



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

Yamila Fernandes Mota Alves

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE  
LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DE CACAU NA AMAZÔNIA**

Belém, PA  
2017

Yamila Fernandes Mota Alves

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE  
LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DE CACAU NA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Santos Lopes

Belém, PA  
2017

Yamila Fernandes Mota Alves

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE  
LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DE CACAU NA AMAZÔNIA**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Silvia Helena M. da Silva (Membro externo)  
INST. EVANDRO CHAGAS

---

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

---

Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira (Membro Suplente)  
FEA/ITEC/UFPA

Belém, PA  
2017

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este estudo ao meu amigo e amado esposo Jorge, aos meus filhos e a minha família, por todo apoio, incentivo e suporte para meu crescimento profissional.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me permitir alcançar esse sonho.

Ao meu grande Amor Jorge. Obrigada por me incentivar a crescer profissionalmente e a buscar o meu sucesso, e sobretudo por sempre ser meu parceiro, meu companheiro, meu amigo.

Aos meus amados filhos Yasmin e Ian, por serem minha inspiração, minha razão de viver!

Aos meus pais, pelo amor com que fui criada, e pela importância para com a minha educação e estudo. Vocês são o meu “espelho”!

À professora Alessandra, por aceitar ser minha orientadora e pela dedicação na realização desta dissertação. Muito obrigada!

À equipe do Instituto Evandro Chagas, em especial à professora Silvia, pela crucial participação na realização das análises e pelo carinho. E também ao colega Ruan, pelas explicações e parceria.

Ao Instituto Tecnológico Vale – ITV, pelo projeto do Cacau e em especial ao amigo Santelmo, por ter cedido uma parte do seu tempo para colaborar na análise do sequenciamento genético.

Aos professores do programa pelas disciplinas e por sempre estarem à disposição, principalmente ao professor Nelson, pelas sugestões e pelas palavras amiga.

Aos meus amigos “coorientadores” Clésia e Jean. Muito obrigada pela amizade, paciência e principalmente colaboração, vocês foram meu braço direito!

Aos meus amigos do mestrado, Adriano, Rennan, Adriane, Samiria, Rayane, Victor, Yasmin, Sérgio, Wagner, Lorena e Joseane. Obrigada pela convivência, vocês são maravilhosos, já quero continuar com a mesma turma no doutorado!

Aos colegas de laboratório, principalmente Gilson e Silvana por terem me mostrado o “caminho das pedras”. À Fabielle pela companhia nas “aventuras” vividas no meio da mata Amazônica.

Aos graduandos do LABIOTEC, Felipe, Alan, Leticia, Thais e Carol, por me ajudarem na realização das análises.

À Comissão Executiva do Plano da lavoura Cacaueira – CEPLAC da região transamazônica e da cooperativa de Cacau Orgânico de Medicilândia, por terem nos recebido tão bem e nos mostrado na prática a paixão que é lidar com o Cacau.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo”

(Walter S. Landor)

## RESUMO

A fermentação da semente de cacau tem papel fundamental na formação dos precursores de sabor do chocolate. Esse processo ocorre de forma espontânea nas fazendas cacaeiras e ainda hoje esse processo possui grandes variações de qualidade. As leveduras são os microrganismos que dominam a fermentação, principalmente na fase inicial com a produção de etanol. Este trabalho teve como objetivo identificar as leveduras envolvidas na fermentação das sementes de cacau orgânico brasileiro na Amazônia brasileira. Os resultados encontrados mostraram que os parâmetros de pH e temperatura de fermentação são similares às de outras localidades e em sistemas convencionais de produção. As espécies dominantes da fermentação foram a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Pichia manshurica*. A identificação da espécie *Cryptococcus flavus* nesta pesquisa é inédita em fermentação de cacau. Essa espécie poderá ser empregada para identificar o cacau orgânico de Medicilândia. *Pichia sp.* e *Pichia membranifaciens* também foram encontradas, porém restritas ao período entre 32 e 48 horas da fermentação. A maioria das espécies identificadas demonstraram resistência a altas temperaturas (40°C), com exceção da *C. flavus* que não cresceu em temperaturas maiores que 30 °C. Dentre as espécies identificadas, a *C. flavus* foi a única que apresentou capacidade de produzir três enzimas: amilase, lipase e, especialmente pectinase. A atividade da enzima pectinase é importante na degradação da polpa no início da fermentação, o que ocorreu exatamente no tempo em que a *C. flavus* foi isolada. A *P. manshurica* demonstrou uma importante atividade lipolítica, e foi a única levedura encontrada nos tempos finais de fermentação.

**Palavras-chave:** microflora; *Cryptococcus*; lipase; *Pichia*; pectinase.

## ABSTRACT

The fermentation of the cocoa beans plays a fundamental role in the formation of the chocolate flavor precursors. This process occurs spontaneously in the cocoa farms and until now it has significantly variations in the quality. Yeasts are the microorganisms that dominate the fermentation, mainly in the initial phase with the ethanol production. The aim of this work was to identify the yeasts evolved in cocoa fermentation by organic production in Brazilian Amazon. The results showed that the pH and temperature parameters are similar to those of other localities and conventional production, with its highest temperature being 46.5 °C. The dominant species were *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia manchurica*. The identification of *Cryptococcus flavus* in this work is inedited in cocoa fermentation. This specie could be employed to identify organic cocoa seeds from Mediclândia. *Pichia sp.* and *Pichia membranifaciens* were also found, but limited between 32 and 48 of fermentation. The majority of the species identified demonstrated resistance to high temperatures (40°C), exception made to *C. flavus*, which did not grow at temperatures above 30 °C. Between the identified species, the *C. flavus* was the only one, which presented capacity to produce three enzymes: amylase, lipase and especially pectinase. The activity of the pectinase enzyme is important in the degradation of the pulp at the beginning of fermentation, which happens exactly at the time when *C. flavus* was isolated. The *P. manshurica* showed an important lipolytic activity and it was the only one found in the final stages of the fermentation process.

**Key-words:** microflora; *Cryptococcus*; lipase; *Pichia*; pectinase.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Participação dos municípios com maior produção de cacau do Pará .....	5
Figura 2. Espécie híbrida de Cacau Forastero em área da CEPLAC/MEDICILÂNDIA.....	6
Figura 3. Rota metabólica da fermentação alcoólica da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
Figura 4. Região do DNAr com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2 .....	10

### **ARTIGO. Diversidade e potencial enzimático de leveduras durante a fermentação de cacau orgânico na Amazônia**

Figura 1. Média da temperatura aferida nos tempos de fermentação do cacau.....	27
Figura 2. Média do pH aferido nos tempos de fermentação do cacau.....	28
Figura 3: Crescimento de colônias de leveduras ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ) durante o processo de fermentação.....	29
Figura 4. Identificação das leveduras amazônicas e o tempo em que foram isoladas.....	29
Figura 5: Árvore filogenética das linhagens de leveduras isoladas do cacau amazônico. A região ITS1/ITS2 e 5.8S foi amplificada por PCR.....	30

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**AOAC** – Métodos Oficiais de Análises

**CEPLAC** - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

**g** - Grama

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**pH** - Potencial Hidrogeniônico

**UFC** – Unidade Formadora de Colônia

° **C** – Celsius

**%** - Porcentagem

**h** – Horas

**YM** – *Yeast Extract, Malt Extract* (Meio de Extrato de malte)

**mL**– Mililitro

**YEPD** – *Yeast Extract, peptone e dextrose* (Meio de Extrato de Leveduras, Dextrose e Peptona)

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da polimerase)

**Vol** – Volume

**ITS** – *Spacer Transcribed Internal* (Espaço Transcrito Interno)

**M** – Molar

**dNTP**– Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1	
2.	OBJETIVOS .....	3	
2.1	Objetivo geral.....	3	
2.2	Objetivos específicos .....	3	
CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS PRESENTES NA FERMENTAÇÃO DO CACAU AMAZÔNICO: UMA REVISÃO.....4			
1.	INTRODUÇÃO .....	4	
2.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	5	
2.1	O Cacau.....	5	
2.1.1	<i>Commodity</i> .....	5	
2.1.2	<i>Cacau (Theobroma cacao)</i> .....	8	
2.3	Isolamento e identificação molecular.....	9	
2.4	Biotecnologia e Uso de Enzimas.....	11	
2.4.1	<i>Leveduras e enzimas</i> .....	11	
2.4.1.1	<i>Pectinase</i> .....	12	
2.4.1.2	<i>Amilase</i> .....	12	
2.4.1.3	<i>Lipase</i> .....	13	
2.4.1.4	<i>Protease</i> .....	14	
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....			15
CAPÍTULO II. DIVERSIDADE DE LEVEDURAS DA FERMENTAÇÃO DE CACAU ORGÂNICO NA AMAZÔNIA.....20			
1.	INTRODUÇÃO .....	20	
ARTIGO. DIVERSIDADE E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE CACAU ORGÂNICO NA AMAZÔNIA.....21			
Resumo.....			21
<b>1. Introdução</b> .....			21
<b>2. Material e métodos</b> .....			22
2.1	Fermentação e coleta das amostras.....	22	
2.2	Isolamento das linhagens de leveduras.....	23	
2.3	Extração de DNA de leveduras e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	24	
2.4	Atividade enzimática .....	25	
2.4.1	<i>Lipase</i> .....	25	
2.4.2	<i>Proteinase</i> .....	25	
2.4.3	<i>Amilase</i> .....	26	

2.4.4 <i>Pectinase</i> .....	26
2.5 Análise Estatística.....	27
<b>3. Resultados</b> .....	<b>27</b>
3.1 Temperatura, pH e crescimento de leveduras .....	27
3.2 Identificação das espécies isoladas .....	29
3.3 Atividade enzimática e temperatura crítica de crescimento.....	30
<b>4. Discussão</b> .....	<b>31</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>34</b>
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	 35

## INTRODUÇÃO

A semente de cacau fermentada é a principal matéria prima para a produção do chocolate e este processo depende de microrganismos diversos, que podem variar extensamente em função da localidade, técnicas de fermentação, tempo de fermentação e também pela variedade e maturidade dos frutos de cacau (ARDHANA; FLEET, 2003).

A polpa de cacau rica em carboidratos e inicialmente estéril, é contaminada rapidamente por microrganismos presentes no ambiente quando os frutos são abertos e estocados no cocho de fermentação (NIELSEN et al., 2005). Durante a fermentação ocorrem sucessões microbianas, e em paralelo diversas reações químicas e bioquímicas, que resultam na formação do aroma e sabor de chocolate (DE VUYST et al.,2010).

Os principais grupos presentes durante o processo de fermentação da semente de cacau são as leveduras, as bactérias lácticas e as bactérias acéticas. As leveduras são as que primeiro atuam na massa de cacau, especificamente, na polpa ácida e rica em açúcares, que é o substrato inicial para a produção de etanol (SANDHYA et al.,2016).

Padronizar o processo de fermentação de sementes de cacau para garantir a uniformidade e qualidade das amêndoas fermentadas é ainda um desafio encontrado pelos produtores rurais (SANDHYA et al.,2016).

Diversos parâmetros de qualidade e monitoramento do processo, como temperatura, pH e acidez das sementes de cacau são empregados até os dias atuais, e mais recentemente pesquisas sobre a diversidade da microflora atuante têm sido realizados em diversas regiões produtora de cacau, no entanto na Amazônia são escassos os relatos de identificação de espécies de microrganismos da fermentação de cacau.

Para identificação das espécies de leveduras isoladas são empregadas técnicas moleculares que permitem com alta precisão identificar os microrganismos. As técnicas mais utilizadas são a Eletroforese em gel com gradiente desnaturação (PEREIRA et al.,2013), um método de agrupamento por impressão baseado na amplificação de elementos repetitivos de DNA (*Fingerprint*) e a amplificação de sequências dos genes ribossomais ITS (SAMAGACI et al.,2016, DANIEL et al.,2009) e LSU D1/D2 (DANIEL et al., 2009).

A predominância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na primeira fase do processo de fermentação foi encontrada em alguns estudos na Indonésia, Gana e Brasil (ARDHANA; FLEET, 2003; PEREIRA et al.,2013; NIELSEN et al.,2007; PAPALEXANDRATOU et al., 2011) principalmente em fermentações que são feitas em montes. A presença de algumas

leveduras é bastante reportada em fermentação do cacau, como as cepas *Pichia kudriavzevii* e *Hanseniaspora opuntiae* (DANIEL et al., 2009; HO et al., 2014; PAPALEXANDRATOU et al., 2013).

As cepas isoladas da fermentação da semente de cacau requerem uma caracterização fisiológica completa, afim de ter uma melhor compreensão da sua capacidade de adaptação a condições ambientais complexas. Informações adicionais sobre atividades enzimáticas podem melhorar e completar seu perfil fisiológico para compreensão de seu potencial impacto no processo de fermentação (VISINTIN et al., 2016).

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, no primeiro temos uma revisão de literatura sobre a importância do cacau e os processos que envolvem a fermentação de suas sementes, bem como a atuação das leveduras nesse processo e sua capacidade enzimática. No segundo capítulo, temos o artigo, de isolamento e identificação das leveduras da fermentação de cacau em Medicilândia, que é o município com maior produção de cacau na Amazônia e no Brasil.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Isolar e identificar as leveduras atuantes na fermentação natural de cacau orgânico em Medicilândia (PA) e avaliar o potencial enzimático das leveduras isoladas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os parâmetros de temperatura e pH da polpa de cacau durante a fermentação;
- Isolar as leveduras atuantes na fermentação;
- Identificar as cepas através de sequenciamento genético da região alvo;
- Avaliar o potencial enzimático (proteínase, lipase, pectínase e amilase) das leveduras identificadas;
- Criar uma coleção de cepas (MICOTECA) com as leveduras identificadas geneticamente e com a descrição de suas características morfológicas e enzimáticas.

## CAPÍTULO I

### CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS PRESENTES NA FERMENTAÇÃO DO CACAU AMAZÔNICO: UMA REVISÃO

#### 1 INTRODUÇÃO

Este capítulo compreende a revisão do processo fermentativo do cacau, a ação das leveduras neste processo e a técnica de identificação molecular destes microrganismos.

A produção do cacau (*Theobroma cacao*) é um agronegócio de grande importância econômica no mundo e fornece a principal matéria prima para a produção de um produto secular, o chocolate (HO; ZHAO; FLEET, 2015), sendo a fermentação, um passo crucial no processo de pós colheita desse fruto para desenvolver os diferentes sabores e aromas procurados pela indústria do chocolate (SCHWAN; WHEAL, 2004; ARDHANA; FLEET, 2003).

Os microrganismos responsáveis pela fermentação são as leveduras, as bactérias lácticas e acéticas, sendo que outras espécies microbianas, como fungos filamentosos e outros tipos de bactérias, podem se desenvolver e influenciar na qualidade desse processo (SCHAWN; FLEET, 2014). As leveduras atuam inicialmente e convertem os açúcares da polpa do cacau em etanol, além de assimilar o ácido cítrico e hidrolisar a pectina presente, através da excreção de enzimas como a pectinase. A presença de enzimas pectinolíticas são importantes para a solubilização da polpa, facilitando a penetração de oxigênio na massa fermentada, e impulsionando o crescimento bacteriano aeróbico após a ação das leveduras (LEAL et al., 2008; CRAFTACK et al., 2013).

Não está totalmente compreendido como os grupos de microrganismos ou espécies individuais determinam a qualidade do chocolate e quais são de fato essenciais ou não para o processo de fermentação (HO et al., 2014). Os primeiros relatos dos microrganismos responsáveis pela fermentação espontânea de cacau foram publicados no início do século XX por Preyer Buitenzorg (1901), e a partir de então, tentativas de desenvolver culturas iniciais para melhor controle do processo de fermentação estão sendo estudadas, para melhorar a qualidade do cacau fermentado (ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS; 2004; GALVEZ et al., (2007); NIELSEN et al., 2007; PAPALEXANDRATOU et al., 2011; CRAFTACK et al., 2013; SAMAGACI et al., 2016; VISINTIN et al., 2016).



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O Cacau

#### 2.1.1 Commodity

A cacauicultura é uma atividade agrícola de grande importância econômica, social e ecológica para as regiões de clima tropical úmido (NIELSEN et al., 2007). De acordo com os dados da *International Cocoa Organization* (ICCO), os maiores produtores mundiais de cacau são a Costa do Marfim com 1.449 mil toneladas na safra 2012/13, seguida por Gana (835,5 mil toneladas), Indonésia (410 mil toneladas), Nigéria e Camarões (225 mil toneladas), Equador (191,5 mil toneladas) e Brasil (185,3 mil toneladas) (ICCO, 2013).

Segundo relatório do IBGE de agosto de 2015 (Tabela 1), a Bahia produz 54,3% do total de cacau no Brasil, sendo seguida pelo estado do Pará com 40,8%.

Tabela 1: Produção de cacau no Brasil (IBGE, 2015)

	Bahia	Pará	Rondônia	Espírito Santo	Amazonas	Mato Grosso
<b>% Produção</b>	54,3	40,8	2,2	1,7	0,8	0,2
<b>Produtividade por hectare</b>	645	860	430	202	645	618

Fonte: IBGE, 2015.

No estado do Pará, os principais municípios produtores de cacau (Figura 1) segundo a FAPESPA/SEDAP (2015), concentra-se principalmente na Região de integração do Xingu, com destaque para Medicilândia com sistema orgânico que atingiu quase 40% do total produzido no Pará, seguida por Uruará (10,89%) e Placas (8,35%).



Figura 1: Participação dos municípios com maior produção de cacau do Pará (FAPESPA, 2015).

### 2.1.2 Cacau (*Theobroma cacao*)

Vários indicadores são usados para medir a qualidade das sementes de cacau, como o tamanho, cor e acidez, no entanto, os indicadores mais importantes são a quantidade e o tipo de compostos voláteis presentes nas sementes (OWUSU, 2010). Esses compostos são formados durante a etapa de torração, porém seus precursores são gerados durante o processo de fermentação e secagem, são influenciados por fatores como o tipo de cacau (genótipo), técnicas de fermentação e secagem, condições edafoclimáticas e microflora atuante (AFOAKWA,2010).

As principais variedades de cacau encontrados no mundo são: Forastero da região amazônica, mais comum e menos rico em aromas; Criollo, raramente cultivado devido a susceptibilidade a doenças, porém rico em aromas; Trinitário, uma espécie híbrida entre o Forastero e o Criollo, rica e diversa quanto aos aromas, produzido no Equador e conhecido pelo seu fino paladar (LUNA, 2002; BECKETT, 2000).

O Forastero (Figura 2), nativo da bacia Amazônica compreende 95% da produção mundial de cacau e é geralmente conhecido como “massa de cacau” no comércio. As sementes são planas, adstringentes e de coloração roxa, devido a presença das antocianinas. Possuem elevada produtividade e considerados moderadamente resistente às pragas (KONGOR et al.,2016).



Figura 2: Espécie híbrida de cacau Forastero em área da CEPLAC/MEDICILÂNDIA.

Fonte: Acervo pessoal (2016).

Depois de colhido, os frutos são quebrados e abertos e as sementes cobertas de polpa de cacau são retiradas manualmente. A polpa é rica em glicose, frutose e sacarose (10% a 15%) e seu pH inicial é relativamente baixo (entre 3,3 à 4,0) principalmente devido à alta concentração de ácido cítrico presente (1% a 3%) (THOMPSON et al.,2001; ARDHANA; FLEET, 2003; SCHAWN; WHEALS, 2004). A semente *in natura* tem um forte sabor adstringente e necessita ser fermentada e seca para a formação dos precursores de sabor do cacau, (aminoácidos livres e açúcares redutores) (HO; ZHAO; FLEET, 2014).

### 2.1.3 Fermentação da semente de cacau

Dois principais fenômenos ocorrem durante este processo: a) atividade microbiana na polpa mucilagenosa, com produção de álcool e ácidos e liberação de calor; b) reações bioquímicas no interior dos cotilédones, iniciadas pela difusão de produtos do metabolismo dos microrganismos fermentativos. A elevação da temperatura e a difusão de ácidos orgânicos através da testa causam a morte do embrião (LOPEZ; DIMICK, 1991).

Durante a fermentação, as sucessões microbianas ocorrem com as alterações do microambiente (temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio). Os principais grupos microbianos são as leveduras, as bactérias lácticas e as bactérias acéticas (ARDHANA; FLEET, 2003).

Leveduras e bactérias lácticas são dominantes nas fases iniciais do processo de fermentação (entre 48 e 96 horas). A maioria dos constituintes da polpa fresca, como a glicose, frutose e ácido cítrico, são fermentados e transformados em etanol e ácido láctico. Como consequência, as mudanças que ocorrem no substrato permitem o crescimento de bactérias acéticas que são aeróbicas e metabolizam o etanol em ácido acético (SCHWAN; WHEALS, 2004). Na Figura 3 apresenta-se o mecanismo da fermentação da molécula de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O metabolismo da fermentação das leveduras conduz muito rapidamente para o consumo dos açúcares simples e sua conversão em etanol e dióxido de carbono. A fermentação alcoólica é uma reação térmica moderada (93.3kJ consumo da molécula de glicose), conduzindo a um aumento na temperatura da massa, que atinge de 35 a 40°C (JESPERSEN et al.,2005).

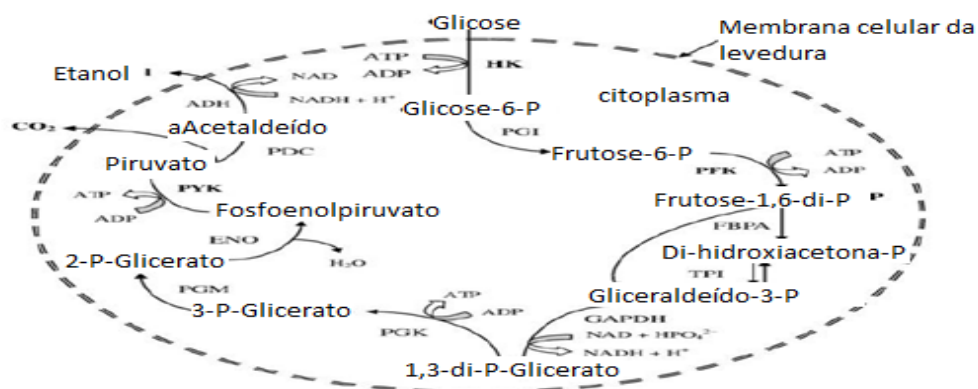


Figura 3: Rota metabólica da fermentação alcoólica da *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: BAI et al, (2008).

A quebra da pectina ocasionada pelas leveduras libera açúcares para o meio favorecendo a produção de ácido láctico por bactéria lácticas em sua maioria as espécies *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*, e tais transformações fazem com que parte da polpa se liquefaça e seja drenada para fora das caixas facilitando a difusão de oxigênio na massa. Após 48 horas de fermentação a disponibilidade de etanol, produzido pelas leveduras e a entrada de oxigênio (fase aeróbica), induz a proliferação de bactérias acéticas, que ao produzir ácido acético a partir do etanol, elevam a temperatura da massa cacauera até cerca de 50°C (ILLEGHEMS, 2012).

Já foram encontrados também fungos filamentosos em sementes de cacau, porém é sempre um motivo de preocupação, uma vez que existe a produção de micotoxinas (COPETTI et al., 2012).

A fermentação em larga escala do cacau é um dos poucos processos dependentes de microrganismos que não tem padronização na indústria alimentícia. A falta da padronização deste processo tem levado muitos pesquisadores ao desenvolvimento tanto de tecnologias ligadas a construção de reatores, como também a busca por microrganismos mais adaptados e eficientes para a realização destas fermentações. O melhoramento de linhagens de leveduras também tem demonstrado resultados positivos para este processo (MEERSMAN et al., 2013).

## 2.2 Leveduras

Os fungos eucariotos possuem formas leveduriformes ou filamentosas (ALEXOPOULOS et al., 1996). As leveduras são fungos formados por uma única célula eucarionte, em sua maioria são classificados como ascomicetos, tem forma esférica, oval ou

cilíndrica. A reprodução das leveduras pode ser assexuada por brotamento ou podem realizar também a reprodução sexuada quando ocorre a fusão de duas células (MADIGAN et al., 2004; GONÇALVES, 2007). As leveduras são ubíquas, têm metabolismo peculiar que permite a utilização de nutrientes variados e nas mais diversas condições ambientais. Crescem principalmente onde há presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores, de nutrição quimioheterotrófico absorptiva, aeróbios e anaeróbicos facultativos, com temperatura ótima de crescimento entre 25 a 30° C e pH de 4 a 7, sendo que algumas espécies são patogênicas ao homem (MADIGAN et al., 2004).

As leveduras colonizam diversos nichos ecológicos devido à sua habilidade de utilizar vários substratos para sua nutrição absorptiva. Essa característica permite que as leveduras secretem enzimas que hidrolisam macromoléculas a moléculas menores principalmente fontes de carbono e hidrogênio, que podem ser incorporadas e utilizadas em sua alimentação. Tem extrema importância econômica e, são utilizadas na produção de bebidas fermentadas como cervejas e vinhos, e outros alimentos, como pães e queijos, cuja espécie mais importante e conhecida é a *Saccharomyces cerevisiae* (ALEXOPOULOS et al., 1996; SANTOS et al., 1996).

As espécies mais comuns na fermentação do cacau são: *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida stellimalicola*, *Schizosaccharomyces pombe* (ILLEGHEMS, 2012).

Baseado nas análises de combinação molecular e morfológica e também dados fisiológicos, Daniel et al. (2009) identificaram *P.kudriavzevii*, *S. cerevisiae* e *H.opuntiae* como as principais espécies envolvidas na fermentação das sementes de cacau em Gana (África Ocidental) e confirmaram estudos anteriores (JESPERSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2007). Além dessas, os mesmos autores relataram algumas espécies que ainda não tinham sido encontradas na fermentação de cacau como, *Candida carpophila*, *Candida orthopsilosis*, *Kodamaea ohmeri*, *Meyerozyma caribbica* e *Saccharomycodes ludwigii*. Nielsen et al., (2010), encontraram novas espécies envolvidas na fermentação de Gana como a *Candida halmiae* e *Candida awuuii*.

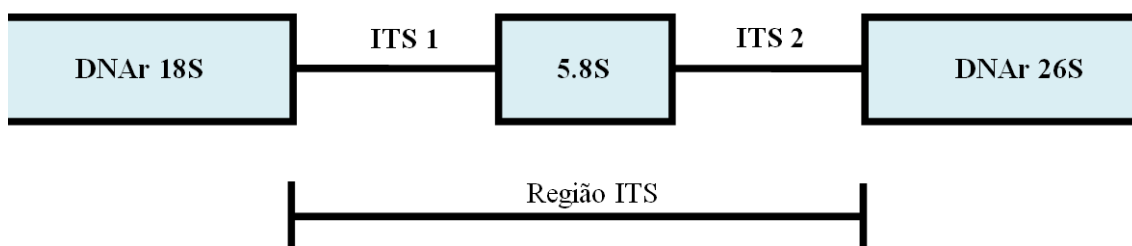
### **2.3 Isolamento e identificação Molecular**

A avaliação da diversidade microbiana depende de uma acurada identificação das espécies isoladas. A maioria dos estudos que tratam de identificação das leveduras são com base na caracterização fenotípica, seguido de identificação molecular das leveduras isoladas,

muitas vezes baseada em sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S rRNA (JESPERSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2005; DANIEL et al., 2009).

O método mais frequentemente citado é o sequenciamento com identificação dos isolados pela análise e comparação de uma sequência de bases nucleotídicas. O DNA é extraído e uma sequência “alvo”, como mostrado na Figura 4, é amplificada e sequenciada e os dados são alinhados e analisados. Os “alvos” mais comuns usados para uma ampla gama de fungos estão dentro do DNAr e incluem o Espaçador Interno Transcrito (ITS1 e ITS2) e as regiões D1 e D2 da maior subunidade ribossomal. Os resultados são então comparados com sequências que fazem parte de um banco de dados (GenBank) (HOSPENTHAL; RINALDI, 2008).

Figura 4: Região do DNAr com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2.



Fonte: FELIX (2013).

A identificação pode ser refinada através do agrupamento dos isolados usando o método de *fingerprint* com base PCR (reação em cadeia polimerase) para amplificar os elementos de DNA repetitivos (DANIEL et al., 2015). PCR e Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) tem sido uma ferramenta interessante para monitoramento da composição total de espécies de leveduras em sementes de cacau (NIELSEN et al., 2007), vinho (COCOLIN et al., 2000) e fermento (MEROOTH et al., 2003).

Jespersen et al. (2005) identificaram leveduras em sementes fermentadas em Gana, África, através de uma técnica denominada polimorfismo do comprimento dos cromossomos (CLP, acrônimo em inglês), e sugeriu esta técnica a ser implantada na busca por leveduras que acompanham um coquetel de culturas iniciais.

Samagaci et al. (2014) identificaram e analisaram a dinâmica de crescimento das leveduras envolvidas na fermentação de cacau de uma região da Costa de Marfim por PCR da região ITS1/ITS2 5.8S do DNAr das linhagens isoladas e realizaram uma seleção de leveduras pectinolíticas através de testes sob estresse controlado.

## 2.4 Biotecnologia e Uso de Enzimas

Um problema recorrente na indústria de chocolate é a qualidade inferior das amêndoas de cacau devido a carência de controle de parâmetros de processo. Uma porcentagem significativa das sementes não sofre as alterações necessárias (principalmente a acidificação do pH e aumento da temperatura) para a formação dos precursores de sabor e aroma de chocolate. O controle do processo de fermentação, e emprego de cultura *starter* são ferramentas potenciais para a melhoria da qualidade das amêndoas de cacau (AQUARONE et al., 2001).

Nielsen et al. (2005) concluíram que para definir um coquetel de microrganismos inicial é imprescindível conhecer a diversidade que ocorre naturalmente nas fermentações, e assim descobrir o papel de cada uma para mimetizar o processo de fermentação natural e ter uma reprodutibilidade adequada.

Alguns países possuem pedido de patentes para a inoculação de leveduras durante o processo de fermentação, como leveduras híbridas geneticamente (USP\_Brasil/2008), composição microbiana de leveduras e lactobacillus (Barry Callebaut AG\_Suíça/ 2010), inóculo de *Pichia kluyveri* (CHR. HANSEN A/S \_Dinamarca/ 2012); e de uma composição delas (DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS\_ Dinamarca/ 2015) (INPI, 2017). Essas patentes, aliada aos trabalhos realizados na últimas décadas, contribuem para um futuro processo de fermentação de sementes de cacau, no qual será possível realizar sua padronização de qualidade tanto pela inoculação inicial de leveduras no processo, como por controles baseados em aspectos já pré-definidos, como análise de indicadores de qualidade onde a formação e/ou degradação de compostos como polifenóis, albuminas e vicilinas servem de orientação (LIDIA et al.,2011; SAMAH et al.,1992).

### 2.4.1 Leveduras e enzimas

Alguns microrganismos são produtores de enzimas hidrolíticas, como celulasas, xilanasas, amilases, pectinases, lipases e proteases, que clivam polímeros complexos em moléculas mais simples capazes de serem metabolizadas ou absorvidas pelos organismos (BADRI et al., 2009).

As enzimas são utilizadas na biologia molecular e na biomedicina, no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos. São bastantes ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e

valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores (ORLANDELLI, 2012).

As reninas microbianas já são usadas na produção de queijos, desde 1970. Coalhos de origem microbiana têm sido aplicados em larga escala nos EUA. Cerca de 70% dos queijos produzidos nos EUA e cerca de 30% da produção mundial utilizam proteases microbianas. A presença de proteases durante a maturação de alguns queijos não é totalmente indesejada, pois elas participam da promoção do sabor e da textura, característicos de certos tipos de queijo (KOBBLITZ, 2014).

#### *2.4.1.1 Pectinase*

São produzidas por vegetais e microrganismos e seu substrato são os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais. Em virtude disso, pectinases endógenas podem causar importantes alterações na textura de frutas e hortaliças (KOBBLITZ, 2014).

A capacidade das pectinases em degradar a parede celular tem sido muito utilizada no processamento de sucos e vinhos nas últimas décadas, sendo bastante utilizada na indústria de alimentos. Hoje, a maioria dessas enzimas são provenientes de fungos (ALIMARDANI, 2011).

Algumas leveduras envolvidas na fermentação alcoólica da semente de cacau são hábeis em secretar pectinases, quebrando as paredes celulares da polpa, permitindo a perda de fluidos e a permeação de oxigênio na massa, modificando o microambiente e favorecendo o crescimento de microrganismos aeróbicos, como as bactérias lácticas e acéticas (SCHAWN; FLEET, 2014).

As leveduras pectinolíticas produzem diferentes enzimas (pectinaesterase, poligalacturonase, pectatoliase e pectinaliase) de acordo com o ambiente e seus antecedentes genéticos. Por exemplo, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* e *Candida* produzem poligalacturonase (principalmente as endo), enquanto que o gênero *Rhodotorula* produz também a pectinaesterase (BLANCO et al., 1999).



#### 2.4.1.2 Amilase

O amido é um polissacarídeo constituído de centenas ou milhares de unidades de glicose. As amilases são carboidrases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e/ou  $\alpha$ -1,6 presentes no amido, no glicogênio e nos sacarídeos derivados (KOBELITZ, 2014). Há dois grupos importantes de amilases, que são as glicoamilases e as  $\alpha$ -amilases.

As  $\alpha$ -amilases microbianas estão entre as enzimas mais importantes na biotecnologia atual principalmente por sua utilização em várias indústrias, tais como alimento, produtos farmacêuticos, produtos têxteis, etc. Elas representam 30% das enzimas utilizadas no mercado mundial (HOMAEI et al., 2015)

Muitos gêneros de leveduras foram isolados de ambientes marinhos e verificou-se que algumas cepas produziam  $\alpha$ -amilases tal como os gêneros *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* e *Cryptococcus*. Nos últimos anos, o interesse em seu potencial biotecnológico aumentou muito, principalmente por não produzirem toxina como os fungos filamentosos (ARTTIRILMASI, 2013).

#### 2.4.1.3 Lipase

São enzimas largamente distribuídas na natureza, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (KOBELITZ, 2014). Atualmente, apenas lipases de origem animal ou microbiana têm aplicação industrial; essas últimas predominam no mercado.

As lipases produzidas por bactérias e leveduras são de especial interesse devido a sua facilidade de produção e já terem sido bastante estudadas (GUPTA et al., 2014). A classe com maior produção comercial é a *Candida sp.*, porém existem várias outras cepas que apresentaram potencial lipolítico, como algumas cepas dos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotoryla*, *Candida* e *Wickerhamomyces* (YALÇIN, 2013). Uma lipase fúngica de considerável interesse é a produzida por *Geotrichum candidum*, pois é bem específica para o ácido oleico; e é por esse motivo conhecida como lipase cis-9-ácido graxo específica (KOBELITZ, 2014).

Dependendo das condições, as lipases também catalisam reações de síntese, como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular), sendo que a atividade de água ( $a_w$ ) do meio reacional é um dos fatores determinantes para o equilíbrio da reação no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) (MESSIAS et al., 2011).

De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis à altas temperaturas; possuem elevada especificidade, quimio e enantiosseletividade, que fazem com que sejam altamente aplicáveis em processos industriais (VILLENEUVE et al., 2000; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

#### *2.4.1.4 Protease*

As proteases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em moléculas de proteínas, resultando em peptídeos e aminoácidos. Essas enzimas estão entre as mais importantes e representam mais de 65% do total de vendas de enzimas para as indústrias (HSIAO et al., 2014; RAO et al., 1998).

Na indústria alimentícia, na fabricação do queijo, as protease são utilizadas como agente coagulante e atuam diretamente na qualidade do queijo, influenciando no sabor e propriedades funcionais (YEGIN et al., 2011).

Várias proteases estão presentes nos cotilédones das sementes de cacau maduro, as quais tornam-se ativas após a ruptura celular e acidificação nos nibs durante a fermentação (VOIT et al., 1994). As proteínas constituem 10-15% do peso seco das sementes de cacau, o segundo constituinte mais abundante após os lipídeos. Com a fermentação, essas moléculas serão clivadas em oligopeptídeos e aminoácidos que são os precursores essenciais para o desenvolvimento do aroma do cacau (CALIGIANI et al., 2016).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. Oxford, UK: Wiley Blackwell Publishers, 2010.

ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C.W; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. New York, USA: Wiley New York, 1996.

ALIMARDANI-THEUIL, P; CLAISSE, A.G.; DUCHIRON, F. Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. **Process Biochemistry**, v.46, p. 1525-1537, 2011.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnology in food production**. v.4. São Paulo: Editora Blücher, 2001.

ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 87-99, 2003.

BADRI, D.V., QUINTANA, N.,E.G. EL KASSIS, H.K. KIM, Y.H. CHOI, A. SUGIYAMA, R. VERPOORTE, E. MARTINOIA, D.K.. An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke on overhaul of natural soil microbiota. **Plant Physiology**, v.151, p. 2006-2017, 2006.

BAI, JF; LIN, XG; YIN, R; ZHANG, HY; WANG, JH; CHEN, XM; LUO, YM. The influence of arbuscular mycorrhizal fungi on as and P uptake by maize (*Zea mays* L.) from As-contaminated soils. **Applied soil ecology**, v. 38(2), p.137-145, 2008.

BAYON, M.A.P; ORTIZ, I.A; HIDALGO, J.M.A; ALVAREZ, P.J.M; ARRIBAS, M.V.M. Characterization of Commercial Inactive Dry Yeast Preparations for Enological Use Based on Their Ability To Release Soluble Compounds and Their Behavior toward Aroma Compounds in Model Wines. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 57, p. 10784-10792, 2009.

BECKETT, S.T. **The Science of Chocolate**. Londres: Editora Royal Society of Chemistry Paperbacks, 2000.

BLANCO, P; SIEIRO, C; VILLA, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v.175, p. 1-9, 1999.

CALIGIANI, A; MARSEGLIA, A; PRANDI, B; PALLA, G; SFORZA, S; Influence of Fermentation Level and Geographical Origin on Cocoa Bean Oligopeptide Pattern. **Food Chemistry**, v. 211, p. 431-439, 2016.

COCOLIN L; BISSON, L.F; MILLS, D.A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, p. 81–87, 2000.

COPETTI M. V; IAMANAKA, B. T; MORORÓ R.C; PEREIRA, J. L; FRISVAD, J.C; TANIWAKI, M.H. The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and

Ochratoxin A production by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.155, p. 158–164, 2012.

CRAFACK, M; KEUL, H; ESKILDSEN, C. E; PETERSEN, M. A; SAERENS, S; BLENNOW, A. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, v. 63, p. 306-316, 2014.

DANIEL, E; ONWUKWE, G.U; WIERENGA, R.K; QUAGGIN, S.E; VAINIO, S.J; KRAUSE, M. ATGme: Open-source web application for rare codon identification and custom DNA sequence optimization. **BMC Bioinformatics**, v.16, p. 2-6, 2015.

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

DE VUYST, L; LEFEBER, T; PAPALEXANDRATOU, Z; CAMU, N. The Functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. **Biotechnology of lactic Acid Bacteria. Novel Applications**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010.

FELIX, A.M.S. Avaliação de marcadores aplicáveis à diversidade genética de *Jatropha curcas* e espécies relacionadas (Euphorbiaceae) FELIX, A.M.S. Dissertação (Mestrado) apresentando ao curso de Ciências Biológicas, na área de concentração Biologia celular e Molecular, UFPE, 2013.

FUNDAÇÃO AMAZÔNIA DE AMPARO A ESTUDOS E PESQUISAS DO PARÁ BOLETIM AGROPECUÁRIO DO ESTADO DO PARÁ 2015. Belém, nº1, julho 2015.

GONÇALVES\_ALVEZ, S. L; LOISENU, G; PAREDES, J. L; BAREL, M; GUIRAUD, J.P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p. 124-130; 2007.

HASAN, F; SHAH, A. A; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

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.

HOMAEI, A., GHANBARZADEH, M., MONSEF, F. Biochemical features and kinetic properties of alpha-amylases from marine organisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.83, p. 306-314, 2015.

HSIAO, N.W; CHEN, Y; KUAN, Y.C; LEE, Y.C; LEE, S.K; CHAN, H.H; KAO, C.H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 89–94; 2014.

ICCO; THE INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Categories of Cocoa Beans. Disponível em: <http://www.icco.org/about-cocoa/growing-cocoa.html> .Acesso em: 10 de dez. 2015.

ILLEGHEMS, K; DE VUYST, L; PAPALEXANDRATOU, Z; WECKX, S. Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. **Journal Plos One**, v.29, 2012.

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

INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Disponível em: <<https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=PreviousRegister&CodP edido=977445&Resumo=&Titulo>>. Acesso em: 29 de março, 2017.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos. Teoria e Aplicações práticas**. Campinas, São Paulo: Editora RBE; 2014.

KONGOR, J.E; HINNEH, M; VAN DEWALLE, D; AFOAKWA, E.O; BOECKX, P; DEWETTINCK, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile, A review. **Food Research International**, v.82, p. 44–52, 2016.

LEAL, G.A; GOMES, L.H; EFRAIM, P; TAVARES, F.C.A; FIGUEIRA, A. Fermentation of cacao (*Theobroma cacao L.*) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 788-798, 2008.

LOPEZ, A.S; DIMICK, P.S. **Cocoa fermentation. Enzymes, biomass, food and feed**, v. 9, Second edition. Weinheim, Germany: VCH, 1995.

LUNA, F; CROUZILLAT, D; CIROU, L; BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v.50, p. 3527-3532, 2002.

MEERSMAN, E; STEENSELS, J; PAULUS, T; STRUYF, N; SAELS, V; MATHAWAN, M. Breeding strategy to generate robust yeast starter cultures for cocoa pulp fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, p. 6166-6176, 2015.

MESSIAS, J.M; COSTA, B.Z; LIMA, V.M.G; GIESE, E. C; DEKKER, R.F.H; BARBOSA, A.M. Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, p. 213-234, 2011.

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

NIELSEN, D.S; HONHOLT, S; TANO-DEBRAH, K; JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast**, v.22, p. 271–284, 2005.

OWUSU, M. Influence of raw material and processing on aroma in chocolate. **Department of Food Science**, Thesis of University of Copenhagen, 2010.

PAPALEXANDRATOU, Z; FALONY, G; ROMANENS, E; JIMENEZ, J. C; AMORES, F; DANIEL, H.M. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 7698-7714, 2011.

PAPALEXANDRATOU, Z; LEFEBER, T; BAHRIM, B; LEE, O.S; DANIEL, H. M; DE VUYST, L. 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. **Food Microbiology**, v.28, p. 1326-1338, 2013.

PEREIRA, G. V. D; MIGUEL, M; RAMOS, C. L; SCHWAN, R. F. Microbiological and physico-chemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p. 5395-5405, 2012.

PREYER-BUITENZORG, A. Über Kakao fermentation. **Tropenpflanzer**, v.5, p. 157–173. 1901.

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

SAMAGACI, L; OUATTARA, H; NIAMKE, S; LEMAIRE, M. Pichia kudrazevii and Candida nitrativorans are the most well-adapted and relevant yeast species fermenting cocoa in Agneby-Tiassa, a local Ivorian cocoa producing region. **Food Research International**, v. 89, p. 773-780, 2016.

SANDHYA, M.V.S; YALLAPPA, B.S; VARADARAJ, M.C; PURANAIAK,J; JAGANMOHAN, L; JANARDHAN, P; PUSHPA S, M. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (Theobroma cacao) fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 731-738, 2016.

SCHWAN RF. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1477-1483, 1998.

SCHWAN, R. F; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 204-221, 2004.

SCHWAN, R.F., FLEET, G.H. **Cocoa and coffee fermentations**. New York: CRC. Press Taylor & Francis Group, 2014.

THOMPSON, S.S; MILLER, K.B; LOPEZ, A.S. Cocoa and coffee. **Journal of Food Microbiology Fundamental and frontiers**, v. 8, p. 649-661, 2001.

Ü. ARTTIRILMASI; DERGISI, T.B. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 38, p. 101-108, 2013.

VILLENEUVE, P; MUDERHWA, J. M; GRAILLE, J; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

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

YALCIN, H.T; CORBACI, C; UCAR, F.B. Molecular characterization and lipase profiling 1066 of the yeasts isolated from environments contaminated with petroleum. **Basic Microbiology**, v. 54, p. 85-92, 2013.

YEGIN, S; FERNANDEZ, L; SALGADO, M.J.G; GUVENC, A; GOKSUNGUR, U; TARI, Y. Aspartic proteinases from *Mucor spp.* in cheese manufacturing. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 89, p. 949-960, 2011.

## **CAPÍTULO II**

### **DIVERSIDADE DE LEVEDURAS DA FERMENTAÇÃO DE CACAU ORGÂNICO NA AMAZÔNIA**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A diferença entre a técnica convencional e a técnica de cultivo orgânico está no manejo da plantação, que considera o uso dos nutrientes do solo para a plantação, o manejo de biofertilizantes e combate a pragas por métodos que não causem desequilíbrio ecológico e ambiental, ao invés de produtos químicos e sintéticos. (OLIVEIRA, 2009).

A maioria dos microrganismos que crescem durante o processo de fermentação são provenientes da casca dos frutos, das mãos dos agricultores, do cesto que transportam os frutos, mas principalmente são provenientes dos resíduos da fermentação anterior presente no cocho de madeira e das folhas de bananeira que cobrem a fermentação (SCHAWN; WHEALS, 2004).

A influência da origem do cacau e as práticas de fermentação estão sendo estudadas intensivamente (CAMU et al., 2007; NIELSEN et al., 2007; DANIEL et al., 2009; PPALEXANDRATOU; DE VUYST, 2011). Esses estudos auxiliam no entendimento do impacto das práticas de fermentação na sucessão microbiana. Tem se buscado um maior aprofundamento sobre a comunidade microbiana atuante, sua dinâmica e efeito sobre a qualidade do cacau (HAMDOUCHE et al., 2015).

Não há relatos sobre a diversidade das leveduras durante a fermentação de cacau orgânico na Amazônia. Esta pesquisa foi realizada em Medicilândia, importante localidade produtora de cacau no Brasil, que possui grande número de fazendas com sistema de cultivo orgânico. E o objetivo deste trabalho foi identificar as leveduras durante o processo fermentativo de sementes de cacau produzidos por sistema orgânico e avaliar potencial o enzimático desses importantes microrganismos.



## Artigo submetido à revista *Food Research International* no mês de maio de 2017

Diversidade e potencial enzimático de leveduras durante a fermentação de cacau orgânico na Amazônia

Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated in Amazonian organic cocoa fermentation

### Resumo

A fermentação da semente de cacau tem papel fundamental na formação dos precursores de sabor do chocolate. Esse processo ocorre de forma espontânea nas fazendas cacauceiras e ainda hoje a fermentação possui grandes variações de qualidade. As leveduras são os microrganismos que dominam a fermentação, principalmente na fase inicial com a produção de etanol. Este trabalho teve como objetivo identificar as leveduras envolvidas na fermentação das sementes de cacau orgânico da Amazônia brasileira e avaliar seu potencial enzimático. As espécies dominantes da fermentação foram a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Pichia manshurica*. Foi identificada uma espécie nunca antes relatada em fermentação de cacau, a *Cryptococcus flavus*. A maioria das espécies identificadas demonstraram resistência a altas temperaturas (40°C), com exceção da *C. flavus* que não cresceu em temperaturas maiores que 30 °C. Dentre as espécies identificadas, a *C. flavus* foi a única que apresentou capacidade de produzir as enzimas amilase, lipase e, especialmente pectinase. A atividade da enzima pectinase é importante na degradação da polpa no início da fermentação, período este em que a *C. flavus* foi encontrada. A *P. manshurica* demonstrou uma significativa atividade lipolítica, e foi a única levedura encontrada nos tempos finais de fermentação (120 e 144 horas) onde a temperatura atingiu 42,9°C e pH de 4,1.

Palavras-chave: amilase; *Cryptococcus*; pectinase; *Pichia*; Theobroma

### 1. Introdução

A semente de cacau é a principal matéria prima para a produção do chocolate o que torna a cacauicultura uma atividade agrícola de grande importância econômica, social e ecológica para as regiões de clima tropical úmido (Nielsen et al., 2007; Badri et al., 2013). As sementes do *Theobroma cacao* são adstringentes e precisam ser fermentadas e secas para desenvolver o sabor típico de “chocolate” apreciado por consumidores no mundo todo (Nielsen et al., 2013).

A fermentação é o fator pós colheita de maior importância para o desenvolvimento de sabor da semente de cacau (Thompson et al., 2001; Schwan & Wheals, 2004) e ocorre de forma

espontânea com uma sucessão de microrganismos que envolvem leveduras, bactérias lácticas e acéticas (Crafack et al., 2013). Depois de colhidos, o cacau é aberto manualmente e as sementes, envoltas em polpa, são fermentadas num processo tradicional, em caixas ou em montes, de quatro a sete dias (Visintin et al., 2016).

As leveduras são os primeiros microrganismos que atuam na massa de cacau, especificamente, na polpa ácida e rica em açúcares, que é o substrato inicial para a produção de etanol (Sandhya et al., 2016; Schwan & Wheals, 2004). Estudos demonstram que grande parte dos compostos como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e éster, envolvidos no desenvolvimento do sabor e aroma característico, são formados por reações bioquímicas e enzimáticas que ocorrem dentro do cotilédone durante a fermentação (Pereira et al., 2012; Rodriguez et al., 2012; Crafack et al., 2013; Sanchez et al., 2015).

Há uma grande diversidade das espécies de leveduras durante a fermentação de cacau, e pode variar em função da localidade, sistema de produção dos frutos (convencional e orgânico), condições edafoclimáticas, sistema de fermentação, dentre outros. (Jespersen et al., 2005; Nielsen et al., 2005; Daniel et al., 2009). Em Gana, Daniel et al. (2009) encontraram como dominantes as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* e *Hanseniaspora opuntiae*. Na Nigéria (Jespersen et al., 2005), República Dominicana (Galvez et al., 2007) e Indonésia, o gênero *Candida* foi relatado como o mais frequente. No Brasil, Pereira et al. (2012) classificou *S. cerevisiae* e *Hanseniaspora sp.* como as espécies dominantes no processo de fermentação em cultivares na Bahia.

Não há relatos da diversidade das leveduras em fermentação de cacau produzido por sistema orgânico na Amazônia, e ao mesmo tempo esse sistema de produção tem crescido significativamente nessa região. Por isso este estudo teve como objetivo a identificação das leveduras encontradas na fermentação natural das sementes de cacau orgânico produzidas em Medicilândia, Pará, região norte do Brasil, e avaliar o potencial enzimático destas leveduras.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Fermentação e Coleta das amostras**

Os frutos do cacaueiro (*Theobroma cacao*) de espécie Forastero foram colhidos em Medicilândia, Pará (Latitude de 3°26'45" S, Longitude 52° 53'20" W) no final do mês de junho

de 2015. Os frutos foram quebrados com auxílio de lâminas metálicas e abertos manualmente para a remoção das sementes. As sementes foram colocadas em cochos de madeira (100 x 100 x 20 cm) misturadas com folhas de bananeira e cobertas com sacos de aniagem. Cada cocho recebeu aproximadamente 300kg de semente, após 24 h ocorreu o primeiro revolvimento da massa. Os revolvimentos seguintes ocorreram de 48 em 48h.

O processo de fermentação foi acompanhado durante os sete dias consecutivos e vinte e sete amostras de aproximadamente 300g (retiradas de diferentes pontos e profundidades do cocho) foram coletadas nos tempos de 0, 4, 8, 24, 48, 72, 120, 144 e 168 horas de fermentação, sendo armazenadas em sacos estéril de polietileno e transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPA (LABIOTEC/PPGCTA), da Universidade Federal do Pará. Para análise dos parâmetros da fermentação, foi utilizado termômetro digital devidamente calibrado em três profundidades e em pontos diferentes do cocho para temperatura e para o pH foi utilizado metodologia AOAC (2006) n°970.21 com pHmetro digital.

## 2.2 Análise micológica

Para o isolamento de leveduras foram coletadas 10g de amostra das sementes, e estas foram assepticamente transferidas para sacos estéreis com filtro lateral contendo 90mL de água peptonada a 1% e em seguida homogeneizadas em equipamento (Stomacher, Seward, Inglaterra) por 4 minutos. Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas, até a diluição  $10^{-8}$  onde alíquotas de 100 $\mu$ L foram semeadas através da técnica de plaqueamento de superfície em placas de Petri contendo meio sólido YM com 1% de glicose, 2% de agar bacteriológico, 0,5% peptona (Inlab, Brasil) 0,3% extrato de malte (Kasvi, Brasil) e 0,3% de extrato de levedura (Becto, EUA) e incubadas a 30°C durante 4 dias. Após esse período de incubação as colônias de leveduras foram contadas com o auxílio de uma lupa de um contador de colônias com fundo quadriculado (Phoenix-Luferco), sendo considerada a seleção de placas com número de colônias contido no intervalo de precisão de 25 a 250 e excluída as colônias de fungos filamentosos e bactérias. O resultado da contagem em placas foi expresso em UFC/ml de amostra.

Após diferenciação e contagem, foram selecionadas 30 leveduras predominantes e, foram isoladas em placa de Petri contendo meio sólido YM por esgotamento e incubadas em estufa por 30°C durante 2 dias. Após este período, as leveduras isoladas foram transferidas para tubos

de ensaio contendo 6mL de meio sólido inclinado YEPD com 2% ágar, 2% dextrose, 1% peptona (Inlab, Brasil) e 1% extrato de levedura (Becto, EUA), incubados a 30°C durante 48h e armazenados sob refrigeração a 4°C até sua utilização para extração de DNA.

### 2.3 Extração de DNA de leveduras e Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR)

Para a extração do DNA genômico foi seguido o protocolo descrito por *Sambrook et al.* (2001) com adaptações. As amostras de leveduras isoladas da fermentação natural do cacau foram cultivadas em meio sólido YEPD e incubadas por 48 horas em temperatura de 30°C. Após crescimento, as colônias foram transferidas para microtubos de 2 mL contendo 300 µL de tampão Tris-EDTA (TE – Tris-HCl 1M pH 7.5, EDTA 0,5 M pH 8.0), onde foram adicionados 300 µL de tampão de lise (Tris-HCl 1M pH 9.0 na solução 300 mM, EDTA 100 mM na solução, Sacarose a 50%, Dodecil Sulfato de Sódio a 10%), 300 µL de tampão de homogeneização (Tris-HCl 1 M, NaCl 1 M, EDTA 0,5 M e Sacarose) e 15 µL de proteinase K (10 mg / mL), submetidos a 56°C em banho-maria por 12 horas para ação da enzima. Na segunda etapa da extração, foi utilizado o método clássico de fenol/clorofórmio e suas repetições.

A identificação molecular das leveduras foi realizada baseando-se nos *primers* propostos por Chen et al. (2001) e Fugita et al. (2001), utilizando-se *primers* específicos ITS1 e ITS4, que amplificam as regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do DNA extraído pela técnica de PCR. O fragmento de gene da região ITS1 e ITS2 foram amplificados usando o primer ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

A reação de amplificação foi realizada com 1 M de Betaína, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada dNTP (desoxinucleotídeo trifosfato), 1 mM dos *primers* (ITS1 E ITS4), 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase (Platinum® *Taq*, Invitrogen, Brasil) e 2 µL de DNA, com volume final de 25 µL. As reações de PCR foram realizadas em termociclador (PX2 Thermo Hybaid, RU) com desnaturação inicial à 95°C por 5 min, seguidos por 35 ciclos (94°C/1min, 55,5°C/2 min e 72°C/2 min) e extensão final à 72°C por 10 min. O produto da amplificação foi revelado por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/vol) corado com SyBR® Safe, em tampão TBE 1X (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3), a 69 volts, 60 miliamperes, por 60 minutos usando o marcador de peso molecular (*ladder*) de 100 pb e de 1kb. A visualização do DNA foi realizada com auxílio de um transiluminador UVP (BioImaging Systems).

Os produtos da PCR foram purificados conforme protocolo do fabricante do kit de purificação Big Dye vs. 3. O processo foi realizado em sequenciador eletrônico (Applied Biosystems®,

mod. 3730). As sequências foram geradas com o auxílio do *software* Geneious® (vs. R9) e identificadas no banco de dados virtual Blast© (GenBank).

As reações bidirecionais foram sequenciadas e analisadas num analisador de DNA ABI 3730 (ThermoFisher®). A montagem de seqüências com MAFFT v. 7.2 (Kato & Standley, 2013) e a análise filogenética baseada na máxima verossimilhança foram realizadas utilizando o *software* Geneious R10 (Biomatters). Para análise filogenética, o pacote PHYML (utilizando o modelo de substituição GTR + G, com 1.000 repetições de bootstrap) (Guindon & Gascuel, 2003) implementado no Geneious R10.

## 2.4 Atividade enzimática das leveduras e temperatura crítica

As leveduras depois de isoladas, foram avaliadas quanto ao seu crescimento em diferentes temperaturas (30, 35, 40 e 45°C) por 48h em placas de Petri contendo meio YM.

Para todos os ensaios de atividade enzimática produzidas por leveduras provenientes da fermentação natural do cacau amazônico foram empregados cultivos de até 48 h mantidos à temperatura de 27°C em meio sólido YEPD inclinado e todos os experimentos foram realizados em duplicata. Os meios de cultura específicos para cada prova enzimática, após o preparo foram mantidos e conservados sob refrigeração a 4°C até o momento de sua utilização.

### 2.4.1 Atividade da lipase

A análise foi realizada em meio lipase contendo: 10 g peptona (OXOID, Inglaterra), 5 g de NaCl (VETEC, Brasil), 0,1 g CaCl<sub>2</sub> (NUCLEAR, Brasil), 20 g ágar Base (Merck, Alemanha), 10 mL Tween 20 (VETEC, Brasil), em 1000 mL água destilada. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Uma alíquota (10µL) de cada colônia foi depositada sob uma placa de Petri contendo meio ágar lipase e, em seguida incubada a 27°C por 10 dias. Foram consideradas produtoras de lipase as amostras que produziram um halo opaco ao redor da colônia (MUHSIN et al.,1997).

### 2.4.2 Atividade da Proteinase

A capacidade em secretar proteinase foi detectada pela técnica descrita por Rùchel et al. (1982). Amostras cultivadas por 48h a 30°C em meio YEPD inclinado foram inoculadas em placa de

Petri (10 $\mu$ L) contendo meio de cultura ágar proteinase, preparado conforme segue: **Meio I:** 18 g ágar Base (Merck, Alemanha), 900 mL água destilada; **Meio II:** 11,7 g de YCB (HIMEDIA, Índia), 2 g albumina bovina - Fração V (Sigma, EUA), 2,5 mL Protovit® (Roche, Brasil), 100 mL água destilada estéril. O meio I foi autoclavado por 15 minutos a 121°C e resfriado a 50°C. O meio II foi filtrado em membrana Millipore com porosidade de 0,45  $\mu$ m e acrescentado ao meio I. As placas foram incubadas a 37°C, e a leitura realizada no décimo dia. A presença da enzima foi detectada pela formação de um halo transparente ao redor das colônias.

A análise dos resultados foi realizada através do cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro mais o halo produzido (dcd), proposto por Price et al. (1982). Esta equação representa a produção enzimática (**PE**);

$$PE = dc \div dcd \quad (2)$$

Segundo Price et al. (1982):

PE = 1,0; indica que o microrganismo não é produtor da enzima;

PE  $\geq$  0,64 < 1; indica que o microrganismo é positivo, produtor da enzima;

PE < 0,64; indica que o microrganismo é fortemente positivo, produtor de enzima.

O diâmetro da colônia e do halo será medido com o paquímetro digital (ABSOLUTE – Mitutoyo Products, Brasil).

### 2.4.3 Atividade da Amilase

Para avaliar o potencial de produção de amilase foi utilizada a metodologia de Khokhar, Mukhtar e Mushtaq (2011) com algumas adaptações. O meio ágar sal mineral constituiu de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,0 g.L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>; 1,0 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01 g.L<sup>-1</sup> de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar; e como fonte de carbono utilizou-se amido solúvel (20,0 g.L<sup>-1</sup>). O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 e posteriormente foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Foram vertidos 20 mL do meio em placas estéreis. Cada levedura previamente isolada foi repicada (10 $\mu$ L) para uma placa contendo o meio ágar sal mineral solidificado. As placas foram depositadas em estufa de incubação à 30°C durante 72 h. Percorrido esse período foi realizada a revelação do halo de degradação do amido com solução de lugol. Foram adicionados 15 mL da solução sobre a superfície das placas e descartados logo após. Posteriormente as placas foram

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

#### 2.4.4 Atividade da Pectinase

O potencial pectinolítico das leveduras previamente isoladas foi avaliada por crescimento em meio ágar sal mineral (2,0 g.L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>; 1,0 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g.L<sup>-1</sup> de KCl; 0,01 g.L<sup>-1</sup> de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar;) suplementado com pectina cítrica (10,0 g.L<sup>-1</sup>), conforme metodologia adaptada de Reddy e Sreeramulu (2012). O pH inicial do meio foi ajustado para 7.0 e posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Foram adicionados 20 mL do meio em placas estéreis. Uma alçada da colônia de levedura (10µL) previamente isolada foi inserida na placa e incubadas em estufa de crescimento microbiano a 30°C durante três dias. O halo de degradação da pectina foi observado por meio da adição de 15mL de solução de Lugol com posterior descarte. Após o descarte da solução foi observado instantaneamente à formação de zonas claras ou amareladas ao redor da colônia, evidenciando assim a atividade pectinolítica.

### 2.5 Análise Estatística

Para todos os resultados obtidos foram calculadas média, desvio padrão, coeficiente de variação e teste de médias Tukey com o auxílio do programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT INC., 2004).

## 3. Resultados

### 3.1 Temperatura, pH e Crescimento de Leveduras

Os valores médios de temperatura e pH das sementes de cacau são apresentados nas figuras 1 e 2, respectivamente.

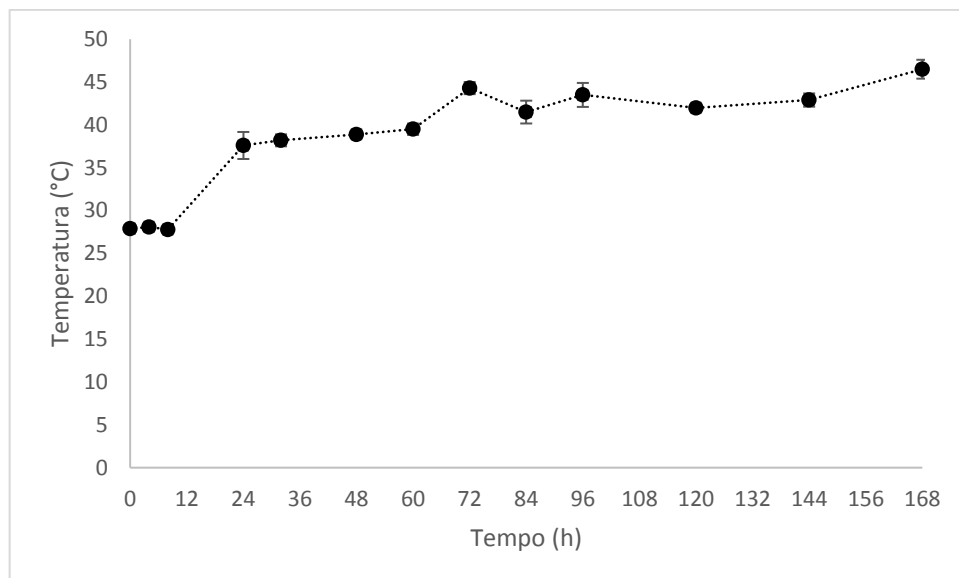


Figura 1. Média da temperatura aferida nos tempos de fermentação do cacau.

A temperatura aferida durante o período de fermentação das sementes de cacau (Figura 1), apresentou um aumento de 10°C após as 24 horas iniciais. Em 72 horas, a temperatura das sementes ultrapassaram 40°C, e seguiu oscilando até atingir a máxima com 7 dias de fermentação (46,5°C).

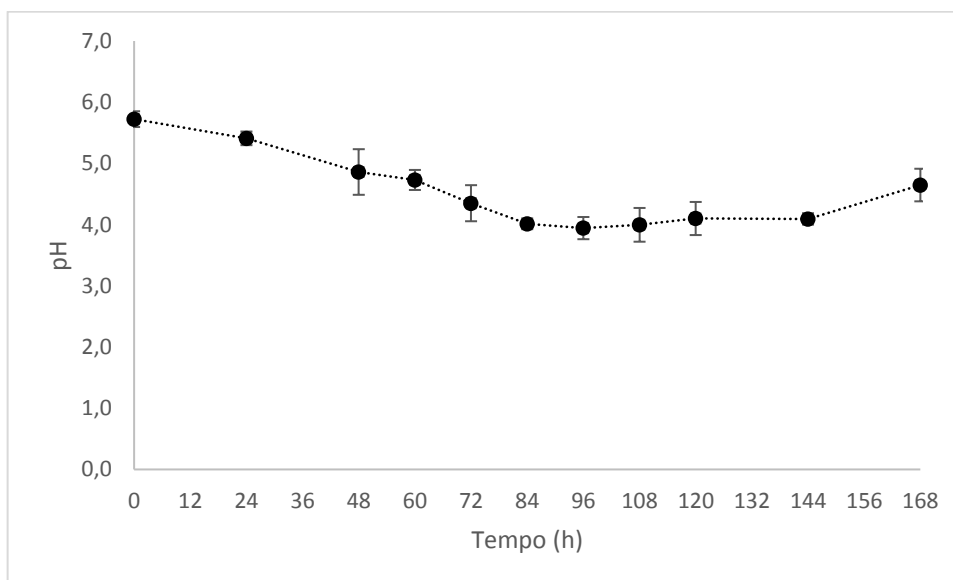


Figura 2. Média do pH aferido nos tempos de fermentação do cacau.



Os valores médios de pH, Figura 2, decresceram durante a fermentação, tendo o seu valor máximo no início da fermentação com a semente fresca de cacau ( $5,72 \text{ mL NaOH} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e o mínimo após as 96h ( $3,94\text{mL NaOH} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

A contagem de colônias de leveduras (Figura 3), mostra crescimento a partir do tempo 4 h. As leveduras cresceram mais na fase inicial da fermentação, tendo sua maior população em 24 h ( $1,75 \cdot 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Nos tempos 72, 96 e 168 não houve contagem, pois o resultado do UFC/ml ficou abaixo de  $10^2$ , o que demonstra que o meio utilizado não foi viável para recuperar as células.

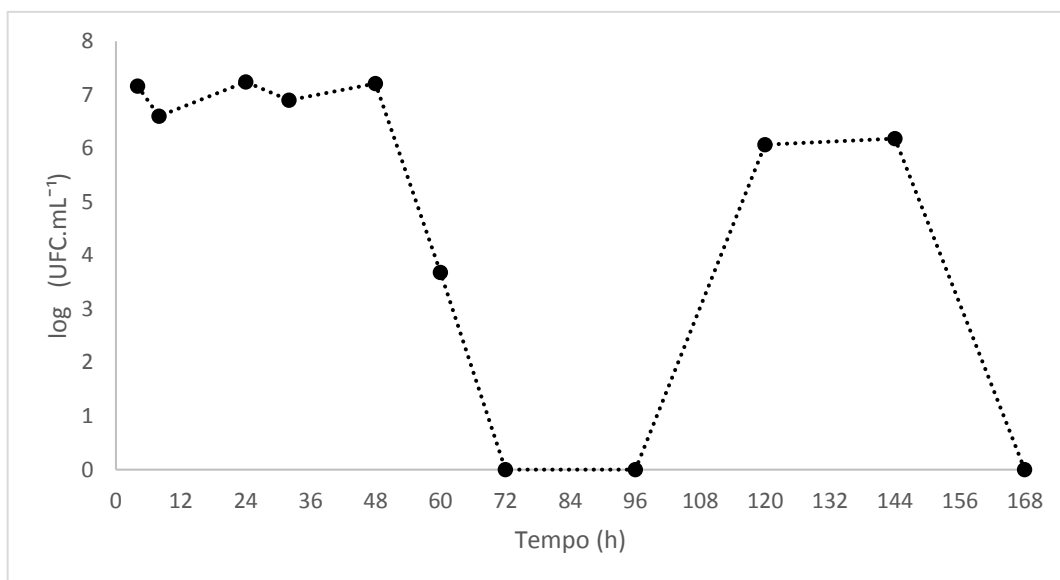


Figura 3. Crescimento de colônias de leveduras ( $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) durante o processo de fermentação.

### 3.2 Identificação das espécies Isoladas

A Figura 4 mostra a distribuição das espécies de leveduras durante a fermentação de cacau orgânico.

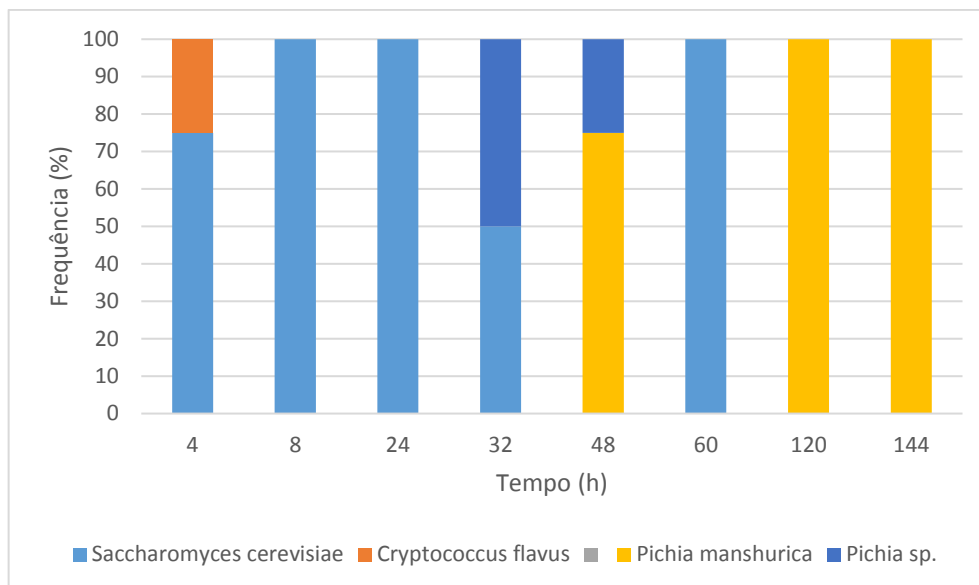


Figura 4. Identificação das leveduras amazônicas e o tempo em que foram isoladas.

Conforme apresentado na Figura 4, as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia manshurica* apresentaram maior diversidade de linhagens. A espécie *Cryptococcus flavus* encontrada nas primeiras quatro horas de fermentação não havia sido relatada anteriormente em fermentação de cacau.

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi encontrada até o tempo de 60 horas, enquanto que a *Pichia manshurica* isolada em 48 horas tornou-se dominante e exclusiva na fermentação a partir de 120 horas, que mostra que esta espécie de levedura é termo resistente.

A figura 5 mostra que as linhagens de *S. cerevisiae* (11 linhagens) apresentam um menor polimorfismo na sequência ITS1/ITS2 do DNAr diferente das cepas *P. manshurica* (10 linhagens) que foram divididas em 3 grupos por apresentar um maior polimorfismo dessa região amplificada.

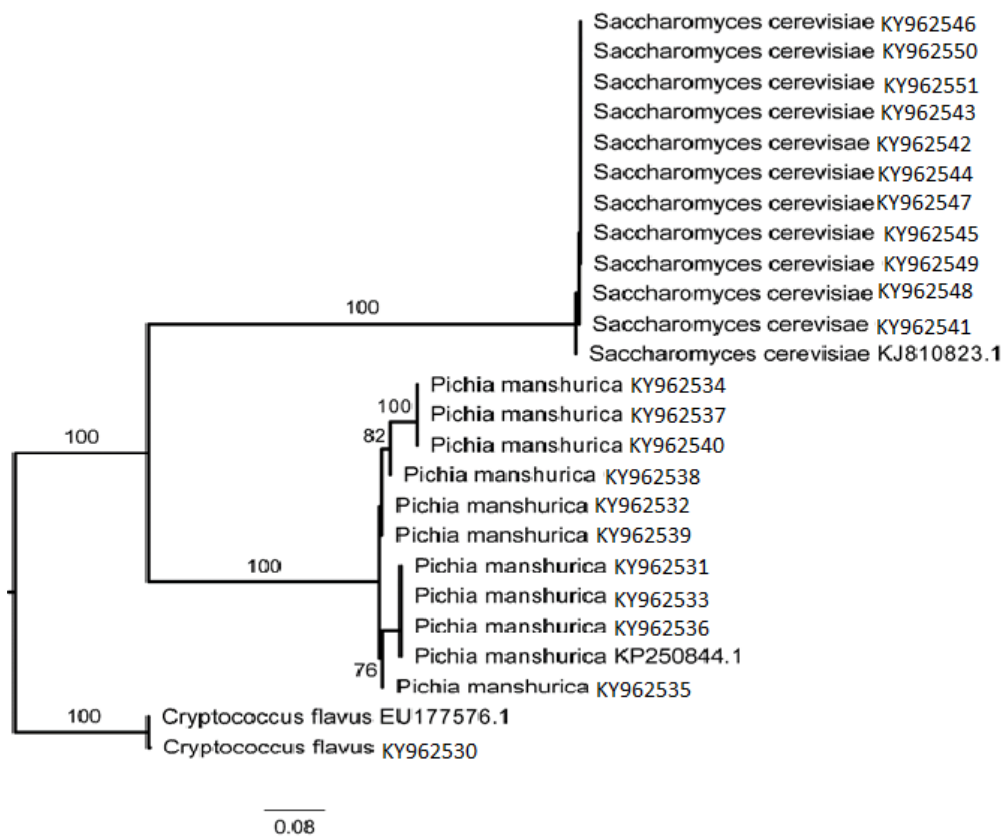


Figura 5: Árvore filogenética das linhagens de leveduras isoladas do cacau amazônico. A região ITS1/ITS2 e 5.8S foi amplificada por PCR.

### 3.4 Atividade enzimática e temperatura crítica de crescimento

O cálculo da atividade enzimática foi feito a partir do tamanho da colônia e com o diâmetro total do halo formado, e todos os resultados foram menor que 0,64, indicando que o microrganismo é fortemente positivo, ou seja, um bom produtor da enzima estudada. Na Tabela 1 temos os resultados da atividade enzimática e da temperatura crítica por levedura.

A cepa *C. flavus* não apresentou tolerância a temperaturas maiores que 30°C, o que claramente indica o motivo pelo qual ela aparece somente no primeiro tempo de fermentação. As outras espécies cresceram até 40°C, demonstrando uma maior tolerância a temperatura.

Tabela 1: Valores de temperatura crítica e os resultados obtidos na avaliação de atividade enzimática das cepas isoladas.

Leveduras	Tempo	Acesso	TC (°C)	Amilase	Lipase	Pectinase	Proteinase
		<b>BLAST</b>					
<i>Cryptococcus flavus</i>	4	FN4289421	30	0,3	0,46	0,28	*
<i>Pichia sp.</i>	32	KP223718.1	40	*	0,33	*	*
<i>Pichia sp.</i>	48	JN900496.1	40	*	0,46	*	*
<i>Pichia manshurica</i>	48	KM368827.1	40	*	0,43	*	*
<i>Pichia manshurica</i>	120	KP132515.1	40	*	0,3	*	*

TC – Temperatura crítica, \*Sem presença de halos.

Quanto a produção de atividade enzimática, a cepa *Cryptococcus flavus*, se mostrou versátil pois apresentou resposta positiva nos testes quanto a amilase, lipase e pectinase e todas as linhagens do gênero *Pichia* apresentaram produção de lipase. Nenhuma cepa demonstrou atividade de protease.

#### 4. Discussão

A fermentação da semente de cacau está sendo estudada em várias regiões produtoras como, Costa do Marfim, Gana, Indonésia, República Dominicana, Austrália e Brasil (Ardhana & Fleet, 2003; Camu et al., 2007; Galvez et al., 2007; Nielsen et al., 2007; Daniel et al., 2009; Papalexandratou et al., 2011; Pereira et al., 2013; Ho, Zhao & Fleet, 2014; Hamdouche et al., 2015; Maura et al., 2016; Visintin et al., 2016), contudo, o estudo com o cacau brasileiro amazônico é bastante escasso. Com isso, a fermentação da semente de cacau de Medicilândia, maior produtor de sementes de cacau do norte do Brasil, foi acompanhada para avaliação do processo local bem como isolar e identificar as leveduras presentes.

Das 30 leveduras isoladas, quatro espécies foram identificadas envolvidas nesse processo de fermentação. *P. Manshurica* e a *S. cerevisiae* foram as espécies dominantes. A *S. Cerevisae* já havia sido relatada como dominante na fermentação brasileira e também em Gana e Malásia

(Daniel et al., 2009; Papalexandratou et al., 2013; Pereira et al., 2012), porém, em um mesmo país temos diferentes linhagens de leveduras dominantes para cada região produtora. Em Gana, as linhagens reportadas como dominantes por Nielsen et al. (2007) são *H. Guilliermondii* e *P. Membranifaciens* e por Daniel et al., (2009) são *P. Kudriavzevii* e *H. Opuntiae*. Em Costa do Marfim, as leveduras dominantes foram identificadas como *H. Opuntiae* (Hamdouche et al., 2015) *Hyphopichia burtonii* e *Meyerozyma caribbica* (Papalexandratou & De Vuyst, 2001) *S. Cerevisae* (Visintin et al., 2016) ou *P. kudriavzevii* e *Candida nitratorans* (Samagaci et al., 2016).

A cepa *C. flavus*, encontrada no início do processo de fermentação e em menor quantidade, não havia sido identificada em outro país e pode ser específica da fermentação de cacau de Medicilândia. Samagaci et al., (2016) entretanto, não exclui a possibilidade de que leveduras que são encontradas nessa fase do processo serem somente contaminantes trazidos pelos utensílios ou pelo ambiente, não caracterizando a fermentação local.

Uma característica interessante observada no processo de fermentação de cacau orgânico na Amazônia foi que a espécie *S. cerevisiae* foi dominante nos primeiros dias de fermentação (até o tempo 60h) e a espécie *P. manshurica* dominou os dias seguintes, com uma sucessão bem definida. A distribuição temporal observada no estudo de Daniel et al., (2009) indicou uma preferência da espécie *H. opuntiae* pelos primeiros tempos de fermentação (até 48 h) porém as cepas *P. kudriavzevii* e *S. cerevisiae* cresciam em ambas as fases.

As leveduras foram analisadas quanto à produção de enzimas e o que foi observado foi que a levedura *Cryptococcus flavus*, se mostrou uma cepa versátil pois apresentou resposta positiva nos testes quanto a amilase, lipase e pectinase. Samagaci et al. (2016) em seu estudo, investigaram as leveduras pectinolíticas provenientes de uma fermentação da Costa do Marfim e os resultados revelaram que dentre sete espécies isoladas somente as cepas de *Candida nitratorans* e as de *Pichia Kudriavzevii* foram hábeis em hidrolisar a pectina presente nas placas.

Em um estudo de Blanco et al. (1999), relativo a degradação da massa de cacau, algumas cepas de leveduras foram testadas quanto à atividade da pectinase e as *S. cerevisiae* apresentaram melhor resultado, seguido da *C. ethanolica*. Visintin et al. (2016) estudaram a fermentação do cacau africano, e das cepas isoladas, somente 19% foram capazes de degradar a pectina. Nesse estudo somente a cepa *C. flavus* (Figura 8B) apresentou atividade pectinolítica e as cepas de *S. cerevisiae* não apresentaram atividade enzimática, porém nem todas cepas passaram por testes

enzimáticos, já que foram selecionadas uma amostra aleatória do total de colônias crescidas em cada tempo, logo, leva-se a crer que, algumas cepas de *S. cerevisiae* não isoladas mas presentes na fermentação do cacau amazônico apresentem essa atividade.

Das 30 leveduras isoladas da fermentação do cacau de Medicilândia, aproximadamente 30% apresentaram atividade enzimática para lipase, sendo que todas eram do gênero *Pichia*. A semente fresca de cacau possui em sua composição aproximadamente 40% de lipídeos (LOPEZ; DIMICK, 1995), sendo principal composição da manteiga de cacau, porém não há estudos relacionados à ação da lipase excretada por leveduras presentes no processo de fermentação com a degradação dessas moléculas.

A degradação das proteínas presente nos cotilédones em peptídeos e aminoácidos livres parece ter papel central para a formação dos aromas típicos do chocolate, diz Afoakwa (2010) porém nenhuma cepa neste estudo apresentou resultados para a produção de protease.

Somente a *C. flavus* apresentou resultados positivos para a atividade de amilase. Alguns estudos (BARROS et al.,2009; WANDERLEY et al.,2004) demonstraram a ação da enzima  $\alpha$ -amilase produzida por essa levedura, confirmando os resultados relatados. A ação dessas enzimas sobre o amido é rápida, uma vez que elas apresentam muito maior atividade sobre substratos de alta massa molecular, gerando uma mistura de oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares, chamada dextrina ou maltodextrina (KOBBLITZ, 2014).

## 5. CONCLUSÃO

Foi identificada a espécie *Cryptococcus flavus* que é inédita no processo de fermentação de cacau e pode caracterizar a proveniência e/ou sistema de cultivo orgânico do cacau amazônico. A capacidade enzimática desta espécie se destacou pela ótima produção extracelular de pectinase, amilase e lipase. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* dominou as primeiras horas do processo fermentativo. A *Pichia manshurica* foi encontrada tanto na fase inicial da fermentação quanto nos tempos finais. Isso demonstra a resistência desta espécie às variações do meio fermentativo e sua influência no processo. Todas as espécies do gênero *Pichia* apresentaram significativo potencial lipolítico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. Wiley Blackwell Publishers, Oxford, UK, pp 20–22, 2010.

AFOAKWA, E. O., PATERSON, A., FOWLER, M., RYAN, A. (2008). 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., QUAO, J., BUDU, A. S., TAKRAMA, J., SAALIA, F. K. Effect of pulp pre-conditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 62, p. 755-764, 2011.

AFOAKWA, E. O., QUAO, J., TAKRAMA, F. S., BUDU, A. S., SAALIA, F. K. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **International Food Research Journal**, v. 19, p. 1071-1077, 2012.

ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 87-99, 2003.

BARROS, M.C., SILVA, R.N., RAMADA, M.H.S., GALDINO, A.S., MORAES, L.M.P., TORRES, F.A.G., ULHOA, C.J. The influence of N-glycosylation on Biochemical properties of Amy -1, an  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1682-1686, 2009.

BLANCO, P., SIEIRO, C., VILLA, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**.v.175, p. 1-9, 1999.

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

CHEN, Y.C., EINER, J.D., KATTAR, M. M., BARRET, S.L.R., LAFE, K., BUI, U., LIMAYE, A.P., COOKSON, B.T. Polymorphic Internal Transcribed Spacer region 1 DNA Sequences identify medically important yeasts. **Journal of clinical microbiology**, p. 4042-4051, 2001.

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

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

FUJITA, S. I., SENDA, Y., NAKAGUCHI, S., HASHIMOTO, T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3617–3622. 2001.

GALVEZ, S.L., LOISEAU, G., PAREDES, J.L., BAREL, M., GUIRAD, J.P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of food Microbiology**,v. 114, p. 124-130, 2007.



- HAMDOUCHE, Y., GUEHI, T., DURAND, N., KEDJEBO, K. B. D., MONTET, D., MEILE, J.C. Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. **Food control**, v.48, p. 117-122, 2015.
- HO, V.T.T., ZHAO, J., FLEET, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.174, p. 72-87.
- JESPERSEN, L., NIELSEN, D. S., HONHOLT, S., & JAKOBSEN, M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeasts Research**, v. 5, p. 441-453; 2005.
- KHOKHAR, I. B.; MUKHTAR, I.; MUSHTAQ, S. Isolation and screening of amylolytic filamentous fungi. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 15, n. 1, p. 203-206, 2011.
- KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos**. Teoria e Aplicações práticas. Editora RBE; 2014.
- LOPEZ, A.S.; DIMICK, P.S. **Cocoa fermentation**. **Enzymes, biomass, food and feed** (p 561-577), 1995.
- MOREIRA, I.M.V., MIGUEL, M.G.C.P., DUARTE, W.F., DIAS, D.R., SCHAWN, 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.
- MUHSIN, T.M., AUBAID, A.H., AL DUBOON, A.H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Micoses**, p. 465-469, v. 40, 1997.
- NIELSEN, D. S; TENIOLA, O.D., BAN-KOFFI L., OWUSU, M., ANDERSSON, T.S., HOLZAPFEL, W.H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 168-186, 2007.
- NIELSEN, D.S., HONHOLT, S., TANO-DEBRAH, K., JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast** v.22 (4), p.271–284, 2005.
- PAPALEXANDRATOU, Z., FALONY, G., ROMANENS, E., JIMENEZ, J. C., AMORES, F., DANIEL, H.-M. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 7698-7714, 2011.
- PAPALEXANDRATOU, Z.; DE VUYST, L. Assessment of the yeast species diversity of cocoa bean fermentations in different cocoa producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS Yeast Research**, v.11, p. 564-574, 2011.
- PARACHIN, N.S., SIQUEIRA, S., FARIA, F.P., TORRES, F.A.G., MORAES, L.M.P. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of *CfXYNI* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 59, p. 52-57, 2009.
- PEREIRA, G. V. D., MIGUEL, M., RAMOS, C. L., SCHWAN, R. F. Microbiological and physico-chemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 5395-5405, 2012.

- RAMOS, C.L., THORSEN, L., SCHAWN, R.F., JESPERSEN, L. Strain specific probiotics properties of lactobacillus fermentum, lactobacillus plantarum and Lactobacillus brevis isolates from Brazilian food products. **Food Microbiology**. v. 36, p. 22-29, 2013.
- REDDY, P. L.; SREERAMULU, A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v. 1, n. 3, p. 186-193, 2012.
- SAMAGACI, L., OUATTARA, H., NIAMKE, S., LEMAIRE, M. *Pichia kudrazevii* and *Candida nitrativorans* are the most well-adapted and revelant yeast species fermenting cocoa in Agneby-Tiassa, a local Ivorian cocoa producing region. **Food Research International**, v. 89, p. 773-780; 2016.
- 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.
- VISINTIN, S., ALESSANDRIA, V., VALENTE, A., DOLCI, P., COCOLIN, L. Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. **International Journal of Food Microbiology** v. 216, p. 69-78; 2016
- WANDERLEY, K.J., TORRES, F.A.G., MORAES, L.M.P., ULHOA, C.J. Biochemical characterization of a  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology letters**, v. 231, p. 165-169, 2004.