



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

SILVANA DE FÁTIMA OLIVEIRA DE ALMEIDA
**Leveduras da fermentação do cacau amazônico: caracterização molecular e perfil de
enzimas extracelulares**

BELÉM - PA

2018



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

SILVANA DE FÁTIMA OLIVEIRA DE ALMEIDA
**Leveduras da fermentação do cacau amazônico: caracterização molecular e perfil de
enzimas extracelulares**

Orientador: Prof. Dr^a. Alessandra Santos Lopes

BELÉM - PA

2018

SILVANA DE FÁTIMA OLIVEIRA DE ALMEIDA

**Leveduras da fermentação do cacau amazônico: caracterização molecular e perfil de
enzimas extracelulares**

Tese VIII, apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Avaliada em: ____/____/____

Conceito: _____

Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues (PPGCTA/ITEC/UFPA)

Prof. Dr^a. Luiza Helena Meller da Silva (PPGCTA/ITEC/UFPA)

Prof. Dr. Camilo Barroso Texeira (FEA/ITEC/UFPA)

Prof. Dr. Guilherme Côrrea Oliveira (ITV)

BELÉM - PA

2018

Tudo é do pai, toda honra e toda glória, é dele a vitória alcançada em minha vida.

Frederico Cruz

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem ele não teria forças pra chegar até aqui;

A Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos Lopes, exemplo de muita dedicação e trabalho, que me proporcionou ensinamentos aos quais levarei para sempre;

Em especial ao meu parceiro de laboratório e amigo que irei levar por toda vida, você foi peça fundamental em todos os momentos dessa caminhada, Gilson Celso A. Chagas Júnior;

A minha mãe, peça fundamental para que eu possa alcançar meus objetivos;

Ao meu amor, pela compreensão nos momentos mais difíceis deste trabalho;

A todos os amigos e colegas de laboratório, que me ajudaram em todos os momentos dessa caminhada: Fabielle, Letícia, Thais, Paulo, Carol, Alan, Lucas, Henrique, Felipe, me perdoem se esqueci de alguém;

Aos amigos, parceiros e irmãos Andréa Pinto, Marcelo Cardoso e Maely Brito, que sempre estiveram prontos para estender a mão quando mais precisei;

À minha família pela torcida;

Ao pesquisador Dr. Guilherme Oliveira, por toda ajuda durante a execução desse trabalho, és um profissional admirável;

A Prof^a. Dr^a. Vanessa Albres, o meu muito obrigada, por sempre me escutar e aconselhar, nos momentos difíceis desse trabalho;

Ao Professor Dr. Renan Chisté, pelo apoio na reta final deste trabalho;

Aos Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues, Prof^a Dr^a. Luiza Helena Meller da Silva e Dr^a. Elisa Ferreira Moura, pelas contribuições, críticas e sugestões científicas que certamente elevaram a qualidade do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade oferecida;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida;

Ao Instituto Vale Tecnológico, pelo apoio Financeiro;

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO GERAL

A fermentação de cacau tem sido estudada em diversos países, é considerada pela literatura científica a etapa mais importante para obtenção de chocolate com qualidade. O processo fermentativo é realizado por microrganismos naturalmente presentes nos utensílios utilizados para abrir os frutos, na caixa de fermentação e no ambiente. Os principais microrganismos que realizam a fermentação de cacau são: leveduras, bactérias lácticas e acéticas. Para obtenção de amêndoas fermentadas com qualidade, é essencial o entendimento do papel das leveduras, pois esses microrganismos iniciam a fermentação e permanecem durante todo o processo. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar as leveduras presentes durante a fermentação de cacau e investigar a capacidade das espécies isoladas em produzir enzimas hidrolíticas. As fermentações foram realizadas em fazendas, da mesma forma que os proprietários realizavam, ambas com duração de sete dias e coleta de amostra a cada 24 horas, para identificação das leveduras foi realizado o sequenciamento do fragmento da região D1/D2 do gene rRNA 26S e amplificado com *primers* universais para eucariotos NL1GC e LS2, em todos os tempos de fermentação foi medido a temperatura e pH das amostras. Um total de 44 isolados de leveduras foi obtido de Medicilândia e 29 em Tucumã. Em Medicilândia, foram identificadas as espécies *Pichia manshurica* e *Saccharomyces cerevisiae*. Em Tucumã cinco espécies *Pichia fermentans*, *P. kudriavzevii*, *P. manshurica*, *S. cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*. Para o teste de potencial enzimático em Medicilândia 3 leveduras apresentaram potencial para produção da enzima amilase, 10 para celulase, 1 para lipase e 2 para proteinase, as leveduras produtoras das enzimas foi a *S. cerevisiae*. Em Tucumã a *S. cerevisiae* não produziu nenhuma enzima, a espécie *Pichia*, obteve resultado positivo para as enzimas amilase, celulase e fosfolipase. Desta forma, este estudo propõe a importância das leveduras durante a fermentação de cacau, visto que foi observada a dominância dos gêneros *Pichia* e *Saccharomyces*, nas duas localidades desta pesquisa, e a produção de enzimas hidrolíticas a partir dessas espécies, que sugere que essas leveduras podem ser utilizadas em processos biotecnológicos na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Enzima, identificação, *Pichia*, *Saccharomyces*.

ABSTRACT

The fermentation of cocoa has been studied in several countries, it is considered by the scientific literature the most important step to obtain quality chocolate. The fermentation process is carried out by microorganisms naturally present in the utensils used to open the fruits, in the fermentation box and in the environment. The main microorganisms that carry out the fermentation of cacao are: yeasts, lactic and acetic bacteria. In order to obtain quality fermented almonds, it is essential to understand the role of yeasts, since these microorganisms initiate fermentation and remain throughout the process. The objective of this study was to isolate and identify the yeasts present during the cocoa fermentation and to investigate the ability of the isolated species to produce hydrolytic enzymes. The fermentations were carried out in farms, in the same way that the owners performed, both with duration of seven days and sample collection every 24 hours, for the identification of the yeasts the sequencing of the D1 / D2 region fragment of the 26S rRNA gene was carried out and amplified with universal primers for NL1GC and LS2 eukaryotes, at all fermentation times the temperature and pH of the samples were measured. A total of 44 yeast isolates were obtained from Medicilândia and 29 from Tucumã. In Medicilândia, the species *Pichia manshurica* and *Saccharomyces cerevisiae* were identified. In Tucumã five species *Pichia fermentans*, *P. kudriavzevii*, *P. manshurica*, *S. cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. For the potency test in Medicilândia, 3 yeasts showed potential for the production of amylase, 10 for cellulase, 1 for lipase and 2 for proteinase, the yeasts that produced the enzymes were *S. cerevisiae*. In Tucumã *S. cerevisiae* did not produce any enzyme, the *Pichia* species obtained a positive result for the enzymes amylase, cellulase and phospholipase. Thus, this study proposes the importance of yeasts during cocoa fermentation, since the dominance of the *Pichia* and *Saccharomyces* genera was observed in the two localities of this research, and the production of hydrolytic enzymes from these species, which suggests that these yeasts can be used in biotechnological processes in the food industry.

Key words: Enzyme, identification, *Pichia*, *Saccharomyces*.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Frutos de cacau Criollo e Forasteiro respectivamente.....	11
Figura 2. Fermentação das sementes de cacau.....	12

Capítulo II

Figura 1. Dimensões e compartimentos da caixa de fermentação proposta por Grimaldi.....	35
--	----

Capítulo III

Figure 1. Average pH (A) and temperature (B) for the fermentation of cocoa, Medicilândia and Tucumã.....	67
Figure 2. Phylogenetic analysis of yeast species identified in two localities (Medicilândia e Tucumã) in Pará state, in the Brazilian Amazon.....	69

Capítulo IV

Figura 1. Crescimento de leveduras submetidas a estresse térmico em Medicilândia (A) e Tucumã (B).....	90
Figura 2. Potencial enzimático das cepas isoladas em Medicilândia (A) e Tucumã (B) - PA.....	91

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Produção Mundial de amêndoas de cacau.....	10
Tabela 2. Diversidade de leveduras na fermentação de cacau realizadas em diferentes países.....	15

Capítulo II

Tabela 1. Características na composição de compostos fenólicos em quatro cultivar do (<i>Theobroma cacao</i> L.).	33
Tabela 2. Diversidade de leveduras na fermentação do cacau realizadas em diferentes países.....	38

Capítulo III

Table 1. Distribution of isolated dominant species of yeast during fermentation of cocoa in Medicilândia and Tucumã, state of Pará, in the Brazilian Amazon.....	68
---	----

Capítulo IV

Tabela 1. Caracterização físico-química* dos cotilédones das amêndoas de cacau fermentadas em duas localidades Amazônicas.....	86
Tabela 2. Distribuição dos isolados de leveduras durante as fermentações nas localidades de Medicilândia (M) e Tucumã (T).....	87

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
RESUMO GERAL	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	6
Capítulo I - Revisão da literatura.....	8
1. Cacau.....	9
1.1 Cultivar.....	10
1.2 Fermentação das sementes de cacau.....	11
1.3 Atividade microbiana durante a fermentação de cacau.....	13
1.4 Características e diversidade de leveduras presentes na fermentação de cacau.....	15
1.5 Identificação de leveduras.....	16
1.6 Enzimas na fermentação de cacau.....	18
Referências.....	20
Capítulo II –O uso de leveduras como cultura starter na fermentação de cacau: uma abordagem geral.....	29
ABSTRACT.....	29
SUMÁRIO.....	30
1. Introdução.....	30
2. Obtenção das amêndoas de cacau.....	32
2.1 Cultivar.....	32
2.2 Fermentação das sementes de cacau.....	34
2.3 Mudanças Bioquímicas.....	36
3. Leveduras.....	38
3.1 Diversidade de leveduras durante a fermentação do cacau.....	38
3.2 A importância das leveduras durante a fermentação.....	40
4. Culturas starter.....	41
4.1 Efeitos da adição de cultura starter durante a fermentação de cacau.....	41
4.2 Comparação da qualidade das sementes fermentadas com e sem cultura starter.....	44

5. Conclusões.....	46
Referências.....	47
Capítulo III - Diversity of yeasts during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon.....	60
ABSTRACT.....	61
RESUMO.....	61
INTRODUCTION.....	62
MATERIALS AND METHODS.....	63
Fermentation.....	63
Determination of temperature and pH during fermentation.....	64
Isolation, purification and maintenance of isolates.....	64
DNA extraction and PCR reaction.....	65
Sequencing of samples.....	66
RESULTS.....	66
Fermentation parameters pH and temperature.....	66
Identification of yeast diversity.....	67
DISCUSSION.....	70
CONCLUSIONS.....	72
REFERENCES.....	73
Capítulo IV - Ocorrência de enzimas hidrolíticas extracelulares de leveduras isoladas da fermentação de cacau na Amazônia brasileira.....	79
RESUMO.....	80
INTRODUÇÃO.....	81
MATERIAL E MÉTODOS.....	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS.....	93

INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é a principal matéria-prima para a produção de chocolate. O processo de fermentação das sementes de cacau tem como objetivo a morte do embrião presente na semente, que impede que as mesmas germinem e facilita a remoção da polpa mucilaginosa presente ao redor das sementes. Além disso, certos precursores do aroma (aminoácidos livres, peptídeos, ácidos e açúcares redutores) são formados e contribuem, depois da torração, para o sabor do chocolate (AFOAKWA et al., 2008; BECKETT, 2009). A fermentação ocorre de forma espontânea, pela ação de microrganismos e envolve o crescimento sucessivo de várias espécies de leveduras, bactérias lácticas e acéticas, fungos filamentosos e, possivelmente espécies de *Bacillus* (LIMA et al, 2011; THOMPSON et al., 2013).

A polpa das sementes de cacau é rica em açúcares fermentáveis, como a glicose, frutose e sacarose, e possui baixo pH (3.0-3.5), principalmente devido à presença de ácido cítrico, estes fatores torna o meio propício para o crescimento de leveduras. (LEFEBER et al., 2010). As leveduras são os primeiros microrganismos atuantes no processo fermentativo do cacau, convertem os açúcares presentes na polpa em etanol, produzem enzimas que degradam a pectina presente na polpa, e favorece as condições de crescimento de outros microrganismos. Além disso, também produzem compostos voláteis, como aldeídos, cetonas, álcoois, terpenos e ésteres, que contribuem significativamente com o sabor e aroma do chocolate (OWUSU et al., 2011; CRAFACK et al., 2013).

O metabolismo das leveduras é fundamental para o desenvolvimento de aroma no chocolate. A pesquisa realizada por Ho, Zhao e Fleet (2014), aponta que a ausência de leveduras durante a fermentação do cacau afeta as características sensoriais de qualidade do chocolate, com produção de um chocolate ácido. Dentre as leveduras identificadas durante a fermentação do cacau a *Hanseniaspora guilliermondii* ou *Hanseniaspora opuntiae* geralmente são dominantes nos primeiros dias de fermentação, a *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* e algumas espécies de *Candida spp.* estão presentes durante os sete dias de fermentação (GÁLVEZ et al., 2007; DANIEL et al., 2009; HO, ZHAO, E FLEET 2014).

A microflora identificada em processos fermentativos de cacau em diferentes países (incluindo o Brasil) confirma que é possível encontrar diferenças quanto às espécies

identificadas na fermentação de cada país, sugerindo que fatores como manipulação, temperatura local, umidade, solo e fatores abióticos podem alterar a microbiota local (PAPALEXANDRATOU et al., 2011; ILLEGHEMS et al., 2012). Estudos no estado da Bahia revelam que diferenças climáticas existentes entre a Bahia e o Pará reforçam a necessidade da realização desta pesquisa no estado do Pará.

Na região amazônica, em particular no estado do Pará, não há relatos de pesquisas sobre a identificação da diversidade de leveduras durante a fermentação de cacau. Tendo em vista, o grande potencial da Região e o papel importante desses microrganismos para a qualidade do chocolate, o objetivo deste estudo foi identificar espécies de leveduras dos municípios de Medicilândia e Tucumã, de forma a promover um melhor entendimento da flora microbiana durante a fermentação do cacau amazônico. Adicionalmente, foi realizado o estudo dos parâmetros físicos químicos das amêndoas de cacau e seu potencial enzimático quanto à produção das enzimas (amilase, celulase, fosfolipase, lipase e proteinases).

Esta pesquisa foi dividida em 4 capítulos que estão apresentados abaixo:

Capítulo I: Revisão da Literatura

Capítulo II: O uso de levedura como cultura starter na fermentação de cacau: uma abordagem geral (artigo científico)

Capítulo III: Diversity of yeast during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon (artigo científico)

Capítulo IV: Ocorrência de enzimas hidrolíticas extracelulares de leveduras isoladas da fermentação de cacau na Amazônia Brasileira (artigo científico).

CAPITULO I

REVISÃO DA LITERATURA

1. CACAU

O cacau *Theobroma cacao* L. (família *Sterculiaceae*) é economicamente importante devido às suas sementes valiosas. As sementes de cacau são a principal matéria-prima para a produção de chocolate com ou sem qualidade. Fatores como cultivo, tratamento, pós-colheita e processamento são essenciais para a obtenção da matéria prima de boa qualidade (WOOD; LASS, 2001). O cultivo ocorre principalmente em regiões tropicais, como Costa do Marfim, Gana, Nigéria, Camarões, Indonésia e Brasil.

O Brasil é o quinto maior produtor de cacau no mundo (Tabela 1) e a cacauicultura brasileira está distribuída nas regiões nordeste (Bahia), Norte (Pará, Rondônia e Amazonas), Sudeste (Espírito Santo) e Centro-Oeste (Mato Grosso) (ICCO, 2016; INCRA, 2013). A Tabela 1 apresenta porcentagem dos países com maior produção de amêndoas de cacau fermentadas.

Tabela 1. Produção Mundial de amêndoas de cacau.

País	Porcentagem de produção de amêndoas de cacau
Costa do Marfim	43 %
Gana	20 %
Camarões	5 %
Nigéria	5 %
Brasil	4%

Fonte: ICCO, 2016.

Na década de 90, a crise financeira no mercado de cacau e a vassoura de bruxa diminuíram a produção de cacau no Brasil. A produção nacional, ainda vem se recuperando das perdas impostas pela disseminação da vassoura de bruxa na tradicional região cacaueira da Bahia, assim abriu-se uma oportunidade para a expansão da cacauicultura no estado do Pará, de forma a consolidar integralmente a sua cadeia produtiva (BATISTA et al., RAMOS et al., 2014).

A Amazônia brasileira apresenta um grande potencial para a produção de cacau, devido à sua vasta extensão de terras e o solo de terra roxa. Além disso, apresenta um significativo potencial no que diz respeito aos aspectos estratégicos, ecológicos e políticos.

Por isso, trabalhos de expansão da cacaicultura têm sido realizados desde o início da década de 1970 na Amazônia (MARTINS; MATOS; SOUSA, 2001).

O Pará é o maior produtor de cacau do Brasil, com produção de 115 mil toneladas em 2017. A cacaicultura paraense é explorada basicamente por pequenos produtores, destacando-se como uma das mais competitivas do mundo, principalmente quando se considera a produtividade média (850 kg/ha) e o baixo custo de produção da lavoura (US\$ 800,00/t), observados no Território da Transamazônica, zona que concentra 77% da produção estadual (INCRA, 2013; IBGE, 2017).

Os municípios de Medicilândia, Tucumã, Cametá e Tomé-Açu têm contribuído largamente com a produção do cacau Paraense, sendo Medicilândia o principal produtor do estado com 41 mil toneladas ao ano, que segundo o (INCRA, 2015) já é responsável por 25% de toda a produção nacional.

1.1 CULTIVAR

O cacau é conhecido por ter sua origem na América do Sul e Central. As cultivar possuem diferenças no rendimento das amêndoas, nas características de sabor e na resistência a pragas e doenças (AFOAKWA et al., 2008). As sementes de cacau é o principal produto comercializado, após a fermentação e secagem, para a produção de chocolate. Neste contexto, o tipo de cultivar é um fator determinante na qualidade do chocolate, em virtude das características peculiares de cada um, tais como, o conteúdo de polifenóis, acidez e etc (ELWERS, ZAMBRANO e ROHSIUS, 2009).

Existem três subespécies de (*Theobroma cacao* L.) que são mais utilizadas na produção de chocolate, a classificação foi estabelecida com base nas características morfológicas e geográficas. O Criollo, subespécie mais cultivada na América Central e do Sul; Forasteiro, cultivar do alto e baixo Amazonas no Brasil e o Trinitário, resultante da hibridização entre Forasteiro e Criollo. As variedades Trinitário e Criollo produzem um chocolate considerado de qualidade excelente de suave aroma e sabor (THOMPSON, 2001).



Figura 1. Frutos de cacau Criollo (A) e Forasteiro (B) respectivamente.

Fonte: Embrapa, 2011.

A subespécie Forasteiro é caracterizada pelas sementes achatadas, de forma quase triangular, e se encontram firmemente alojadas à polpa (Lajus, 1982), representa 95% de toda produção mundial de cacau devido a maior produtividade e resistência a pragas e doenças. Essa variedade produz um chocolate com sabor mais ácido e adstringente (BECKETT, 1997). É a cultivar mais difundida mundialmente, sendo predominante no Brasil na região da Bahia e Amazônia (CEPLAC, 1998).

Motamayor et al., 2008 relataram que existem outros cultivares distribuídos pelo planeta. Contudo, não são tão representativos quanto os três citados acima. Dois outros cultivares, tradicionais tem sido descritos: Nacional e Amelonado. Essa nova classificação que reflete melhor a diversidade genética, ao invés da tradicional, propõe a classificação do germoplasma de cacau em 10 grupos: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional e Guiana, ao invés da classificação tradicional em Criollo, Forasteiro e Trinitário.

1.2 FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU

Após os frutos serem colhidos são mantidos inteiros e amontoados por cerca de três dias antes da quebra para facilitar a retirada das sementes com a polpa fortemente aderida a placenta do fruto. O fruto é aberto com o auxílio de um cutelo (instrumento não amolado apropriado para a quebra do cacau sem danificar a semente) partindo o fruto em duas partes, expondo à polpa e as sementes, que são desprendidas da placenta manualmente, sendo destinada à fermentação (DIAS, 2001).



Figura 2. Fermentação das sementes de cacau.

Fonte: Ceplac, 2014.

A fermentação é uma etapa essencial para a obtenção de amêndoas com boa qualidade e ocorre de maneira rudimentar e empírica até os dias atuais. As sementes são amontoadas em caixas de madeira, caixas plásticas, sacos de lona, cestas ou em bandejas e são cobertas e/ou forradas com folhas de bananeira pelo período de 5 a 7 dias (ROHAN, 1964; BECKETT, 1997). O tempo requerido para fermentação das sementes é variável, de acordo com o tipo de cacau, as sementes do grupo Forasteiro são geralmente fermentadas por períodos superiores há cinco dias (BECKETT, 1994). Outro fator importante é o grau de maturação das sementes de cacau no início da fermentação, devido a diferenças na composição da polpa, afetando assim a qualidade do processo fermentativo (LEFEBER et al., 2010; AFOAKWA et al., 2013).

As sementes fermentadas do fruto são o principal produto comercializado. É a partir dos cotilédones que se obtém a matéria prima para produção do chocolate, comercialmente chamados de “*nibs*”. Antes da fermentação os cotilédones apresentam coloração branca ou violácea. Após a fermentação e secagem, devem apresentar coloração marrom (MARTINI et al., 2008).

A fermentação das sementes de cacau ocorre em duas etapas: a primeira etapa envolve reações bioquímicas realizadas por microrganismos na polpa das sementes; a segunda fase envolve várias reações enzimáticas que ocorrem dentro dos cotilédones (SCHWAN e WHEALS, 2004). A fermentação das sementes de cacau é uma importante etapa, a maioria dos compostos flavorizantes do chocolate é formada devido às reações metabólicas e

enzimáticas que ocorrem dentro dos cotilédones. Os microrganismos são fundamentais nesta etapa, visto que produzem substâncias (ácidos e álcoois) que provocam a morte do embrião e iniciam as reações químicas que produzem os precursores aromáticos do chocolate (KRATZER et al., 2009).

Em função da atividade metabólica microbiana, que promove as reações oxidativas de caráter exotérmico, o processo fermentativo do cacau é acompanhado por um aumento na temperatura da massa, que alcança valores em torno de 45 a 51 °C, em aproximadamente 48 horas de fermentação, permanecendo com esta temperatura por alguns dias (GÁLVEZ et al., 2007). A prática de revolvimentos frequentes durante a fermentação é uma forma de controlar a elevação da temperatura e também o nível de ácidos, fatores que influenciam diretamente na atividade enzimática, a qual é indispensável para o desenvolvimento dos precursores do sabor e aroma do chocolate (SCHWAN et al., 1990).

Os principais fenômenos físicos e bioquímicos que ocorrem nesta etapa são os seguintes:

- Remoção natural da polpa mucilaginosa;
- Morte do gérmen (perda da capacidade de germinação da semente);
- Hidrólise de proteínas (aminoácidos);
- Hidrólise de açúcares presentes na polpa;
- Escurecimento dos cotilédones, ocasionado por reações de oxidação dos compostos fenólicos.

1.3 ATIVIDADE MICROBIANA DURANTE A FERMENTAÇÃO DE CACAU

A microflora dominante na fermentação do cacau (leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas) pode variar de acordo com as condições ambientais (umidade, temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, localização geográfica, dentre outros (CAMU et al., 2007). O desenvolvimento dos microrganismos que participam da fermentação é propiciado pela polpa mucilaginosa que envolve as sementes de cacau, caracterizada por conter cerca de 80 a 90% de água, 10-13% de açúcares e pH variando entre 3,5-3,6 (FORSYTH; QUESNEL, 1963). A composição da polpa é um fator que interfere diretamente na seleção da microflora fermentativa, tendo em vista que a proporção de açúcares varia em função da idade do fruto (SCHWAN e WHEALS, 2004).

Os microrganismos participam de três etapas principais: (I) uma fase inicial, anaeróbica, onde as leveduras são dominantes e convertem os açúcares da polpa que envolve a semente em etanol e dióxido de carbono; (II) uma fase intermediária, microaerófila, realizada por bactérias lácticas que produzem ácido lático e a (III) fase final, aeróbica, onde as bactérias acéticas são dominantes e oxidam o etanol a ácido acético, CO₂ e água (CAMU et al., 2007).

A diversidade microbiana é oriunda do solo, ar, superfície dos frutos, folhas de bananeira, mãos e utensílios dos manipuladores (ICMSF, 1998). As leveduras constituem a população microbiana predominante nos primeiros dias de fermentação, em virtude de seu crescimento ser favorecido pela presença de ácidos orgânicos (principalmente ácido cítrico), riqueza em açúcares fermentáveis e baixo conteúdo de oxigênio da massa (JESPERSEN et al., 2005). Estas desempenham um papel importante na fermentação, promovendo condições favoráveis para o crescimento de bactérias (SCHWAN e WHEALS, 2004).

Dentre as principais atividades metabólicas que as leveduras promovem na fermentação do cacau destacam-se: (i) assimilação de cerca de 60 % do ácido cítrico na presente polpa, levando a um aumento do pH de 4.2 a 4.68, que favorece o crescimento das bactérias; (ii) conversão de açúcares simples em etanol e dióxido de carbono; (iii) produção de ácidos orgânicos (ácidos oxálico, fosfórico, succínico e málico), que migram para parte interna das sementes, causando a morte das mesmas; (iv) produção de metabólitos secundários, os quais contribuem para sabor e aroma do chocolate, e (v) secreção de pectinases que reduzem a viscosidade da polpa, permitindo a aeração da massa (SCHWAN e WHEALS, 2004; GALVEZ et al., 2007).

Durante a fermentação alcoólica, o calor produzido, faz com que ocorra a morte do embrião das sementes. Como resultado dessa atividade microbiana, reações bioquímicas são iniciadas na semente para formar o sabor necessário e precursores de cor (PAPALEXANDRATOU et al., 2011). As bactérias lácticas crescem por volta de 36 horas após o início da fermentação mediante as condições favoráveis de pH e microaerobiose proporcionadas pela fase anterior. Prevalencem por um curto período de 16 a 24 horas. Metabolizam os açúcares remanescentes evidenciando a degradação da polpa e originando, entre outros metabólicos, o ácido lático que irá propiciar condições de pH e aeração favorável para o crescimento das bactérias acéticas. A presença de álcool resultante da reação ocorrida

nas primeiras 48 horas, propicia um ambiente favorável para às bactérias acéticas existentes no meio que oxidam o etanol a ácido acético. (FERRÃO, 2008; KOSTINEK et al., 2008).

1.4 CARACTERÍSTICAS E DIVERSIDADE DE LEVEDURAS PRESENTES NA FERMENTAÇÃO DE CACAU

As leveduras são fungos eucariotos pertencentes ao Reino Fungi, sendo caracterizadas por apresentar um crescimento vegetativo predominantemente unicelular, que pode ocorrer por brotamento ou divisão binária (WALKER e WHITE, 2005). Existem aproximadamente 1.500 espécies de leveduras identificadas. Há relatos que menos de 1 % das espécies foram estudadas. Assim há um enorme potencial a ser descoberto de novas espécies, com possíveis potenciais biotecnológicos (BOUNDY-MILLS, 2012).

As leveduras são ubíquas e possuem metabolismo peculiar que permite a utilização de nutrientes variados e crescimento nas mais diversas condições ambientais. Crescem principalmente onde há presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores, são predominantemente aeróbias, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30 °C e pH de 4 a 7 (MADIGAN et al., 2004).

Para seu crescimento e obtenção de energia, as leveduras dependem de fontes de carbono orgânico. O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, alguns ácidos orgânicos, glicerina ou etanol. Entretanto os carboidratos são os nutrientes de maior importância, visto que as leveduras não são fotossintetizantes e dependem estritamente deste nutriente como fonte de energia e carbono (BAMFORTH, 2005).

A diversidade de leveduras na fermentação do cacau tem sido associada às diferentes localidades de fermentação, e às condições do processo fermentativo. Estudos revelam uma diversidade de leveduras na fermentação do cacau em diferentes países, que são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Diversidade de leveduras na fermentação de cacau realizadas em diferentes países.

Gêneros	Local	Ano
<i>Cryptococcus</i> , <i>Pichia</i> , <i>Candida</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Hanseniaspora</i> e <i>Saccharomyces</i>	Oeste da África	Jespersen et al., (2005).

<i>Hanseniaspora</i> , <i>Candida</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Kodamaea</i> , <i>Meyerozyma</i> , <i>Saccharomycodes</i>	Gana	Daniel et al., (2009).
<i>Eukaryotes</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>S.cerevisiae</i> , <i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Issatchenkia terrícola</i> .	Brasil	Moreira et al., (2013).
<i>Candida intermedia</i> , <i>Cryptococcus</i> <i>flavescens</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Hanseniaspora</i> .	Australia	Ho, Zhao, e Fleet (2014).
<i>Candida intermedia</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i> , <i>Pichia Manshurica</i> , <i>S.cerevisiae</i>	Cuba	Y. Fernandez et al., (2016).

Frente à vasta diversidade representada pela biodiversidade de leveduras na região amazônica ainda não estudadas, isolar e identificar esses microrganismos de forma rápida e confiável pode ser importante no processo fermentativo do cacau, uma vez que é possível obter estirpes de espécies com atividade metabólica desejável e produtoras de metabolitos secundários, que podem estar intimamente associados ao sabor e aroma peculiar do chocolate produzido nessa região.

1.5 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

A identificação e classificação tradicional de leveduras baseiam-se em características morfológicas e fisiológicas (YARROW, 1998). Características morfológicas tais como: a forma da célula, tipo de brotamento e esporo, e a formação de filamentos são critérios considerados para identificação de gêneros e para as características fisiológicas, a assimilação e fermentação de açúcares, também são utilizadas para classificação taxonômica tradicional das espécies de leveduras (KURTZAMAN; FELL, 1998).

Para a identificação de leveduras é necessário diferenciar gêneros e espécies que taxonomicamente estão muito próximos, mas que têm propriedades muito diferentes no que se refere às características fermentativas (CARRO; PIÑA, 2000). O uso de características morfológicas para identificação de espécies de leveduras é um critério instável, devido à morfologia ser variável entre estirpes de mesma espécie, sendo frequentemente estabelecida com base em apenas uma ou duas características (RAINIERI, ZAMBONELLI; KANEKO, 2003).

Técnicas moleculares tornaram-se mais acessíveis nos últimos anos e têm sido extensivamente aplicadas para a classificação e a caracterização genética de leveduras das mais diversas áreas de pesquisas. Os princípios dos métodos de identificação molecular baseiam-se na análise de regiões do genoma que sejam conservadas dentro de amostras da mesma espécie, mas que sejam variáveis entre espécies, sendo úteis para a identificação correta de microrganismos (ERCOLINI, 2004).

A caracterização molecular envolve o isolamento do DNA genômico, amplificação do DNA isolado, pela reação de polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento do fragmento amplificado (CROUS et al., 2009). A PCR tem como princípios básicos amplificar regiões específicas da molécula de DNA com a ação da enzima DNA polimerase. A técnica permite amplificar um número ilimitado de sequências alvo, as quais podem ser estudadas por métodos convencionais de análise do DNA. A porção do DNA a ser amplificada é flanqueada pelo par de iniciadores ou *primers* que são sequências de DNA construídas artificialmente, e que são específicas de duas regiões distintas no DNA de interesse. Eles pareiam as bases do DNA com a fita molde funcionando como um iniciador para as cópias de DNA a serem formadas. O DNA molde é então amplificado pela atuação da enzima decodificadora DNA-polimerase (BROWN, 1999).

Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação a fita dupla de DNA é desnaturada através da elevação da temperatura (92-95 °C), desta forma ocorre a separação da dupla fita de DNA em duas fitas simples. Na etapa de anelamento a temperatura é rapidamente reduzida para (50-60 °C), a temperatura utilizada depende do tamanho e sequência do *primer* utilizado, o anelamento dos *primers* ocorre em regiões específicas de cada fita de DNA separada, que serve como molde, delimitando, assim, a região inicial e a região final da sequência genética a ser amplificada. Em seguida, na etapa de extensão a temperatura é elevada para (72-75 °C), ocorre a síntese do DNA complementar

à fita-molde pela enzima DNA polimerase. A extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizados como molde a sequência alvo, de maneira que uma cópia é realizada. Este ciclo pode ser repetido por dezenas de vezes e a quantidade de DNA de interesse, dobra a cada ciclo. A PCR permite iniciar o processo com quantidades mínimas de DNA (ordem de picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com uma grande quantidade de uma sequência específica do DNA de interesse (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Assim técnicas moleculares têm sido utilizadas para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de leveduras. Essas técnicas baseiam-se principalmente na análise de variabilidade de regiões do DNA genômico, através de marcadores moleculares (GUARRO et al., 1999). Em leveduras, as regiões mais analisadas são as regiões não codificadoras com repetições sequenciais que são altamente conservadas, como a região do DNA ribossomal e os minissatélites ou VNTR (Variable Number Tandem Repeats) que são sequências com 11 a 60 pares de bases que se repetem lado a lado na fita de DNA no genoma de eucariotos. Regiões contendo essas sequências podem ser amplificadas através de técnicas baseadas em PCR (KURTZMAN, 1992; DEBRAUWERE et al., 1997).

1.6 ENZIMAS NA FERMENTAÇÃO DE CACAU

As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas, por este motivo, possuem grande aplicabilidade biotecnológica e industrial. Tendem a melhorar a qualidade de um produto ou até tornar mais fácil a obtenção do mesmo (BARATTO et al., 2011). A extensa diversidade microbiana na natureza faz com que a busca por microrganismos produtores de enzimas seja inesgotável. A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores das novas tecnologias para a síntese de compostos com alto valor agregado (ORLANDELLI et al., 2012).

As enzimas hidrolíticas são utilizadas em processos industriais, sendo aplicadas nas indústrias têxteis (amilase, celulase, pectinase, oxidoredutase), de detergentes (celulase, lipase, protease, oxidoredutase), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidoredutase), de papel (lipase, oxidoredutase, xilanase), e de couro (lipase, protease) (NIELSEN et al., 1998; KIRK et al., 2002)

As principais vantagens de se utilizar leveduras como fontes de enzimas em grande escala, quando comparadas aos fungos filamentosos, é a obtenção de elevadas concentrações de enzimas, ajuste das condições de cultivo, fácil e rápida triagem de microrganismos produtores, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação de

baixo custo, e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação (REED, 1997; SILVA, 2003).

Uma das características bioquímicas peculiares das leveduras que vem sendo frequentemente estudada na fermentação do cacau é a sua atividade enzimática. A liberação de enzimas por esses microrganismos promove a degradação de compostos presentes na polpa que envolve a semente de cacau, resultando na perda de fluidos e a aeração da massa, favorecendo, assim o crescimento das bactérias (SILVA, 2011).

O desenvolvimento dos precursores do aroma envolve a ação de vários microrganismos presentes na polpa de cacau e a ação de enzimas sobre os carboidratos, proteínas e polifenóis. Ao contrário de muitas outras matérias primas fermentadas, enzimas endógenas desempenham um papel crucial no desenvolvimento do sabor do cacau (LEHRIAN e PATTERSON, 1983).

Durante a fermentação do cacau a secreção de enzimas hidrolíticas por leveduras é muito útil como as enzimas pectinolíticas que, em contato com o substrato, podem melhorar a aeração da massa; enzimas amilolíticas, que produzem o aumento da concentração de açúcares redutores pela hidrólise do amido e as enzimas proteolíticas, que geram a melhor concentração de aminoácidos livres. Essas enzimas são importantes também para a formação do *flavor* do cacau (AMIN et al., 1998; SCHWAN, 1998).

Silva 2011, verificou que as leveduras isoladas durante a fermentação do cacau secretam enzimas hidrolíticas em um curto tempo de crescimento e fermentam em meio de cultura de baixo custo e em diferentes valores de pH, mostrando ser uma fonte promissora de enzimas extracelulares de interesse e aplicação industrial e biotecnológica, principalmente naqueles processos que envolvem o processamento de alimentos.

A busca dos consumidores e de órgãos governamentais por produtos alimentícios com menos aditivos e tratamentos químicos tem aumentado o interesse do uso de enzimas na indústria alimentícia (TUNGA et al., 2003). Portanto, a tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para a síntese de compostos de alto valor agregado (FERNANDES, 2007). Devido aos fatores mencionados anteriormente torna-se imprescindível à busca por outras fontes dessas enzimas e a realização de pesquisas visando à seleção de novas linhagens que secretem enzimas de importância biotecnológica (SILVA, 2010).

REFERÊNCIAS

AFOAKWA, E.O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v .48, p. 840 – 857, 2008.

AFOAKWA, E. O.; KONGOR, J. E.; TAKRAMA, J. F.; BUDU, A. S. Changes in acidification, sugars and mineral composition of cocoa pulp during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **International Food Research Journal**, v. 20(3), p. 1215-1222, 2013.

AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase and Carboxypeptidase) of Cocoa Bean during Fermentation. **Journal Science Food Agricultural**, v.76, p.123-128, 1998.

BAMFORTH, C. W. **Food, Fermentation and Microorganisms**. 1 Edição, New York: Editora Blackwell, 2005, 236p.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de Microrganismos Produtores de Enzimas Hidrolíticas Isolados da Região do Meio Oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba v. 11 n. 2, p. 15-28, julho/dezembro 2011.

BATISTA, N. N.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 221–227, 2015

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. Edited by ST BECKETT, 2 edition. London: Blackie academic, 1994, 408p.

BECKETT, S.T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**, St. Paul, 2.ed. Suffolk: St. Edmundsbury Press Ltda., 1997. 408p.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 edition. London: Chapman and Hall, p. 20-23, 2009.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2 edição. Editora UFV, 2009, 532p.

BOUNDY-MILLS, K. Yeast culture collections of the world: meeting the needs of industrial researchers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 39, n.5, p. 673-680. 2012.

BROWN, T. A. **Genética: um enfoque molecular**. 3 edição. Editora Guanabara Koogan, 1999, 336p.

CAMU N, DE WINTER. T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentations of cocoa beans in Ghana. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1809–1824, 2007.

CEPLAC. Comissão Executiva do Plano Lavoura Cacueira. Normas Técnicas para o Cultivo do Cacau no Recôncavo Baiano. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. CEPEC - CENTRO DE PESQUISA DO CACAU MINISTÉRIO DA AGRICULTURA -- 1998 - MANUAL TÉCNICO - PGS.01 A 42.

CARRO, D.; PIÑA, B. Identificación de cepas de levadura de interés enológico. **Revista de Enologia**, n. 3, 2000. Disponível em <http://www.acenologia.com/ciencia52_1.htm> Acesso em 13 nov. 2014.

CRAFACK, M.; MIKKELSEN, M. B.; SAERENS, S.; KNUDSEN, M.; BLENNOW, A.; LOWOR, S. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 103–116, 2013.

CROUS, P.W., WINGFIELD, M.J. AND GROENEWALD, J.Z. Niche sharing reflects a poorly understood biodiversity phenomenon. **Persoonia**, v. 22, p. 83-94, 2009

DANIEL, H. M.; VRANCKEN, G.; TAKRAMA, J. F.; CAMU, N.; VOS, P.; VUYST, L. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. **Yeast Research**, v.9, p. 774–783, 2009.

DEBRAUWERE, H.; GENDREL, C.; LECHAT, G. S.; DUTREIX, M. Differences and similarities between various tandem repeat sequences: Minisatellites and microsatellites. **Biochemistry**, v. 79, p. 577-586, 1997.

DIAS, J. C. **Beneficiamento do cacau**. In: NETO, Silva. Sistema de Produção de cacau para a Amazônia Brasileira. Belém: CEPLAC, p. 84 – 88, 2001.

ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; COPPOLA, S. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **Journal of Applied Microbiology**, n. 96, p.1090–1096, 2004.

ELWERS, S.; ZAMBRANO, A.; ROHSIUS, C. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 937–948, 2009.

FERRÃO, JOSÉ E.M. The Death Of The Seed. Its Importance In Post - Of Cocoa Seeds. **Revista De Ciências Agrárias**, p. 262-267, 2008.

FORSYTH, W.G.C.; QUESNEL, V.C. The mechanism of cacao curing. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**, n. 25; p. 457- 459, 1963.

GÁLVEZ, S. L.; LOISEAU, G.; PAREDES, J. L.; BAREL, M.; GUIRAUD, J. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p.124–130, 2007.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. Society. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

HO, V.T.T; ZHAO, J; FLEET, G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.174, p.72-87, 2014.

ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS-ICMSF. **Microbiología de los alimentos**: Características de los patógenos microbianos. Zaragoza-España: Acriléia, 1998.

INCRA. **Produção de cacau no Pará em ritmo de consolidação**. Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária – INCRA. 2016. Disponível em: <<http://www.incra.gov.br/index.php/noticias-sala-de-imprensa/incra-na-midia/13226-jornalproducao-de-cacau-no-para-em-ritmo-de-consolidacao>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

International Cocoa Organization. ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XXXVIII, No. 4, Cocoa year 2016 [Internet document] URL. [http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related documents/46statisticsproduction.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related%20documents/46statisticsproduction.html) (Acessado 12/12/2017).

JESPERSEN, L.; NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S.; JAKOBSEN, M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **Yeast Research**, v. 5, p. 441–453, 2005.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13 n. 4, p. 345-351, 2002.

KOSTINEK, M.; BAN-KOFFI, L.; OTTAH-ATIKPO, M.; TENIOLA, D et al. Diversity of Predominant Lactic Acid Bacteria Associated with Cocoa Fermentation in Nigeria. **Current Microbiology**, jun/out, p. 307-314, 2008.

KRATZER, U.; FRANK, R.; KALBACHER, H.; BIEHL, B.; WÖSTEMEYER, J.; VOIGT, J. Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. **Food Chemistry**, v.113, p. 903–913, 2009.

KURTZMAN, C. P. rRNA Sequence Comparisons for Assessing Phylogenetic Relationships among Yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 1-6, 1992.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. The yeasts, a taxonomic study. 4. edition. Amsterdam: **Elsevier Science Publications**. p. 69-75, 1998.

LAJUS, B. Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau. São Paulo, 1982. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1982.

LEFEBER, T.; JANSSENS, M.; CAMU, N.; DE VUYST, L. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. **Applied Environmental Microbiology**. V. 76, p. 7708–7716, 2010.

LEHRIAN D. W.; PATTERSON G.R. Cocoa fermentation, in Biotechnology, a Comprehensive Treatise, vol. 5, ed. by Reed G. Verlag Chemie, Basel, p. 529–575, 1983.

LIMA, L.J.R.; ALMEIDA, M.H.; NOUT, M.J.R.; ZWIETERING, M.H. *Theobroma cacao* L., “The Food of the Gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 51, p. 731–761, 2011.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Pearson Education. v.1, p.466-467. 2004.

MARTINI, M.H.; FIGUEIRA, F.; LENCI, C.G.; TAVARES, D.Q. Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n.3, p.425-431, 2008.

MARTINS, A. C. S.; MATOS, P. G. G.; SOUSA, J. M. S. **Regiões Produtoras de cacau na Amazônia**. In: Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira. SILVA NETO, P. J (coord). Belém, CEPLAC, 2001. 125p.

MOREIRA, I. M. V.; PEDROZO, M. G. C.; DUARTE, M. W. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the

fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. **Food Research International**, v. 54, p. 9–17, 2013.

MOTAMAYOR, J. C.; LACHENAUD, P.; MOTA, J. W. S. E.; LOOR, R.; KUHN, D. N.; BROWN, S.; SCHNELL, R. J. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian Chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). **Plos One journal**, v. 3, n. 10, p. 1-8, 2008.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v. 12, n.3, p. 6971, 1998.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações**. SaBios: Revista de Saúde e Biologia, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

OWUSU, M.; PETERSEN, M.A.; HEIMDAL, H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate.. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, p. 1–11, 2011.

PAPALEXANDRATOU, Z.; VRANCKEN, G.; DE BRUYNE, K.; VANDAMME, P.; DE VUYST L. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1326-1338, 2011.

RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; MIGUEL, M. G. C. P.; SCHWAN, R. F. Impact of diferente cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. **Food Research International**, v. 64, p. 908–918, 2014.

RAINIERI, S.; ZAMBONELLI, C.; KANEKO, Y. *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, Genetic Diversity and Evolution. **Journal of Bioscience and Bioencineering**, v. 96, n. 1, p. 1-9, 2003.

REED, G. Enzymes in Food Processing. **Academic Press**, Londres. 1997.

ROHAN, T.A; CONNEL, M. The precursors of chocolate aroma: A study of the flavonoids and phenolic acids. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 29, p. 460- 463, 1964.

SCHWAN, R. F.; LOPEZ, A.; SILVA, D. O.; VANETTI, M. C. D. Influência da frequência e intervalos de revolvimentos sobre a fermentação de cacau e qualidade do chocolate. **Revista Agrotrópica**, n.2, p. 22–31, 1990.

SCHWAN, R.F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied and environmental microbiology**, v.64, p.1477-1483. 1998.

SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, n. 4, p. 205–221, 2004.

SILVA, E G. Seleção de leveduras pectinolíticas isoladas de frutas tropicais. 2003. 79 p. Dissertação (Mestrado) Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Lavras, 2003.

SILVA, C. H. D. Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas. 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

SILVA, M.S. Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do. Cacau. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

SUH, S.; BLACKWELL, M.; KURTZMAN, C. P.; LACHANCE, M. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1006–1017, 2006.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. **Cocoa and Coffee**. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. 2. ed. 2001.

THOMPSON, S.S.; MILLER, K.B.; LOPEZ, A.; CAMU, N. Cocoa and coffee, In: Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (Eds.), **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 4th ed. ASM Press, Washington, DC, p. 881–889, 2013.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v.38, p.1553–1558, 2003.

YARROW, D. **Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts**. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. (eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publications. p. 77-101, 1998.

WOOD, G.A.R., LASS, R.A. *Cocoa*, fourth ed. Blackwell Science, Oxford, 2001.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. **Introduction to Fungal Physiology**. In: *Fungi: biology and applications*. KAVANAGH, K. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2005, 293p.

CAPÍTULO II

O uso de levedura como cultura starter na fermentação de cacau: uma abordagem geral

Silvana de F. Oliveira de Almeida², Gilson Celso A. Chagas Junior² & Alessandra Santos Lopes².

O uso de levedura como cultura starter na fermentação de cacau: uma abordagem geral

Silvana de F. Oliveira de Almeida², Gilson Celso A. Chagas Junior² & Alessandra Santos Lopes².

ABSTRACT

The fermentation of cocoa is carried out spontaneously by several microorganisms, especially yeasts, acetic and lactic bacteria. This process, when naturally occurring, remains from 2 to 10 days, according to the practices of each locality. The present study conducted a review of the literature on the use of yeast as starter culture that are used to accelerate the cocoa fermentation process and ensure superior quality. Several studies compare the quality of fermented cocoa seeds with and without the use of starter cultures, the researches emphasize that the use of starter cultures of yeasts reduces the days of fermentation and improve the flavor and aroma of the fermented cocoa seeds.

Key words: microbioma; *S. cerevisiae*; *Theobroma cacao* L.

O uso de leveduras como cultura starter na fermentação de cacau: Uma abordagem geral.

RESUMO

A fermentação de cacau é realizada de forma espontânea por diversos microrganismos, com destaque para leveduras, bactérias acéticas e lácticas, este processo quando ocorre de forma natural permanece de 2 a 10 dias, de acordo com as práticas de cada localidade. O presente estudo realizou uma revisão da literatura sobre o uso de leveduras como cultura starter que são utilizadas para acelerar o processo fermentativo de cacau e garantir qualidade superior. Diversos estudos comparam a qualidade das sementes de cacau fermentadas com e sem o uso de culturas starter, as pesquisas destacam que a utilização de culturas starter de leveduras diminui os dias de fermentação e melhoram o sabor e aroma das sementes de cacau fermentadas.

Palavras-chave: microbioma; *S. cerevisiae*; *Theobroma cacao* L.

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	30
2.	Obtenção das amêndoas de cacau.....	32
2.1	Cultivar.....	32
2.2	Fermentação das sementes de cacau.....	34
2.3	Mudanças Bioquímicas.....	36
3.	Leveduras.....	38
3.1	Diversidade de leveduras durante a fermentação do cacau.....	38
3.2	A importância das leveduras durante a fermentação.....	40
4.	Culturas starter.....	41
4.1	Efeitos da adição de cultura starter durante a fermentação de cacau.....	41
4.2	Comparação da qualidade das sementes fermentadas com e sem cultura starter.....	44
5.	Conclusões.....	46
	Referências.....	47

1. Introdução

O Cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma cultura de grande importância econômica no mundo, sendo a principal matéria-prima para a fabricação de chocolate (Krähmer *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2015). A cadeia de produção do chocolate é complexa, e inclui diversos atores. Começa com os produtores de cacau que realizam as etapas de: plantio, colheita, fermentação e secagem das amêndoas de cacau (De Brito *et al.*, 2001).

A fermentação das sementes de cacau é a etapa mais importante para fabricação de um chocolate de boa qualidade, pois promove alterações bioquímicas que dão origem aos

precursores de aroma e sabor nas amêndoas de cacau (Kadow *et al.*, 2013; Krähmer *et al.*, 2015). As sementes de cacau após a abertura do fruto possui gosto adstringente e desagradável, é fermentada e seca para obter os sabores característicos do cacau. Os principais microrganismos presentes na fermentação de cacau são: leveduras, bactérias acéticas e lácticas. As leveduras se multiplicam nos primeiros dias e seu declínio se dar devido o esgotamento das fontes de energia como os açúcares fermentáveis presentes na polpa. Além disso, esses microrganismos são responsáveis pela produção de etanol e fazem à degradação da polpa, liberando enzimas que irão realizar diversas reações bioquímicas, as leveduras também são produtoras de ésteres e álcoois, que têm sido relatados por contribuir para um complexo de compostos voláteis e aroma que caracteriza o sabor do chocolate (Ardhana, 2003; Schwan & Wheals, 2004; Owusu *et al.*, 2011).

A fermentação realizada por microrganismos é um passo fundamental no processo de produção de muitos alimentos e bebidas, incluindo chocolate, cerveja, vinho, pão e queijo. A qualidade desses produtos depende essencialmente do microbioma presente, que apresentará diferenças marcantes nas características do produto. Durante milhares de anos, os processos fermentativos foram realizados espontaneamente. No entanto, desde o desenvolvimento de técnicas para isolar e manter culturas microbianas puras, um número crescente de produtores vem fazendo uso de cultura starter (Barnett, 2001).

Desde o início do século XX, foram feitas tentativas para desenvolver inóculos microbianos (culturas starter) que melhore a qualidade do cacau fermentado. Na última década, culturas starter foram utilizadas para estudar a influência da inoculação de microrganismos presentes em fermentações de cacau realizadas no Brasil, Costa do Marfim, Equador e Gana (Jespersen *et al.*, 2005, Nielsen *et al.*, 2007; Camu *et al.*, 2007, 2008; Daniel *et al.*, 2009; Lefeber *et al.*, 2010, 2011; Garcia-Armisen *et al.*, 2010; Papalexandratou *et al.*,

2011a,b). Além disso, uma análise multifásica dos microrganismos e metabólitos foi realizada para determinar a influência dos mesmos durante o processo fermentativo e no chocolate produzido, comparando os processos de fermentação e produtos finais com e sem o uso de cultura starter (Camu *et al.*, 2008; Papalexandratou *et al.*, 2011a,b).

A presença de leveduras no processo de fermentação de cacau contribui para determinar a qualidade do produto final, chocolate (Pereira *et al.*, 2012; Mahazar *et al.*, 2015). No entanto, não há muitos trabalhos de revisão do papel de leveduras isoladas a partir da fermentação de cacau que são utilizadas como culturas starter para acelerar o processo fermentativo. Esta revisão discutiu sobre os principais aspectos da fermentação de cacau e do uso de culturas starter na qualidade das amêndoas fermentadas.

2. Obtenção das amêndoas de cacau

2.1 Cultivar

As diferentes subespécies de cacau utilizadas durante o processo fermentativo irá influenciar diretamente no sabor e aroma do produto final. Existe quatro subespécies que são mais utilizadas na produção de chocolate, o Criollo, mais cultivado na América Central e do Sul, Forasteiro, cultivar do alto e baixo Amazonas no Brasil (Thompson, 2001), Trinitário espécie resultante da hibridização entre Forasteiro e Criollo e o Nacional, encontrado no Equador e com características genéticas semelhantes ao Criollo (Fowler, 1999; Saltini *et al.*, 2013). Os cultivar Trinitário e Criollo produzem um chocolate considerado de qualidade excelente “fino”, sua produção mundial não chega a 5 % de acordo com ICCO (The International Cocoa Organization, 2015).

Diferentes cultivares de cacau têm diferenças na qualidade, que se refletem nas características do produto final. Estas diferenças foram estudadas e são bem conhecidas pelos

produtores de chocolate. No entanto, não há publicação que define claramente como essas diferenças foram encontradas (Saltini *et al.*, 2013).

A concentração de compostos fenólicos nas amêndoas de cacau é variável e depende principalmente da genética do fruto, e outros fatores como: regiões geográficas de cultivo, práticas agronômicas e condições climáticas (Afoakwa, 2013). Na tabela 1 são apresentados os cultivares e suas principais características.

Tabela 1. Características na composição de compostos fenólicos em quatro cultivar do (*Theobroma cacao* L.).

Cultivar	Características	Referências
Criollo	- Rico em procianidinas, epicatequinas (polifénóis); - Cafeína; - Pouca ou ausência de antocianina; - Alto teor de aspartato de ácido cafeíco.	(Counet <i>et al.</i> , 2004) (Cruz <i>et al.</i> , 2015) (Elwers <i>et al.</i> , 2009)
Forasteiro	- Presença de antocianina	(Lima <i>et al.</i> , 2011)
Nacional	Não encontrado na literatura	_____
Trinitário	- Presença de antocianina	(Elwers <i>et al.</i> , 2009)

O sabor e aroma do cacau são condicionados não apenas a atributos genéticos do cacaueiro, como também a modificações que ocorrem durante sua colheita e beneficiamento. Basicamente, após a colheita do cacau, são efetuadas as operações de abertura dos frutos, fermentação das sementes junto à polpa que as envolve, secagem e torrefação para obtenção das amêndoas de cacau, que serão utilizadas na obtenção de manteiga e pó de cacau, além de

chocolates e produtos análogos (Beckett, 1994). O genótipo do fruto de cacau influencia o tipo, quantidade de proteínas, carboidratos e polifenóis (Afoakwa *et al.*, 2008).

2.2 Fermentação das sementes de cacau

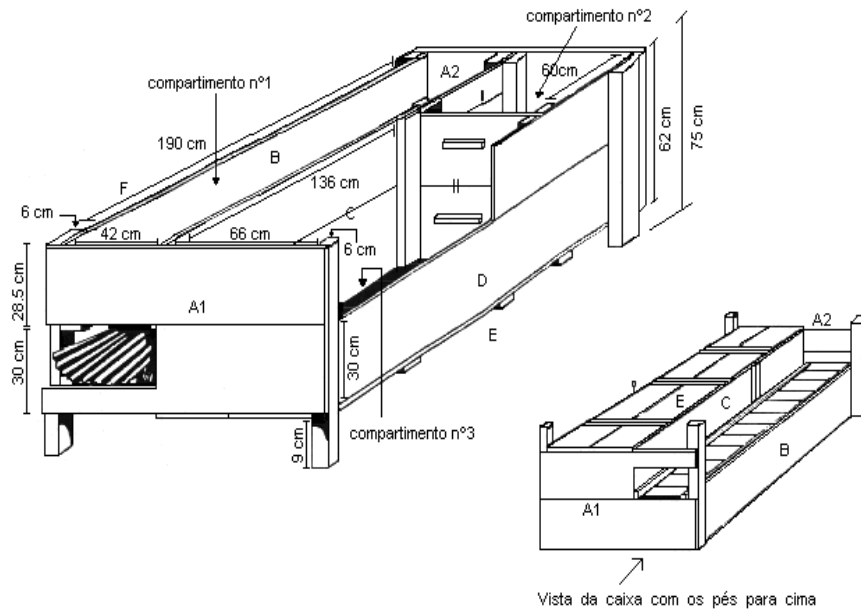
As sementes de cacau é a principal matéria-prima para produção de chocolate. A fermentação é um dos processos mais importantes para melhorar a qualidade das sementes de cacau e para o desenvolvimento dos precursores de sabor do chocolate (Fowler, 2009; Thompson *et al.*, 2013; Schwan *et al.*, 2014; Ho *et al.*, 2015; Krähmer *et al.*, 2015).

Após os frutos serem colhidos estes são mantidos inteiros e amontoados por cerca de três a cinco dias antes da quebra, para facilitar a retirada das sementes com a polpa fortemente aderida a placenta do fruto. Na quebra, o fruto é aberto com o auxílio de um cutelo (instrumento não amolado apropriado para a quebra do fruto sem danificar a semente) partindo o fruto em duas partes expondo à polpa e as sementes que são desprendidas da placenta, manualmente, e então a massa do fruto é destinada a fermentação (Dias, 2001).

A fermentação das sementes de cacau ocorre de forma natural, levando assim a produtos finais de qualidade variável. É realizada em caixas, cestas, bandejas, barris ou em plataformas, dependendo da produção de cacau e região, ocorre de 2 a 10 dias, de acordo com as práticas agrícolas locais (Lima *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2013; Schwan & Fleet, 2014). Normalmente em fermentações que utilizam caixas de madeira o cacau Criollo é fermentado em 5 dias, já o Forasteiro que apresenta sementes mais grossas e, maior quantidade de pigmentos, é fermentado por 7 dias e o Trinitário de 6 a 8 dias (Rohan, 1964; Fowler; Leheup & Cordier, 1998).

Uma técnica diferenciada para a fermentação foi proposta por Grimaldi (1978) onde este sugeriu a utilização de caixas de madeiras específicas para fermentação contínua que as denominou de T-60, a caixa apresenta três compartimentos possuindo forma e volume

adequados para cada uma das fases de fermentação (anaeróbia e aeróbia) e os revolvimentos são realizados pela transferência de um compartimento para outro conforme Figura 1.



Fonte: GRIMALDI, 1978.

Figura 1: Dimensões e compartimentos da caixa de fermentação proposta por Grimaldi.

Lopes (2000) e Mattietto (2001) utilizaram a caixa de fermentação proposta por Grimaldi e conseguiram acompanhar de forma efetiva as alterações físico-químicas ocorridas durante o processo de fermentação do cacau, obtendo amêndoas bem fermentadas classificadas como Tipo I (superior) segundo os parâmetros do Codex Alimentarius.

O acompanhamento de alguns parâmetros é utilizado como referência de uma fermentação bem sucedida, entre eles: tempo de processamento, temperatura do ambiente e da massa, revolvimento, pH e acidez da polpa, sistema de fermentação e microbiota existente.

A temperatura deve aumentar de forma rápida nas primeiras 24 horas de fermentação e esta é controlada pelos períodos de revolvimento da massa. Se o aumento for muito lento e não for alcançada uma temperatura suficientemente alta, o produto obtido será constituído de

sementes germinadas e mal fermentadas. Além disso, o controle da temperatura é imprescindível para o desenvolvimento dos microrganismos fermentadores (Camu *et al.*, 2008). A acidez do cotilédone é um parâmetro muito importante, pois, em excesso, promove um sabor desagradável que deprecia o produto para o consumo. Porém, esta é decorrente da atividade metabólica dos microrganismos que produzem entre outros, ácido lático que por não ser volátil, tende a permanecer no cotilédone após a secagem. Dias (1998) observou que a diferença de acidez esta relacionada com o cultivar, quantidade de polpa da semente e época de colheita.

Ao final da fermentação as amêndoas apresentam cerca de 50 % de umidade, estas devem ser secas para redução da umidade a cerca de 7 % a fim de estabilizar a atividade dos microrganismos e oferecer condições para que reações enzimáticas e químicas (Afoakawa, 2010).

2.3 Mudanças bioquímicas

A polpa que envolve as sementes de cacau é relatada na literatura como rica em açúcares fermentáveis (glicose, frutose e sacarose) cerca de 9 a 13 % (Lefeber *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011), alta acidez (pH 3.0-3.5) presença de diversos ácidos orgânicos, com destaque para o ácido cítrico Guehi *et al.* (2010), e um teor de proteína de 0.4 a 0.6 % (Lima *et al.*, 2011).

O papel dos diferentes grupos microbianos presentes durante a fermentação de cacau tem sido discutido na literatura científica Vuyst *et al.* (2010), Lima *et al.* (2011). O microbioma presente durante a fermentação de cacau é complexo e envolve o crescimento de várias espécies de leveduras, bactérias lácticas e acéticas e, possivelmente, espécies de *Bacillus*, outras bactérias e fungos filamentosos (Ardhana & Fleet, 2003; Schwan & Wheals, 2004; De Vuyst *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2013).

A ação de microrganismos leva a alterações físicas e químicas durante o processo fermentativo. A primeira fase (48 horas) da fermentação, as leveduras e bactérias lácticas consomem açúcares da polpa e ácidos orgânicos (cítrico), com produção de etanol e lactato (Galvez *et al.*, 2007). A produção de ácido acético a partir da oxidação do etanol pelas bactérias acéticas produz dióxido de carbono e calor, aumentando a temperatura da massa, que pode chegar a valores próximos de até 50 °C (Schwan & Wheals, 2004; Van thi thuy ho *et al.*, 2014). Após as primeiras 48 horas, as leveduras pectinolíticas degradam a polpa das sementes, drenando o líquido preso no interior da mesma, aumentando a aeração e favorecendo o crescimento de bactérias acéticas (Schwan & Wheals, 2004).

Posteriormente ocorre a etapa de “quimiofermentação” ou segunda fase. Nesta fase, as enzimas do cacau (glicosidases, proteases e polifenoloxidasas) são ativadas em decorrência da difusão do conteúdo celular, ocorre à morte da semente caracterizando o aparecimento da amêndoa de cacau. Em geral, as proteínas são hidrolisadas a aminoácidos livres, polifenóis são parcialmente transformados, açúcares são hidrolisados, formando ácidos voláteis. Nesta fase as reações de hidrólise e oxidação dos pigmentos, bem como a condensação dos flavonóides caracterizam a cor marrom das sementes (Forsyth & Quesnel, 1963).

As principais transformações químicas estão associadas a alterações referentes a sabor e coloração das amêndoas. Ressalta-se inicialmente a liberação de antocianinas (cor roxo-púrpura) pela atuação das glicosidases resultando na perda da coloração das amêndoas e liberação de açúcares (galactose e arabinose). Os flavonóides incolores oriundos destas podem condensar-se formando os taninos diminuindo a adstringência das amêndoas (Nazaruddin *et al.*, 2006; Ferrão, 2007; Camu *et al.*, 2008).

As enzimas polifenoloxidasas convertem os polifenóis (principalmente epicatequinas e antocianinas livres) em quinonas. Polifenóis e quinonas formam complexos com outro polifenóis, peptídios e aminoácidos, conferindo o acastanhamento dos cotilédones e ainda

evita o aparecimento do sabor desagradável que é produzido quando proteínas inalteradas são submetidas à ação de temperaturas elevadas durante a torração (Saknarov & Ardila, 1999; Martini, 2008).

3. Leveduras

3.1 Diversidade de leveduras durante a fermentação do cacau

Trabalhos realizados para identificação de leveduras em países como Gana, República dominicana e África, destacaram a seguinte microbiota, *Hanseniaspora guilliermondii* e *Hanseniaspora opuntiae*, os autores relatam que geralmente essas espécies dominam a parte inicial da fermentação, em seguida a *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* e algumas espécies de *Candida spp.* São frequentemente dominantes durante o restante da fermentação de cacau (Ardhana & Fleet, 2003; Jespersen *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007; Daniel *et al.*, 2009).

A diversidade de leveduras na fermentação de cacau tem sido associada a diferentes localidades de fermentação, e às condições do processo fermentativo. Estudos revelam uma diversidade de leveduras na fermentação em diferentes países, que são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Diversidade de leveduras na fermentação do cacau realizadas em diferentes países.

Gênero	Local	Ano
<i>Candida inconspícua</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> ,	Republica	(Galvez <i>et al.</i> , 2007).
<i>Pichia fermentans</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Candida zeylanoides</i>	Dominicana	

<i>Hanseniaspora</i> , <i>Candida</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Kodamaea</i> , <i>Meyerozyma</i> , <i>Saccharomycodes</i>	Gana	(Daniel <i>et al.</i> , 2009).
<i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida sorbosivorans</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Pichia</i> <i>manshurica</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i>	Equador	(Papalexandratou <i>et al.</i> , 2011).
<i>Eukaryotes</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>S.cerevisiae</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Yarrowia</i> <i>lipolytica</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Issatchenkia terrícola</i> .	Brasil	(Moreira <i>et al.</i> , 2013).
<i>Candida intermedia</i> , <i>Cryptococcus flavescens</i> <i>Pichia</i> <i>guilliermondii</i> , <i>Hanseniaspora</i> .	Australia	(Ho <i>et al.</i> , 2014).
<i>Candida insectorum</i> , <i>P. manshurica</i> , <i>C. insectorum</i> , <i>P. galeiformis</i> , <i>P. kudriavezii</i>	Costa do Marfim	(Hamdouche, Y <i>et al.</i> , 2015).
<i>P. manshurica</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>And P. kudriavzevii</i> .	Cuba	(Maura, FY <i>et al.</i> , 2016).

3.2 A importância das leveduras durante a fermentação

No início da fermentação, a presença do líquido mucilaginoso na polpa reduz a difusão de oxigênio nas sementes, criando condições anaeróbicas, assim as leveduras podem produzir CO₂ e etanol a partir dos açúcares existentes (Nielsen *et al.*, 2007; Leal *et al.*, 2008). As leveduras desempenham um papel significativo na degradação da polpa que envolve as sementes de cacau, esses microrganismos diminuem a acidez da polpa através da metabolização do ácido cítrico (Schwan & Wheals, 2004). De Vuyst *et al.* (2010) e Lima *et al.* (2011), relatam que as leveduras iniciam a fermentação alcoólica dos açúcares, gerando etanol que, junto com o ácido acético, penetram na semente e causando a morte do embrião, desencadeando reações bioquímicas endógenas que produzem os precursores do sabor de chocolate.

A produção de etanol é uma característica importante das leveduras presentes no processo fermentativo de cacau, devido à condução da oxidação exotérmica aeróbia que transforma etanol em ácido acético levando ao aumento da temperatura (45 a 50 °C), que favorece a multiplicação de bactérias acéticas e lácticas (Schwan & Wheals, 2004; Camu *et al.*, 2007, 2008).

A natureza espontânea das fermentações de cacau é apontada como fonte de variação do microbioma entre as diferentes localidades estudadas, o que influencia diretamente na qualidade final do produto. Mais de uma centena de espécies de microrganismos já foram isolados das fermentações de cacau e de equipamentos envolvidos durante o processo (Nielsen *et al.*, 2010; Papalexandratou *et al.*, 2011a, 2013; Meersman *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2014).

Delves-Broughton *et al.* (2005), utilizou a natamicina para inibir o crescimento de leveduras nas fermentações de cacau, proporcionando assim um mecanismo para investigar o

papel e a contribuição das leveduras para fermentação e seu impacto na qualidade do chocolate. O papel das leveduras durante a fermentação de cacau foi comprovado no estudo de Ho *et al.* (2014), os autores utilizarão a natamicina para inibir o crescimento de levedura, demonstrando que o cacau fermentado na ausência de leveduras produziu um chocolate com ausência de aromas característicos.

4. Culturas starter

4.1 Efeitos da adição de cultura starter durante a fermentação de cacau

Culturas starter podem ser definidas como inóculos microbianos vivos ou em estado latente que se desenvolvem pela fermentação de um determinado substrato presente no meio (Hammes & Hertel, 1998). Geralmente, são empregadas com o propósito de alterar de forma benéfica o processo fermentativo.

O uso de cultura starter com grupos de microrganismo é bastante utilizado na indústria alimentícia. Produtos como queijos, iogurtes, bebidas como vinhos, cafés e bebidas lácteas com fins probióticos são produzidos com o uso de microrganismos selecionados (Holzapfel; Tamang; Watanabe, 2016). Em sua maioria, a escolha dos microrganismos se dá visando o objetivo de conferir características conhecidas ao produto final. Por exemplo, *Lactobacillus casei* é utilizado na produção de bebidas probióticas, haja vista a sua participação benéfica para a flora intestinal humana.

Muitas espécies de leveduras foram identificadas a partir da fermentação de cacau, mas a atividade dessas cepas selvagens em fermentação natural é inadequada e limita a quantidade de etanol produzida por unidade de tempo, provavelmente devido ao inóculo de partida limitado. A inoculação de microrganismos durante o processo fermentativo de cacau tem sido utilizada para melhorar a qualidade e o tempo de fermentação das amêndoas (Ramos *et al.*, 2014; Arana-Sanchez *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2017)

Estudos vêm tentando padronizar um inóculo ideal para uso na fermentação das sementes de cacau. Leveduras das espécies *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* e algumas do gênero *Pichia* vêm sendo utilizadas em testes com inóculos nos locais de fermentação (Batista *et al.*, 2015, 2016).

Menezes *et al.* (2016) adicionou a levedura *S. cerevisiae* na fermentação de cacau com o objetivo de verificar sua influência sobre a qualidade do chocolate produzido com essas amêndoas fermentadas. Neste estudo, foi verificada a alta capacidade de produção de alguns compostos: alcoóis, ésteres, pirazinas, entre outros compostos precursores de aroma e sabores característicos do chocolate. Em estudo realizado no estado da Bahia, Brasil, a aceitação de amostras de chocolate produzidas pelos dois ensaios (com e sem inóculo microbiano) não diferiu significativamente, no entanto, algumas diferenças nos atributos relacionados ao sabor do chocolate foram observadas. Craack *et al.* (2013) estudaram a influência da *P. kluyveri* no sabor do cacau e observaram que a cultura starter contendo esta levedura influenciava positivamente no sabor do chocolate.

Na fermentação com adição de cultura starter foi produzido um chocolate com forte sabor de café e amargor superior ao chocolate produzido por fermentação espontânea. Contudo, os autores indicam que estudos sobre compostos voláteis produzidos na fermentação e a diversidade microbiana são importantes para entender melhor o papel das leveduras durante a fermentação de cacau e no chocolate produzido a partir das amêndoas fermentadas (Batista *et al.*, 2015).

Moreira *et al.* (2017), mostraram que a levedura *S. cerevisiae* foi a cepa predominante durante as fermentações com e sem adição do inóculo microbiano. Este fato indicou que esta levedura pode ser uma cultura starter promissora usada no processo de fermentação de cacau. Alguns trabalhos relataram o uso da *S. cerevisiae*, como cultura starter e concluíram que a

inoculação da levedura acelerou o processo de fermentação, com redução nos dias de fermentação (Ramos *et al.*, 2014; Menezes *et al.*, 2016).

A *S. cerevisiae* é uma levedura com alta capacidade de degradar a pectina presente na polpa de cacau, facilitando assim, a liberação dos açúcares, aumentando a disponibilidade de substrato para as demais espécies presentes. Além disso, esta espécie é fortemente produtora de etanol, o que acarreta além de inibição de bactérias putrefativas, a formação de compostos que conferem aroma com características florais e frutadas ao chocolate (Crafack *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2016). De acordo com Moreira *et al.* (2017) a inoculação de leveduras acelerou de 24 a 48 horas o consumo de carboidratos, provavelmente devido à maior população de microrganismos no ensaio inoculado do que no controle.

Em paralelo, outras espécies estão sendo estudadas na produção de inóculos. Leveduras do gênero *Pichia*, como *Pichia kluyveri* e *Pichia manshurica*, e da espécie *Kluyveromyces marxianus* são benéficas para a fermentação, uma vez são boas produtoras de etanol, aldeídos, pirazinas, ésteres, e outros compostos precursores de aroma e sabor (Vinícius *et al.*, 2012; Freitas; Puerari; Teixeira, 2012; De Melo *et al.*, 2015; Menezes *et al.*, 2016; Sandhya *et al.*, 2016).

Outros benefícios que podem ser citados, é que estas espécies melhoram a drenagem da polpa, aumentando a aeração, o que pode estar relacionado com a rápida sucessão microbiana por parte das bactérias do ácido láctico e acético. Desta forma, pode-se ter a aceleração do processo de fermentação otimizando o processo, como verificado no estudo de Sandhya *et al.* (2016), onde o tempo de fermentação foi reduzido em três dias.

Porém, um dos problemas que podem surgir com o uso de culturas starter, está no fato de que a flora microbiana inoculada irá competir ou até mesmo superar o microbioma presente espontaneamente nas sementes de cacau (Schwan & Wheals, 2004). O uso de cultura starter ainda não foi utilizado para produção comercial de amêndoas de cacau em grande

escala, não apenas por falta de conhecimento do processo de fermentação, mas também devido os altos custos de produção da cultura starter em laboratório, bem como a manutenção, e a falta de procedimentos padrões na inoculação dos microrganismos em processos de fermentação em pequena escala (De Vuyst *et al.*, 2010).

4.2 Comparação da qualidade das sementes fermentadas com e sem cultura starter

Desde a introdução de culturas starter na fermentação comercial para indústria de alimentos, a *S. cerevisiae* tem sido o microrganismo mais utilizado. Isso pode ser atribuído a várias características fisiológicas, que a torna adequada para fermentações industriais (Steensels & Verstrepen, 2014). A *S. cerevisiae* é capaz de superar a maioria das leveduras em fermentação industrial de vinho, Pretorius, (2000), cacau, Jeserpen *et al.* (2005), cidra, Pando *et al.* (2010) e cerveja (Bokulich *et al.*, 2012).

Essa vantagem pode ser atribuída a várias características, incluindo alta tolerância ao estresse (etanol e temperatura), rápido metabolismo e a capacidade de crescer sob condições aeróbicas e anaeróbicas. Curiosamente, estas características são apresentadas em diversas espécies de leveduras, mas somente combinadas na *S. cerevisiae* (Steensels & Verstrepen, 2014). Por último, a *S. cerevisiae* não produz toxinas prejudiciais para os seres humanos, garantindo seu uso seguro em fermentações de alimentos de acordo com a EFSA (European Food Safety Authority, 2013).

A intensidade da proliferação microbiana e a presença de um ou outro grupo de microrganismos na fermentação e secagem são essenciais para a obtenção de um produto de boa qualidade (Schwan & Wheals, 2004). A combinação de culturas dependentes (fermentação espontânea) e independentes (cultura starter) foi utilizada para estudar a comunidade microbiana durante a fermentação de cacau em vários países, Brasil, Costa do

Marfim, Equador e Gana (Jespersen *et al.*, 2005, Nielsen *et al.*, 2007; Daniel *et al.*, 2009; Garcia-Armisen *et al.*, 2010; Lefeber *et al.*, 2010, 2011; Papalexandratou *et al.*, 2011). Nos estudos mencionados acima foi realizada uma abordagem multifásica, que incluiu: análises microbiológicas, dos metabólitos, qualidade do chocolate produzido através da avaliação sensorial, no intuito de comparar os processos de fermentação e os produtos finais em todo o mundo (Camu *et al.*, 2008; Papalexandratou *et al.*, 2011a, b).

A inoculação da *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* e *Kluyveromyces marxianus* demonstraram a influência positiva destas espécies no que se refere ao sabor das amêndoas fermentadas em relação à fermentação espontânea (Lefeber *et al.*, 2011; Crafacck *et al.*, 2013). Comparando as fermentações com cultura dependentes e independentes, o autor relata que a inoculação de leveduras confere melhor sabor e aroma nas amêndoas fermentadas (Ho *et al.*, 2014).

Cempanka *et al.* (2014), compararam alguns parâmetros entre a fermentação espontânea e com adição de cultura starter, o estudo demonstrou diferenças entre as fermentações no que se refere aos substratos e metabólitos. A adição do inóculo microbiano de leveduras melhorou significativamente o processo de remoção da polpa mucilaginosa que recobre as sementes de cacau, ao mesmo tempo diminui o pH final de 6.12 (fermentação espontânea) para 5.19 (com adição de cultura starter). Os resultados obtidos sugerem que a duração do processo de fermentação pode ser reduzido pela adição de culturas starter de leveduras. O estudo conclui que o tema deve ser aprofundado em pesquisas mais detalhadas, e que a adição da *S. cerevisiae*, subespécie *Chevalieri* melhorou o processo de fermentação das sementes de cacau.

Os resultados obtidos por Crafacck *et al.* (2014), em estudo realizado com o cacau do cultivar Forasteiro em Gana, indica que a escolha da técnica de fermentação e o uso de culturas starters tem impacto no aroma e sabor sensorial do chocolate. Os autores relatam que o uso de culturas starters altera o aroma e o sabor do chocolate, porém, as diferenças

observadas foram pequenas para mudar significativamente a percepção dos provadores do chocolate em relação à fermentação espontânea. O estudo sugere o uso de uma maior densidade de inóculo microbiano irá acelerar a drenagem da polpa, assim acentuando o impacto dos microrganismos inoculados.

A Inoculação de um mix de cultura starter, composto de *P. kluyveri* *Lactobacillus fermentum* L18, *Acetobacter O pasteurianus* A149 pareceu ter influência positiva no sabor do chocolate comparado ao chocolate elaborado a partir da fermentação espontânea, obtendo pontuações mais altas na avaliação dos jurados para os quesitos: doçura, aroma e sabor geral. Estes resultados sugerem que as leveduras tem um impacto maior sobre a qualidade sensorial do cacau do que anteriormente relatado na literatura científica do cacau. No entanto, ensaios adicionais incluindo diferentes densidades de cultura starter são sugeridos pelos autores (Crafack *et al.*, 2013).

5. Considerações finais

- Estudos que investigam a influência do uso de culturas starter de leveduras durante a fermentação de cacau, têm sido realizados em todo mundo. A maioria das pesquisas aponta a ação benéfica da adição de inóculos microbianos no início da fermentação de cacau. A literatura científica do cacau relata que a adição de leveduras no início do processo fermentativo melhora as seguintes etapas: metaboliza mais rápido os carboidratos presentes na polpa que recobre as sementes de cacau, assim acelera o processo fermentativo e diminui os dias de fermentação, confere melhor aroma e sabor as amêndoas e ao produto final (chocolate). Porém os resultados diferenciam se de acordo com o mix utilizado com diferentes espécies.
- A *S. cerevisiae* foi destaque na maioria dos artigos abordados neste estudo, que relatam seu papel importante na rápida produção de etanol a partir dos açúcares fermentáveis da polpa, desta forma 95 % das pesquisas utilizadas neste trabalho

utilizarão a *S. cerevisiae*, como uma das espécies de leveduras presentes no inóculo microbiano.

- A maioria dos artigos utilizados nesta pesquisa sugere que devem ser realizadas pesquisas mais avançadas sobre o uso de culturas starters na fermentação de cacau, os autores relatam a importância de estudar os seguintes aspectos: quantidade de inóculo microbiano utilizado, espécies de leveduras e a modificação do microbioma naturalmente presente na fermentação espontânea.

Referências

Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M & Ryan A (2008) Flavour formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 840-857.

Afoakwa EO (2010) *Chocolate Science and Technology*. Ames: Wiley-Blackwell.

Afoakwa EO, Kongor JE, Takrama J & Budu AS (2013). Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 20: 1843-1853.

Arana-Sanchez A, Segura-Garcia LE, Kirchmayr M, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E & Gschaedler-Mathis A (2015) Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 31: 359-369.

Ardhana M & Fleet G (2003) The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal Food Microbiology*, 86: 87-99.

Batista NN, Ramos LC , Ribeiro DD, Pinheiro MCA & Schwan FR (2015) Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 63: 221-227.

Batista NN, Ramos LC , Ribeiro DD, Pinheiro MCA & Schwan FR (2016) The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 1101-1110.

Beckett ST (1994) *Industrial chocolate manufacture and use*, 2^a ed. London, Blackie Academic. 408p.

Bokulich NA, Bamforth CW & Mills DA (2012) Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS One*, 7: 35507.

Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, Vancanneyt M & De Vuyst L (2007) Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentations of cocoa beans in Ghana. *Applied Environmental Microbiology*, 73: 1809-1824.

Camu N, De Winter T, Solomon KA, Takrama SJ, Bernaert H & De Vuyst L (2008) Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 2288-2297.

Cempaka L, Aliwarga L, Purwo S & Kresnowat PMTA (2014) Dynamics of cocoa bean pulp degradation during bean fermentation. Effects of yeasts starter culture addition. *Journal Mathematical Sciences*, 46: 14-25.

Counet C, Ouwerx C, Rosoux D & Collin S (2004) Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 6243-6249.

Crafack M, Mikkelsen MB, Saerens S, Knudsen M, Blennow A, Lowor S, Takrama J, Swiegers JH, Petersen GB, Heimdal H & Nielsen DS (2013) Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 103-116.

Crafack M, Keul H, Eskildsen CE, Petersen MA, Saerens S, Blennow A, Larsen-Skovmand M & Swiegers JH (2014) Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63: 306-316.

Cruz MFJ, Leite BP, Soares ES & Bispo SE (2015) Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao*, L) cultivars during fermentation. *Food Science and Technology*, 35: 279-284.

Daniel HM, Vrancken G, Takrama JF, Camu N, Vos P & Vuyst L (2009) Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *Yeast Research*, 9: 774-783.

De Brito ES, García NHP, Gallão MI, Cortelazzo AL, Fevereiro PS & Braga MR (2001) Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 281-288.

Delves-Broughton J, Thomas LV, Doan CH & Davidson PM (2005) *Antimicrobials in foods*, 3ª ed. USA, Taylor & Francis. 721p.

De Melo Pereira GV, Neto E, Soccol VT, Medeiros ABP, Woiciechowski AL & Soccol CR (2015) Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International*, 75: 348-356.

De Vuyst L, Lefeber T, Papalexandratou Z & Camu N (2010) The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In: Mozzi, F, Raya RR & Vignolo GM (Eds.) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Wiley-Blackwell, Ames, IA, p. 301-326.

Dias JC, (1998) Influência do tamanho do fermentador e da época do ano no tempo de fermentação e acidez do cacau. Belém, CEPLAC-SUPOR. 18p. (Boletim técnico, 016).

DIAS JC, (2001) Beneficiamento do cacau. In: NETO, Silva. *Sistema de Produção de cacau para a Amazônia Brasileira*. Belém, CEPLAC. p. 84-88.

Elwers S, Zambrano A & Rohsius C (2009) Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*, 229: 937-948.

European Food Safety Authority (2013) Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed. Parma, Itália, 11: 3449.

Ferrão JM A, (2007) morte da semente: sua importância na tecnologia pós-colheita do cacau. *Revista de Ciências Agrárias*, 31: 265 -270.

Forsyth WGC & Quesnel VC (1963) Mechanisms of cocoa curing. *Advances in Enzymology*, 25: 457-492.

Fowler MS, Leheup P & Cordier JL (1998) Cocoa, coffee and tea. In: Wood BJB, *Microbiology of Fermented Foods*. Boston, Springer. p. 128-147.

Fowler MS (2009) Cocoa beans: from the tree to factory. In S. T. Beckett (Ed.), *Industrial chocolate manufacture and use*, Chichester: Blackwell Publishing Ltd. p. 10-47.

Gálvez SL, Loiseau G, Paredes, JL, Barel M & Guiraud J (2007) Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 124-130.

Garcia-Armisen T, Papalexandratou Z, Hendryckx H, Camu N, Vrancken G, De Vuyst L & Cornelis P (2010) Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. *Applied Microbiology Biotechnology* 87: 2281-2292.

Grimaldi J (1978) Les possibilités D'amélioration des techniques D'ecabossage et de fermentation dans le processus artisanal de lapréparation du cacao. *Café, Cacao Thé*, 22: 303-316.

Guehi TS, Zahouli IB, Ban-Koffi L, Fae MA & Nemlin JG (2010) Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 1564-1571.

Hamdouche Y, Guehi T, Durand N, Kedjebo, KBD, Montet D & Meile JC (2015) Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: towards the identification of molecular markers. *Food Control* 48: 117-122.

Hammes WP & HERTEL C (1998) New developments in meat starter cultures. *Meat Science*, 49: 125-138.

Ho VTT, Zhao J & Fleet G (2014) Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174: 72-87.

Ho VTT, Zhao J & Fleet G (2015) The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205: 54-67.

ICCO – The International Cocoa Organization (2015). Fine or flavour cocoa. Retrieved from <http://www.icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>. Assessed on 13–11-15.

Jespersen L, Nielsen DS, Honholt S & Jakobsen M (2005) Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5: 441-453.

Kadow D, Bohlmann J, Phillips W & Lieberei R (2013) Identification of main fine or flavor components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao L.*). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86: 90-98.

Krähmer A, Engel A, Kadow D, Ali N, Umaharan P, Kroh LW & Schulz H (2015) Fast and neat-Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 181: 152-159.

Leal GA, Gomes LH, Efraim P, de Almeida Tavares FC & Figueira A (2008) Fermentation of cacao (*Theobroma cacao L.*) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*, 8: 788-798.

Lefeber T, Janssens M, Camu N & De Vuyst L (2010) Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media to compose a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied Environmental Microbiology*, 76: 7708-7716.

Lefeber T, Gobert W, Vrancken G, Camu N & De Vuyst L (2011) Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentations in vessels. *Food Microbiology*, 28: 457-464.

Lima LJR, Almeida MH, Nout MJR & Zwietering MH (2011) *Theobroma cacao* L., “The food of the gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of the fermentation. *Critical Reviews Food Science Nutrition*, 52: 731-761.

LOPES AS (2000) Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos “Universidade Estadual de Campinas, Campinas” 112p.

Mahazar NH, Sufian NF, Meor Hussin AS, Norhayati H, Mathawan M & Rukayadi Y (2015) *Candida* sp. as a starter culture for cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans fermentation. *International Food Research*, 22: 1783-1787.

Martini MH, Figueira F, Lenci CG & Tavares DQ (2008) Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 31: 425-431.

Mattietto RA (2001) Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos “Universidade Estadual de Campinas” Campinas, 163p.

Maura YF, Balzarini T, Clapé BP, Evrard P, De Vuyst L & Daniel HM (2016) The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 233: 34-43.

Meersman E, Steensels J, Mathawan M, Wittocx PJ, Saels V, Struyf N, Bernaert H, & Vrancken G (2013) Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. PLoS One, 8: 81559.

Menezes AGT, Batista NN, Ramos LC, Silva ARA, Efraim P, Pinheiro MCA & Schwan FR (2016) Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Research International, 81: 83-90.

Moreira IMV, Miguel MGCP, Duarte WF, Dias D R & Schwan RF (2013) Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. Food Research International, 54: 9-17.

Moreira IMV, Vilela LF, Miguel MGCP, Santos C, Lima N & Schwan RF (2017) Impact of a microbial cocktail used as a starter culture on cocoa fermentation and chocolate flavor. Molecules, 22: 766.

Nazaruddin R, Seng LK, Hassan O & Said M (2006) Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. Industrial Crops and Products, 24: 87-94.

Nielsen DS, Honholt S, Tano-Debrah K & Jespersen L (2005) Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Yeast, 22: 271-284.

Nielsen DS, Teniola OD, Ban-Koffi L, Owusu M, Andersson TS & Holzapfel WH (2007) The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal Food Microbiology*, 114: 168-186.

Nielsen DS, Jakobsen M & Jespersen L (2010) *Candida halmiae* sp. nov., *Geotrichum ghanense* sp. nov. and *Candida awuiai* sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 1460-1465.

Owusu M, Petersen MA & Heimdal H (2011) Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36: 1-11.

Pando BR, Querol SA & Suárez VB (2010) Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology*, 27: 503-508.

Papalexandratou Z, Camu N, Falony G & De Vuyst L (2011a) Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology*, 28: 964-973.

Papalexandratou Z, Falony G, Romanens E, Jimenez JC, Amores F, Daniel HM & De Vuyst L (2011b) Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied Environmental Microbiology*, 77: 7698-7714.

Papalexandratou Z, Lefeber T, Bahrim B, Lee OS, Daniel HM & De Vuyst L (2013) *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and

Acetobacter pasteurianus predominate during wellperformed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35, 73-85.

Pereira GVM, Miguel MGCP, Ramos CL & Schwan RF (2012) Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 5395-5405.

Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.

Puerari C, Teixeira K, Freitas R (2012) New cocoa pulp-based ke fi r beverages : Microbiological , chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, 48: 634-640.

Ramos CL, Dias, DR, Miguel, MGCP, Schwan RF (2014) Impact of diferente cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64: 908-918

Rohan TA & Connel M (1964) The precursors of chocolate aroma: A study of the flavonoids and phenolic acids. *Journal of Food Science*, 29: 460-463.

Saknarov IYU & ARDILA GB (1999) Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying. *Food Chemistry*, 65: 51-54.

Sandhya MVS, Yallappa BS, Varadaraj MC, Puranaik J, Jaganmohan RL, Janardhan P, Pushpa P & S Murthy S (2016) Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 65: 731-738.

Saltini R, Akkerman R & Frosch S (2013) Optimizing chocolate production through traceability: a review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, 29:167-87.

Schwan RF, Pereira GVM, & Fleet GH (2014) Microbial activities during cocoa fermentation. In: Schwan F & Fleet GH (Eds.) *Cocoa and coffee fermentations*. London: CRC Press Taylor and Francis. p.125-135.

Steensels J & Verstrepen KJ (2014) Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68: 61-80.

Schwan RF & Wheals AE (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44: 205-221.

Tamang JP, Watanabe K & HOLZAPFEL WH (2016) Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7: 377.

Thompson SS, Miller KB & Lopez AS (2001) *Cocoa and Coffee*. In: Doyle MP, Beuchat LR & Montville TJ (Eds) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Library of Congress

Cataloging-in-Publication in Data. Washington, DC: American Society for Microbiology. p. 872.

Thompson SS, Miller KB, Lopez A & Camu N (2013) Cocoa and coffee, In: Doyle MP & Buchanan RL (Eds.) Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Washington, DC: American Society for Microbiology. p.881-889.

Ho VTT, Zhao J & Fleet G (2014) Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. International Journal of Food Microbiology, 174: 72-87.

Pereira MVG, Miguel PCGM, Ramos LC & Schwan FR (2012) Cocoa Fermentations and Screening of Yeast and Bacterial Strains To Develop a Defined Starter Culture. Applied and Environmental Microbiology, 78: 5395-5405.

CAPÍTULO III

Diversity of yeasts during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon

Silvana de F. Oliveira de ALMEIDA*, Letícia R Carvalho SILVA, Gilson Celso A. Chagas JUNIOR, Guilherme OLIVEIRA, Silvia Helena Marques da SILVA, Santelmo VASCONCELOS & Alessandra Santos LOPES.

Artigo aceito para publicação na revista Acta Amazonica

Diversity of yeasts during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon

ABSTRACT

The purpose of this study was to identify the yeasts involved in spontaneous cocoa fermentation in the Brazilian Amazon region. The fermentation process was carried out experimentally in Medicilândia and Tucumã, State of Pará, northern Brazil, during a period of six days. A total of 44 yeasts were isolated from Medicilândia and 29 from Tucumã. Molecular identification was carried out by sequencing the fragment of the D1/D2 region of the rRNA 26S gene and expanded with universal primers for NL1GC and LS2 eukaryotes. Two species of Medicilândia, yeasts were identified as *Pichia manshurica* and *Saccharomyces cerevisiae*. Five species of Tucumã yeasts were identified as *Pichia fermentans*, *P. kudriavzevii*, *P. manshurica*, *S. cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. The results show that *P. manshurica* and *S. cerevisiae* have the potential for use as cultures, to improve the quality of cocoa seeds fermented in the Brazilian Amazon region. The accession numbers for GenBank sequences in this study are from MF043900 to MF043908 and MF043882 to MF043899.

KEYWORDS: accession, GenBank, molecular identification, *Pichia Manshurica*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Diversidade de leveduras presentes na fermentação de cacau de duas localidades na Amazônia Brasileira

RESUMO

A proposta deste estudo foi identificar as leveduras envolvidas na fermentação espontânea de cacau na Amazônia Brasileira. A fermentação foi realizada em Medicilândia e Tucumã, Pará, Brasil, durante 6 dias. Um total de 44 isolados de leveduras foi obtido de Medicilândia e 29 de Tucumã. A identificação molecular foi realizada por sequenciamento do fragmento da região D1/D2 do gene rRNA 26S e amplificado com *primers* universais para eucariotos

NL1GC e LS2. Em Medicilândia, foram identificadas duas espécies, *Pichia manshurica* e *Saccharomyces cerevisiae*. Em contraste, cinco espécies foram identificadas em Tucumã, *Pichia fermentans*, *P. kudriavzevii*, *P. manshurica*, *S. cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*. Os resultados mostram que *P. manshurica* e *S. cerevisiae* podem ser utilizadas como culturas para melhorar a qualidade das sementes de cacau fermentadas na Amazônia Brasileira. Os números de acesso das sequências de nucleotídeos no GenBank neste estudo são MF043900 a MF043908 e MF043882 a MF043899.

PALAVRAS-CHAVE: acesso Genbank, identificação molecular *Pichia manshurica*, *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUCTION

Up to the mid-1990s, Brazilian cocoa was cultivated almost exclusively in the state of Bahia (Northeast region of Brazil). However, with the onset of the witch's broom disease, which devastated cocoa plantations in Bahia in the 1980's and the early 1990's, the state of Pará (North region of Brazil) became an increasingly important source of cocoa. In 2016, Pará produced 115,127 tons of fermented cocoa seeds out of a total national production of 200,000 tons, which shows the great importance of Pará in the Brazilian cocoa market (CEPLAC, 2016). The fermentation of cocoa seeds is a natural and spontaneous process that is carried out by a succession of microorganisms (Afoakwa *et al.* 2013; Kadow *et al.* 2013; Krahmer *et al.* 2015).

The dominant microorganisms during fermentation are yeasts, and acetic and lactic acid bacteria. Yeasts play an essential role in fermentation, as these microorganisms are responsible for the production of ethanol based on fermentable sugars present in the pulp of the seeds, also facilitating the intake of oxygen through the degradation of the pulp. Low quantities of oxygen allow the growth of lactic and acetic bacteria, and the release of enzymes

that carry out a range of biochemical reactions and which are also producers of superior esters and alcohols, reported as volatile compounds that are essential for the aroma and the flavour of chocolate (Schwan and Wheals 2004; Camu *et al.* 2008; Owusu *et al.* 2011). The influence of the region of origin of the cocoa pods, the fermentation methods used in local farms, and the role of microorganisms present in fermentation on the quality of the fermented cocoa seeds have been widely investigated in Cuba, Ecuador, Indonesia and Malaysia (Papalexandratou *et al.* 2011; Papalexandratou *et al.* 2013; Fernández-Maura *et al.* 2016). There are no reports in the literature about the microflora during the cocoa fermentation in the Amazon region.

In Pará, the municipality of Medicilândia is the second largest producer of cocoa in Brazil and the largest producer of organic cocoa. Medicilândia is the largest producer of organic cocoa in Brazil, exporting their nibs to other countries, such as Germany and Austria. The locality of Tucumã has been highlighted by the growth of the production in the last years. A rudimentary fermentation process is still used in the state, without any knowledge of the active microflora. Therefore, the objective of this study was to carry out the molecular identification of the diversity of yeasts present during cocoa fermentation in two different localities in Pará, in the municipalities of Medicilândia and Tucumã.

MATERIALS AND METHODS

Fermentation

The fermentation experiments were conducted in the cities of Medicilândia (03°26',46" S, 52°53',20" W) and Tucumã (06°44',51" S 51°09',40" W), Pará State, Brazil. The distance between the cities is 963 km. The fermentation processes were made in duplicate (n=2), in June and July 2014. All the analyses were carried out at the Food Science, Technology and Engineering Laboratory (LCTEA), at the Federal University of Pará, Brazil.

The cocoa pods (hybrids from *Forastero* group) were manually opened with stainless steel knives 24 hours after the harvest, and approximately 70 kg of seeds were placed in a wooden box with a volume of 0.063 m³ and with dimensions of 1.0 m (length) × 0.30 m (width) × 0.25 m (height). The boxes were covered with banana leaves (approximately 2 kg) and burlap bags to keep the storage fermentation temperature. The fermentation process was monitored during 6 days and the cocoa seeds were turned daily in the boxes after 48 h from the beginning of the fermentation to allow oxygenation and to facilitate the acetic bacteria adaptation to the medium. Samples of approximately 300 g (consisting of 20 g portions) were removed from different points in the fermentation box after 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours, and stored in sterile polyethylene bags under freezing.

Determination of temperature and pH during fermentation

The temperature was measured during the fermentation (0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours) and it was established through the insertion of a skewer-type digital thermometer (Incoterm®, mod.: 9791.16.1.00, Porto Alegre, RS, Brazil) at different places' of the fermentation box (surface, middle and bottom). The pH (970.21, AOAC) was measured according to the Official Methods for Cocoa and its Products (Horwitz, 2006). The frozen cocoa seeds were discarded the husks and embryo and the extracted cotyledons were ground using an analytical mill (IKA®, mod. A11b).

Isolation, purification and maintenance of isolates

A sample of 25 g of cocoa beans was aseptically collected, transferred to a Stomacher bag and homogenised in 225 mL of peptone water at 1% w/v. A serial decimal dilution was performed to the 10⁻⁷. Aliquots of 1 mL were plated using the pour plate technique using Petri dishes (n = 3) containing Potato Dextrose Agar, with the addition of tartaric acid at 1% w/v, and incubated at 30 °C for 1 to 4 days. After the incubation period, the yeast colonies were

counted using the standard dish counting method, with the establishment of the number of Colony-Forming Units per gram of seeds (CFU g⁻¹) for each point of the fermentation time (Daniel *et al.* 2009). The colonies with differing morphological characteristics were purified.

The purification of isolates was carried out in agar malt extract media, with addition of 10% tartaric acid. The purified yeast colonies were moved to YEPD media (bacteriological agar 15 gL⁻¹; yeast extract 5 gL⁻¹; glucose 20 gL⁻¹ and peptone 10 gL⁻¹) with 1 mL/100 mL of chloramphenicol, and incubated for two days at 30 °C, to obtain pure isolates. After the purification step, the isolates were kept in YEPD medium at -4 °C (APHA, 2001).

DNA extraction and PCR reaction

For the extraction and purification of yeast genomic DNA, a portion of each isolated lineage was transferred to an Erlenmeyer containing 50 mL of YEPD broth and incubated in an orbital agitator (Lucadema ®, mod. Luca-223, Campinas, SP, Brazil) at 150 rpm at 30 °C during 12 hours. Aliquots of 1 mL were transferred to conic tubes, centrifuged at 4,000 rpm for 5 minutes, the supernatant was discarded and the DNA was extracted and purified using the Kit AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep kit (Axygen, Biosciences®, USA) according to the instructions of the manufacturer. The DNA was stored at -20 °C. A fragment of 250 bp of the D1/D2 region of the rRNA 26S gene was amplified with universal primers for gc- NL1 eukaryotes (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') and LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3' Invitrogen®) (Cocolin-Bisson and Mills 2000).

PCR was carried out in a mix consisting of 7.4 µL of ultrapure water, 5 µL of betaine, 2.5 µL of 10 x buffer, 1 µL of dNTPs (10 mM); 2.5 µL of each primer, 2 V of magnesium chloride - MgCl₂, 0.1 µL of Taq DNA polymerase, and 2 µL of DNA, giving a total reaction volume of 25 µL. The PCRs were conducted in an Amplitherm® Thermocycler and amplified using the following parameters: initial denaturation at 94 °C for 3 minutes, 30

cycles of 94 °C for 35 seconds, 52 °C for 60 seconds and 72 °C for 75 seconds, followed by a final extension at 72 °C for 10 minutes.

To verify the amplification, the quantity and integrity of the extracted DNA, the PCR products were subjected to electrophoresis analysis in agarose gel at 2%.

Sequencing of samples

The PCR products were purified sequentially with isopropanol 65% and ethanol 70% at 4,000 rpm 10 °C for 45 min and 10 min, respectively. Afterwards, the cycle sequencing reactions were performed with ~20 ng of amplified DNA using the Big Dye Terminator kit v. 3.1 (ThermoFisher®), as recommended by the manufacturer. The bi-directional reactions were sequenced and analyzed in DNA Analyzer ABI 3730 (ThermoFisher®, Carlsbad, CA, USA). Sequences assembly with MAFFT v. 7.2 (Kato and Standley 2013) and phylogenetic analysis based on maximum likelihood were conducted using the software Geneious R10 (Biomatters). For phylogenetic analysis, the PHYML package (using the GTR+G substitution model, with a bootstrap test to support the branches using 1,000 replicates) (Guindon and Gascuel 2003) implemented in Geneious R10 and similarity analysis by BLAST searches in GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RESULTS

Fermentation parameters pH and temperature

The pH and temperature profiles (Figure 1) of the cocoa seeds varied, as expected, during the fermentation process. The initial pH values were 5.33 and 5.25 for the cocoa seeds from Medicilândia and Tucumã, respectively. For the cocoa seeds from both cities, the pH decreased up to 48 hours, followed by an increase until the end of the fermentation. The pH values found at the end of fermentation were 5.0 for the seeds from Medicilândia and 6.48 from Tucumã. The pH values found in the cocoa seeds from both locations can be considered

as low acidic seeds and they produce a ‘milder’ chocolate with international notoriety in the manufacture of high quality products.

The average temperature profiles for the cocoa seeds from both the locations showed a significant increase after the first 48 hours of fermentation, with temperatures above 40 °C, due to the metabolism of the lactic and acetic acid bacteria that releases more energy to the fermentative mass. In the cocoa seeds from Medicilândia, the highest mean was found after 144 hours, when the temperature reached 47 °C (Figure 1B), while in Tucumã it was after 120 hours, when the temperatures reached 45.5 °C.

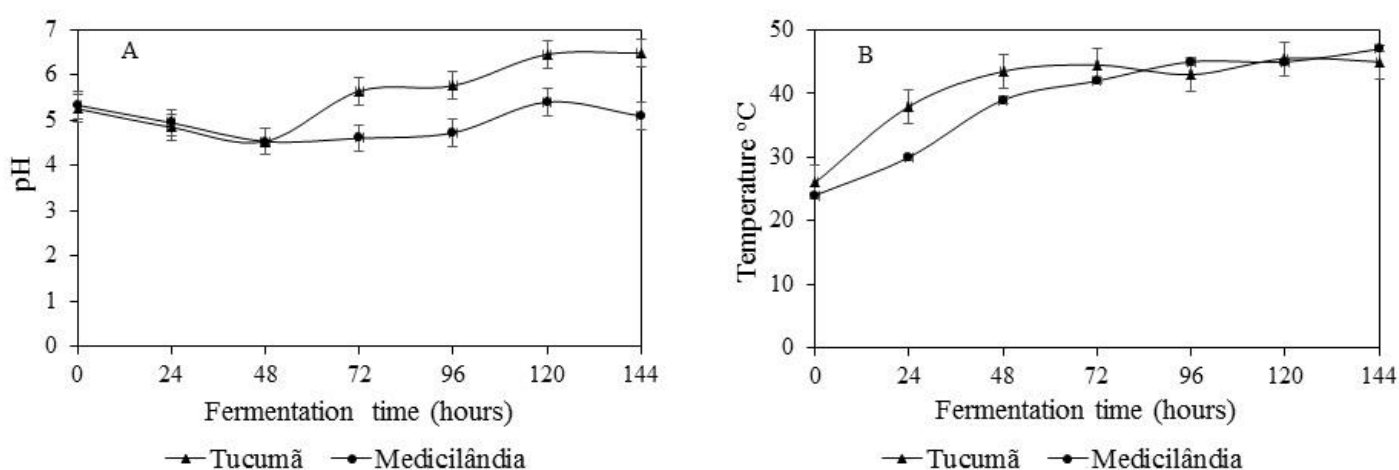


Figure 1. Average pH (A) and temperature (B) for the fermentation of cocoa, Medicilândia and Tucumã.

Identification of yeast diversity

Seventy-three yeast isolates were obtained from the two studied localities, the cities of Medicilândia (n=44) and Tucumã (n=29). The colonies showed morphological differences in color (white and yellowish-white), general appearance (smooth surface and rough) and gloss (bright and opaque). Under microscopic observation, yeast cells presented round and oval shapes. Over the six days of fermentation, it was observed that after 48 and 120 hours a small

number of isolates were obtained from the two locations, which can be attributed to changes and adaptations of microbial groups.

The values of the microbial count found in the fermentation of cocoa seeds from Medicilândia at 0 hours was 10^6 CFU.g⁻¹, reaching the same value at 144 hours of fermentation. In the case of the seeds from Tucumã, the fermentation reached maximum levels of 10^8 CFUg⁻¹ after the beginning of the fermentation process. The microbial counts remained between 10^5 and 10^7 CFUg⁻¹ until the end of the process. These results confirm the presence of yeasts during the entire fermentation process, and not just in the first few hours. The identification and distribution of the isolates as a function of fermentation time can be visualised in Table 1.

Table 1. Distribution of isolated dominant species of yeast during fermentation of cocoa in Medicilândia and Tucumã, state of Pará, in the Brazilian Amazon.

				Fermentation time (hours)						
				0	24	48	72	96	120	144
Species	GenBank	% identity	<i>E</i> value	Medicilândia						
<i>P. manshurica</i>	KU316788.1	100	6e-119	1	2	-	-	3	5	4
<i>S. cerevisiae</i>	EU441887.1	99	8e-132	4	17	-	-	1	2	2
Tucumã										
<i>P. fermentans</i>	KU820954.1	100	8e-117	1	-	-	-	1	-	-
<i>P. kudriavzevii</i>	KU316741.1	100	5e-92	-	-	-	1	-	-	-
<i>P. manshurica</i>	KU316788.1	100	5e-119	-	1	-	-	3	1	1
<i>S. cerevisiae</i>	EU441887.1	99	8e-132	1	2	-	-	1	-	-
<i>Z. bailii</i>	KJ433981.1	100	2e-123	-	2	-	-	-	-	-

The fermentation of cocoa seeds carried out at the two localities showed that the genera *Pichia* and *Saccharomyces* were predominant. In the seeds from Medicilândia, two species were identified, *S. cerevisiae* (63.4%) and *P. manshurica* (36.6%). In the first 24 hours of fermentation in Medicilândia, the specie *S. cerevisiae* was dominant with 21 isolates identified, however after 96 hours the yeast *P. manshurica* showed itself to be more adapted to the environment, as this was the dominant specie with 12 isolates.

In the seeds from Tucumã, the diversity of yeasts was greater than Medicilândia: *Pichia fermentans*, *P. kudriavzevii*, *P. manshurica*, *S. cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. The *P. manshurica* had the highest number of lineages (3) throughout the fermentation process. In this research, they were isolated two *Z. bailii* strains from the initial 24 hours of fermentation in the city of Tucumã.

Figure 2 presents the phylogenetic analysis performed in the cocoa seeds from the localities of Medicilândia and Tucumã. The accession GenBank Nos of the nucleotide sequences in this study can be found from MF043900 to MF043908 and MF043882 to MF043899.

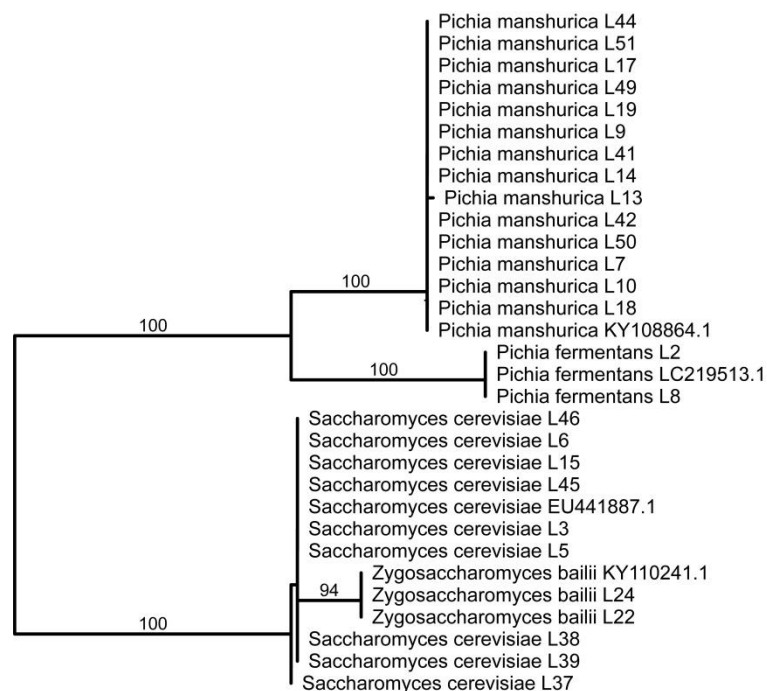


Figure 2. Phylogenetic analysis of yeast species identified in two localities (Medicilândia e Tucumã) in Pará state, in the Brazilian Amazon.

It was observed in Tucumã the contamination by filamentous fungi in the period of 96 hours of fermentation. The role played by filamentous fungi in the microbial succession during the fermentation of cocoa is not well known.

DISCUSSION

A decrease in the pH within the first 48 hours of fermentation is the result of the permeation of the organic acids from the seeds core. The sugars present in the pulp (especially glucose, sucrose and fructose) are primary metabolites of yeasts and lactic acid bacteria. Ethanol produced by yeast will serve as a substrate for lactic acid and acetic bacteria that metabolize the ethanol produced by the yeasts. The increase in the pH after 48 hours of fermentation is due to the consumption, by the yeasts, of citric acid present in the pulp (Galvéz *et al.* 2007; Lefeber *et al.* 2011; Moreira *et al.* 2013). This behaviour was observed for the cocoa seeds in both the studied locations.

The more neutral pH values found in the present study are similar to those reported in studies carried out in Côte d'Ivoire and Cuba (Samagaci *et al.* 2014; Fernández-Maura *et al.* 2016). Cocoa seeds with a final pH under 4.5 show potential to yield the characteristic flavour of chocolate, while this potential is significantly increased when the pH ranges from 5.0 to 5.5 (Amin *et al.* 2002).

Regarding temperature, the behaviour similar to that reported (Papalexandratou *et al.* 2011; Moreira *et al.* 2013). These authors found a mean maximum temperature of 46.8 °C after 144 hours of fermentation as a result of microorganism metabolic activity. The values found in this are considered satisfactory for a successful fermentation process (Camu *et al.* 2007, 2008).

The presence and the growth of yeasts during fermentation can be affected by many factors, including: initial microflora, use of starter cultures, the chemical composition of the cocoa seeds, the fermentation temperature, and also by the interactions between different species and different microorganisms (Gomes 2007).

Other work has isolated in the Dominican Republic, Ghana and Brazil other 91, 496 and 98 strains of yeasts, respectively (Gálvez *et al.* 2007; Daniel *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2012).

Arana-Sánchez *et al.* (2015) and Menezes *et al.* (2016) reported microbial count for the genus *Saccharomyces* around 10^8 and 10^9 during the fermentation of cocoa. These values similar to the ones found in the present work. In a study carried out in Australia, there were reported values of 10^6 and 10^7 CFUg⁻¹ after 72 hours of fermentation, shows that the fermentation site affects directly the microbial growth (Ho *et al.* 2014).

Yeast species belonging to the genus *Pichia* and the yeast *S. cerevisiae* have been reported as being producers of toxins that inhibit the growth of other yeast species (Peinado *et al.* 2000; Branco *et al.* 2014). *P. manshurica* is able to metabolise some acids, including lactic acid, which could explain the predominance of this species in the last days of the cocoa fermentation process. These results are in agreement with those found in the two locations studied in this work, and explain the dominance of these two genus (Franco and Pérez-Díaz 2012).

Saccharomyces cerevisiae is the most commonly reported yeast during alcoholic fermentation in several fermentation processes, due to its ability to produce and tolerate high concentrations of ethanol and sugars in an acid medium (Zinnai *et al.* 2013). In Brazil and in other countries (Ghana, Mexico, Malaysia), *S. cerevisiae* has stood out as the dominant species in the fermentation of cocoa due to its ability to adapt to changes in pH and

temperature, and its low nutritional needs (Papalexandratou *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2012; Moreira *et al.* 2013; Papalexandratou *et al.* 2013; Arana-Sánchez *et al.* 2015; Batista *et al.* 2015). However, there are few reports on the isolation of *P. manshurica* during cocoa fermentation except for one study conducted in Cuba (Fernández-Maura *et al.* 2016). The importance of the yeast genera *Pichia* and *Saccharomyces* in cocoa fermentation is highly significant because their presence at both locations.

It has been reported that this yeast may induce unwanted changes in food, especially in wine fermentation, where it brings an excessive production of carbon dioxide (CO₂) and also affects sensory characteristics (Zuehlke *et al.* 2013).

The isolation process most likely captured the species that were in higher abundance. It has been reported that cocoa fermentation initiated with a defined inoculum, such as *S. cerevisiae* isolated from the cocoa fermentation process, speeded up the fermentation process during the first 36 hours of fermentation (Ramos *et al.* 2014; Menezes *et al.* 2016). This is reflected in the length of time that *P. manshurica* and *S. cerevisiae* could ferment the cocoa seeds.

It is possible, therefore, to affirm the importance of both yeast species found in Medicilândia and Tucumã, as they remained present throughout the fermentation process, with a prevalence of *S. cerevisiae* in the first few days of the process and of the *P. manshurica* in the last few days of fermentation, in both localities. Indicating the resistance of the species to the various environmental conditions during the fermentation process.

CONCLUSIONS

This research identified a diversity of five yeasts from cocoa seeds fermented spontaneously in Brazilian Amazon and the yeast specie *Pichia manshurica* is unprecedented in Brazilian Amazon cocoa fermentation. *S. cerevisiae* and *P. manshurica* that should be further

examined for their role in the quality of the Brazilian cocoa. Characterization studies of microbial species have a great potential to develop starter cultures to improve the quality of Brazilian Amazon cocoa.

ACKNOWLEDGMENTS

The study's financier the Instituto Tecnológico Vale (ITV) (CacauP2). The Graduate Program in Food Science and Technology of the Federal University of Pará (PPGCTA/UFPA) for the infrastructure offered. GO is a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico fellow (309312/2012-4).

REFERENCES

- Afoakwa, E.O.; Kongor, J.E.; Takrama, J.; Budu, A.S. 2013. Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao* L) seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 1843-1853.
- Amin, I.; Jinap, S.; Jamilah, B.; Harikrisna, K.; Biehl, B. 2002. Analysis of vicilin (7S)-class globulin in cocoa cotyledons from various genetic origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 728-732.
- APHA. 2001. American Public Health Association. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3th ed. APHA, Washington, 624p.
- Arana-Sánchez, A.; Segura-García, L.E.; Kirchmayer, M.; Orozco-Ávila, I.; Lugo-Cervantes, E.; Gschaedler-Mathis, A. 2015. Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 359-69.

Batista, N.N.; Ramos, C.L.; Dias, D.R.; Pinheiro, A.C.M.; Schwan, R.F. 2015. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *Food Science and Technology*, 63: 221-227.

Branco, P.; Francisco, D.; Chambon, C.; Hébraud, M.; Arneborg, N.; Almeida, M.G. 2014. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 843-853.

Camu, N.; De Winter, T.; Verbrugghe, K.; Cleenwerck, I.; Vandamme, P.; Takrama, J. S.; Vancanneyt, M.; De Vuyst, L. 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa seeds in Ghana. *Applied of Environmental Microbiology*, 73: 1809-1824.

Camu, N.; Gonzalez, A.; De Winter, T.; Van Schoor, A.; De Bruyne, K.; Vandamme, P.; Takrama, J.S.; Addo, S.K.; De Vuyst, L. 2008. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied of Environmental Microbiology*, 74: 86-98.

CEPLAC. 2016. Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira. Statistics of Cocoa Seeds in the State of Pará, Brazil during the year of 2016. (<http://www.ceplacpa.gov.br/site/wp-content/uploads/2016/09/SAFRA-2016-JULHO-RELATORIO.pdf>). Accessed on 07/03/2018.

Cocolin, L.; Bisson, L. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 189: 81-87.

Crafack, M.; Mikkelsen, M.B.; Saerens, S.; Knudsen, M.; Blennow, A.; Lowor, S.; *et al* 2013. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 103-116.

Crafack, M.; Keul, H.; Eskildsen, C.E.; Petersen, M.A.; Saerens, S.; Blennow, A.; Nielsen, D.S. 2014. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63: 306-316.

Daniel, H.M.; Vrancken, G.; Takrama, J.F.; Camu, N.; De Vos, P.; De Vuyst, L. 2009. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, 9: 774-783.

Fernández Maura. Y.; Balzarini, T.; Clapé, B.P.; Evrard, P.; De Vuyst, L.; Daniel, H. M. 2016. The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 233: 34-43.

Franco, W.; Pérez-Díaz, I.M. 2012. Role of selected oxidative yeasts and bacteria in cucumber secondary fermentation associated with spoilage of the fermented fruit. *Food Microbiology*, 32: 338-344.

Gomes, F.C.O.; Silva, C.L.; Marini, M.M.; Oliveira, E.S.; Rosa, C.A. 2007. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2438-2447.

Guindon, S.; Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.

Ho, V.T.T.; Zhao, J.; Fleet, G. 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174: 72-87.

Horwitz, W. 2006. Official methods of analysis of the AOAC International. 16th ed. AOAC, Arlington,
(http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/AOAC_Member/Pubs/OMA/AOAC_Official_Methods_of_Analysis.aspx) Access: 02/03/2016.

Kadow, D.; Bohlmann, J.; Phillips, W.; Lieberei, R. 2013. Identification of main fine or flavor components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 8: 90-98.

Krähmer, A.; Engel, A.; Kadow, D.; Ali, N.; Umaharan, P.; Kroh, L.W.; Schulz, H. 2015. Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 181: 152-159.

Lagunes Gálvez, S.; Loiseau, G.; Paredes, J.L.; Barel, M.; Guiraud, J.P. 2007. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 124-130.

Leal, G.A.; Gomes, L.H.; Efraim, P.; De Almeida, T.; Flavio, C.; Figueira, A. 2008. Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*, 8: 788-798.

Lefeber, T.; Gobert, W.; Vrancken, G.; Camu, N.; De Vuyst, L. 2011. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28: 457-464.

Lefeber, T.; Papalexandratou, Z.; Gobert, W.; Camu, N.; De Vuyst, L. 2012. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30: 379-392.

Menezes, A.G.T.; Batista, N.N.; Ramos, C.L.; Silva, A.R.A.; Efraim, P.; Pinheiro, A.C.M.; Schwan, R.F. 2016. Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 81: 83-90.

Moreira, I.M.V.; Pedrozo, M.G.C.; Duarte, M.W.F.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. 2013. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 54: 9-17.

Owusu, M.; Petersen, M.A.; Heimdal, H. 2012. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *Journal of Food Processing Preservation*, 36: 446-456.

Papalexandratou, Z.; Falony, G.; Romanens, E.; Jimenez, J.C.; Amores, F.; Daniel, H. M.; De Vuyst, L. 2011. Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional Ecuadorian Spontaneous Cocoa Bean Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7698-7714.

Papalexandratou, Z.; Lefeber, T.; Bahrim, B.; Lee, O.S.; Daniel, H.M.; Vuyst, L.D. 2013. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35: 73-85.

Pereira, G.V.M.; Miguel, M.G.C.P.; Ramos, C.L.; Schwan, R.F. 2012. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 5395-5405.

CAPÍTULO IV

Ocorrência de enzimas hidrolíticas extracelulares de leveduras isoladas da fermentação de cacau na Amazônia brasileira

Silvana de F. Oliveira de Almeida, Gilson Celso A. Chagas Junior, Alessandra Santos Lopes.

Ocorrência de enzimas hidrolíticas extracelulares de leveduras isoladas da fermentação de cacau na Amazônia brasileira

RESUMO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é a principal matéria prima para fabricação do chocolate, a fermentação das sementes de cacau é a principal etapa para obtenção de um produto final com qualidade. A fermentação de cacau é realizada por microrganismo, dentre eles as leveduras, a produção de enzimas por leveduras isoladas a partir da fermentação de cacau Amazônico, ainda é desconhecida. O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e determinar a eficiência de leveduras presentes na fermentação de cacau Amazônico em produzir enzimas extracelulares (amilase, celulase, fosfolipase, lipase e proteinases). Foram isoladas 73 cepas em duas localidades estudadas, Medicilândia (44) e Tucumã (29). Dentre as 44 cepas de Medicilândia, 21 foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*. Na localidade de Medicilândia 3 leveduras apresentaram potencial para produção da enzima amilase, 10 para celulase, 1 para lipase e 2 para proteinase, sendo classificadas como *S. cerevisiae*. As leveduras que produziram proteinase e lipase foram fortemente produtoras destas enzimas. 42 cepas foram positivas para a enzima fosfolipase. Das 29 cepas isoladas em Tucumã, 3 foram caracterizadas como *S. cerevisiae*. O teste do potencial enzimático das leveduras em Tucumã mostrou que a *S. cerevisiae* não produziu nenhuma enzima e dentre as não-*Saccharomyces*, 3 obtiveram potencial para amilase, 5 para celulase e 17 para fosfolipase. Este estudo demonstrou que a produção de enzimas na fermentação de cacau na Amazônia brasileira é promissora e aponta a necessidade de aprofundar pesquisas de aplicação biotecnológica para as leveduras isoladas.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia; fosfolipase; *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

As enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na obtenção de muitos produtos como: detergentes, surfactantes, papel e celulose, produtos lácteos, em produtos cosméticos e farmacêuticos, e em processos biotecnológicos (Nabarlatz et al. 2012).

A produção de enzimas por microrganismos possui diversas vantagens sobre as de origem animal e vegetal, como: menor custo de fabricação, produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas (Oliveira et al. 2006). Desta forma, as enzimas microbianas estão ganhando mercado, substituindo a catálise química convencional em muitos processos biotecnológicos (Vermelho et al. 2013).

Durante a fermentação do vinho, a *Saccharomyces cerevisie* degrada moléculas de polissacárideos, por meio da ação de enzimas secretadas por esta levedura (pectinases, celulases, hemicelulases e amilases). A literatura tem comprovado que a ação destas enzimas também facilita a liberação de precursores aromáticos durante o processo fermentativo (Louw et al. 2006, Bautista et al. 2007). A microbiota presente na Amazônia brasileira pode possuir peculiaridades e características de interesse industrial que poderiam ser exploradas na seleção de leveduras que secretem enzimas para aplicação nos mais variados processos industriais.

Portanto, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, torna possível a aplicação de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos a partir de plantas ou animais. As localidades de Medicilândia e Tucumã se destacam quanto à produção de cacau no estado do Pará, e Medicilândia é o maior produtor do estado, sendo essas as localidades escolhidas para esta pesquisa (IBGE 2017). O

potencial das cepas de leveduras isoladas a partir da fermentação de amêndoas de cacau na região Amazônica representa uma fonte ainda pouco investigada quanto à produção de enzimas extracelulares.

Este estudo teve como objetivo isolar e identificar as leveduras presentes na fermentação de cacau e avaliar as mesmas quanto à produção das enzimas amilases, celulasas, lipases, proteinases e fosfolipases, no intuito de contribuir para a seleção de microrganismos com potencial de aplicação na obtenção de produtos ou no melhoramento dos processos de importância biotecnológica.

MATERIAL E MÉTODOS

As fermentações das sementes de cacau foram realizadas nas cidades de Medicilândia (Latitude: 03° 26' S, Longitude: 52° 53' W) e Tucumã (Latitude: 06° 44' S Longitude: 51° 09' W), em triplicata (n=3), nos meses de junho e julho de 2015, respectivamente. As análises deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia da Engenharia de Alimentos (LCTEA), da Universidade Federal do Pará.

A fermentação foi realizada em caixa de madeira composta por três compartimentos com volume de 0.063 m³. A fermentação teve início com o acondicionamento das sementes de cacau Forasteiro (70 kg) e das folhas de bananeira (6 kg) de forma intercalada. Amostras de aproximadamente 300 g (compostas por porções de 20 g foram retiradas de diferentes locais da caixa de fermentação) nos tempos 0, 24, 48, 96, 120, 144 e 168 horas, sendo armazenadas em sacos estéreis de polietileno e transportadas sob congelamento (Daniel et al. 2009). Durante todos os tempos de fermentação foi medida a temperatura das sementes de acordo com (Camu et al. 2007). As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com os Métodos Oficiais para Cacau e Derivados (Capítulo 31) da AOAC (2005); acidez total

titulável (31.1.06), umidade (31.1.02), cinzas (31.1.04), lipídios (31.4.02), proteína (31.01.08) e fibras (31.2.02).

As análises microbiológicas foram iniciadas com a coleta de 25 g de amostra assepticamente transferidas para sacos estéreis e homogeneizadas em 225 mL de água peptonada a 1 %. Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas, até a diluição 10^{-7} . Alíquotas de 1 mL, foram plaqueadas por profundidade em placas de petri (n=3) contendo meio Ágar Extrato de Malte com adição de ácido tartárico a 10 % e incubadas à 30 °C pelo período de 48 horas. Após o período de incubação, as colônias de leveduras foram contadas pelo método de contagem padrão em placas, determinando-se o número de Unidades Formadoras de Colônias por grama de amêndoa (UFC g⁻¹), em cada tempo de fermentação (Daniel et al. 2009).

Posteriormente, para purificação das cepas foi utilizado o meio YEPD composto de (ágar bacteriológico 15 g/L, extrato de levedura 5 g/L, glicose 20 g/L e peptona 10 g/L), com adição de 1 mL/L de cloranfenicol, e incubadas em estufa microbiológica a 30 °C, durante 48 horas, para obtenção de cepas puras. A manutenção das cepas foi realizada em tubos de rampa com meio YEPD e mantidas a 4 °C (Apha 2001).

Os experimentos para diferenciação das leveduras *S. cerevisie* e não-*Saccharomyces*, foram realizados em triplicata (n=3). As linhagens foram reativadas em tubo de ensaio inclinado contendo meio sólido YEPD, e incubadas em estufa a 30 °C, durante 12 horas. A diferenciação da espécie *S. cerevisie* e não-*Saccharomyces*, foi realizada de acordo com a chave de identificação proposta por (Vaughan-Martini & Martini 1993, Sanni & Lonner 1993). Em todos os ensaios foi utilizada uma levedura controle da espécie *S. cerevisie* (cepa pertencente ao banco de microrganismo do LABIOTEC)

A temperatura de 30 °C por 72 horas foi utilizada em todos os experimentos a seguir. O teste de exclusão por estresse foi iniciado com a inoculação das leveduras em meio sólido YEPD. Após o crescimento, as leveduras foram transferidas para o meio sólido YEPD, com 8 %, (v/v) de etanol. As cepas resistentes ao estresse em presença de etanol foram inoculadas em meio contendo (extrato de levedura 1 g/100 mL, peptona 1 g/100 mL e ágar 1.5 g/100 mL) com adição de 2 g/100 mL de glicose. As leveduras resistentes à concentração da fonte de carbono foram semeadas em meio sólido contendo 20 g% (p/v) de sacarose adicionado de 8 % (v/v) de etanol. As leveduras selecionadas no teste anterior foram submetidas ao teste de assimilação de fonte de nitrogênio em meio *Yeast Carbon Base* (YCB) (Sigma-Aldrich®), composto por 11.7 g/100 mL (YCB) e 4 g/100 mL de ágar, a fonte de nitrogênio utilizada foi o nitrito de sódio 2 g%.

O teste de tolerância à temperatura foi realizado em todas as leveduras (n=73) e na levedura controle. As leveduras foram semeadas em placas de Petri contendo meio sólido YEPD e incubadas em estufas a 25, 30, 35, 40 e 45 °C pelo período de 72 horas.

A determinação do potencial enzimático foi realizado pelo método qualitativo (*cup plate*), onde as leveduras são inoculadas em meios de cultura específicos para a avaliação da formação de halo. As leveduras foram reativadas em meio YEPD, por 48 horas antes do início dos ensaios enzimáticos. Em todos os ensaios foi utilizada à temperatura de 37 °C durante 10 dias. O potencial enzimático da enzima lipase foi determinado em meio lipase (peptona bacteriológica 10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, cloreto de cálcio 0.1 g, ágar base 20 g/L, tween20 10 mL/L) (Muhsin et al. 1997). Para a enzima fosfolipase foi utilizado o meio ágar fosfolipase (peptona bacteriológica 2 g, glicose, 4 g, cloreto de sódio, 11.46 g, cloreto de cálcio 0.11 g, ágar base 4.9 g, para 200 mL de água destilada). À temperatura do meio foi diminuída até 50 °C, para adição de 32 mL de solução de gema de ovo (Price et al. 1982).

A enzima amilase foi testada em meio contendo: 3 g/L de extrato de carne, 5 g/L de peptona, 15 g/L de ágar e 20 mL de solução de amido a 10 % (Seeley & VanDemark 1990). Para proteinase foi utilizado dois meios de cultura, meio I: ágar base 18 g em 900 mL de água destilada. Meio II: 11.7 g de YCB, albumina bovina fração V 2 g, Protovit 2.5 mL, água destilada estéril 100 mL. O meio I foi autoclavado e resfriado até 50 °C, o meio II foi esterilizado em filtro milipore 0.45 µm e acrescentado ao meio I. O ágar carboximetilcelulose (CMC - ágar 1.8 g/100 mL, 1 g/100 mL e 500 mL de tampão acetato de sódio 0.1 M, pH 5.0), foi utilizado para a enzima celulase (Dingle et al. 1953).

Os resultados foram obtidos pelo cálculo da razão (CZ) entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais o halo produzido (dcd), $CZ = dc/dcd$, proposta por (Price et al. 1982). Esta razão representa a capacidade enzimática, onde $CZ = 1.0$ indica que o microrganismo não é produtor da enzima, $CZ \geq 0.64$, indica que o microrganismo é produtor da enzima e $CZ < 0.64$; indica que o microrganismo é fortemente produtor da enzima. Os diâmetros das colônias foram medidos com um paquímetro (Vonder).

Foram calculadas a média e o desvio padrão dos resultados obtidos nas análises físico-químicas, com o auxílio do programa Statistica® versão 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização físico-química das amêndoas de cacau fermentadas por 7 dias estão apresentados na (Tabela 1). Os resultados são expressos em base seca. Os resultados mostram que a localidade de Tucumã apresentou no geral valores ligeiramente maiores em relação à região de Medicilândia. A faixa de umidade está dentro dos padrões para o último dia de fermentação, visto que as amêndoas de cacau ainda passarão pelo processo de secagem natural ao sol, onde a umidade final fica em torno de 6 a 8 % (Efraim et al. 2010).

Tabela 1. Caracterização físico-química* dos cotilédones das amêndoas de cacau fermentadas em duas localidades Amazônicas.

MEDICILÂNDIA				
Umidade (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Fibras (%)
36.80 ± 0.71 ^a	45.45 ± 0.79 ^b	11.14 ± 0.07 ^c	1.90 ± 0.32 ^d	1.54 ± 0.30 ^{de}
TUCUMÃ				
37.11 ± 2.80 ^a	50.28 ± 0.31 ^b	13.03 ± 0.06 ^c	2.28 ± 0.12 ^d	1.96 ± 0.35 ^{de}

*Os valores representam a média de três repetições (média±desvio-padrão).

De acordo com os dados da (Tabela 1), o teor de lipídios foi o parâmetro que mais se diferenciou entre as regiões, Tucumã apresentou maior teor em relação à Medicilândia. Papalexandrotou et al. (2013), relataram valores de 54 % para lipídios, no cacau fermentado na Malásia. Os resultados de proteínas, cinzas e fibras encontrados na localidade de Medicilândia foram semelhantes aos observados em Tucumã. Afoakwa et al. (2013) apresentaram valores entre 16-22 %, para proteínas no cacau fermentado em Gana. O teor de cinzas variou de 1.90 e 2.28 % em Medicilândia e Tucumã, respectivamente.

A acidez no município de Medicilândia obteve valores de 31.65 e 20.42 mEqNaOH/100 g de cotilédone, para o início e término da fermentação, respectivamente. Em Tucumã, a acidez inicial (0 horas) foi de 14.93 mEqNaOH/100 g de cotilédone, com valor final (168 horas) de 1.16 mEqNaOH/100 g. A acidez final da fermentação realizada em Medicilândia foi semelhante à relatada por Leal et al. (2008), que encontraram resultados de 21 mEqNaOH/100 g para o cacau fermentado e seco. Um cacau com boa qualidade para indústria deve ter acidez após a fermentação e secagem entre 12 e 15 mEqNaOH/100 g (Cohen & Jackix 2005). Vale ressaltar que as amêndoas de cacau, após a fermentação passam pela secagem natural, onde ocorre evaporação de ácidos com redução da acidez.

A (Tabela 2) apresenta o número de isolados em cada localidade estudada. Foram isoladas nas duas localidades um total de 73 cepas: Medicilândia (n=44) e Tucumã (n=29). As colônias apresentaram diferenças morfológicas na cor (branca e branco-amarelada), aspecto (superfície lisa e rugosa) e brilho (brilhante e opaca). Na observação microscópica as leveduras apresentaram formas redondas e ovais.

Tabela 2. Distribuição dos isolados de leveduras durante as fermentações nas localidades de Medicilândia (M) e Tucumã (T).

Localidade (isolados de leveduras)	Tempo de fermentação (horas)						
	0	24	48	96	120	144	168
Medicilândia	5	18	2	5	-	8	6
Tucumã	3	8	1	8	1	1	7

Observou-se que a localidade de Medicilândia foi a que obteve maior número de isolados. Ao longo dos 7 dias de fermentação, nos tempos 48 e 120 horas foi observado uma quantidade menor de isolados nas duas localidades, o que pode ser atribuído a mudança e adaptação de grupos microbianos. Em trabalhos realizados na República Dominicana, Gana, e Brasil, foram isoladas 91, 496 e 98 cepas de leveduras, respectivamente Daniel et al. (2009) e Pereira et al. (2012), o que sugere que as condições ambientais de cada local influenciam no crescimento de leveduras ao longo do processo fermentativo.

A contagem microbiana na fermentação de Medicilândia no tempo 0 horas foi de 10^6 UFC g^{-1} , alcançando o mesmo valor com 168 horas de fermentação. A fermentação realizada no município de Tucumã obteve valores máximos de 10^8 UFC g^{-1} , com 0 horas, posteriormente os valores permaneceram entre 10^5 a 10^7 UFC g^{-1} , até o final do processo fermentativo. No Brasil existem poucos trabalhos relacionados ao crescimento de leveduras

durante a fermentação de cacau. De acordo com Ho et al. (2014) em estudo realizado na Austrália relataram valores de 10^6 e 10^7 UFC g⁻¹ com 72 horas de fermentação.

Nesta pesquisa, a população de leveduras foi observada durante todo o processo fermentativo nas duas localidades estudadas. A literatura relata que algumas espécies de leveduras conseguem permanecer durante todo o processo fermentativo, devido à capacidade de metabolizarem ácido láctico e acético, que são formados a partir de 24 horas de fermentação, sendo os gêneros *Candida* e *Saccharomyces*, comumente encontrados durante todo o processo fermentativo (Ho et al. 2014, Batista et al. 2015).

No teste de exclusão por estresse foi observada a tolerância das leveduras a diferentes condições de concentração de açúcares e etanol. A maioria das espécies de leveduras isoladas em processos fermentativos que são realizados de forma espontânea são fisiologicamente adaptadas às condições adversas como: altas concentrações de álcool e açúcar. Em Medicilândia apenas uma levedura foi excluída.

O teste de assimilação de fontes de nitrogênio mostrou-se satisfatório para diferenciação de *S. cerevisiae* e não - *S. cerevisiae*. As leveduras da espécie *S. cerevisiae*, não conseguem se multiplicar neste meio de cultura, assim é possível obter uma diferenciação correta. Em Medicilândia, das 43 cepas avaliadas, 21 não conseguiram crescer, o que caracteriza a prevalência da espécie *S. cerevisiae* nesta localidade, o crescimento da *S. cerevisiae* foi observado em todos os tempos de fermentação nesta localidade. Das 29 cepas da localidade de Tucumã, 4 foram excluídas. Das 25 cepas restantes da localidade de Tucumã 3 não se multiplicaram.

A microflora encontrada no cacau fermentado em diferentes países apresentam semelhanças e a espécie *S. cerevisiae*, é apontada como dominante na fermentação de cacau (Daniel et al. 2009, Moreira et al. 2013, Papalexandratou et al. 2013). A *S. cerevisiae*

consegue se multiplicar em condições adversas de pH e temperatura, e se destaca também devido à tolerância, à concentração de açúcares e etanol, e sua adaptação à elevada acidez. Esses fatores são responsáveis pela persistência dessa espécie durante toda fermentação e desaparecimento de outras (Pereira et al. 2012, Moreira et al. 2013).

A inoculação da *S. cerevisiae* durante a fermentação de cacau tem sido estudada, sendo associada à produção de chocolates com qualidade superior (Papalexandratou et al. 2013, Batista et al. 2015). A importância do metabolismo das leveduras sobre o desenvolvimento de aroma no chocolate foi recentemente elucidada por Ho et al. (2014), os autores testaram o uso de natamicina para inibir o crescimento de leveduras durante a fermentação de cacau, o estudo mostrou que o chocolate obtido apresentava a ausência de aromas característicos do chocolate.

O estresse térmico é um importante parâmetro para o acompanhamento da fermentação de cacau. Durante os sete dias de fermentação os cochos alcançam valores de até 50 °C. A (Figura 1) apresenta o teste de estresse térmico, variando as temperaturas a 25, 30, 35, 40 e 45 °C.

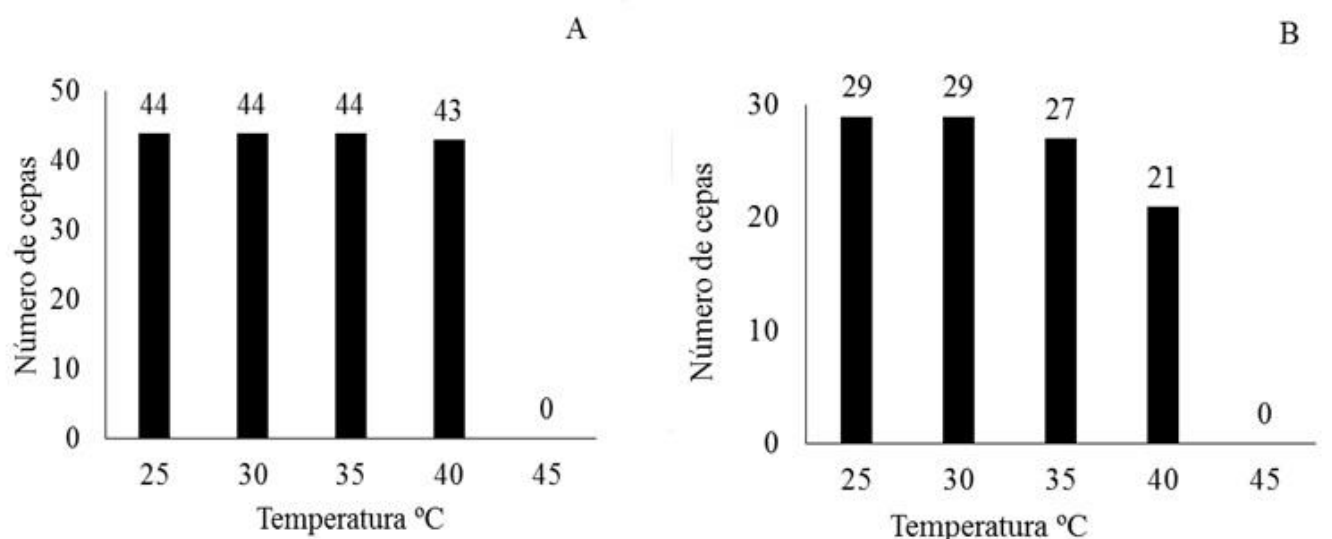


Figura 1. Crescimento de leveduras submetidas a estresse térmico em Medicilândia (A) e Tucumã (B).

As leveduras da localidade de Medicilândia foram mais resistentes às temperaturas que foram submetidas, com exceção a de 45 °C, onde nenhuma levedura de ambas as localidades cresceram. A capacidade das leveduras em se multiplicar a temperaturas acima de 45 °C nos cochos de fermentação pode ser atribuída a melhores condições de adaptação do microrganismo, levando em consideração, maior disponibilidade de substrato no meio.

Dentre as 44 cepas de Medicilândia (Figura 2a), 3 apresentaram atividade para amilase, 10 para celulase, 1 levedura foi produtora de lipase e 2 de proteinase, sendo classificadas como *S. cerevisiae*. As leveduras que produziram proteinase e lipase foram fortemente produtora destas enzimas ($Z < 0.64$). Apenas duas leveduras não produziram fosfolipase e obteve-se um percentual de 42 (97 %), classificadas como produtoras de fosfolipase.

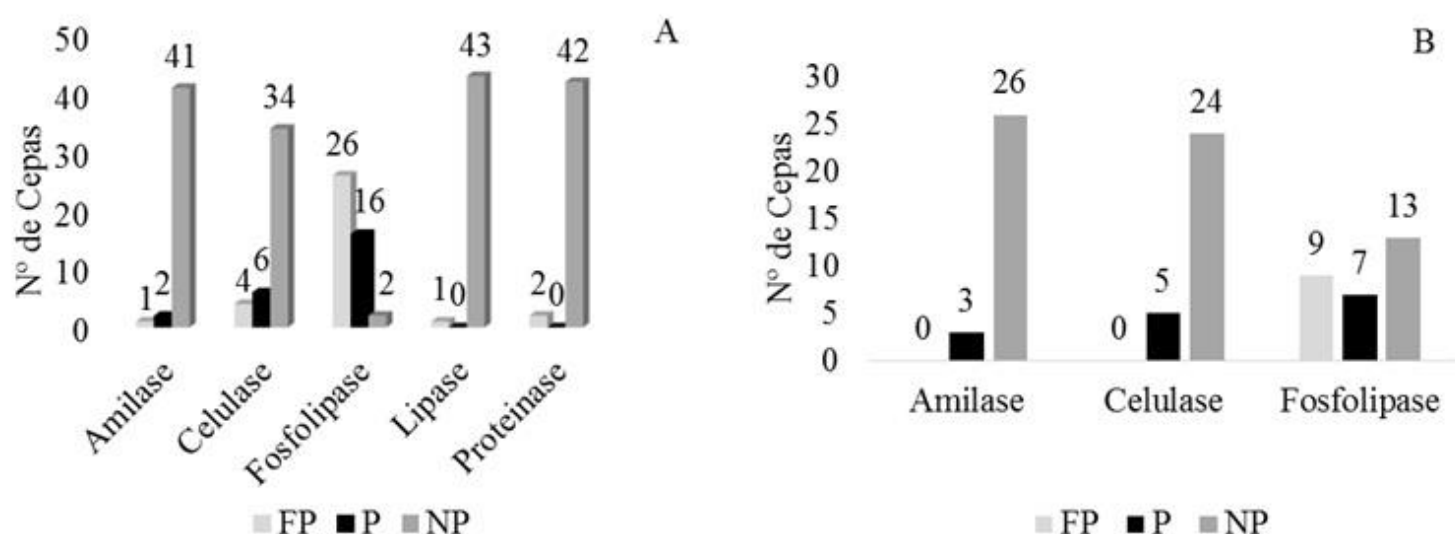


Figura 2. Potencial enzimático das cepas isoladas em Medicilândia (A) e Tucumã (B) - PA. FP: fortemente produtora, P: produtora e NP: não produtora.

Das 29 cepas isoladas em Tucumã, não foi visualizado halo de hidrólise para lipase e proteinase. 3 produziram amilase, 5 celulase e 17 foram produtoras de fosfolipase (Figura 2b). As cepas consideradas *S. cerevisiae* de Tucumã não produziram nenhuma enzima. Das leveduras produtoras de fosfolipase, 9 (52 %) foram classificadas como fortemente produtora, pois apresentaram índice de capacidade enzimática menor que 0.64.

A produção de enzimas por leveduras é considerada de grande interesse industrial. A diversidade de microrganismos existentes que podem ser utilizados para produção enzimática é grande, e há possibilidade de descobertas de novas espécies para esse fim (Fernández et al. 2000). Na literatura científica do cacau são escassos os trabalhos que relatam o potencial enzimático de leveduras isoladas a partir da fermentação de cacau, este estudo demonstrou o potencial, ainda pouco explorado desses microrganismos. Alam et al. (2008) e Martins et al. (2008) estudaram a atividade da celulase, descrevendo a importância da busca por novos microrganismos que excretam esta enzima. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam na liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior

interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Tolan 2002). No presente trabalho esta enzima foi produzida nas duas localidades, porém no município de Medicilândia, as leveduras foram fortemente produtora de celulase.

As fosfolipases podem ser aplicadas em diversas áreas na indústria de alimentos como emulsificantes e também em reações de interesterificação de fosfolipídeos, além de serem utilizadas em produtos para panificação, no processamento de gorduras, óleos e na extração de componentes vegetais (Casado, 2012). As duas localidades estudadas mostraram-se promissoras quanto à produção desta enzima, pois em todos os testes realizados a fosfolipase foi a enzima produzida pela maioria das leveduras isoladas.

CONCLUSÕES

1. A localidade de Medicilândia apresentou maior número de cepas isoladas em relação a Tucumã, à levedura *S.cerevisiae* foi dominante na fermentação realizada em Medicilândia. O melhor potencial enzimático para as enzimas amilases, celulasas, fosfolipases, proteinases e lipases, foram encontrados em Medicilândia, sendo esta localidade produtora de todas as enzimas, com destaque para fosfolipase com 42 cepas.
2. Verificou-se que as leveduras isoladas a partir da fermentação de cacau podem ser uma fonte promissora de enzimas extracelulares de interesse para aplicação industrial e biotecnológica, principalmente em processos que envolvem o processamento de alimentos.

REFERÊNCIAS

- Afoakwa, E. O. et al. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, v. 50, n. 6, p. 1097-1105, 2013.
- Alam, M. Z. et al. Statistical optimization of process conditions for cellulose production by liquid state bioconversion of domestic waste water sludge. *Bioresourcetecnology*. Essex, v. 99, n. 11, p. 4709-4716, 2008.
- American Public Health Association (APHA). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3. ed. Washington, 2001.
- Batista, N. N. et al. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *Food Science and Technology*, v. 63, n. 1, p. 221-227, 2015.
- Bautista, O. A. B. et al. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 7, p. 546-552, 2007.
- Cohen, K. O.; Jackix, M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.
- Camu N, W. T. et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied Environmental Microbiology*, v. 73, n. 6, p. 1809-1824, 2007.
- Casado, V. Torres, F. C. Martin, D. Regiero, G. Phospholipases in Food Industry: A Review. *Methods in Molecular Biology*, v. 861, 2012.
- Daniel, H. M. et al. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, v. 9, n. 5, p. 774-783, 2009.

Dingle, J. et al. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 4, n. 3, p. 149-155, 1953.

EFRAIM, P. et al. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 1, p. 142-150, 2010.

Fernández, M. et al. Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making, *International Journal of Food Microbiology*, v. 59, n. 1, p. 29-36, 2000.

Ho, V. T. T. et al. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 174, p. 72-87, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *IBGE: dados de base estatísticos*. 2017. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201702.pdf. Acessado em: 03 de março de 2017.

Leal, G. A. et al. Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 5, p. 788-798, 2008.

Louw, C. et al. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavor. *Journal of Biotechnology*, v. 125, n. 4, p. 447–461, 2006.

Martins, L. F. et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 5, p. 1417-1424, 2008.

Moreira, I. M. V. et al. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, v. 54, n. 1, p. 9-17, 2013.

Muhsin, T. M. et al. Atividades enzimáticas extracelular de dermatófitos e leveduras isoladas em meios sólidos. *Micoses*, v. 40, p. 465-469, 1997.

Nabarlatz, D. et al. Extraction and purification of hydrolytic enzymes from activated sludge. Resources, *Conservation and Recycling*, v. 59, n. 1, p. 9-13, 2012.

Oliveira, A. N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

Papalexandratou, Z. et al. *Hanseniaspora opuntia* e, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 73-85, 2013.

Pereira, G. V. M. et al. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 15, p. 5395-5405, 2012.

Price, M. F. et al. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

SANNI, A. I.; LONNER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 517-523, 1993.

Seeley, H. W. et al. Selected Exercises from Microbes in Action: *A Laboratory Manual of Microbiology*. 4. ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1990. p. 351.

STATISTICA (data analysis software system), version 8 (Statsoft). 2008. Disponível em: <<http://www.statsoft.com.br/pt/downloads.php>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2014.

Tolan, J. S. Logens process for producing ethanol from cellulosic biomass. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 3, n. 4, p. 339-345, 2002.

Vaughan-Martini, A.; Martini, A. A Taxonomic key the genus *Saccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 113-119, 1993.

Vermelho, A. B. et al. Diversity and Biotechnological Applications of Procaryotic Enzymes. *The Prokaryotes*, 1. ed. Springer-Verlag Heidelberg: Berlin, Germany, 2013. p. 214-235.

Ramos, C.L.; Dias, D.R.; Miguel, M.G.C.P.; Schwan, R.F. 2014. Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64: 908-918.

Reis, R.V.; Bassi, A.P.G.; Silva, J.C.G.; Ceccato-Antonini, S.R. 2013. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44: 1121-1131.

Schwan, R.F.; Wheals, A.E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation ans its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 205-221.

Saltini, R.; Akkerman, R.; Frosch, S. 2013. Optimizing chocolate production through traceability: a review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, 29: 167-187.

Samagaci, L.; Ouattara, H.G.; Goualié, B.G.; Niamke, S.L. 2014. Growth capacity of yeasts potential starter strains under cocoa fermentation stress conditions in Ivory Coast. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26: 861-870.

Santos, A.; Marquina, D.; Leal, J.A.; Peinado, J.M. 2000. (1/6)-b-DGlucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1809-1813.

Zinnai, A.; Venturi, F.; Sanmartin, C.; Andrich, G. 2013. The kinetics of alcoholic fermentation by two yeast strains in high sugar concentration media. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 3: 1-5.

Zuehlke, J.M.; Petrova, B.; Edwards, C.G. 2013. Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4: 57-78.