



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

SILVANA DE FÁTIMA OLIVEIRA DE ALMEIDA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA
DE BACTÉRIAS ACÉTICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CACAU
(*Theobroma cacao* L.)**

BELÉM - PA

2013



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

SILVANA DE FÁTIMA OLIVEIRA DE ALMEIDA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA
DE BACTÉRIAS ACÉTICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CACAU
(*Theobroma cacao* L.)**

Orientador: Prof. Dr^a: Alessandra Santos Lopes

Co-orientador: Prof. Dr^a: Vanessa Albres Botelho

BELÉM - PA

2013

SILVANA DE FÁTIMA OLIVEIRA DE ALMEIDA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA
DE BACTÉRIAS ACÉTICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CACAU
(*Theobroma cacao* L.)**

Dissertação IV de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Avaliada em: 28/02/2013

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr^a. Alessandra Santos Lopes – Orientadora

(PPGCTA/ITEC/UFPA)

Prof. Dr^a. Vanessa Albres Botelho – Co-Orientadora (FEA/ITEC/UFPA)

Dr^a. Elisa Ferreira Moura (Embrapa/CPATU)

Prof. Dr^a. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço (PPGCTA/ITEC/UFPA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a “**Deus**”, por toda força que a mim foi dada. Sem Sua ajuda não teria chegado até aqui;

À minha mãe pelo apoio durante essa caminhada. Peça fundamental para o alcance dos meus objetivos;

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

A Prof^a. Vanessa Albres, por toda dedicação, empenho e paciência, nas horas mais difíceis desta conquista. O meu muito "obrigada";

Ao "meu amor", por todo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis deste trabalho;

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

À minha família pela torcida;

As professoras Lúcia Lourenço e Elisa Moura, pela contribuição durante todo este trabalho;

Ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, e as suas técnicas D. Suely e D. Célia, que me auxiliaram e foram partes essenciais desta pesquisa;

Ao Laboratório de Fontes Amiláceas e Produtos Açucarados (LAFAMI) da Universidade Federal do Pará;

A alguns amigos que conheci e me ajudaram nessa conquista; Danilo, Mayara, Fabiane, Giseli, Joyce, Cláudia, Valena, Sthefano, Cyntia.

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;

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	V
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1.....	3
ESTUDO DA DIVERSIDADE DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS NA FERMENTAÇÃO DO CACAU AMAZÔNICO: UMA REVISÃO.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 O CACAU.....	4
1.1.1 Aspectos gerais.....	4
1.1.2 Variedades.....	4
1.1.3 Fermentação das sementes do cacau.....	6
1.1.4 Diversidade microbiana no cacau.....	8
1.1.5 Características e metabolismo das bactérias acéticas.....	9
1.1.6 Seleção das bactérias acéticas.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
CAPÍTULO 2.....	16
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	16

2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 MATERIAL.....	17
2.1.1 Amostras	17
2.2 METODOLOGIA.....	17
2.2.1 Fermentação natural da semente do cacau	17
2.2.2 Coleta das amostras	18
2.2.3. Caracterização físico-química	18
2.3 MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO DO CACAU.....	19
2.3.1 Swab de superfície das cascas e frutos do cacau	19
2.3.2 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas	19
2.3.3 Isolamento de bactérias acéticas	19
2.3.4 Caracterização bioquímica das linhagens isoladas e identificadas como gêneros <i>Acetobacter</i> e <i>Gluconobacter</i>	20
2.3.4.1 Produção de H₂S, Indol e Motilidade	20
2.3.4.2 Produção de pigmento marrom	21
2.3.4.3 Crescimento a 30% de glicose	21
2.3.4.4 Oxidação completa de etanol	21
2.4 DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>Acetobacter</i> e <i>Gluconobacter</i>	21
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA.....	22
3.2 MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO DO CACAU - <i>Swab</i> de superfície.....	24
3.3 CONTAGEM DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS.....	25

3.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ACÉTICAS.....	26
3.5 DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>Acetobacter</i> e <i>Gluconobacter</i>	30
4. CONCLUSÃO.....	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXO I.....	35

RESUMO

A fermentação do cacau é realizada por microrganismos, dentre eles leveduras, bactérias acéticas e lácticas, que são responsáveis pelas reações bioquímicas que ocorrem ao longo da fermentação. Países como, Gana, República Dominicana, Costa do Marfim e Indonésia, já realizaram estudos sobre as bactérias acéticas atuante na fermentação do cacau, porém tem-se percebido que esta variabilidade é influenciada devido às condições climáticas e fatores do processo fermentativo como: duração, disponibilidade de substrato e condições de pH favoráveis para a multiplicação microbiana no decorrer do processo fermentativo. Devido ao crescente interesse internacional na região amazônica, este estudo foi conduzido com o intuito de isolar e identificar bactérias acéticas presentes no cacau amazônico. No processo fermentativo foi confirmada a contaminação por *Staphylococcus aureus*, nas cascas dos frutos e nas folhas de bananeiras. Os parâmetros físico-químicos avaliados durante as três fermentações confirmou a importância da relação do crescimento microbiano em função dos valores de pH e temperatura favoráveis para o desenvolvimento das bactérias acéticas e aeróbias mesófilas. Foram isoladas 81 cepas de bactérias acéticas sendo 37 caracterizadas do gênero *Acetobacter* e 44 como *Gluconobacter*, o melhor tempo de crescimento foi com 48 horas de fermentação, devido condições ideais de pH e temperatura e a maior disponibilidade de nutrientes no meio. Os isolados foram submetidos a testes bioquímicos para diferenciação em nível de espécie, sendo identificadas duas espécies do gênero *Acetobacter* e nenhuma do gênero *Gluconobacter*. As espécies *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurins*, foram as duas espécies encontradas. Para a espécie *A. aceti* foram identificadas 14 cepas nos tempos 12, 24 e 36 horas de fermentação, já a espécie *A. pasteurins* foram encontradas 4 cepas no tempo 96.

Palavras-chave: Cacau, Microorganismos, Fermentação, *Acetobacter*, *Gluconobacter*.

ABSTRACT

The fermentation of cocoa is made by microorganisms, including yeasts, lactic and acetic bacterias, which are responsible for the biochemical reactions that occur throughout the fermentation. Countries like Ghana, Dominican Republic, Ivory Coast and Indonesia, has conducted studies about acetic bacteria active in the fermentation of cocoa, But it has been perceived that this variability is influenced due to climatic conditions and factors from fermentation process, such as: duration, availability of substrate and pH conditions favorable for microbial growth during the fermentation process. Due to the crescent international interest in the Amazon region, this study was conducted in order to isolate and identify acetic bacteria present in cocoa Amazon. In the fermentation process was confirmed contamination by *Staphylococcus aureus* on peels of fruits and leaves of banana trees. The physico-chemical parameters evaluated during the three fermentations confirmed the importance of the microbial growth in function of pH and temperature favorable for the development of acetic bacteria and aerobic mesophilic. Were isolated 81 strains of acetic bacteria, which 37 characterized the genus *Acetobacter* and 44 *Gluconobacter* with the best growth time on 48 hours of fermentation, because the ideal conditions of pH and temperature and higher nutrient availability in the environment. The isolates were submitted to biochemical tests to differentiate the species level, where were identified two species of the genus *Acetobacter* and any of *Gluconobacter* genus. The species *Acetobacter aceti* and *pasteurins*, were the two species found. For the species *A. aceti* were identified 14 strains in time 12, 24 and 36 hours fermentation, while for the species *A.pasteurins*, four strains were found at time 96.

Keywords: Cocoa, Microorganisms, Fermentation, *Acetobacter*, *Gluconobacter*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cacau Crioulo e Forasteiro	5
Figura 2: Fermentação natural do cacau.....	6
Figura 3: Esquema da caixa T60, proposta por Grimaldi (1978).....	17
Figura 4: Média da temperatura (A) e pH (B), durante a fermentação (n=3) de cacau.....	22
Figura 5: Média da Contagem de bactérias aeróbias mesófilas durante a fermentação.....	25

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Diferenças bioquímicas entre os principais gêneros encontrados na fermentação do cacau.....	11
Tabela 2. Média da contagem de cepas de coliformes totais e <i>S. aureus</i> em amostras da casca de frutos do cacau e em folhas de bananeira.....	24
Tabela 3. Distribuição dos isolados de bactérias acéticas durante as três fermentações.....	26
Tabela 4. Diferenciação bioquímica dos gêneros de bactérias do ácido acético.....	28
Tabela 5. Tabela 5. Diferenciação das espécies do gênero <i>Acetobacter</i> na fermentação do cacau amazônico.....	30

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACIDH – Acetato Desidrogenase

AIDH – Álcool Desidrogenase

AOAC – Métodos Oficiais de Análises

BP – Ágar Baird-Parker

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

ERJOH – Estação Experimental de Recursos Genéticos José Haroldo

FAO - Food and Agriculture Organization

G - Grama

H₂S - Ácido Sulfídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LST – Caldo Lauril Sulfato Triptose

LAFAMI – Laboratório de Fontes Amilácias e Produtos Açucarados

NaOH - Hidróxido de sódio

NMP – Número Mais Provável

PCA – Ágar Padrão

pH - Potencial Hidrogeniônico

PPM – Produção de Pigmento Marrom

SIM – Ágar Semi Sólido

TSA – Ágar Triptona de Soja

UFC – Unidade Formadora de Colônia

° C – Celsius

% - Porcentagem

INTRODUÇÃO

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).

A fermentação do cacau é realizada por vários microrganismos: leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas, e cada grupo se desenvolve de acordo com as condições propícias do meio. As condições iniciais de anaerobiose permite o crescimento de leveduras que produzem etanol a partir dos açúcares presentes na polpa. Além disso, as leveduras pectinolíticas removem a polpa, permitindo a entrada de ar na massa (SCHWAN et al., 1996; SCHWAN; WHEALS, 2004). Em sequência as bactérias lácticas convertem etanol e o ácido cítrico presente na polpa em ácido lático e, quase que paralelamente as bactérias acéticas produzem ácido acético a partir da oxidação do etanol (HONORÉ et al., 2010).

A difusão do ácido acético no meio resulta principalmente na perda de germinação da semente e nas reações enzimáticas no interior das sementes (WOLLGAST; ANKLAN, 2000; SCHWAN; WHEALS, 2004). O ácido acético, atua diretamente na hidrólise das proteínas e da sacarose, liberando aminoácidos livres e açúcares redutores, e na mudança de pH que atua indiretamente na ativação de enzimas do germen e do cotilédone.

A atividade das bactérias acéticas é essencial para a produção de chocolate com alta qualidade, pois as mesmas atuam também na oxidação das antocianinas e condensação das proteínas com os taninos, sendo que esta última reação favorece a perda de adstringência para a qualidade do chocolate (BRITO et al., 2000).

Estudos realizados sobre a diversidade de espécies de bactérias acéticas envolvidas na fermentação do cacau em Gana e na República Dominicana observaram que a variabilidade da microflora é influenciada devido às condições climáticas e fatores do processo fermentativo como: duração, disponibilidade de substrato e condições de pH favoráveis para a multiplicação

destas no decorrer do processo fermentativo (ARDHANA; FLEET, 2003; CAMU et al., 2007).

Tendo em vista o papel importante das bactérias acéticas para a qualidade do chocolate e a escassez de pesquisas sobre a fermentação do cacau e sua microflora na região amazônica, este estudo teve como objetivo a caracterização bioquímica das bactérias acéticas do cacau amazônico.

CAPÍTULO 1

ESTUDO DA DIVERSIDADE DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS NA FERMENTAÇÃO DO CACAU AMAZÔNICO: UMA REVISÃO

1. INTRODUÇÃO

A fermentação do cacau é realizada essencialmente por microrganismos dentre eles as bactérias acéticas tem sido frequentemente estudadas na fermentação em vários países, devido seu papel fundamental durante o processo fermentativo.

Com a multiplicação das bactérias acéticas na fermentação do cacau, ocorre a produção de ácido acético e este desempenha um papel importante na hidrólise das proteínas no cotilédone. Além disso, o ácido é responsável pela permeabilização das enzimas excretadas pelas leveduras e, juntamente com o ácido láctico oferecem condições ideais de pH para as reações enzimáticas no interior das sementes na fase de quimiofermentação (CAMU et al., 2008).

A fase de quimiofermentação processa-se independentemente da presença de células vivas, enzimas presentes no interior das sementes, tais como; glicosidases, proteases e polifenoloxidasas são ativadas, devido à difusão do conteúdo celular e mudança do pH no meio, ocorre também a morte da semente, que a partir deste momento se denomina amêndoa (FORSYTH; QUESNEL, 1963; ZAHOU LI et al., 2010).

Embora todas as fases da tecnologia pós-colheita do cacau sejam importantes para a obtenção de um cacau comercial de boa qualidade, é durante a fermentação que ocorrem as transformações mais acentuadas no exterior e no interior das sementes (FERRÃO, 2008).

Esse capítulo tem como objetivo realizar uma revisão sobre a fermentação do cacau, técnicas de isolamento e identificação de colônias de bactérias do ácido acético, usando testes bioquímicos convencionais.

1.1 O CACAU

1.1.1 Aspectos gerais

No cenário internacional do cacau, segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), desde meados da década de 1990, o Brasil vem ocupando a quinta maior produção dentre os países produtores, atrás da Costa do Marfim, Indonésia, Gana e Nigéria. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produziu 200,00 mil toneladas de cacau (amêndoa) em 2011, sendo as Regiões Norte/ Nordeste responsáveis por mais de 96% dessa produção.

A cacauicultura 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 (CEPLAC, 2010).

O Pará é o segundo maior produtor brasileiro de cacau, sendo o Estado da Bahia o primeiro. Segundo o IBGE, a safra 2011/2012, produziu 60 mil toneladas, com um crescimento aproximadamente de 25%.

1.1.2 Variedades

O cacau é um fruto muito popular, pois a partir de sua semente é obtido um dos alimentos mais conhecidos e apreciados: o chocolate. Seu sabor é condicionado não apenas a atributos genéticos do cacauzeiro (variedade), como também a modificações que ocorrem durante seu beneficiamento (BECKETT, 1994).

Existem três subespécies de (*Theobroma cacao* L.) que são mais utilizadas na produção de chocolate, o Crioulo, variedade mais cultivada na América Central e do Sul, Forasteiro, variedade do alto e baixo Amazonas no Brasil (THOMPSON, 2001), e o Trinitário é a última espécie resultante da hibridização entre Forasteiro e Crioulo. As variedades Trinitário e Crioulo produzem um chocolate considerado de qualidade excelente e suave aroma e sabor (BECKETT, 1997).

Os frutos do cacau Crioulo são caracterizados pelas sementes brancas ou de coloração púrpura muito clara, o que está relacionado com a pouca ou nenhuma quantidade de antocianinas encontrada nessas sementes (ELWERS et al., 2009).



Fonte: EMBRAPA (2011)

Figura 1. Cacau Crioulo e Forasteiro respectivamente

A variedade 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).

O cacau pertencente ao grupo Forasteiro é a variedade mais difundida mundialmente, sendo predominante no Brasil na região da Bahia e Amazônica (CEPLAC, 1998).

A variedade Trinitário apresenta sementes que variam de amarelo ao roxo. O chocolate originado desta variedade é considerado de qualidade intermediária sendo cultivado na Malásia e Indonésia (BECKETT, 1997).

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: Maraño, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional e Guiana, ao invés da classificação tradicional em Crioulo, Forasteiro e Trinitário (MOTAMAYOR et al., 2003, 2008).

1.1.3 Fermentação das sementes do cacau

A fermentação é uma etapa essencial para a obtenção de amêndoas de 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, durante 5 a 7 dias onde ocorre a fermentação e a cura das sementes (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).



Fonte: AGROCIM (2011).

Figura 2. Fermentação natural do cacau.

Grimaldi (1978) propôs o uso de caixas de madeira para fermentação, sendo composta por três compartimentos, possuindo forma e volume adequados para cada uma das fases de fermentação (anaeróbia e aeróbia). As sementes inicialmente são espalhadas no primeiro compartimento da caixa; após as primeiras 48 horas são transferidas para o segundo compartimento e depois de 96 horas para o terceiro compartimento. A remoção das sementes é realizada para a entrada de ar na polpa e para drenagem do líquido, oriundo da ação microbiana na polpa. Após as primeiras 48 horas os revolvimentos ocorrem em intervalos de 24 horas.

O processo de fermentação envolve a ação de microrganismos que levam a alterações físicas e químicas ao longo da fermentação. Durante 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 (LOPEZ, 1986). 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 estabelecimento de bactérias acéticas (SCHWAN; WHEALS, 2004).

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 a 50°C (SCHWAN; WHEALS, 2004). O calor e o ácido acético causam a morte do gérmen das sementes, com consequente perda da membrana seletiva permeável (FORSYTH; QUESNEL, 1963; BIEHL et al., 1982).

Posteriormente ocorre a cura das sementes também conhecida como “quimiofermentação” ou segunda fase. Nesta fase, as enzimas do cacau são ativadas em decorrência da difusão do conteúdo celular, tais como; glicosidases, proteases e polifenoloxidasas, e ocorre a 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; ZAHOULI et al., 2010).

Portanto, os produtos da fermentação (etanol, acetato e lactato), além do calor afetam diretamente os componentes da semente, causando importantes alterações bioquímicas para o desenvolvimento do sabor do chocolate, cor, e aroma (THOMPSON et al., 2001).

A temperatura pode ser um indicador muito bom de acompanhamento da fermentação, se o aumento for muito lento ou se não for alcançado uma temperatura suficientemente alta, o produto obtido será constituído de sementes mal fermentadas (ZAMALLOA, 1994).

A prática de revolvimentos durante a fermentação é uma forma de controlar a elevação excessiva da temperatura e também do nível de ácidos, (SCHWAN et al., 1990). Segundo Forsyth e Quesnel (1963), o primeiro revolvimento deve ser realizado 24 horas após o início da fermentação. Em trabalho realizado por Gálvez et al., (2007), os revolvimentos foram realizados no tempo 24, 48 e 96 horas.

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

1.1.4 Diversidade microbiana no cacau

A contribuição dos microrganismos na fermentação está além da realização da fermentação alcoólica e acética. Estes estão associados ao desenvolvimento de sabor na produção de compostos voláteis através do metabolismo secundário (HANSEN et al., 1998; SCHWAN; WHEALS, 2004).

A microflora na fermentação do cacau (leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas) pode variar de acordo com as condições ambientais, disponibilidade de nutrientes, localização geográfica, dentre outros (CAMU et al., 2007; NIELSEN 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 polpa atua como substrato para o crescimento espontâneo de microrganismos, que são provenientes principalmente do solo, ar, superfície dos frutos, folhas de bananeira, mãos e utensílios dos manipuladores (ICMSF, 1998). 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; WHEALS, 2004).

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 das bactérias. Além de disso, produzem compostos voláteis, como aldeídos, cetonas, alcoóis, terpenos e ésteres, que contribuem significativamente com o sabor e aroma do chocolate (SCHWAN; WHEALS, 2004).

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. Prevelem por um curto período 16 a 24 horas. Metabolizam os açúcares remanescentes evidenciando a degradação da polpa e originando, entre outros metabólicos, o ácido láctico que irá propiciar condições de pH e aeração favorável para o crescimento de bactérias acéticas (SCHWAN; WHEALS, 2004; KOSTINEK et al., 2008).

A presença de álcool resultante da reação ocorrida nas primeiras 48 horas, propicia um ambiente favorável para as bactérias acéticas existentes no meio que oxidam o etanol a ácido acético. O cacau nesta fase tem um cheiro marcado a vinagre (FERRÃO, 2008). A oxidação do etanol é uma reação altamente exotérmica e eleva a temperatura a valores próximos de 50 °C (GÁLVEZ et al., 2007).

1.1.5 Características e metabolismo das bactérias acéticas

As bactérias acéticas compreendem a família da *Acetobacteriaceae* sendo considerados microrganismos Gram negativos, com morfologia elipsoidais, em forma de bastonetes ou cocos, ocorrendo isoladas aos pares ou em cadeias. Podem ser móveis, ou não, com flagelos peritríquios ou polar, não formam esporos, aeróbias e podem oxidar açúcares e demais metabólicos secundários, como álcool de baixo peso molecular (HOLT et al., 1994; RASPOR; GORANOVIC, 2008).

A temperatura ótima de crescimento é 30°C, as bactérias do ácido acético são catalase positivas, o pH ótimo para crescimento é entre 5 e 6,5, também podem crescer em valores baixos de pH de 3 a 4, (HOLT et al., 1994).

Os gêneros pertencentes a esta família são: *Granulibacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Acetobacter*. Neste último temos espécies capazes de realizar a oxidação completa do etanol convertendo-o em gás carbônico e água (HOLT et al., 1994; FRANCO; LANDGRAF, 2005; BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008).

Em geral as bactérias do ácido acético pertencentes, ao gênero *Acetobacter* tem sido encontrada com maior frequência do que aquelas do gênero *Gluconobacter* na fermentação do cacau (CAMU et al., 2007), devido a capacidade das primeiras em crescer na presença de etanol. Os métodos comumente utilizados para identificação destas em nível de espécie estão baseados na diferenciação fisiológica e bioquímica, tais como: crescimento em etanol, produção de pigmentos e fermentação de carboidratos (TOIT; LAMBRECHTS, 2002).

Uma variedade de mais de 100 espécies de bactérias acéticas em diferentes ecossistemas já foram encontradas (FLEET, 1999). Durante a fase aeróbica na fermentação do cacau, *Acetobacter pasteurianus* é a principal espécie de bactérias acéticas, que participa da fermentação espontânea do cacau (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Na presença de etanol, estas são capazes de produzir ácido acético como produto da oxidação incompleta realizada pelo metabolismo respiratório desses microrganismos (ROMANOA et al., 2000). A via metabólica ocorre no citoplasma e também no periplasma pela atuação de duas enzimas: álcool desidrogenase (AIDH) e acetato desidrogenase (ACIDH) (HUTKINS, 2006).

Tais reações de oxidação correspondem à fermentação oxidativa, pois envolvem a oxidação incompleta do álcool acompanhada pelo acúmulo de grande quantidade dos metabólicos formados no meio de crescimento (LU; LEE; SCHE, 1999; HUTKINS, 2006).

1.1.6 Seleção das bactérias acéticas

Os gêneros de bactérias mais relatados na fermentação das sementes do cacau são: *Acetobacter* e *Gluconobacter* apresentando uma diversidade de mais de 40 espécies. Dentre estes o gênero *Acetobacter* tem preferência por

metabolizar etanol e os demais gêneros açúcares como a frutose (BAMFORTH, 2005; YAMADA, 2008).

Nielsen et al., (2007) encontrou as espécies *Acetobacter syzygii*, *A. pasteurianus*, e *A. tropicalis* como predominantes no processo de fermentação em Gana. *Acetobacter lovaniensis* também foi encontrada na fermentação na Indonésia e República Dominicana (ARDHANA; FLEET, 2003; GÁLVEZ et al., 2007).

Tabela 1. Diferenças bioquímicas entre os principais gêneros encontrados na fermentação do cacau.

Propriedade	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Temperatura ótima de crescimento (°C)	25-30	25-30
pH ótimo	5.4 – 6.3	5.5 – 6.0
Oxidação completa de etanol	+	-
Oxidação de Lactato	+	-

Fonte: HUTIKINS, 2006.

Os métodos frequentemente utilizados para identificação desses microrganismos estão baseados em diferenciações fisiológica e bioquímica, tais como: crescimento em etanol, produção de pigmentos e fermentação de carboidratos (TOIT; LAMBRECHTS, 2002).

Entretanto ainda não há trabalhos de identificação bioquímica para diferenciação dos gêneros e espécies de bactérias acéticas presente no cacau amazônico. Tendo em vista o papel importante desses microrganismos para a obtenção do chocolate de boa qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROCIM - Disponível em < <http://www.agrocim.com.br>> Acesso em 24 de Agosto de 2011.

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.

BAMFORTH, C. W. **Food, Fermentation and Microorganisms**. New York: Blackwell, 2005.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 2 ed. London: Chapman and Hall, 1994. 408 p.

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

BIEHL B, P. D.; Sagemann W. Effect of acetic acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. **Food Agriculture v 33**: p.1101–1109, 1982.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine - A review. **International Journal of Food Microbiology**. Australian, n. 125, p. 60-70, 2008.

BRITO, E. S.; GARCIA, N. H. P.; GALLÃO, M.; CORTELAZZO, A. L.; FEVEREIRO, P. S.; BRAGA, M. R., Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 81, p. 281-288, 2000.

CAMU N, DE WINTER T, VERBRUGGHE K, CLEENWERCK I, VANDAMME P, TAKRAMA JS, 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.

CAMU N, DE WINTER T, ADDO SK, TAKRAMA JS, BERNAERT H; DE VUYST L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavor of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,v 88: p.2288–2297, 2008.

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.

DE LEY, J.; GOSSELÉ, F.; SWINGS, J. Genus I Acetobacter. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Maryland: Williams & Wilkens, 1984. p. 268-274.

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.

FAOSTAT. **Produção Mundial de Cacau**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 25 Maio. 2011.

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**. New York, n. 25; p. 457- 459, 1963.

FRANCO B. D. G. DE MELO; LANDGRAF, MARISA. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Australia, n.50, p. 101–117, 1999.

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.

GRIMALDI, J. Les possibilités D'amélioration des techniques D'ecabossage et de fermentation dans le processus artisanal de la préparation du cacao. **Café, Cacao**, Thé, v. 22, n. 4, p. 303-316, 1978.

HANSEN, C. E.; OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal Science Food Agriculture**, n. 77, p. 273–281, 1998.

HOLT, J. M., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. Y; WILLIAMS, S. T. (1994). Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). (p. 71e84) Maryland, U.S.A: Williams; Wilkens.

HONORÉ G. OUATTARA, SYLVIE REVERCHON, SÉBASTIEN L. NIAMKE, WILLIAM NASSER. Molecular Identification And Pectate Lyase Production By *Bacillus* Strains Involved In Cocoa Fermentation. 2010. **Journal Food Microbiology**.

HUTKINS, R W. **Vinegar Fermentation**. In: *Microbiology and technology of fermented foods*. New York: IFT, 2006.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos 6 ed.**

Ecología microbiana de los productos alimentarios. Zaragoza-España: Acribia, 1998.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 08 Agosto, 2011.

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.

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

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

Lopez, A.S. (1986) Chemical changes occurring during the processing of cacao. Proceedings of the Symposium Cacao Biotechnology (Dimick, PS, ed), p. 19–54. The Pennsylvania State University, University Park.

LU, S. F; LEE F.L; CHEN, H.K.A. Termotolerante and high acetic-producing bacterium *Acetobacter sp.* **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 55-62, 1999.

MOTAMAYOR, J. C. et al. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, London, v. 89, p. 380-386, 2003.

MOTAMAYOR, J. C. et al. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). **PloS ONE**, Chicago, v. 3, n. 10, p. 1-8, 2008.

NIELSEN, D. S et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods, Germany, **International Journal of Food Microbiology**, n. 114, p. 168-186, 2007.

ROHAN, T.A; CONNELL, 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.

ROMANOVA, A. et al. Acetic acid bacteria as enantioselective biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis**, n. 17, p. 235–240, 2000.

RASPOR, P.; GARANOVIC, D. S. Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Slovenia, n. 28, p. 101-124, 2008.

SCHWAN, R. F. Microbiology of cocoa fermentation: A study to improve quality. In: 12° CONFERÊNCIA NACIONAL DE PESQUISA EM CACAU. Salvador, 1996.

SCHWAN, R. F. Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. **Applied and Environmental Microbiology**, Brasil, v. 64, n. 4, p. 1477-1483, 1999.

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.

SEA. Secretária do Estado de Agricultura. Zoneamento agroclimático do estado de Minas Gerais. Cultura do Cacau. Belo Horizonte, 1980.

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.

TOIT, W. J.; LAMBRECHS, M. G. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, 2002.

WOLLGAST, J., ANKLAN, E. Review in polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, Essex, n. 33, p.423-447, 2000.

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

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P. Genera and species in acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Thailand, n. 125, 2008.

ZAMALOA, W. A. C. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (*Theobroma cacao L.*) produzidos no Estado de São Paulo**. Campinas, 1994. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ZAHOULI, G. I. B. et al. Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material. **Advance Journal of Food Science and Technology**, Côte d'Ivoire, v. 2, n. 4, p. 184-190, 2010.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS.

1. INTRODUÇÃO

Progressos significativos têm sido realizados na última década sobre a diversidade das espécies microbianas associadas à fermentação do cacau e sobre o perfil de crescimento das espécies em todo o processo em vários países como: Gana, Indonésia e República Dominicana (CAMU et al., 2008; DANIEL et al., 2009; KOSTINEK et al., 2008). No entanto, ainda faltam informações sobre a cultura do cacau em regiões com um grande potencial de produção, como a Amazônica, devido à extensa diversidade microbiana e fatores diversos como clima, solo, localização geográfica, método de fermentação, disponibilidade de nutrientes e etc.

Estudos científicos sobre a fermentação natural do cacau na Amazônia e sobre a microflora atuante nesta região, ainda são escassos, desta forma, este estudo apresenta dados sobre o processo de fermentação natural das sementes de cacau, contribuindo para futuros avanços na obtenção de amêndoas de cacau de qualidade superior.

Este capítulo teve como objetivo Identificar as principais espécies de bactérias acéticas envolvidas no processo de fermentação natural do cacau amazônico por métodos bioquímicos e acompanhar alterações nos parâmetros físico-químicos (pH, temperatura e acidez) que influenciam o crescimento e multiplicação das bactérias no decorrer das fermentações espontâneas. Também foi avaliada a presença de contaminantes nas folhas de bananeira e cascas dos frutos de cacau utilizados no processo de fermentação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Foram utilizados frutos de cacau (30kg) para cada fermentação, constituídos da misturas de diversos híbridos da variedade Forasteiro, provenientes da Estação Experimental de Recursos Genéticos José Haroldo (ERJOH) /CEPLAC/SUPOR, localizada em Marituba-PA (Latitude de 1°12'00", longitude 48° 13'30").

Também foram utilizadas folhas de bananeira de plantas existentes no Campus da Universidade Federal do Pará (Latitude 01°27'21", Longitude 48°30'16").

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Fermentação natural da semente do cacau

Foi utilizado o processo fermentativo descrito por Grimaldi (1978) e realizado em três fermentações, no Laboratório de Fontes Amiláceas e Produtos Açucarados (LAFAMI), da Universidade Federal do Pará, nos meses de abril (duas fermentações) e maio (uma fermentação) de 2012. O método consiste na fermentação em caixa de madeira (190 x 120 x 60 cm), composta por três compartimentos conforme apresentado na Figura 3.

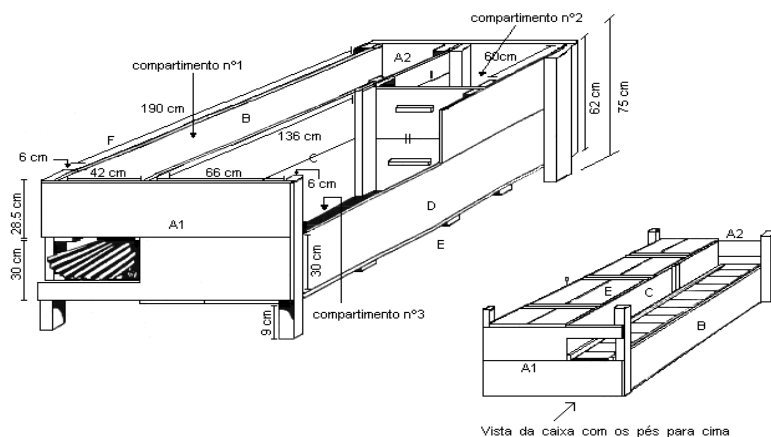


Figura 3. Esquema da caixa T60, proposta por Grimaldi (1978).

O processo foi realizado em triplicata (n=3) e teve início com o acondicionamento das sementes (30 kg) e das folhas de bananeira (4 kg), no primeiro compartimento da caixa (Figura 3), de forma intercalada e ao final cobertas com sacos de aniagem. As folhas de bananeiras são utilizadas como fonte de leveduras para acelerar a primeira etapa da fermentação (48 horas) e o saco de aniagem cobre a massa fermentativa com intuito de manter o calor gerado no processo. A massa permanece por 48 horas e, após esse intervalo de tempo é revolvida para o segundo compartimento por mais 48 horas, onde é realizado o revolvimento diário. Esse procedimento se deve à necessidade de aeração da massa para o crescimento das bactérias lácticas e acéticas. Após 96 horas a massa é revolvida para o compartimento 3 e permanece no mesmo até o término do processo (168 horas ou 7 dias) com revolvimentos diários.

2.2.2 Coleta das amostras

A coleta foi realizada no tempo zero (sementes frescas) e depois nos tempos 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas de fermentação (amêndoas). Foram retiradas amostras em três diferentes pontos da caixa (superfície, meio e profundidade) com o objetivo de tornar a coleta representativa. A temperatura da massa foi registrada diariamente e lida em diferentes níveis da caixa: superfície, meio e profundidade.

As amêndoas foram retiradas para as análises físico-químicas e microbiológicas em intervalos de 24 horas e acondicionadas em sacos de polietileno de baixa densidade e armazenadas a -18°C até a realização das análises.

2.2.3. Caracterização físico-química

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Fontes Amiláceas e Produtos Açucarados (LAFAMI) da Universidade Federal do Pará.

Foram monitorados os seguintes parâmetros durante os sete dias de fermentação, de acordo com os Métodos Oficiais para Cacau e Derivados (Capítulo 31) da AOAC (1997);

- Acidez total titulável (nº 31.1.06);
- pH da massa das sementes de cacau (nº 31.1.07);

2.3 MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO DO CACAU

2.3.1 Swab de superfície das cascas e frutos do cacau

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pará, de acordo com o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods da American Public Health Association* (APHA, 2001).

As análises de *swab* foram realizadas nas folhas das bananeiras e na superfície dos frutos. Foram diluídas em água peptonada (0,1% v/v) na proporção de 1:10, após este período as amostras foram repicadas em triplicatas em meios de cultura específicos para as contagens em tubos de coliformes totais e *Staphylococcus aureus*.

- Presença de *S. aureus*

Realizado em placas com meio Ágar Baird-Parker (BP), espalhando o inóculo com alça de Drigalski, depois da completa absorção do líquido incubou se as placas invertidas, a 35-37°C durante 48h.

- Presença de Coliformes totais (NMP)

Foi empregada a técnica dos tubos múltiplos com diluições seriadas em Caldo Lauril Sulfato Tryptose (LST) para teste presuntivo, seguido de teste confirmativo em Caldo Verde Brilhante Bile 2% para a determinação do NMP/g para coliformes totais e Caldo E.C para determinação do NMP/g de coliformes a 45°C. Para os casos positivos, foi estimado o Número Mais Provável (NMP/g).

2.3.2 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

A contagem padrão em placas de bactérias mesófilas foi realizada pela técnica de semeadura em profundidade (*pour plate*) utilizando como meio de cultura Ágar Padrão (PCA) seguido de incubação a 35°C por 24/48 horas (DANIEL, et al., 2009).

2.3.3 Isolamento das bactérias acéticas

Para o isolamento das bactérias acéticas foram coletadas 20 g de amostra assepticamente e foram transferidas para sacos estéreis e

homogeneizadas em 180 mL de água peptonada tamponada a 0,1% em *Stomacher* (da marca Seward), por aproximadamente três minutos, e em seguida colocadas em repouso por 30 minutos para realização das etapas analíticas microbiológicas (CAMU et al., 2007). Em seguida, a partir dessa diluição foram realizadas diluições decimais seriadas, até a diluição de 10^{-12} , (CAMU et al.,2007).

Foram inoculadas as três últimas diluições com alíquotas de 0,1 mL e semeadas em placas com meios sólidos utilizando a técnica de inoculação por superfície para o meio de cultura, MEP e a técnica de semeadura por profundidade para o meio GEYC. As placas ficaram incubadas à 30°C de 2 a 5 dias. Após esse período de incubação as colônias de bactérias acéticas foram contadas pelo método de contagem padrão em placas, determinando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC), e isoladas para posterior identificação.

Foram isoladas pelo menos cinco colônias com características de bactérias acéticas de cada placa e transferidas para Ágar Triptona de Soja (TSA), sendo neste mantidas a temperatura de 10°C para realização das provas bioquímicas.

2.3.4 Caracterização bioquímica das linhagens isoladas e identificadas como Gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*

As cepas mantidas sob refrigeração foram ativadas em TSA por 24 horas e submetidas inicialmente aos testes de coloração de Gram e de catalase. As cepas que obtiveram resultado negativo para coloração de Gram e positivo para catalase foram submetidas a provas bioquímicas conforme Bartowsky (2008).

2.3.4.1 Produção de H₂S, indol e motilidade

As culturas foram semeadas em Ágar semi-sólido (SIM), e incubadas a 30°C por 48 horas. A produção de H₂S foi verificada, mediante a formação de mancha negra ao redor da área inoculada. Para a produção de indol após o período de incubação foi adicionado Reativo de Kovacs e verificado a formação

de anel vermelho indicando teste positivo. Para motilidade foi observado o deslocamento da cultura no Ágar.

2.3.4.2 Produção de pigmento marrom

Foram estriadas culturas pela técnica de semeadura por esgotamento em meio de GYEC, com posterior incubação 30°C por 48 horas em estufa bacteriológica. A ausência de pigmentação marrom indicou teste positivo para *Acetobacter* e a presença indicou o gênero *Gluconobacter*.

2.3.4.3 Crescimento a 30% de glicose

Foram estriadas culturas em Ágar 1 (Anexo I), seguido de incubação por 48 horas. Considerada prova positiva para as cepas que conseguirem se multiplicar neste Ágar.

2.3.4.4 Oxidação completa de etanol

Foram repicadas culturas sólidas no Caldo 1 (Anexo I) seguida de incubação a 30°C por 48 horas. A oxidação completa é confirmada pela mudança de coloração do caldo de vermelho para amarelo e para oxidação incompleta ou parcial foi atribuído aos tubos que apresentaram mudança de coloração vermelha para laranja.

2.4 DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES *Acetobacter* e *Gluconobacter*

Foram realizados testes de oxidação de etanol e produção de ácido a partir de glicose e xilose, Bartowsky (2008). A diferenciação também ocorreu através da temperatura e pH ótimo de crescimento de cada espécie (GULLO; GIUDICI, 2008).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para todos os resultados obtidos nas análises físico-químicas do processo de fermentação foram calculada 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 E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO–QUÍMICA

A Figura 4 mostra a evolução média da temperatura e do pH do cacau durante a fermentação.

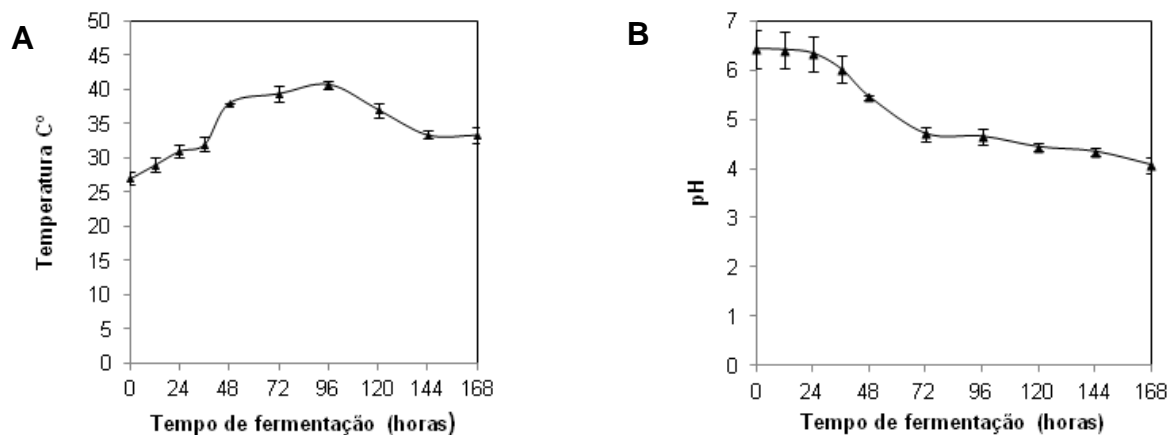


Figura 4. Média da temperatura (A) e pH (B), durante as três fermentações do cacau.

Os perfis médios de temperatura obtidos durante as três fermentações (Figura 4), mostram uma elevação da temperatura a partir das primeiras 12 horas de fermentação, atingindo valores mais elevados no quarto dia fermentação (40°C). O aumento da temperatura durante a fermentação do cacau é consequência do metabolismo das leveduras, através do consumo dos açúcares e produção de energia (calor) e etanol e está relacionada à qualidade do processo de fermentação. A reação de oxidação do álcool pelas leveduras e consequente produção de ácido acético também é essencial para elevação da temperatura (GÁLVEZ et al., 2007).

Schwan e Wheals (2004) e Nielsen et al., (2007) consideram o valor de 45°C satisfatório para as primeiras 48 horas de fermentação, atribuindo essa temperatura um cacau de boa qualidade final. Neste trabalho nas primeiras 48 horas o valor máximo alcançado foi de 38°C.

No presente trabalho os valores encontrados foram abaixo dos considerados ótimos para uma boa fermentação, essa diferença podem ser

atribuídas especialmente às condições climáticas nos meses que foram realizadas as fermentações (abril e maio), que são caracterizados por intensas chuvas e, conseqüente menor temperatura (25 a 30°C).

As leveduras e as bactérias lácticas e acéticas se desenvolvem melhor na faixa de temperatura entre 20 e 35°C em condições tropicais, e por isso esses microrganismos constituem a principal microflora atuante durante a fermentação do cacau.

O comportamento da temperatura obtido é semelhante ao encontrado por Camu et al., (2007), que encontrou média máxima de 43,5°C. Este autor relata que as chuvas ocorridas durante a fermentação e menor temperatura ambiente (29°C), influenciaram na temperatura obtida durante o processo fermentativo. Lefeber et al., (2011) encontrou valores próximos ao do presente trabalho, no início das fermentações, a temperatura da polpa foi 25°C, e a temperatura máxima foi de 41°C no final das fermentação.

O decréscimo nos valores de pH é resultado da permeação dos ácidos orgânicos formados, especialmente pelas bactérias lácticas e acéticas. O comportamento do pH encontrado nesta pesquisa para todas as fermentações realizadas foi diferente aos relatados na fermentação do cacau, Galvéz et al., (2007) e Lefeber et al., (2011), encontraram aumento no pH entre 24 e 72 horas de fermentação e os mesmos relataram que o aumento no pH é atribuído ao consumo de ácido cítrico presente na polpa pelas leveduras. No presente trabalho a polpa provavelmente encontrava-se com mínimas quantidades de ácido cítrico, caracterizando um decréscimo constante no pH em todas as fermentações.

O decréscimo constante do pH encontrado, caracterizou uma acidez elevada no final da fermentação, sendo a acidez inicial de 4,62 (ml Na OH/ 100g), com valor médio final de 18,78 (ml Na OH/ 100g).

A elevação da acidez durante o processo fermentativo atribui-se, aos ácidos acético e láctico, resultantes da oxidação do etanol. O aumento da acidez durante a fermentação foi observada em todas as fermentações realizadas neste trabalho, caracterizando a produção de ácido pelas bactérias acéticas e lácticas presente no processo fermentativo. Lefeber et al., (2011), encontrou um constante aumento na acidez durante a fermentação.

3.2 MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO DO CACAU - *Swab* de Superfície.

3.2.1 *Swab* de superfície das cascas e frutos do cacau

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes ao *swab* de superfície para detecção de coliformes totais e *S. aureus* na casca de frutos de cacau e nas folhas de bananeira utilizados na fermentação.

Tabela 2. Média da contagem de cepas de coliformes totais e *S. aureus* em amostras da casca de frutos do cacau e em folhas de bananeira.

Fermentação	Coliformes totais (UFC. g ⁻¹)		<i>S. aureus</i> (UFC. g ⁻¹)	
	Cascas Fruto	Folhas Bananeira	Cascas Fruto	Folhas Bananeira
1	ausente	ausente	8,6 x 10 ¹¹	7,5 x 10 ¹⁰
2	ausente	ausente	5,3 x 10 ¹²	8,1 x 10 ¹¹
3	ausente	ausente	9,2 x 10 ¹⁰	6,2 x 10 ¹⁰

Não foi detectada a presença de coliformes totais (Tabela 2). Este resultado mostra que as etapas de colheita e transporte dos frutos e das folhas de bananeira se desenvolveram em condições higiênicas sanitárias adequadas. Na literatura não foram encontrados outros trabalhos científicos que tenham realizado a análise de coliformes totais em frutos de cacau utilizados para fermentação.

Ao mesmo tempo foi encontrado um alto índice de contaminação por *S. aureus*, conforme pode ser visualizada na Tabela 2. Tal contaminação deve-se ao contato com os manipuladores após a abertura do fruto. Ardhana e Fleet, (2003) relataram a presença de *S. aureus* na fermentação do cacau na Indonésia. Estes autores enfatizam a importância do monitoramento da higiene e conduta durante a fermentação para garantir que esses contaminantes não se tornem predominantes durante o processo fermentativo.

3.3 CONTAGEM DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS

A Figura 5 apresenta a média da contagem das bactérias aeróbias mesófilas encontradas na fermentação de cacau.

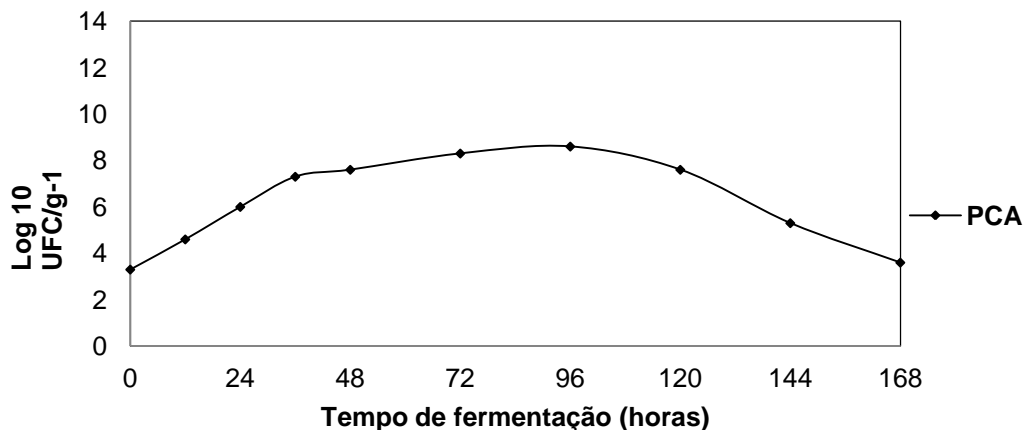


Figura 5. Média da contagem de bactérias aeróbias mesófilas durante fermentação de cacau.

As bactérias mesófilas apresentaram comportamento similar em todas as fermentações, alcançando um desenvolvimento microbiano máximo em todos os ensaios após 96 horas, atingindo uma contagem máxima de $4,0 \times 10^{10}$ UFC/g⁻¹.

As bactérias mesófilas apresentam melhor desenvolvimento em pH entre 4 e 9. Durante as fermentações esses microrganismos obtiveram pH ótimo para o crescimento, pois a média de variação no pH foi de 6 a 4 nas três repetições.

A presença de bactérias mesófilas na fermentação do cacau tem sido relatada na literatura com frequência. Camu et al., (2007) e Gálvez et al., (2007) encontraram a máxima contagem de bactérias mesófilas em 36 e 48 horas, respectivamente na fermentação de sementes de cacau em Gana e República Dominicana.

Essa variação no tempo na contagem máxima é atribuída ao início da entrada de ar na polpa, sendo que esses microrganismos dependem da presença de oxigênio.

3.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ACÉTICAS

No total das três fermentações foram isoladas 81 cepas (Tabela 3) nos meios MEP e GYEC. A partir dos testes de catalase positiva e gram negativa, as cepas foram observadas em microscópio e caracterizadas morfológicamente como bastonetes e cocos. Posteriormente, foram submetidas aos testes bioquímicos que confirmaram a presença dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

Em todos os ensaios, após 48 horas de fermentação, as bactérias acéticas apresentaram maior número de colônias isoladas (Tabela 3), sendo atribuído a maior disponibilidade de substrato (etanol), condições de pH e temperatura ótimas para a multiplicação das mesmas.

Tabela 3. Distribuição dos isolados de bactérias acéticas durante as três fermentações.

Tempo (horas)	pH (média)	Temperatura C°	Fermentação		
			1	2	3
0	6,43	27	3	1	3
12	6,41	29	3	1	3
24	6,34	31	3	2	3
36	6,02	32	3	4	4
48	5,45	38	7	4	6
72	4,70	39	4	2	5
96	4,65	40	3	1	1
120	4,44	37	4	2	3
144	4,34	33	5	0	1
168	4,07	33	0	0	0
			35	17	29

Por oxidação, as bactérias acéticas convertem o etanol produzido durante a fermentação alcoólica em ácido acético (JINAP; 1994). A oxidação é

uma reação altamente exotérmica (496 kJ por molécula de etanol convertido em ácido acético) (LAGUNES;GÁLVEZ, 2002).

Galvéz et al ., (2007) relataram o isolamento de apenas cinco cepas de bactérias acéticas na fermentação do cacau em Gana, porém essa observação pode não refletir a riqueza e a diversidade da população, uma vez que é difícil isolar bactérias acéticas e preservar para a identificação de estirpes puras (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Os isolados apresentados na Tabela 4 mostram os testes bioquímicos realizados para diferenciação de *Acetobacter* e *Gluconobacter*. No presente trabalho, foram consideradas como *Acetobacter* as colônias que apresentaram as seguintes características: produção ou não de H₂S, indol e motilidade, não produção de pigmento marrom, não crescimento a 30% de glicose e oxidação do etanol. Já para o gênero *Gluconobacter* foram considerados: produção de H₂S, indol e motilidade, produção de pigmento marrom, crescimento mais ou menos a 30% de glicose e não oxidação do etanol ou oxidação incompleta (BARTOWSKY; 2008). Dos 81 isolados encontrados, 37 foram caracterizados como *Acetobacter* e 44 como *Gluconobacter*, como pode ser visualizado na Tabela 4.

A literatura relata que o gênero *Acetobacter* tem sido encontrado com maior frequência do que o *Gluconobacter*, na fermentação do cacau, no entanto, nesta pesquisa o gênero *Gluconobacter*, obteve um maior número de cepas isoladas, o que pode ser atribuído a uma baixa concentração de etanol e açúcares na polpa (CAMU et al., 2007; FLEET,1999).

Os testes de oxidação completa do etanol e crescimento em 30% de glicose são considerados conclusivos para diferenciação entre os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*, sendo o primeiro confirmado pela mudança de coloração do caldo de vermelho para amarelo (BARTOWSKY; 2008; CAMU et al., 2007). O segundo é confirmado mediante o crescimento ou não em Ágar, pois as *Acetobacter* se multiplicam e as *Gluconobacter* não conseguem se desenvolver neste meio, provavelmente devido à ausência de algumas enzimas do ciclo de Krebs como a álcool desidrogenase. Neste trabalho os dois testes foram considerados satisfatórios para a diferenciação dos dois gêneros como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Diferenciação bioquímica dos gêneros de bactérias do ácido acético.

Fermentação	Tempo (hs)	Cepa	Catalase	Gram	Glicose	Etanol	*PPM	*H ₂ S, I e M	Gênero
F1	0	1A	+	-	+/-	+	-	+	<i>Gluconobacter</i>
F1	0	2A	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F1	0	3A	+	-	+/-	+	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F2	0	5A	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F3	0	6A	+	-	+/-	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F3	0	7A	+	-	+/-	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F3	0	8A	+	-	+/-	+	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F1	12	1B	+	-	+/-	+	-	+	<i>Gluconobacter</i>
F1	12	2B	+	-	+/-	+	-	+	<i>Gluconobacter</i>
F1	12	3B	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F2	12	4B	+	-	+/-	+/-	-	+	<i>Gluconobacter</i>
F3	12	5B	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F3	12	6B	+	-	+/-	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F3	12	7B	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F1	24	1C	+	-	+/-	+/-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F1	24	2C	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F1	24	3C	+	-	-	+	-	-	<i>Acetobacter</i>
F2	24	4C	+	-	+/-	+/-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F2	24	5C	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F3	24	6C	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F3	24	7C	+	-	+/-	-	-	+	<i>Gluconobacter</i>
F3	24	8C	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F1	36	1D	+	-	-	+	-	-	<i>Acetobacter</i>
F1	36	2D	+	-	+/-	+/-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F1	36	3D	+	-	+/-	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F2	36	4D	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F2	36	5D	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F2	36	6D	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F2	36	7D	+	-	+/-	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F3	36	8D	+	-	-	+	-	-	<i>Acetobacter</i>
F3	36	9D	+	-	+/-	-	-	+	<i>Gluconobacter</i>
F3	36	10D	+	-	-	+	-	-	<i>Acetobacter</i>
F3	36	11D	+	-	-	+	-	-	<i>Acetobacter</i>
F1	48	1E	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F1	48	2E	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F1	48	3E	+	-	+/-	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F1	48	4E	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F1	48	5E	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F1	48	6E	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F1	48	7E	+	-	+/-	+/-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F2	48	8E	+	-	-	-	-	+/-	<i>Acetobacter</i>

Tabela 4. Diferenciação bioquímica dos gêneros de bactérias do ácido acético.

Continua.

Fermentação	Tempo (hs)	Cepa	Catalase	Gram	Glicose	Etanol	*PPM	*H ₂ S, I e M	Gênero
F2	48	9E	+	-	+/-	+/-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F2	48	10E	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F2	48	11E	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F3	48	12E	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F3	48	13E	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F3	48	14E	+	-	+/-	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F3	48	15E	+	-	+/-	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F3	48	16E	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F3	48	17E	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F1	72	1F	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F1	72	2F	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F1	72	3F	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F1	72	4F	+	-	+/-	-	-	+	<i>Gluconobacter</i>
F2	72	5F	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F2	72	6F	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F3	72	7F	+	-	+/-	+/-	+/-	+	<i>Gluconobacter</i>
F3	72	8F	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F3	72	9F	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F3	72	10F	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F3	72	11F	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F1	96	1G	+	-	+/-	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F1	96	2G	+	-	+/-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F1	96	3G	+	-	+/-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F2	96	4G	+	-	+/-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F3	96	5G	+	-	+/-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F1	120	1H	+	-	+/-	+/-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F1	120	2H	+	-	+/-	+/-	-	-	<i>Gluconobacter</i>
F1	120	3H	+	-	+/-	-	+/-	-	<i>Gluconobacter</i>
F1	120	5H	+	-	+/-	-	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>
F2	120	6H	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F2	120	7H	+	-	+/-	+/-	+/-	-	<i>Gluconobacter</i>
F3	120	8H	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F1	144	1I	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F1	144	2I	+	-	+/-	-	-	+	<i>Gluconobacter</i>
F1	144	3I	+	-	-	+	-	+/-	<i>Acetobacter</i>
F1	144	4I	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F1	144	5I	+	-	-	+	-	+	<i>Acetobacter</i>
F3	144	6I	+	-	+/-	+	-	+/-	<i>Gluconobacter</i>

*PPM - Produção de pigmento marrom.

*H₂S, I e M - O ácido sulfídrico, indol e motilidade.

+/- - Variável ou não variável.

Os testes bioquímicos de PPM e H₂S, I e M, também foram utilizados para diferenciação dos dois gêneros, sendo que as *Acetobacter* não produzem o pigmento, e as *Gluconobacter* são variáveis. Neste trabalho as cepas consideradas como *Acetobacter* não conseguiram formar pigmento como era esperado, e as *Gluconobacter* variaram quanto a produção de pigmentação, não produzindo e em algumas cepas produzindo uma discreta pigmentação. O teste H₂S, I e M, para os dois gêneros são variáveis, não apresentando se como satisfatório para diferenciação.

3.5 DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES *Acetobacter* e *Gluconobacter*

As provas bioquímicas apresentadas abaixo (Tabela 5) foram realizadas para diferenciação das espécies dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* em nível de espécie.

Acetobacter Aceti e *acetobacter pasteurians* foram as duas espécies identificadas nesta pesquisa do gênero *Acetobacter* e nenhuma do gênero *Gluconobacter*. Os testes de oxidação de etanol e produção de ácido a partir de glicose e xilose foram considerados como satisfatório para diferenciação das espécies. A diferenciação também ocorreu através da observação da temperatura e pH ótimos de crescimento para cada espécie como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Diferenciação das espécies do gênero *Acetobacter* na fermentação do cacau amazônico.

Espécie	Temperatura (°C)	pH	Etanol	Glicose	Xilose
<i>A. aceti</i>	30 – 32	6,41 - 6,02	+	+	+
<i>A. pasteurians</i>	40	4,65	+/-	+/-	+/-

Para a espécie *A. aceti* foram identificadas 14 cepas nos tempos 12, 24 e 36 de fermentação, de um total de 26 isoladas nestes tempos (Tabela 5).

A temperatura nos tempos 12, 24 e 36 variou entre 30 e 32°C, com pH oscilando entre 6,41 e 6,02 (Tabela 5). Os valores encontrados neste estudo foram similares aos reportados por Bartowsky (2008) e Gullo e Giudici (2008),

que consideram a espécie *A. aceti* com crescimento ótimo em temperatura de 30 a 35° e pH de 5,4 a 6,4 , bem como também os testes para etanol, glicose e xilose positivos para a espécie.

De Vuys et al., (2008) encontraram a espécie *A. aceti* durante a fermentação do cacau em Gana.

Segundo Bartowsky (2008) e Gullo e Giudici (2008) a espécie *A. pasteurians* apresenta temperatura e pH ótimos de crescimento entre 40 - 45° e 5 – 6, respectivamente. Nesta pesquisa essa espécie foi encontrada no tempo 96 horas de fermentação, em temperaturas de 40°C e pH 4,65, sendo identificadas 4 cepas. Lefeber et al. (2011) identificaram a espécie *A. Pasteurians* por métodos moleculares.

A identificação bioquímica das bactérias acéticas foi realizada por Gálvez et al ., (2007), que identificou cinco cepas da espécie *A. lovaniensis*, durante a fermentação do cacau na República Dominicana.

As bactérias acéticas na fermentação do cacau têm sido estudadas frequentemente, devido seu papel fundamental para se obter um chocolate de qualidade. Entretanto, não é possível chegar à diferenciação de algumas espécies, através do uso exclusivo de testes bioquímicos. Assim, Jespersen et al., (2005) e Nielsen et al., (2005) sugerem usar técnicas moleculares para uma identificação precisa de espécies microbianas presentes durante a fermentação.

4. CONCLUSÃO

A temperatura e pH durante a fermentação foi fundamental para avaliação do crescimento das bactérias acéticas e bactérias aeróbias mesófilas.

Ocorreu a ausência de coliformes totais nas cascas dos frutos, porém foi encontrado um alto índice de contaminação por *S. aureus*, revelando a necessidade do monitoramento dos manipuladores durante a quebra do fruto e durante todo o processo fermentativo.

As bactérias acéticas obtiveram um desenvolvimento máximo com 48 horas de fermentação, devido ao pH de 5,45 e maior disponibilidade de etanol, produzido pelas leveduras nas primeiras 48 horas.

Foram identificadas através de testes bioquímicos 81 isolados de bactérias acéticas sendo 37 caracterizados como *Acetobacter* e 44 *Gluconobacter*. Para a diferenciação em nível de espécie, foram encontradas duas espécies do gênero *Acetobacter* (*A. aceti* e *A. pasteurians*), e para o gênero *Gluconobacter* não foi possível chegar em nível de espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Gaithersburg: Patricia Cunniff (Ed.), 1997.

APHA, American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3 ed. Washington: APHA, 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.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine - A review. **International Journal of Food Microbiology**. Australian, n. 125, p. 60-70, 2008.

CAMU, N., 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.

DANIEL, H. M. et al. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. **FEMS Yeast Res**, n. 9, p. 774–783, 2009.

DE LEY, J.; GOSSELÉ, F.; SWINGS, J. Genus I Acetobacter. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Maryland: Williams & Wilkens, 1984. p. 268-274.

DE VUYST, L., CAMU, N., DE WINTER, T., VANDEMEULEBROECKE, K., DE PERRE, V.V., VANCANNEYT, M., DE VOS, P., CLEENWERCK, I. Validation of the (GTG) 5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, n.125, p.457-464, 2008.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Australia, n.50, p. 101–117, 1999.

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.

GRIMALDI, J. Les possibilités D`amélioration des techniques D`ecabossage et de fermentation dans le processus artisanal de la préparation du cacao. **Café, Cacao, Thé**, v.22, p.306-316, 1978.

GULLO, P. GIUDICI. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection **International Journal of Food Microbiology** 125 p.46–53, 2008.

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.

JINAP, S. Organic acids in cocoa beans—a review. **ASEAN Food Journal** 9, p.3–12, 1994.

LAGUNES-GÁLVEZ, S.G. Isolement et caractérisation de bactéries acétiques provenant de la fermentation du cacao. DEA. Ecole Doctorale Science et Procédé et Biologiques et Industriels. Université de Montpellier II, Montpellier. 34 pp. 2002.

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* 22 (4), p.271–284, 2005.

NIELSEN, D. S et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods, Germany, **International Journal of Food Microbiology**, n. 114, p. 168-186, 2007.

KOSTINEK, M., BAN-KOF, L., OTTAH-ATIKPO, M., TENIOLA, D., SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W.H., FRANZ, C., Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria, 2008.

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.

STATSOFT, INC. Statsoft Statistica 7.0. Disponível em: <www.statsoft.com.br/pt/downloads.php>. Acesso em: 02 mar. 2010.

LEFEBER .T , WILLIAM GOBERT, GINO VRANCKEN, NICHOLAS CAMU, LUC DE VUYST. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. . **Food Microbiology**. n 28, p. 457 - 464, 2011.

ANEXO I

PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURAS

Crescimento a 30% de glicose (Ágar 1)

16g de Caldo base vermelho de fenol;

10g de Ágar Ágar;

30g de Glicose;

1000mL de Água destilada.

Oxidação Completa do Etanol (Caldo 1)

16g de Caldo base vermelho de fenol;

20mL de Etanol;

1000mL de Água destilada.

Meio	Uso	Composição	Referências
GYEC	Isolamento e purificação	Extrato de levedura 2g, Glicose 2g, Carbonato de cálcio 2g, Ágar 2g, Água destilada e deionizada 100ml.	(OHMORI et al., 1980).
MEP	Isolamento, purificação, crescimento, resistência ao etanol e ácido acético.	Extrato de levedura 5g, manitol 25g, peptona bacteriológica 3g, água destilada e deionizada 1000ml.	(DE LEY et al., 1984).

