemiceluloses e estas estão presentes na parede celular da polpa do cacau, por isso é favorável a presença de fungos filamentosos que secretem xilanases, possibilitando assim a síntese de açúcares fermentáveis por meio da degradação da xilana, açúcares esses que serviram como fonte de energia para leveduras e bactérias presentes na fermentação do cacau.

Não foi verificado na literatura correlação da produção de xilanases com os fungos *T. minioluteus* e *N. nambi*. No entanto, para *A. versicolor* e *C. cladosporioides* existem vários estudos que demonstram a atividade xilanolítica dessas espécies. Hong et al. (2011) em seus estudos caracterizaram xilanases produzidas por *C. cladosporioides* e verificaram que esse fungo possui grande potencial e rápida secreção dessa enzima. A xilanase possui aplicações nas indústrias de alimentos, têxteis, no branqueamento da celulose e do papel, (POLIZELLI et al., 2005; MOURE et al., 2006; KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010).

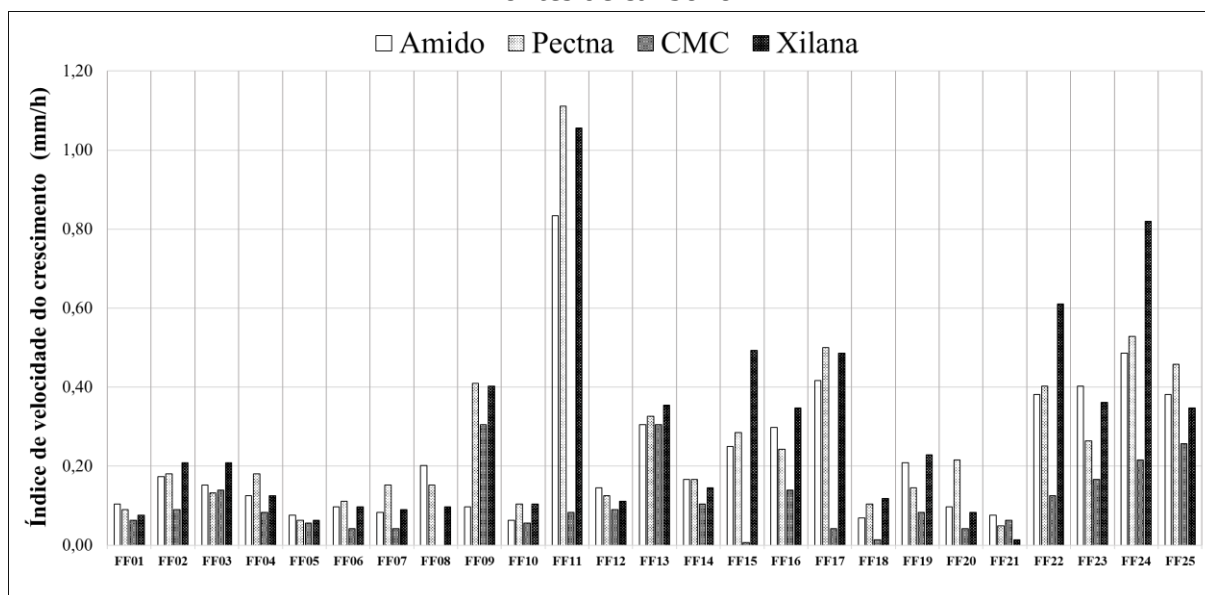
De modo geral, sete isolados apresentaram um bom índice enzimático (IE) nos testes realizados. O fungo filamentoso *Talaromyces minioluteus* (FF01) exibiu boa atividade pectinolítica e xilanolítica, o fungo *Fomitopsis subtropica* v. Cui (FF03) apresentou um bom potencial nos testes de pectinase e celulase, o fungo *Aspergillus versicolor* (FF05) foi o único que se destacou em todos os testes, obtendo um alto índice enzimático na atividade celulolítica e os fungos *Penicillium pimateouiense* (FF10), *Neonothopanus nambi* (FF14) e *Aspergillus parasiticus* (FF16) apresentaram bom potencial apenas na atividade extracelular das enzimas celulase, xilanase e amilase respectivamente.

O isolado FF21 (*Cladosporium cladosporioides*), apresentou bom IE na atividade pectinolítica, celulolítica e xilanolítica. Até o momento não havia na literatura estudos que evidenciem a presença desse fungo na fermentação de cacau no Brasil e em outros países produtores de cacau, assim como não existem dados que correlacionem a presença desse

fungo com uma fermentação de cacau de boa qualidade, no entanto, no processamento do café os fungos do gênero *Cladosporium* tem sido associado com café de qualidade, pois consomem rapidamente a mucilagem do fruto, impedindo o desenvolvimento de outros micro-organismos que podem ocasionar fermentações indesejáveis como a butírica e propiônica devido a indisponibilidade de substrato (PEREIRA, 2002). Além disso o fungo *C. cladosporioides* apresenta um potencial no biocontrole de fungos produtores de micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2004), isso justifica o baixo número de fungos toxigênicos isolados (n=2), o que pode indicar que a presença desse fungo na fermentação do cacau seja favorável.

Outro teste realizado para verificar o potencial enzimático dos fungos filamentosos isolados foi o Índices de Velocidade de Crescimento (IVC). Na Figura 3 estão apresentados o IVC de cada fungo filamentoso isolado da fermentação de cacau em Tucumã, PA.

Figura 3 – Índices de velocidade do crescimento dos fungos filamentosos em diferentes fontes de carbono



Observou-se que os fungos do gênero *Talaromyces* (FF01, FF02 e FF07), *Fomitopsis* (FF03), *Penicillium* (FF04, FF06, FF10 e FF19), *Aspergillus* (FF05), *Daldinia* (FF08), *Neonothopanus* (FF14), *Pleosporales* (FF12 e FF18), *Phyllosticta* (FF20) e *Cladosporium* (FF21) apresentaram baixos índices de velocidade de crescimento (IVC), com valores inferiores a 0,35 mm/h para todas as fontes de carbono testadas. Os fungos do gênero *Diaporthe* (FF09, FF15, FF22, FF23, FF24 e FF25) de modo geral apresentaram baixa velocidade de crescimento (<0,35 mm/h) quando utilizado CMC como fonte de carbono e crescimento razoável (0,35 a 0,82 mm/h) quando utilizado xilana como fonte de carbono.

O isolado FF11 (*Phanerochaete australis*) se destacou entre os demais isolados, apresentando altos índices de velocidade de crescimento ($>1,00$ mm/h) em duas fontes de carbono testadas (pectina e xilana). Com isso, pressupõe que o fungo filamentoso *P. australis* seja um bom produtor das referidas enzimas, visto que o mesmo apresentou alta velocidade de crescimento nos testes. Essa alta velocidade de crescimento possivelmente justifica a ausência dos halos ou os valores baixos de IE, pois seu crescimento pode ser paralelo a secreção da enzima. Isso pode demonstrar que este fungo tem a capacidade de produzir/secretar enzimas a partir de diferentes substratos (pectina e xilana) em curto tempo, com isso, sua presença na fermentação de cacau pode ser favorável uma vez que um dos principais objetivos dos estudos com fermentação é diminuir o tempo em que esse processo ocorre.

Correlacionando a capacidade de crescimento com a de secreção de enzimas, observou-se que os isolados que obtiveram bom potencial enzimático apresentaram uma taxa de crescimento relativamente baixa, esse fato pode estar relacionado com o gasto inicial de energia para produção e secreção de enzimas, ou simplesmente por ser uma característica fisiológica desses isolados. Esse fato demonstra a importância de se utilizar mais de um teste para avaliar o potencial enzimático dos fungos quando se utiliza um grande número de espécies, pois cada espécie possui características metabólicas peculiares o que torna difícil de ser observada em apenas um teste.

Muitos estudos correlacionam a presença de fungos filamentosos com a produção de micotoxinas durante a fermentação e secagem das sementes do cacau e raros são os estudos na literatura que associam esses micro-organismos com uma fermentação de qualidade. Até hoje não se sabe ao certo se os fungos filamentosos contribuem de modo positivo para a fermentação das sementes do cacau. Porém, com os resultados obtidos no presente estudo verificou-se que algumas espécies de fungos filamentosos podem viver em simbiose com outros micro-organismos presentes na fermentação do cacau (leveduras e bactérias), visto que essas espécies de fungos filamentosos possuem a capacidade de produzir/secretar enzimas hidrolíticas que podem transformar moléculas poliméricas da polpa do cacau em açúcares simples que são utilizados como principal fonte de energia pelas leveduras e bactérias. Um exemplo disso é a pectina presente na polpa do cacau, que quando sofre a ação de pectinases é transformada em moléculas de glicose. Com isso, pode-se dizer que alguns fungos filamentosos presentes na fermentação do cacau contribuem positivamente para que esse processo ocorra.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos conclui-se que:

Dos 25 fungos filamentosos isolados da fermentação de cacau realizada no Município de Tucumã, Pará estão presentes 21 espécies, sendo que 18 delas nunca haviam sido relatadas em fermentações de cacau, fato esse que caracteriza que a fermentação desse município apresenta uma ampla diversidade fúngica.

A maioria dos fungos filamentosos isolados e avaliados apresentam possuem capacidade de secretar enzimas amilolíticas, pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas que atuam na hidrólise da polpa do cacau proporcionando a aeração da massa e a síntese de açúcares redutores, contribuindo para a formação dos precursores do aroma e sabor do chocolate.

A presença dos fungos filamentosos *Talaromyces minioluteus*, *Fomitopsis subtropica* v. Cui, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium pimiteouiense*, *Neonothopanus nambi*, *Phanerochaete australis*, *Aspergillus parasiticus* e *Cladosporium cladosporioides* pode ser um possível indicador de qualidade para a fermentação de cacau, visto que esses fungos apresentaram potencial na secreção de amilases, pectinases, celulasas e/ou xilanases.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, M.; YADAV, D. R.; KIM, S.; UM, Y. H.; KIM, H. S.; LEE, H. B.; LEE, Y. S. Discovery of Two New *Talaromyces* Species from Crop Field Soil in Korea. **Mycobiology**, v. 43, n. 4, 2015.
- ALVAREZ-NAVARRETE, M.; LÓPEZ, G. R.; GARCÍA, A. F.; LÓPEZ, G. R.; MARTÍNEZ-PACHECO, M. M. Selection and molecular identification of fungal isolates that produce xylanolytic enzymes. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 8100–8116, 2015.
- AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Proteolytic activity (aspartic endoproteinase and carboxypeptidase) of cocoa bean during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 123-128, 1998.
- APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. Washington, 2001.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504–510, 2007.
- BALAJEE, S. A.; BORMAN, A. M.; BRANDT, M. E.; CANO, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DANNAOUI, E.; O'DONNELL, K. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here?. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 877-884, 2009.
- BEZERRA, J. D. P.; SANTOS, M. G. S.; SVEDESE, V. M.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 1- 7, 2012.
- BHAT, M. K. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355–383, 2000.
- BOURAS, N.; KIM, Y. M.; STRELKOV, S. E. Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2-3, p. 251-5, 2009.
- BUSH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **Journal Chromatography**, Amsterdam, v. 722, p. 263-278, 1999.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.
- CHEN, B. Y.; JANES, H. W. **PCR Cloning Protocols**. Second edition. New Brunswick, NJ: Humana Press, 2002.
- CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAR, M. M.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; LAKE, K.; BUI, U.; LIMAYE, A. P.; COOKSON, B. T. Polymorphic internal transcribed spacer

region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4042–4051, 2001.

COCOLIN, L., ERCOLINI, D. Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. **Springer**, New York. 2008.

COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 71-94, 2008.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3–23, 2005.

COPETTI, M. V. **Micobiota do cacau: fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate**. 2009. 173f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, SP. 2009.

COPETTI, M. V., IAMANAKA, B. T., PEREIRA, J. L., FUNGARO, M. H., & TANIWAKI, M. H. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 2, p. 141-144, 2011a

COPETTI, M. V., IAMANAKA, B. T., PEREIRA, J. L., FRISVAD, J. C., TANIWAKI, M. H. Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1499–1504, 2011b.

CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. **Fungal Biodiversity**. Vol. 1, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands. (2009).

DAMASO, M. C. T.; TERZI, S. C.; FARIAS, A. X.; OLIVEIRA, A. C. P.; FRAGA, M. E.; COURI, S. Selection of Cellulolytic Fungi Isolated from Diverse Substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 513-520, 2012.

DEB, P.; TALUKDAR, S. A.; MOHSINA, K.; SARKER, P. K.; SAYEM, S. M. A. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. **Springerplus**. v. 2, p. 154-166, 2013.

DESAI, S.; NITYANAND, C. Microbial laccases and their applications: a review. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 98–124, 2011.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under Solid State Fermentation, **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6065–6072, 2011.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 297-314, 2004.

FAIA, Ana Margarida Fonseca Flores. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água**. 2011. Tese de Doutorado.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

FERRÃO, J. E. M. **Cacau: Tecnologia pós-colheita**. Ligalu edições: Lisboa. 303p. 2002.

FONSECA, M.; SHIMIZU, E.; VILLALBA, L.; ZAPATA, P. Laccase-producing ability and the inducing effect of copper on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina), **Enzyme Microbial Technology**, enzyme microbial technology v. 46, p. 534-539, 2010.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, p.109- 118, 2008.

GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. **Food microbiology**, v. 28, n. 3, p. 406-417, 2011.

GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. **FEMS Microbiological Letters**. p. 1-12. 2009.

GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, v. 178 p. 473–485, 2008.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**. V. 38, p. 1599-1616, 2003.

HALL L, WOHLFIEL S, ROBERTS GD. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for the identification of commonly encountered clinically important yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 41, p. 5099–5102, 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HONG, J. Y.; KIM, Y. H.; JUNG, M. H.; JO, C. W.; CHOI, J. E. Characterization of Xylanase of *Cladosporium cladosporioides* H1 Isolated from Janggyeong Panjeon in Haeinsa Temple. **Mycobiology**, v. 39, p. 306–309, 2011.

JA'AFARU, M. I. Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulase production. **International Scholarly Research Notices Microbiology**, v. 2013, 2013.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931–2944, 2005.

JUSTÉ, A., THOMMAD, B. P. H. J., LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbial**, v. 25, p. 745-761, 2008.

KANAMARU, K. Roles of the His-Asp phosphorelay signal transduction system in controlling cell growth and development in *Aspergillus nidulans*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, p. 1-6, 2011.

KHOKHAR, I. B.; MUKHTAR, I.; MUSHTAQ, S. Isolation and screening of amylolytic filamentous fungi. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 15, n. 1, p. 203-206, 2011.

KNOB, A.; TERRASAN, C.; CARMONA, E. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 389–407, 2010.

KOBLITZ, M.G. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242 p. 2008.

KÖLJALG, U.; NILSSON, R. H.; ABARENKOV, K.; TEDERSOO, L.; TAYLOR, A. F.; BAHRAM, M.; DOUGLAS, B. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. **Molecular ecology**, v. 22, n. 21, p. 5271-5277, 2013.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J. **Diagnóstico Microbiológico**. Medsi, Rio de Janeiro, 2001.

KUMAR, P. G.; SUNEETHA, V. A cocktail enzyme – pectinase from fruit industrial dump sites: A review. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science**, v. 5, n. 2, p. 1252-1259, 2014.

LARA-MARQUEZ, A.; ZAVALA-PARAMO, M. G.; LOPEZ-ROMERO, E.; CAMACHO H. C. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 859–868, 2011.

LARONE, D. H. **Medically important fungi - A guide to identification**. 4ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 2002.

LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying Wood-decad fungi that can degrade toxic chemical. **Biotechnolgy techniques**, Kew, v. 5, n. 4, p. 275-280, 1991.

LOPEZ, A. S. **Chemical changes occurring during the processing of cacao**. In: **Symposium Cacao Biotechnology**. Proceedings. University Park: The Pennsylvania State University, Pennsylvania, p. 19-54, 1986.

LOPEZ, A. S.; DIMICK, P. S. Cocoa Fermentation. In Reed, G. and Nagoda with ana, T. W, eds. *Enzymes, biomass, foodandfeed*, 2nd ed. **Biotechnology**, p. 561-577. 1995.

LUCHETA, A. R.; CANNAVAN, F. S.; ROESCH, L. F. W.; TSAI, S. M.; KURAMAE, E. E. Fungal Community Assembly in the Amazonian Dark Earth. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 4, p. 962–973, 2016.

MACEDO, A. S. L.; NEGREIROS, C. V. B.; BISPO, E. S.; SILVA, A. S.; DRUZIAN, J. I.; Estudo prospectivo da fermentação do cacau (*Theobromacacao* L.) sob o enfoque em pedidos de patentes depositados no mundo entre 1899 a 2012. **Revista Geintec**. v. 3, n. 5, p. 362-371, 2013.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. e PARKER, J. (2004) Microbiologia de Brock. São Paulo: **Prentice Hall**. 10 ed. 608p.

MAHESHWARI R., BHARADWAJ G. & BHAT M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion Biotechnology**. v. 30, p. 372-380, 2009.

MERTENS, J. A.; SKORY, C. D. Isolation and characterization of a second glucoamylase gene without a starch binding domain from *Rhizopus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40 p. 874-880, 2007.

MORENO, M. L.; PÉREZ, D.; GARCÍA, M. T; MELLADO, E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. **Life**, v. 3, n. 1 p. 38-51, 2013.

MOUNJOUENPOU, P.; GUEULE, D.; GUYOT, B.; TONDJE, P. R.; FONTANA-TACHON, A.; GUIRAUD, J. P. Moulds producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 234-241, 2008.

MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylooligosaccharides as food additives and nutraceuticals, **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1913-1923, 2006.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 155, p. 335-350, 1987.

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

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V.; XI, L., GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOGE, G. S. *Fonsecaea nubica* sp. a new species of agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 48, n. 6, p. 800-806, 2010.

NIELSEN, D. S. **The microbiology of Ghanaian cocoa fermentation**. Tese de doutorado. The Royal Veterinary and Agricultural University, Dinamarca. 2006.

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

NIELSEN, D.S.; HONHOLT, S.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations investigated using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). **Yeast**, v. 22, n. 271, 2005.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR. A. F. Hidrolíticas Extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v. 26. n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). 1991. 111 p. **Dissertação** (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OLIVEIRA, J. S.; SOUZA, S. E. de; OLIVEIRA, L. L. de. et al. Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões produtoras de café na Bahia. **Bahia Agrícola**, v. 6, n. 3, 2004.

OLIVEIRA, T. O.; OLIVEIRA, T. O.; PIMENTA, C. J.; CARDOSO, P. G.; SOUZA, S. M. C.; FABRÍCIO, L. F. F.; LEAL, R. S. Production of pectin lyase by isolates *Cladosporium cladosporioides* using submerged fermentation and grape skin as substrate. **Higiene Alimentar**, v. 25, p. 217-218, 2011.

ØSTERGAARD, L. H.; OLSEN, H. S. Industrial applications of fungal enzymes. In: Hofrichter XM (ed) The mycota. **Springer**, p 269–290, (2010).

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PATHAK, S.; NARULA, N. Optimization of pH for the production of amylase by soil mycotic flora of Jabalpur region. Research and Reviews: **Journal of Microbiology and Biotechnology**. V. 2, n. 1, p. 17-2, 2013.

PEREIRA, G. V. M., MAGALHÃES, K. T., ALMEIDA, E. G., COELHO, I. S. C., SCHWAN, R. F. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 121–133, 2013.

PEREIRA, R. T. G. **Influence of *Cladosporium cladosporioides* on the quality of coffee**. 2002. 42p. Dissertation (Master Science in Phytopathology). Federal University of Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulase por *Aspergillus sulphureus***. 2012. 112 p. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PETZOLD, K.; SCHWIKAL, K.; HEINZE, T. Carboxymethyl xylan – Synthesis and detailed structure characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 292–298, 2006.

PITT, J. I. H. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd ed, Springer, NY, USA. (2009).

POLIZELI, M. L. T.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577–591, 2005.

PRAKASHAM, R. S.; SUBBA RAO, C. H.; SREENIVAS RAO, R.; SARMA, P. N. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. **Journal Applied Microbiology**, v. 102, p. 204-211, 2006.

PRYCE, T. M.; PALLADINO, S.; KAY, I. D.; COOMBS, G. W. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. **Medical Mycology**. V. 41, n. 5, p. 369-81, 2003.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62, p. 597-635, 1998.

REDDY, P. L.; SREERAMULU, A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v. 1, n. 3, p. 186-193, 2012.

ROBL D, DELABONA PdaS, MERGEL CM, ROJAS JD, COSTA PdosS, et al. (2013) The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotech** 13: 94.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C.S.; ARAUJO, W. L.; DOS SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of witches' broom disease. **International Journal of Biology Sciences**, v. 1, p. 24–33, 2005.

RUEGGER, M. J. S.; E TAUK-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211. 2004.

SADHU, S.; MAITI, T. K. Cellulase production by bacteria: a review, **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 235–258, 2013.

SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; BELO, I., Screening of winery and olive mill wastes for lignocellulolytic enzyme production from *Aspergillus* species by solid-state fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v.4, p. 201–209, 2014.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. **Food and Indoor Fungi**, Vol. 2., CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, Netherlands. (2010).

SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; BARFKNECHT, D. M.; DA SILVEIRA, M. M. Clarification of fruit juices by fungalpectinases. **LWT- Food Science Technology**, v. 44, p. 2217–2222, 2011.

SANTOS, D. S.; **Inoculação de leveduras start na fermentação do cacau para melhoria do flavor**. 2010. 82p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Santa Cruz, SP.

SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G. Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated *Streptomyces* sp. MDS. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 302-315, 2012.

SCHWAN, R. F. Microbiology of cocoa fermentation: a study to improve quality. In: **CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CACAU**, 12, Salvador, BA, nov. 1996. Anais... Salvador: CEPLAC, 1996.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 44, p. 1-17, 2004.

SEMENOVA, M. V.; SINITSYNA, O. A.; MOROZOVA, V. V.; FEDOROVA, E. A.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SOKOLOVA, L. M.; KOSHELEV, A. V.; BUBNOVA, T. V.; VINETSKII, YU. P.; SINITSYN, A. P. Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 598–602, 2006.

SLIVINSKI, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

SOPER, S. A.; WILLIAMS, D. C.; XU, Y.; LASSITER, S. J.; ZHANG, Y.; FORD, S. M.; BRUCH, R. C. Sanger DNA-sequencing reactions performed in a solid-phase nanoreactor directly coupled to capillary gel electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 19, p. 4036-43, 1998.

SOUZA, L. M.; SOMMER, P. S. M. As enzimas industriais na produção de alimentos: passado, presente e perspectivas futuras. **Jornal da ANBIO**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 7, 2002.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacarupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 43, p. 777–780, 1982.

TURENNE, C. Y.; SANCHE, S. E.; HOBAN, D. J.; KARLOWSKY, J. A.; KABANI, A. M. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1846-1851, 1999.

VELAZQUEZ-CEDENO, M. A.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 201-207, 2002.

VISINTIN, S.; ALESSANDRIA, V.; VALENTE, A.; DOLCI, P.; COCOLIN, L. Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in west Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 216, p. 69–78, 2016.

WATANABE, T. **Soil and Seed Fungi - Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species**. CRC Press, 2002.

WENGENACK N. L.; BINNICKER M. J. Fungal molecular diagnostics. **Clinics In Chest Medicine**. v. 30, n. 2, p. 391-408, 2009.

XU, W. J. WU, Y. M.; YI, H. Y.; BAI, L. J.; CHAI, Y. Q.; YUAN, R. Porous platinum nanotubes modified with dendrimers as nanocarriers and electrocatalysts for sensitive electrochemical aptasensors based on enzymatic signal amplification. **Chemical Communications**, v. 50, n. 12, p. 1451–1453, 2014.

ZAMBARE, V. Solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues. **International Journal of Life Sciences**, v. 4, p. 16–25, 2010.

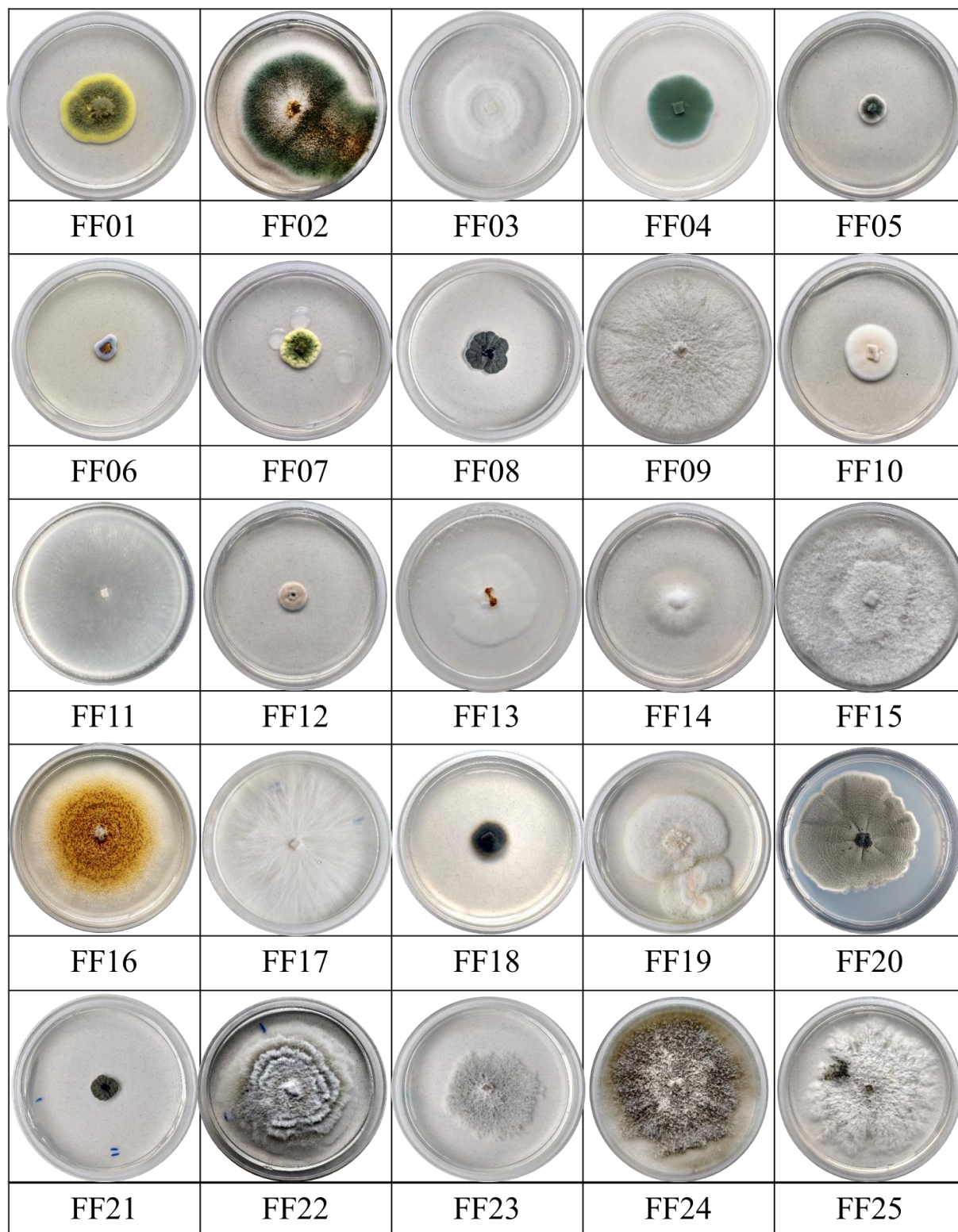
ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHAO, Q. X.; YUAN, S.; ZHANG, Y. L.; ZHU, H.; DAI, C. C., YANG, F.; HAN, F. M. Expression, purification and characterization of pectate lyase A from *Aspergillus nidulans* in *Escherichia coli*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1057–1064, 2007.

ANEXO 1 – PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR E REAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO (KIT COMERCIAL DA BIG DYE VS. 3)

- A) Precipitar o fragmento resultante da PCR como a seguir: adicionar 100 μ L de isopropanol 65% a cada amostra de 25 μ L; deixar em repouso por 15 min ao abrigo da luz; centrifugar por 45 min a 4000 rpm a 10 °C; descartar o sobrenadante invertendo a placa de PCR em papel toalha; adicionar 100 μ L de etanol 70% gelado; centrifugar por 10 min a 4000 rpm a 10 °C; descartar novamente o sobrenadante em papel toalha; dar um spin até 200 rpm com a placa invertida em papel toalha com aceleração e desaceleração mínimas; secar a placa por 1 h em local arejado e ao abrigo da luz; e ressuspender o DNA em 25 μ L de H₂O milli-Q;
- B) Realizar a reação de Cycle Sequencing utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 da ABI, seguindo o protocolo de amplificação e ciclagens de PCR determinados pelo fabricante;
- C) Precipitar a reação de sequenciamento como descrito a seguir: adicionar 2 μ L de solução de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e EDTA 125 mM (pH 8,0) (1:1, v/v) em cada amostra; adicionar de etanol absoluto 25 μ L, vortexar bem a placa e centrifugar a 4000 rpm por 40 min a 4 °C; seguir com um spin com a placa invertida até a centrífuga atingir 500 rpm, para retirada do sobrenadante; adicionar 35 μ L de etanol 70% gelado e centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4 °C (Recomenda-se retirar a formamida do freezer para descongelar); proceder com dois spins como descritos anteriormente e secar a placa a aprox. 60 °C por 30 s; adicionar 10 μ L de formamida Hi-Di em cada poço, vortexar e centrifugar rapidamente;
- D) Colocar a placa de sequenciamento no sequenciador ABI 3730 Genetic Analyzer para a obtenção dos eletroferogramas resultantes das leituras de sequenciamento.

**APÊNDICE A - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS DOS
25 FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA FERMENTAÇÃO DO
CACAU NO MUNICÍPIO DE TUCUMÃ, PA**



APÊNDICE B, C, D e E - HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO PELOS FUNGOS FILAMENTOSOS COM MAIOR ÍNDICE ENZIMÁTICO APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO

