

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU:
Triagem do potencial biotecnológico e tipagem molecular

CARINE MARTINS DOS SANTOS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2019

CARINE MARTINS DOS SANTOS

**LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU:
Triagem do potencial biotecnológico e tipagem molecular**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Orientador (a): Rachel Passos Rezende

Co-orientadores: Carlos Priminho Pirovani

Eric de Lima Silva Marques

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2019

S237 Santos, Carine Martins dos.
Leveduras isoladas da fermentação do cacau: triagem do potencial biotecnológico e tipagem molecular / Carine Martins dos Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2019.

38 f. : il.

Orientadora: Rachel Passos Rezende.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Referências bibliográficas: f. 33-38.

1. Cacau. 2. Cacau – Fermentação. 3. Leveduras. 4. Microrganismos. 5. Chocolate. I. Título.

CDD 633.74

CARINE MARTINS DOS SANTOS

LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU: Triagem do potencial
biotecnológico e tipagem molecular

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 21 de Fevereiro de 2019

Prof. Dr. Nivio Batista Santana
(UESB)

Prof. Dr Eduardo Gross
(UESC)

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio
(UESC)

Prof^a. Dr^a. Rachel Passos Rezende
(UESC- Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Sou grata inicialmente a Deus, por ter me dado a felicidade de escolher fazer esse mestrado, foi uma experiência muito importante para minha formação profissional.

Agradeço a toda minha família, pelo apoio nas minhas decisões, especialmente minha mãe Vânia. Também, ao meu companheiro, por todo incentivo e compreensão. Estendo também meus agradecimentos aos amigos, por todo encorajamento e estímulo.

Aos meus colegas de turma e laboratório, agradeço, por toda recepção e ajuda especialmente a técnica Fabiana, por todo auxílio e palavras de apoio.

Agradeço à Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de formação.

E por fim, à minha orientadora Rachel Passos Rezende, e co-orientadores Carlos Priminho Pirovani e Eric de Lima Silva Marques, agradeço toda cooperação e disponibilidade para conclusão do projeto.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Importância do cacau	4
2.2 Pré-processamento do cacau	5
2.3 Processamento das amêndoas de cacau	7
2.4 Diversidade de leveduras na fermentação	8
2.5 Importância da atividade das leveduras	10
2.6 Enzimas secretadas durante fermentação	13
2.7 Tipagem molecular	14
2.8 Métodos de armazenamento de microrganismos	15
3 OBJETIVOS	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Obtenção das leveduras	18
4.2 Reativação das leveduras	18
4.3 Manutenção dos microrganismos	19
4.4 Ensaio microbiológico para estudo enzimático qualitativo	19
4.4.1 Atividade de invertase, protease, amilase e lipase	19
4.4.2 Atividade de pectinase	19
4.5 Extração de DNA dos isolados	20
4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) com (GTG) ₋₅	20
4.7 Análise de similaridade por agrupamento e PCA	21
4.8 Sequenciamento	21
5 RESULTADOS	22
5.1 Amostras reativadas	22
5.2 Testes enzimáticos	22
5.3 Análise de similaridade por banco	23
5.4 PCA	24
5.5 Sequenciamento e identificação	25
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÕES	32
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Avaliação da qualidade das amêndoas secas do cacau por meio da observação da coloração interna 06
- Figura 2.** Fluxograma do pré-processamento, processamento e fase final da amêndoa antes da comercialização do chocolate, respectivamente 07
- Figura 3.** Mudanças químicas dentro da semente do cacau durante a fermentação. Os microrganismos produzem o etanol, ácido lático e ácido acético que penetram a semente, promovendo assim a morte do embrião. Consequentemente, ocorre a liberação de várias substâncias como antocianinas e proteínas, por exemplo 11
- Figura 4.** Análise dos perfis de (GTG)₋₅ onde A, B, C e D são coletas I, II, III e IV respectivamente 24
- Figura 5.** Análise de componentes principais, sendo A, B, C e D são coletas I, II, III e IV respectivamente 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação original de amostras em estoque de leveduras da fermentação do cacau e a quantidade de amostras recuperadas após reativação dos bancos	22
Tabela 2. Relação de quantidade de amostras positivas para os testes qualitativos de amilase, pectinase, protease, invertase e lipase dos bancos de leveduras isoladas do processo de fermentação do cacau	23
Tabela 3. Relação de leveduras identificadas no banco de CI (amostras da fermentação de cacau Forasteiro)	26
Tabela 4. Relação de leveduras identificadas no banco de CII (amostras da fermentação de cacau Forasteiro)	27
Tabela 5. Relação de leveduras identificadas no banco CIII (amostras da fermentação de cacau Forasteiro)	27
Tabela 6. Relação de leveduras identificadas no banco CIV (amostras da fermentação de cacau Scavina)	28

SANTOS, Carine Martins dos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2019. **Leveduras Isoladas da fermentação do cacau: Triagem do potencial biotecnológico e tipagem molecular.** Orientadora: Rachel Passos Rezende. Co-orientadores: Carlos Priminho Pirovani e Eric de Lima Silva Marques

RESUMO

A principal matéria prima para produção de chocolate são as amêndoas de cacau. O cacau quando colhido, é retirada sua semente envolvida pela polpa, que sofre o importante processo da fermentação. Durante a fermentação ocorre a morte do embrião da semente, tornando-a amêndoa. Para que isso ocorra as leveduras envolvidas no processo têm uma importante participação, pois metabolizam o açúcar da polpa produzindo o etanol, e este é usado por outros microrganismos que o consome e gera outros metabólitos. Esses metabólitos contribuem para que ocorra a morte do embrião da semente. Todo esse processamento está intimamente ligado à qualidade do produto final, pois em uma fermentação mal sucedida o chocolate pode se apresentar amargo e adstringente. Sendo que o processo da fermentação é importante para o sabor e coloração do produto, então, é relevante identificar esses microrganismos, a fim de selecionar aqueles que têm maior contribuição. Portanto, neste trabalho foi realizada uma triagem para avaliar o potencial biotecnológico das leveduras provenientes da fermentação para a produção de cinco enzimas: amilase, pectinase, protease, invertase e lipase; e também a tipagem molecular de todos os isolados. Os quatro bancos de leveduras utilizados estão armazenados no laboratório de Biotecnologia Microbiana/UESC. As análises qualitativas foram feitas para as enzimas com base na técnica *cup plate*. Para a tipagem, o (GTG)⁻⁵ foi usado para diferenciar leveduras de maneira intraespecífica, e o padrão de bandas obtido foi avaliado no software PAST 3.0 para análise de similaridade dos isolados. A partir dos resultados de quais leveduras apresentaram maior desempenho nos testes enzimáticos, foram selecionadas algumas leveduras para serem identificadas. Dentre as leveduras identificadas, destaca-se a *Pichia manshurica* (amostra CII 87b), que se mostrou uma levedura potencial para inóculo *starter*, pois apresentou atividade positiva para todos testes enzimáticos qualitativos. Outra linhagem de *Pichia manshurica* (amostra S357), também se mostrou uma levedura potencial para inóculo *starter*, pois apresentou atividade positiva para a maioria dos testes enzimáticos qualitativos (em exceção da amilase), além de ser relatada como levedura com atividade *killer*. A identificação das mesmas se faz importante, pois em trabalhos futuros podem ser usadas como candidatas para inóculo *starter* e podem ser esclarecidos seus efeitos sobre a fermentação.

Palavras-chave: (GTG)⁻⁵, cultura *starter*, chocolate, microrganismos.

SANTOS, Carine Martins dos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February 2019. **Isolated yeasts from cocoa fermentation: screening of biotechnological potential and molecular typing.** Advisor: Rachel Passos Rezende. Co-advisers: Carlos Priminho Pirovani and Eric de Lima Silva Marques

ABSTRACT

The primary raw material for chocolate production is cocoa almonds. When cocoa is harvested, its seed is removed by the pulp, which undergoes the important fermentation process. During fermentation, the embryo of the seed is killed, making it an almond. For this to occur, the yeasts involved in the process have an essential role because they metabolize the sugar from the pulp-producing the ethanol, and this is used by other microorganisms that consume it and generates other metabolites. These metabolites contribute to the death of the seed embryo. All this processing is closely linked to the quality of the final product, because in an unsuccessful fermentation the chocolate may be bitter and astringent. Since the fermentation process is vital for the flavor and color of the product, then it is relevant to identify these microorganisms in order to select those that have the greatest contribution. Therefore, in this work, screening was carried out to evaluate the biotechnological potential of yeasts from the fermentation for the production of five enzymes: amylase, pectinase, protease, invertase, and lipase; and also the molecular typing of all isolates. The four yeast collections used are stored in the Microbial Biotechnology Laboratory / UESC. Qualitative analyses were performed for the enzymes based on the cup plate technique. For the typing, (GTG)₅ was used to differentiate yeasts in an intraspecific way, and the obtained band pattern was evaluated in the PAST 3.0 software for analysis of similarity of the isolates. From the results of which yeasts showed higher performance in the enzymatic tests, some yeasts were selected to be identified. Among the identified yeasts, we highlight *Pichia manshurica* (CII sample 87b), which proved to be a potential yeast for inoculum starter, since it showed positive activity for all qualitative enzymatic tests. Another strain of *Pichia manshurica* (sample S357) was also a potential yeast for inoculum starter, as it showed positive activity for most of the qualitative enzymatic tests (except for amylase), in addition to being reported as yeast with killer activity. The identification of the same is important because in future works can be used as candidates for inoculum starter and can be clarified its effects on the fermentation.

Keywords: (GTG)₅, culture starter, chocolate, microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

Entre a colheita do cacau até a obtenção do chocolate, é um longo caminho cheio de etapas bioquímicas com envolvimento de diferentes comunidades microbianas. O cacau é a principal matéria prima do chocolate e é cultivado pelo mundo abrangendo a América do Sul, África e Ásia. No Brasil, tem maior produção na Bahia e Pará.

Os frutos depois de colhidos são abertos e sua polpa mucilagínosa é depositada em folhas de bananeira no chão, em caixas de madeira ou outros materiais onde sofrem a ação de microrganismos que fermentam a semente até que seu embrião seja morto. Esse processo de fermentação pode durar de 3 a 7 dias.

A ação dos microrganismos compreende três fases: fase alcoólica, dominada por leveduras; fase láctica, dominada por bactérias ácido láctico e fase acética, onde entram em ação as bactérias ácido acéticas. A fermentação bem feita das sementes do cacau é de grande importância, uma vez que é na fermentação que ocorre a redução de compostos polifenólicos e alcalóides. Estes compostos não são desejados na amêndoa por provocarem sabor amargo e adstringente na amêndoa. Sendo assim, a fermentação interfere nas características finais do chocolate.

As leveduras são os microrganismos principais do processo de fermentação e, portanto, é de grande relevância seu estudo. Além do conhecimento da comunidade presente, os estudos visam avaliar o potencial biotecnológico. Desta maneira, são selecionados microrganismos *starters* do processo fermentativo que podem acelerar, padronizar e elevar a qualidade final do produto.

Neste trabalho foi aplicada a técnica do (GTG)₋₅ que permitiu diferenciar leveduras de maneira intraespecífica, formando diferentes grupos que foram agrupados em *clusters*. Também foi avaliado o potencial biotecnológico das leveduras em relação a produção de enzimas interessantes na degradação da polpa. Algumas leveduras autóctones estão sendo indicadas neste estudo como potenciais iniciadores de processo fermentativo do cacau.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância do cacau

O cacaueteiro (*Theobroma cacao*) é uma planta originária das regiões tropicais da América Central (CUENCA, NAZÁRIO 2002). No Brasil, é nativo da Amazônia e posteriormente foi introduzido em outras regiões (DEAN, 1991). As amêndoas do cacau são de grande importância econômica, pois são mundialmente conhecidas e usadas na fabricação de diversos produtos, especialmente o chocolate (MARTINS, et al., 2005). Atualmente, os países pioneiros na produção de amêndoas são a Costa do Marfim (43%) e Gana (20%) (ICCO, 2017). No Brasil, a produção é distribuída em várias regiões: norte (Rondônia, Amazonas, Roraima, Pará), nordeste (Bahia), sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo), Centro-Oeste (Mato Grosso), não apresentando produção apenas na região sul (ICCO, 2017). Segundo dados do IBGE de 2016 a Bahia e o Pará são os principais produtores da amêndoa no Brasil.

O cultivo do cacau é de grande importância na agricultura do Brasil, pois participa do comércio internacional das amêndoas; além de sua importação e do comércio de derivados. Especialmente na Bahia, tem importância também na agricultura familiar, sendo que a maioria das propriedades que produzem o cacau é menor que 100 hectares (CUENCA, NAZÁRIO 2002).

As populações de cacau se desenvolveram de formas diferentes que foram separadas geograficamente pelo istmo do Panamá. Essas populações possuem características que os qualifica como subespécies diferentes de cacau: o Criolo, o Forasteiro (WOOD, LASS 2001) e o Trinitário (WICKRAMASURIYA et al., 2018). A variedade Forasteiro por ter árvores mais resistentes e fortes, além de um maior teor de gordura se tornou a principal variedade a ser cultivada (WOOD, LASS 2001). Apesar de a variedade Criolo ser bem conhecida por seu sabor superior e ser usado para a produção de chocolate fino, ela é menos frequente devido a sua suscetibilidade a doenças e pragas (WICKRAMASURIYA et al., 2018).

2.2 Pré-processamento do cacau

Na produção do chocolate, nota-se a importante participação das leveduras. Onde as transformações essenciais são geradas a partir da fermentação de sementes do cacau pelas leveduras e posteriormente pela ação de outros microrganismos (OLIVEIRA, 2015). O processo fermentativo é iniciado pelas leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica (MALAJOVICH, 2012) e em seguida, se tem a ação das bactérias ácido láctico e por fim as bactérias ácido acéticas (MAI et al., 2014).

As leveduras estão intimamente ligadas ao cheiro, gosto e coloração do chocolate. Portanto, se faz necessário o estudo destas populações na fermentação, podendo-se selecionar leveduras com atividade metabólica mais almejada (SERRA et al., 2016). A fermentação é uma fase muito importante no processo para se obter amêndoas de qualidade, pois nela ocorre a morte do embrião da semente, liberação de enzimas, hidrólise de açúcares e proteínas, e difusão de compostos fenólicos (EFRAIM et al., 2010).

Existem vários sistemas de fermentação do cacau; no entanto, os sistemas mais utilizados são a fermentação em pilhas ou em caixas de madeira (NIELSEN et al., 2007; PAPALEXANDRATOU et al., 2016), e sistemas como de fermentação em cestos e bandejas (JESPERSEN et al., 2005). Depois de colhido, o fruto é aberto e as sementes envolvidas pela polpa são retiradas e depositadas nas pilhas/caixas para iniciar o processo de fermentação (OLIVEIRA, 2015; BAKER et al., 1994). A polpa é rica em glicose, frutose e sacarose (SCHWAN et al., 2004; NIELSEN et al., 2007; JESPERSEN et al., 2005) e isso torna o ambiente propício para a ação de microrganismos espontâneos que entram no processo através da contaminação obtida desde a quebra do fruto, superfície do fruto, suportes de transporte e até de resíduos de fermentações anteriores (NIELSEN et al., 2007; VISINTIN et al., 2016).

O processo de fermentação é dividido em três fases, sendo que as duas primeiras ocorrem em anaerobiose e atingem cerca de 32°C nos primeiros dois dias, são elas: (i) fase alcoólica, que domina as primeiras 24h onde as leveduras consomem o açúcar e transforma em etanol e CO₂ e ainda aumentam a difusão de oxigênio; (ii) fase láctica, nessa fase as bactérias lácticas também consomem os açúcares, e ainda utilizam o ácido cítrico e transforma em ácido láctico e; (iii) fase

acética ou fase aeróbica, onde entram em ação a partir do terceiro dia as bactérias ácido acéticas que oxidam o etanol e transforma em ácido acético. Esta última fase pode atingir até 50°C, e é a fase em que ocorre a morte do embrião pelo calor ou pela capacidade do ácido acético penetrar na semente (REIS, 2007; OLIVEIRA, 2015).

O teste de corte é o mais comum, utilizado para avaliar a coloração interna das amêndoas, como forma de controle de qualidade (Figura 1). Por lote são cortadas de 100 a 300 amêndoas, em que são analisadas características como cor e odor (FERREIRA et al., 2013). Os resultados comumente observados são coloração marrom, que indica boa fermentação; coloração violeta, que indica fermentação insuficiente.



Figura 1. Avaliação da qualidade das amêndoas secas do cacau por meio da observação da coloração interna

Fonte: FERREIRA, 2013.

Todas as etapas da fermentação estão intimamente ligadas às características finais do chocolate, portanto, é uma fase de grande importância para a obtenção de amêndoas adequadas para a fabricação de chocolates de qualidade (SAMAGACI et al., 2016; DE VUYST et al, 2016). Além disso, no processo de fermentação ocorre também a redução de compostos polifenóis e alcaloides, que não são desejados na amêndoa por ele dar sabor amargo e adstringente a amêndoa (LEE et al., 2016).

Logo após a fermentação, as amêndoas sofrem um processo intermediário antes de serem exportadas para as indústrias: a secagem. Nela, as amêndoas são expostas ao sol e revolvidas regularmente (BATISTA, 2008); esse processo também é de grande importância e não deve ser inadequado para não desenvolver fungos não desejáveis que possam alterar o sabor do produto final ou produzir toxinas

prejudiciais a saúde (EFRAIM et al., 2010). Na figura 2 é mostrado o fluxograma do pré-processamento do cacau como descrito.

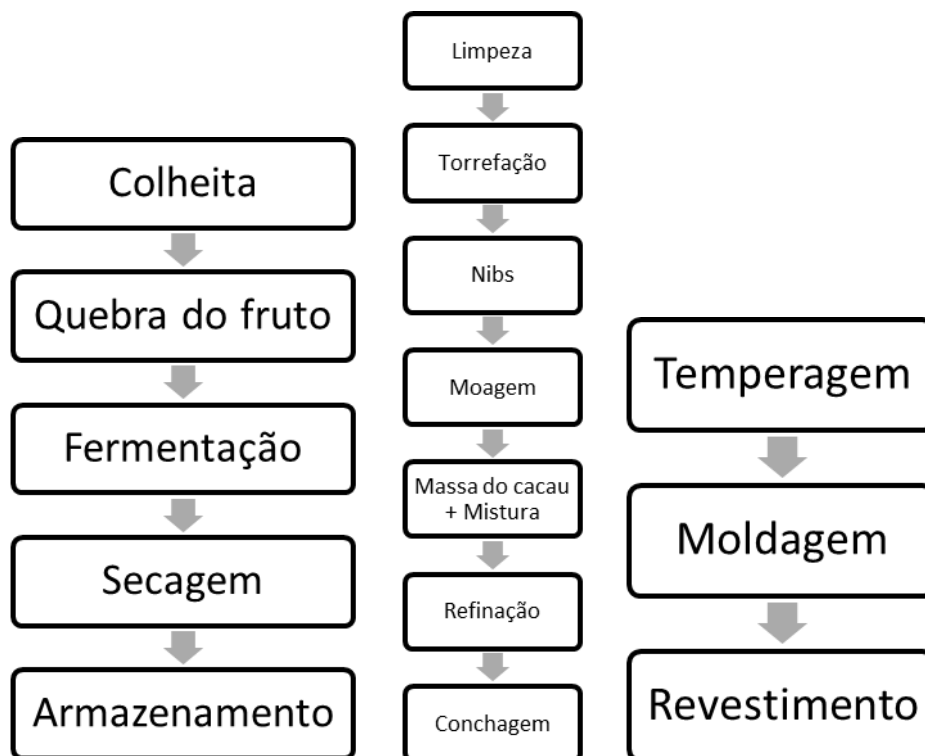


Figura 2. Fluxograma do pré-processamento, processamento e fase final da amêndoa antes da comercialização do chocolate, respectivamente.

2.3 Processamento das amêndoas de cacau

No seu processamento industrial, as amêndoas passam por várias etapas também, como pode ser visto na figura 2. Inicialmente é feita a limpeza das amêndoas, sendo retirado qualquer material estranho, para assim sofrer a torrefação. Depois as amêndoas são descascadas, retirando o tegumento e gérmen – dando origem ao nibs, que é a matéria-prima que sofre a moagem. A partir do nibs são produzidos os subprodutos: massa de cacau, manteiga de cacau, cacau em pó (CRUZ, J.F.M. 2012). Na massa do cacau, é adicionado açúcar e o leite em pó, que são misturados em um tanque. Nessa fase a massa recebe a adição da manteiga do cacau, e é homogeneizada sob temperatura entre 60°C a 80°C até que se obtenha um líquido cremoso e espesso (BATISTA, 2008). No processo seguinte, temos a refinação onde essa mistura é passada em cilindros e peneiras, transformando toda ela em partículas menores (dimensão de 15 a 20 micros). Depois, na conchagem as

partículas sólidas de açúcar e cacau, são revestidas de manteiga de cacau, o que contribui para a textura do chocolate (CRUZ, J.F.M. 2012).

Nas fases finais, temos: temperagem, moldagem e revestimento (Figura 2). Na temperagem, basicamente o chocolate quente e líquido é colocado numa temperatriz para cristalizar em níveis de temperatura bem definidos para cada tipo de chocolate. Na moldagem, o chocolate é derramado nos moldes que são colocados em esteiras rolantes, nesta fase pode-se acrescentar os recheios (como avelã e castanhas). E por fim, na fase de revestimento, como o próprio nome diz, os bombons recebem um revestimento fino de chocolate antes de serem encaminhados para o túnel de resfriamento a 10°C (BATISTA, 2008).

2.4 Diversidade de leveduras na fermentação

A diversidade de leveduras esta diretamente relacionada à localização geográfica, ao ambiente e ao tipo de método fermentativo. Sendo assim, há tem diversos estudos sobre a população das leveduras em diferentes localidades onde se tem a produção das amêndoas pelo mundo. Em um trabalho realizado no sul da Bahia, com amostras da fermentação de cacau da Fazenda São Jorge da cidade de Ilhéus, foram isoladas leveduras e após a extração do DNA, através do DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) foi observado um perfil com uma quantidade de 8 a 13 bandas distintas com intensidades variadas (FERREIRA et al., 2015). Em outro estudo realizado com amostras colhidas em lavouras localizadas na região do cacau do sul da Bahia, foi demonstrado que as leveduras encontradas durante as primeiras 48 h da fermentação foram *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* e *Pichia* (BASTOS et al., 2018).

Ainda sobre análises da fermentação no continente americano, já foram relatados também, estudos da dinâmica de leveduras no Equador. De 132 isolados de leveduras, através da análise de *cluster*, foram revelados dois *clusters* principais: *P. kudriavzevii* e *Pichia manshurica*. A *S. cerevisiae* apresentou apenas 17,4% dos isolados de levedura obtidos. Outras espécies foram encontradas em menos proporções, sendo elas *Kluyveromyces marxianus*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida tropicalis*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula minuta* e *Torulaspota delbrueckii* (PAPALEXANDRATOU et al., 2011). Já em estudos em San Francisco de Macoris

na República Dominicana, a partir de fermentações em caixa, 43 linhagens de leveduras foram isoladas e estas pertenciam aos gêneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* e *Yarrowia* (GÁLVEZ et al., 2007).

Dentre os países africanos, foram relatados estudos no mesmo sentido com amostras colhidas de produtores de Gana, na África Ocidental. Nas pesquisas sobre a população de leveduras, notou-se que na fermentação em pilha a *C. krusei* era a espécie dominante seguida por *P. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *H. guilliermondii* e *T. asahii*. Já na fermentação em bandeja, a *S. cerevisiae* e *P. membranifaciens* foram as espécies dominantes, seguidas por *C. krusei*, *P. kluyveri* e *H. guilliermondii* (JESPERSEN et al., 2005). Em outro estudo, realizado com plantações híbridas de cacau em Gana, nas proximidades da região Leste e da região de Ashanti, foi notado que *H. guilliermondii* foi a levedura predominante em todas fermentações nas primeiras 24 h, além da levedura *Candida zemplinina*. Já a *Candia silvae*, *C. zemplinina* e *Candida diversa* estiveram presentes durante as fermentações em bandeja (NIELSEN et al., 2007). Em localização diferente (perto de New Tafo e Old Tafo - Gana), foi pesquisado também sobre a população das leveduras em fermentações de cacau em pilha e constatou-se como mais frequentes *P. kudriavzevii* (27 isolados), *S. cerevisiae* (22 isolados), *Hanseniaspora opuntiae* (18 isolados), *M. caribbica* (5 isolados) e *Pichia kluyveri* var. *kluyveri* (5 isolados) (DANIEL et al., 2009).

Amostras da Costa do Marfim, também foram analisadas. Dos isolados colhidos da fermentação que ocorreu em caixa de madeira, *Hanseniaspora opuntiae* foi a espécie dominante em todas as etapas da fermentação. Após dois dias de fermentação, foram identificadas *Candida insectorum*, *Pichia kudriavezii*, *Pichia galeiformis* e *Pichia* grupo 1. Outras leveduras foram identificadas ao longo das demais etapas (HAMDOUCHE et al., 2015).

Na Malásia, trabalhos com pesquisa de populações de leveduras do processo fermentativo do cacau nos métodos de fermentação em caixa e pilha, foram encontradas em comum nos dois processos: *Candida sorboxylosa*, *Candida tropicalis*, *H. thailandica*, *H. opuntiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*. Sendo as consideradas principais a *S. cerevisiae*, *H. thailandica*, *H. opuntiae* e *P. kudriavzevii* (MEERSMAN et al., 2013). Em outro estudo também realizado na Malásia, feito apenas considerando fermentações em

caixa, identificaram maior quantidade de isolados de *Sacharomyces cerevisiae*, e menor quantidade de outras espécies, como *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspota delbruecki*, *Hanseniaspora thailandica*, *Pichia manshurica*, *Candida jaroonii* e *Candida tropicalis* (PAPALEXANDRATOU et al., 2013).

Ao sudeste, na Indonésia um estudo feito a partir de fermentações em caixa em três propriedades distintas, foi constatado que *Kloeckera apis* foi a espécie dominante durante os primeiros 24-36 h. A *Kloeckera javanica* e *Kloeckera africana* foram descritas como encontradas em apenas uma das três propriedades. *K. apis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* foram as leveduras de maior destaque na fermentação das três propriedades (ARDHANA et al., 2003).

Já foram estudadas e identificadas diferentes grupos de leveduras em fermentação do cacau. Os gêneros de leveduras mais frequente em fermentações são: *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* e *Pichia* (ILLEGHEMS et al., 2012; MOREIRA et al., 2017). Sendo a mais relatada a *Saccharomyces* (MOREIRA et al., 2017).

2.5 Importância da atividade das leveduras

As leveduras produzem além dos metabólitos principais (etanol, CO₂) outros metabólitos secundários, como aldeídos, compostos de carbonila, ésteres, ácidos graxos, alcoóis, ácidos orgânicos, fenóis e compostos contendo enxofre, que contribuem para o sabor, principalmente os voláteis frutados (MEERSMAN et al., 2015). As leveduras também diminuem a acidez e contribuem para a degradação das proteínas da semente, além de outros compostos (LEAL JR et al., 2008). Uma visão geral de todas as mudanças químicas externas (polpa) e internas (semente) podem ser observadas na figura 3.

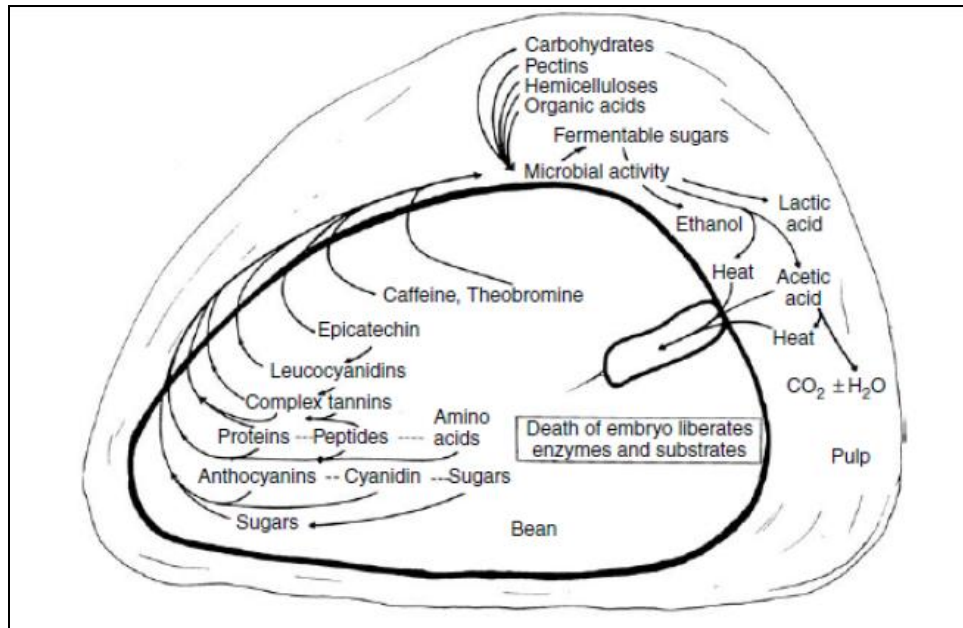


Figura 3. Mudanças químicas dentro da semente do cacau durante a fermentação. Os microrganismos produzem o etanol, ácido láctico e ácido acético que penetram a semente, promovendo assim a morte do embrião. Conseqüentemente, ocorre a liberação de várias substâncias como antocianinas e proteínas, por exemplo.

Fonte: LOPEZ, 1986.

Em vista a relevância do processo de fermentação, quanto a sua eficiência em fermentar a polpa com alta qualidade, muitos pesquisadores têm buscado desenvolver culturas iniciais para fermentação controlada dos grãos de cacau (SCHWAN et al., 1998; MEERSMAN et al., 2015; PAPALEXANDRATOU et al., 2016; VISINTIN et al., 2017). Em experimentos conduzidos em caixas de madeira na Bahia, Brasil, foram monitoradas fermentações com e sem a adição de inóculo. O inóculo selecionado continha *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum*. Após o processo de fermentação e com as amêndoas já secas, estas foram enviadas para produção do chocolate para avaliação de cada tratamento. Houve diferenças quanto à dinâmica de leveduras nos dois tratamentos, tendo em comum a ambos somente a *S. cerevisiae*. Quanto à análise sensorial do chocolate produzido, o tratamento com inóculo mostrou notas frutadas que foram mais intensas no final do paladar (BATISTA et al., 2015). Outros testes foram feitos na Bahia no mesmo sentido, porém o inóculo adicionado selecionado continha *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*. Neste, o inóculo influenciou a qualidade do produto final, mudando seu perfil analítico e a percepção sensorial do

chocolate. Em conjunto *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* tiveram atuação assertiva no perfil analítico do chocolate (VISINTIN et al., 2017).

Testes com híbridos também vem sendo realizados no Centro de Pesquisa da empresa Cacau Barry Callebaut (Pahang, Malásia), onde selecionam duas cepas, a H28 que apresentou a maior tolerância a temperatura e a H19 que mostrou tolerância a altas temperaturas e atividade *killer*. Após todo processo de fermentação e produção do chocolate, notou-se que a fermentação que ocorreu espontaneamente foi descrita como mais amarga e azeda, com sabor torrado, enquanto as fermentações com adição do inóculo foram descritas com sabor e aroma agradável (MEERSMAN et al., 2015).

Não só no meio das fermentações do cacau, mais também nos processos fermentativos do vinho tem se buscado testar culturas multi-starter para melhorar a qualidade do produto, sendo que estudos já tem demonstrado a contribuição de outras leveduras que não-*Saccharomyces*, que levam o vinho a ter um aroma de maior requinte e uma maior qualidade (STRAUSS et al., 2001; CIANI et al., 2006). A *Starmerella bacillaris* é uma levedura que tem sido relatada com destaque na indústria de vinhos, devido sua natureza frutofílica e baixa produção de álcool a partir do açúcar consumido; além disso, ela cresce em altas concentrações de açúcar e em baixas temperaturas (ENGLEZOS et al., 2015). Inclusive, esta já foi relatada em estudos que envolvem fermentações do cacau proveniente da região sul da Bahia nos trabalhos de Ferreira (2007) e Díaz (2016). Nos estudos de Díaz (2016), a *Starmerella bacillaris* se mostrou positiva em testes iniciais para protease e também atividade *killer* contra *H. canadense* CCMB338, *H. anômala* CCMB341 e *H. californica* CCMB346.

Como a fermentação do cacau é um processo espontâneo, isso torna-o complexo e com limitações para a implementação de culturas iniciais. Sendo assim, testes têm sido desenvolvidos para avaliar o desempenho e sucessão microbiana em tanques de aço (PEREIRA et al., 2012). Grupos de pesquisa também tem buscado mostrar a utilidade de culturas iniciadoras bacterianas, sendo que essas contribuem para o processo de fermentação e também podem ser aplicadas no processo controlado (LEFEBER et al., 2010; LEFEBER et al., 2011). Testes dessa natureza demonstraram uma maior e mais rápida conversão do ácido cítrico e

produção de ácido lático, em ensaios que também foram adicionados ou não cepas de levedura (LEFEBER et al., 2012).

2.6 Enzimas secretadas durante fermentação

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade de reações bioquímicas, sendo assim de interesse em aplicações industriais. As enzimas podem ser adquiridas de vegetais, animais e microrganismos. A pesquisa por novas descobertas sobre produção de enzimas, principalmente por microrganismos é constante, sendo os maiores desafios encontrar enzimas que suportem variações de temperatura e pH sem perder sua atividade catalítica (MONTEIRO, V.N; SILVA, R.N., 2009).

No processo de fermentação do cacau, assim como a secagem das amêndoas, as enzimas liberadas pelas leveduras atuam no processo complexo fazendo a hidrólise de açúcares e proteínas, além de promover a difusão de compostos fenólicos (SILVA, M.S. 2011). Algumas enzimas tem maior destaque no processo fermentativo, como as enzimas pectinolíticas, que em contato com a pectina da polpa, promove sua degradação; enzimas proteolíticas, que com a hidrólise de proteínas melhora a concentração de aminoácidos livres; e as enzimas amilolíticas, que melhora a concentração de açúcares redutores pela hidrólise do amido (GÁLVEZ et al., 2007; SILVA, M.S. 2011). Outras enzimas se fazem presentes na fermentação do cacau, como a invertase que faz a inversão de sacarose em glicose e frutose (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998), sendo assim encarregadas da liberação de açúcares redutores que são imprescindíveis à formação do sabor durante a torração das amêndoas (SILVA, 2016).

Já foram relatadas por Silva (2011) leveduras da fermentação do cacau produtoras de lipases; no entanto, a função destas na fermentação é pouco esclarecida. Porém, é bem difundido o seu uso em outros processos industriais, como queijos, pães *light*, margarinas e até detergentes.

Existem leveduras ainda, que podem produzir toxinas extracelulares que são letais para outras leveduras, mas que não trazem nenhum problema para a própria secretora. Essa característica *killer* é interessante para a fermentação do cacau, em que esse tipo de levedura pode ser usada para evitar possíveis contaminações no

processo fermentativo (DÍAZ, 2016); leveduras com essa característica tem sido usadas para controle de contaminantes em processos fermentativos de vinhos (SANTOS, 2010).

2.7 Tipagem molecular

A identificação de microrganismos é geralmente feita por técnicas de observação morfológica, além de testes bioquímicos (GANDRA et al., 2008). No entanto, esses testes envolvem processos demorados. Além disso, a técnica de fermentação espontânea tem variações de microrganismos entre uma fermentação e outra (SCHWAN et al., 2004). Estudos que usam análise por plaqueamento tende a alterar drasticamente a percepção sobre a diversidade, já que muitos microrganismos não são cultiváveis, limitando assim a análise que demonstra apenas espécies que são cultiváveis e não todas aquelas de ocorrência natural do processo (COCOLIN et al., 2000).

Então, alternativamente, tem se desenvolvido métodos moleculares para tipagem de microrganismos como o (GTG)₋₅. Esse método baseia na amplificação de regiões entre microssatélites GTG e CAC para diferenciar leveduras de maneira intraespecífica, rápida, segura e relativamente fácil (LIECKFELDT et al., 1993, SILVA-FILHO et al., 2005, BASÍLIO et al., 2008, ILLEGHEMS et al., 2012, SILVA-BEDOYA et al., 2014).

Esse método utiliza o próprio microssatélite como iniciador da amplificação do DNA em um método conhecido como ISSR (Inter Single Sequence Repeats). Se baseia na amplificação de regiões de alto polimorfismo para a caracterização intraespecífica (LIECKFELDT et al., 1993), mostrando um grande potencial para o agrupamento de leveduras em processos de dinâmica industrial de populações como nas produções de vinho (ENGLEZOS et al., 2015) e fermentação do cacau (SILVA-FILHO et al., 2005, BASÍLIO et al., 2008, NOVA et al., 2009 SILVA-BEDOYA et al., 2014) também sendo utilizada em leveduras ambientais (SILVA-BEDOYA et al., 2014).

Como nem sempre é viável fazer o sequenciamento de tantas amostras de microrganismos, sendo comum em estudos de fermentação do cacau obter grande quantidade de isolados, essa ferramenta se mostra eficaz pelo fato de gerar um

padrão de bandas intraespecífico, que permite avaliar agrupamentos e selecionar um microrganismo principal de cada agrupamento para ser identificado.

Esses padrões de bandas também podem ser usados para fazer comparações com banco de dados, o que permite também identificação rápida sem necessariamente precisar sequenciar. Assim reduz-se a quantidade a ser identificada, não excluindo pressupor a qual espécie as demais estão enquadradas.

Para avaliar perfis de leveduras de uma fermentação de cacau em um experimento conduzido na Bahia, o DNA das leveduras foi submetido ao Rep-PCR que utilizou apenas o primer (GTG)₋₅. Os resultados da análise com o (GTG)₋₅ além de permitir a análise de similaridade através dos dendogramas, permitiu avaliar a inoculação de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* utilizados como cultura inicial em níveis de linhagem (VISINTIN et al., 2017).

A utilização de forma semelhante do primer (GTG)₋₅, também demonstrou ser eficiente quanto ao estudo da comunidade de leveduras da fermentação do cacau realizado em Gana, onde a partir dos perfis de bandas gerados, foi possível fazer dendogramas que foram baseados no coeficiente de similaridade (NIELSEN et al., 2007).

2.8 Métodos de armazenamento de microrganismos

Dentre os métodos de armazenamento de microrganismos para conservação dispomos de métodos de curto, médio e longo prazo. No método de curto prazo temos a exemplo a repicagem contínua ou periódica, que é uma técnica mais rudimentar utilizada para obter microrganismos viáveis. Em métodos de médio prazo temos como exemplo a manutenção em óleos, que se baseia na aplicação de óleo mineral esterilizado sobre a cultura com objetivo de reduzir o metabolismo do microrganismo e no método de longo prazo temos como exemplo a liofilização que se baseia na remoção total da água intracelular do microrganismo congelado por sublimação (DELLARETTI, 2014). Serão melhores detalhadas as técnicas utilizadas para os isolados do presente estudo, em que foram empregadas técnicas de médio prazo, sendo elas congelamento comum (glicerol a - 20° C) e armazenamento em óleo mineral a - 4° C.

Na técnica de congelamento comum, objetiva-se conservar os microrganismos em baixas temperaturas (- 20° C) com crioprotetores como o glicerol (COSTA et al., 2009). É um método simples e acessível, podendo armazenar os microrganismos por um intervalo de tempo de meses a dois anos (DELLARETTI, 2014). Como desvantagem pode diminuir a viabilidade de microrganismos (SOLA et al., 2012).

Num estudo de manutenção de 328 leveduras por congelamento a - 20°C, após três anos verificaram a recuperação de 99,0% das leveduras; após o período de mais um ano (quatro anos no total) perdeu-se apenas 8,4% das leveduras. Provando favorecer grande porcentagem de recuperação, é um método simples e de baixo custo que pode ser de grande empregabilidade na manutenção de leveduras (SILVA et al., 2008).

Já na técnica de armazenamento em óleo mineral esterilizado o intuito é favorecer um ambiente com baixos níveis de oxigênio, sendo assim, é realizada a adição do óleo sobre o meio convencional com o microrganismo já desenvolvido (MARIANO, 2006). Tem como benefício a redutibilidade do tempo de desidratação do meio de cultura por conta da diminuição do nível de oxigênio, podendo ser armazenado por dois a três anos. No entanto, apresenta desvantagens como a possibilidade de haver contaminações (SOLA et al., 2012).

Foi avaliada a viabilidade de seis cepas padrão de leveduras mantidas em óleo mineral, as culturas se apresentaram viáveis em até 18 meses de armazenamento, porém, após esse período de tempo começaram a apresentar um aspecto diferente. Sendo possível afirmar que o armazenamento em óleo não mantém uma viabilidade satisfatória por períodos maiores para todas espécies, pois uma das cepas perdeu sua viabilidade antes dos dois anos de armazenamento (MARIANO, 2006).

3. OBJETIVOS

- Avaliar o percentual de leveduras recuperadas de quatro coletas de fermentações de cacau distintas
- Determinar qualitativamente a produção de enzimas de interesse biotecnológico por essas leveduras
- Avaliar o perfil de similaridade por cada banco de leveduras
- Selecionar levedura autóctone potencial para ser usada como inóculo *starter*

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das leveduras

Em trabalhos anteriores nos laboratórios de Biotecnologia Microbiana e Monitoramento Ambiental da Universidade Estadual de Santa Cruz foram obtidos aproximadamente 400 leveduras no meio de cultura Sabouraud (FERREIRA, 2007; SANTOS, 2012; DÍAZ, 2016). No trabalho de Ferreira (2007), foram realizadas duas coletas de fermentações distintas de cacau do tipo Forasteiro e nos trabalhos de Santos (2012) e Díaz (2016) uma coleta cada, em fermentação de cacau do tipo Scavina e do tipo Forasteiro, respectivamente, totalizando quatro coletas para o isolamento de leveduras que foram usadas no presente estudo. Estas estão armazenadas em glicerol a -20°C e, ou em óleo mineral a 4°C.

As coletas de Ferreira foram realizadas em duas fazendas da região sul da Bahia, nos municípios de Ilhéus (fazenda São Jorge – coleta 1) e no município de Una (fazenda Ararauna – coleta 2). Estas coletas foram feitas em outubro de 2004 (coleta 1) e em julho de 2005 (coleta 2). Sendo por fim estocadas em GYMP em geladeira a 4°C, sob uma camada de óleo mineral estéril. Já o banco de Santos, foi obtido através de coletas realizadas em julho de 2010 na fazenda Leolinda em Uruçuca, Bahia. Sua forma de armazenamento foi da mesma forma descrita anteriormente. E por fim, o banco de leveduras de Díaz foi obtidos a partir de coletas realizadas na fazenda Capela Velha em Uruçuca, Bahia. Os isolados foram estocados a -20° C em tubos inclinados que continham glicerol.

4.2 Reativação das leveduras

Todas as leveduras foram reativadas através da inoculação em meio líquido seguido do plaqueamento com alça de Drigalski. O meio utilizado foi o caldo Sabouraud para a inoculação em meio líquido. Uma alíquota do estoque foi inoculada e incubada a 28° C até apresentar crescimento, sendo comum um tempo máximo de 120h. Após crescimento em meio líquido, uma alíquota foi plaqueada em Ágar Sabouraud. Todos os meios utilizados foram suplementados com 0,05 g/L de Cloranfenicol. As leveduras foram incubadas a 28°C até apresentar crescimento.

Foram feitas novas tentativas com leveduras que não apresentarem crescimento em até sete dias. As colônias foram repicadas para confirmação de sua pureza, para serem armazenados e utilizadas em ensaios posteriores (FERREIRA, 2007; SANTOS, 2012; DÍAZ, 2016).

4.3 Manutenção dos microrganismos

A manutenção dos microrganismos foi realizada através de um método de médio prazo, onde foi feita a preservação dos microrganismos em óleo mineral. Foram preparados meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, NaH_2PO_4 0,2%) em tubos de ensaio e solidificados na forma inclinada. As leveduras foram então estriadas e após o crescimento foi adicionado ao tubo óleo mineral estéril até que cobrisse todo o meio.

4.4 Ensaios microbiológicos para estudo enzimático qualitativo

4.4.1 Atividade de invertase, protease, amilase e lipase

Para estes testes foram utilizados os substratos sacarose, leite, amido e tributirina para pesquisar as enzimas invertase, protease, amilase e lipase, respectivamente. Foram preparadas placas contendo meio YNB e o substrato específico para cada teste enzimático a 2%. As leveduras foram então estriadas (na forma de círculos) na superfície do meio sólido e foram mantidas por 5 dias incubadas a 37 °C, para posterior observação da formação de halos de hidrólise para um teste positivo. Para observação dos resultados dos testes de hidrólise de amido (produção de amilase) foi utilizado solução de lugol a 0,2%. Para os demais, a formação dos halos era observada sem necessidade de revelar.

4.4.2 Atividade de pectinase

Para este teste de pesquisa de pectinase, foram preparadas placas contendo meio Czapeck (cloreto de potássio 0,5 g/L; nitrato de sódio 3 g/L; sulfato de magnésio 0,5 g/L; fosfato de potássio bibásico 1,0 g/L; pectina cítrica 1% e ágar-

ágar 1%). As leveduras foram inoculadas sob forma de discos sobre o meio sólido em triplicata e deixadas sob temperatura de 28°C por cerca de 18 horas. Foi utilizado NaCl 1 M, NaCl 5 M para as lavagens da placa e vermelho congo a 1% para revelar os halos de acordo McKay, (1998).

4.5 Extração de DNA dos isolados

A extração de DNA das leveduras foi realizada de acordo com Basílio et al (2008) e Silva-Filho et al (2005). Os isolados foram inoculados em caldo Sabouraud e incubados por 3 dias à temperatura entre 25-28°C. Após período de crescimento, foram transferidos 1,0 ml de cada cultura para microtubos de 1,5 ml e centrifugados por três minutos a 5.900 g. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 600 µl da solução de lise (Tris-HCl 1 M pH 8,0/ EDTA 0,5 M pH 8,0/ SDS 10%/ NaCl 0,5/ água destilada esterilizada) e colocado sob incubação a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão a cada 5 minutos. Na etapa seguinte, igual volume de fenol/clorofórmio (24:1) foi adicionado e após breve agitação as suspensões foram centrifugadas a 15.400 g por 10 minutos. Foram transferidos 500 µl da fase superior para microtubos novos de 1,5 ml e adicionado 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (1:1) que foram centrifugadas por igual período de tempo e rotação. Após centrifugação, foram transferidos 400 µl da fase superior para novos microtubos e adicionado sobre o mesmo, 800 µl de etanol absoluto gelado, permanecendo em *overnight* a - 20°C para precipitação do DNA. Depois da precipitação, o DNA foi coletado por centrifugação a 15.400 g por 10 minutos e lavado com etanol a 70% por duas vezes. A secagem foi realizada em estufa a 25-28°C por 30 minutos e em seguida foi resuspendido em tampão TE pH 8,0 (TRIS 10Mm/EDTA 1mM) e mantido a - 20°C.

4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) com (GTG)₋₅

A PCR para os primers (GTG)₋₅ foi também realizada de acordo com Basílio et al (2008) e Silva-Filho et al (2005). O primer (5' -GTG GTG GTG GTG GTG -3') foi utilizado com as seguintes condições de reação: um ciclo de desnaturação, a 94°C/5min, seguida por 40 ciclos de 94°C/30 S de desnaturação, 55°C/45 S de

anelamento e 72°C/1,5 min de extensão, terminando o ciclo de 72°C/6 min de extensão final. Os produtos da reação foram separados em géis de agarose a 1,7% (p/v) em tampão 1X TAE a 60 v, por 180 minutos. Os géis foram corados com GelRed para visualização das bandas com luz UV, e o marcador utilizado foi da Invitrogen com peso molecular de 1 Kb, para a comparação de tamanho de bandas.

4.7 Análise de similaridade por agrupamentos e PCA

A análise de similaridade e análise de componentes principais (PCA) foi realizada a partir da matriz de dados de presença e ausência de bandas feitas a partir dos géis, com o programa PAST 3.0. Para a análise de agrupamentos foi utilizada análise multivariada com análise de *clusters* com obtenção dos dendogramas no coeficiente de similaridade Jaccard.

4.8 Sequenciamento

A identificação dos isolados foi feita mediante o método de sequenciamento, usando a técnica de Sanger. Para isso, foi necessário que o DNA extraído fosse submetido a uma PCR com o primers NL1 e NL4. A reação de polimerase em cadeia foi feita com primer NL1 (5' -GCA TAT TAA GCG GAG GAA AAG -3') e NL4 (5' -GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'), que amplificam os domínios D1/D2 do rDNA 26s. Essa reação iniciou com um ciclo de 94°C/3 min, desnaturação, seguida de 35 ciclos de 94°C/1 min, desnaturação, 52°C/1 min de anelamento, 72°C/1 min de extensão e, finaliza-se com 72°C/7 min de extensão final. A quantidade de 50 ng do amplicon foi utilizado para sequenciamento. As sequências foram obtidas com o sequenciador automático ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) usando os protocolos da prestadora de serviço ACTGene Análises Moleculares, Alvorada/RS, Brasil.

5. RESULTADOS

5.1 Amostras reativadas

Para simplificar e ter uma melhor compreensão dos resultados, os bancos da coleta de Ferreira manterão as siglas CI e CII, o de Díaz será descrito como CIII e o de Santos como CIV.

Da reativação das amostras de leveduras, o banco que teve maior número de amostras reativadas foi o CIV (que está entre os mais recentes, 2010). Já o banco com menor número de amostras reativadas, foi o banco CII (que está entre os mais antigos, 2005). Como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 – Leveduras da fermentação do cacau que foram recuperadas.

Relação original de amostras em estoque de leveduras da fermentação do cacau e a quantidade de amostras recuperadas após reativação dos bancos.

Banco	Variedade do cacau	Total de isolados	Total de isolados recuperados
CI	Forasteiro	107	56
CII	Forasteiro	91	19
CIII	Forasteiro	84	39
CIV	Scavina	118	71
TOTAL		400	185

5.2 Testes enzimáticos

Os testes enzimáticos realizados tiveram como perspectiva a seleção de leveduras com potencial biotecnológico e para uso como inóculo *starter* para processos fermentativos do cacau.

Na banco CI, todas as amostras foram positivas para a produção das enzimas invertase, pectinase e lipase. No entanto, apenas quatro amostras foram positivas para protease e nenhuma amostra foi positiva para lipase. No banco CII, também todas as amostras foram positivas para a produção das enzimas invertase,

pectinase e lipase. Um total de sete positivas foram encontradas para protease e apenas duas para amilase.

Já no banco de CIII, todas as amostras se mostraram positivas para a produção das enzimas invertase e pectinase, além de quatro amostras positivas para a produção da enzima protease. Nenhuma amostra se mostrou positiva para a produção da enzima amilase. No entanto, a maioria com exceção das amostras S74a, S255b e S373, apresentaram resultado positivo para atividade de lipase. E por fim, no banco CIV todas as amostras foram positivas para a produção das enzimas invertase, pectinase e lipase. Diferentemente das demais coletas, não foi encontrada nenhuma amostra positiva para protease, já para amilase, sete amostras de mostraram positivas. A relação destes resultados pode ser observada na tabela 2.

Tabela 2 – Leveduras da fermentação do cacau que foram positivas para os testes enzimáticos
Relação de quantidade de amostras positivas para os testes qualitativos de amilase, pectinase, protease, invertase e lipase dos bancos de leveduras isoladas do processo de fermentação do cacau.

Enzima	CI	CII	CIII	CIV	Total
Amilase	0	2	0	7	9
Pectinase	56	19	39	71	185
Protease	4	7	4	0	15
Invertase	56	19	39	71	185
Lipase	56	19	36	71	182

5.3 Análise de similaridade por banco

O (GTG)₋₅ foi realizado com o objetivo de analisar a diversidade e similaridade molecular dos isolados de cada banco, assim como a diversidade entre os bancos.

Com o resultado dos géis, foi feita uma matriz binária, observando a presença e ausência de bandas no gel. Da matriz binária, foram gerados os dendogramas de similaridade no software PAST 3.0, como pode ser observado na figura 4.

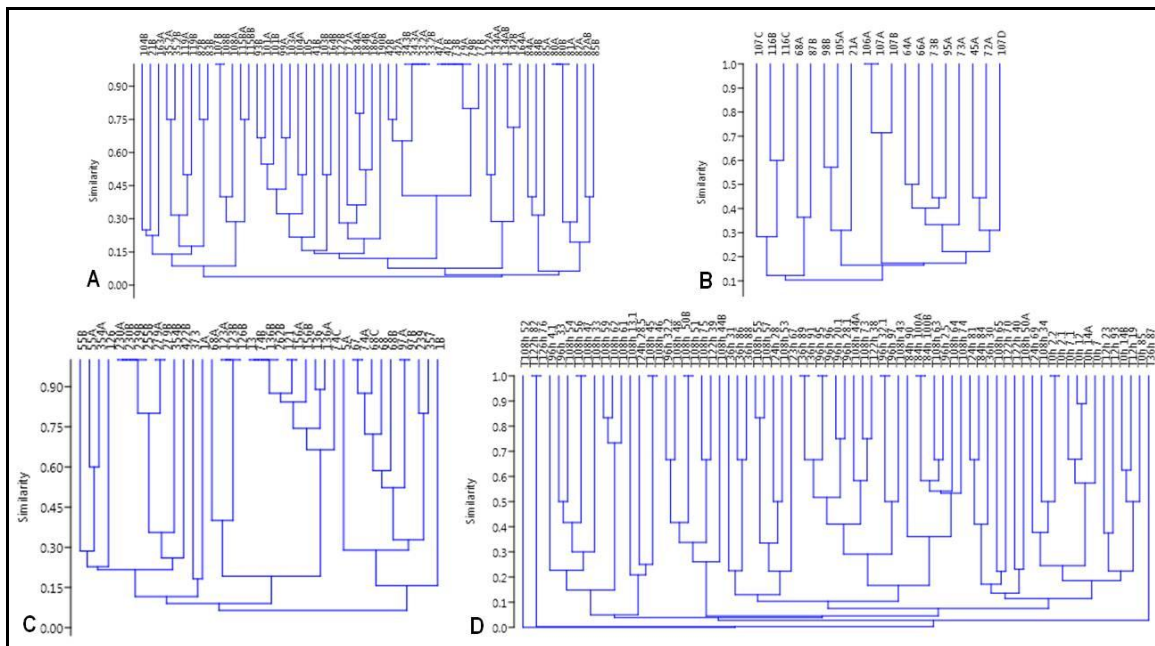


Figura 4. Análise dos perfis de (GTG)-5 onde A, B, C e D são coletas I, II, III e IV respectivamente.

5.4 PCA

A análise de componentes principais foi feita com base na matriz de dados de presença e ausência de bandas feitas a partir dos géis. A finalidade da análise é exploratória onde pode-se avaliar a distribuição dos agrupamentos/sobreposições dos isolados identificados (Figura 5).

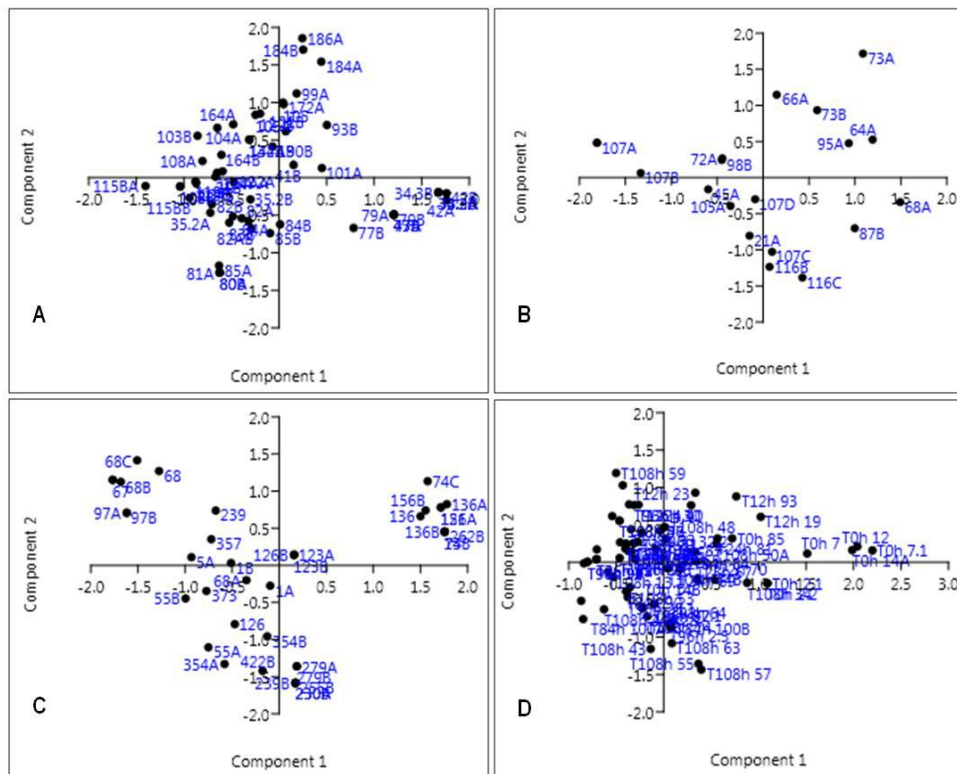


Figura 5. Análise de componentes principais, sendo A, B, C e D são coletas I, II, III e IV respectivamente.

5.5 Sequenciamento e identificação

As amostras de leveduras que mais foram pontuadas como positivas na análise qualitativa dos testes enzimáticos foram então submetidas a sequenciamento de DNA e comparadas com banco de dados. As tabelas abaixo estão organizadas com as amostras identificadas por cada banco, individualmente.

Do banco CI, foram identificadas quatro amostras de leveduras. Sendo 108b e 184a indicadas como similares a *Schwanniomyces etchellsii*, 122b e 184b identificadas como *Candida parapsilosis*. Estas foram às únicas leveduras deste banco que se mostraram positivas para protease, além de invertase, pectinase e lipase como visto na tabela 3.

Tabela 3 – Leveduras da fermentação do cacau do banco CI, que foram identificadas.

Relação de leveduras identificadas no banco de CI (amostras da fermentação de cacau Forasteiro).

Isolados	Identificação	Nº de acesso	Protease	Amilase
CI 108b e CI 184^a	<i>Schwanniomyces etchellsii</i>	NG_042636	+	-
CI 122b e CI 184b	<i>Candida parapsilosis</i>	MK026351	+	-

*Todas as amostras identificadas na tabela foram positivas para os testes enzimáticos qualitativos de pectinase, invertase e lipase. Sendo diferentes das demais de todo o banco por serem positivas para protease. No que diz respeito à porcentagem de similaridade, todas tiveram porcentagem maior que 99,7%.

Já no banco CII, foram identificadas oito amostras de leveduras como pode ser visto na tabela 4, sendo elas 45a indicada como similar a *Yarrowia lipolytica* que foi positiva para todos os testes enzimáticos com exceção da protease e 87b indicada como similar a *Pichia manshurica*, que foi positiva para todos os testes enzimáticos.

Já as demais foram 107c como *Zygoascus hellenicus*; 107d, 107a e 116b como *Schwanniomyces etchellsii*; e 116c e 98b como *Pichia manshurica* que foram positivas para todos os testes enzimáticos, com exceção da amilase.

Tabela 4 – Leveduras da fermentação do cacau do banco CII, que foram identificadas.

Relação de leveduras identificadas no banco de CII (amostras da fermentação de cacau Forasteiro).

Isolados	Identificação	Nº de acesso	Protease	Amilase
CII 45 ^a	<i>Yarrowia lipolytica</i>	NG_055393	-	+
CII 87b	<i>Pichia manshurica</i>	MK101213	+	+
CII 107c	<i>Zygoascus hellenicus</i>	NG_055323	+	-
CII 107d, CII 107a e CII166b	<i>Schwanniomyces etchellsii</i>	NG_042636	+	-
CII 116c e CII 98b	<i>Pichia manshurica strain</i>	MK034750	+	-

* Todas as amostras identificadas na tabela foram positivas para os testes enzimáticos qualitativos de pectinase, invertase e lipase. Sendo diferentes das demais de todo o banco por sete serem positivas para protease e duas para amilase. No que diz respeito à porcentagem de similaridade, todas tiveram porcentagem maior que 99,5%.

Na tabela 5 são as amostras identificadas do banco CIII: S354b, S357 e S230a que apresentaram similaridade com *Pichia manshurica*, e a amostra S156b foi identificada como *Rhodotorula mucilaginosa*. As amostras identificadas desse banco foram positivas para invertase, pectinase, lipase e protease.

Tabela 5 – Leveduras da fermentação do cacau do banco CIII, que foram identificadas.

Relação de leveduras identificadas no banco CIII (amostras da fermentação de cacau Forasteiro).

Amostra	Identificação	Nº de acesso	Protease	Amilase
S156b	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MH000318	+	-
S354b, S357 e S230a	<i>Pichia manshurica</i>	MK034750	+	-

* Todas as amostras identificadas na tabela foram positivas para os testes enzimáticos qualitativos de pectinase, invertase e lipase. Sendo diferentes das demais de todo o banco por serem positivas para protease. No que diz respeito à porcentagem de similaridade, todas tiveram porcentagem igual a 100%.

Do banco das amostras de leveduras coletas do cacau Scavina, que é o CIV foram identificadas sete amostras sendo as únicas indicadas como positivas do banco para o teste de amilase, além de invertase, pectinase e lipase.

São elas T0h 12 como *Wickerhamomyces anomalus*; T 24h 81 e T122h 70 como *Torulaspota delbrueckii*; T36h 30, T36h 87, T108h 34 e T122h 40 como *Pichia kudriavzevii*. Nenhuma amostra neste banco se mostrou positiva para protease como indicado na tabela 6.

Tabela 6 – Leveduras da fermentação do cacau do banco CIV, que foram identificadas.

Relação de leveduras identificadas no banco CIV (amostras da fermentação de cacau Scavina).

Amostra	Identificação	Nº de acesso	Protease	Amilase
T0h 12	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	MH483547	-	+
T24h 81 e T122h 70	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	NG_058413	-	+
T36h 30, T36h 87, T108h 34 e T122h 40	<i>Pichia kudriavzevii</i>	MK101219	-	+

* Todas as amostras identificadas na tabela foram positivas para os testes enzimáticos qualitativos de pectinase, invertase e lipase. Sendo diferentes das demais de todo o banco por serem positivas para amilase. No que diz respeito à porcentagem de similaridade, todas tiveram porcentagem igual a 100%.

6. DISCUSSÃO

A porcentagem de isolados recuperados nos bancos de leveduras da fermentação do cacau foi de 46,2%, sendo representativo uma vez que para todos os bancos foram utilizados a mesma metodologia de reativação. No caso do congelamento comum (glicerol à -20°C), ele é viável por um período entre três meses a dois anos, já o armazenamento em óleo mineral a - 4°C que se trata também de um método de médio prazo, tendo maior sucesso no armazenamento por dois a três anos. O primeiro método tem por desvantagem a redução da viabilidade dos microrganismos; e o segundo, tem por desvantagem a possibilidade de contaminações (SOLA et al., 2012).

As coletas dos isolados foram entre 2004 e 2011, logo os métodos de manutenção mostraram bom desempenho na sua finalidade, pois mesmo depois do seu período considerado como efetivo, foi possível recuperar quase metade dos isolados superando as expectativas.

Dos testes *cup plate*, 100% das leveduras foram positivas para produção das enzimas pectinase e invertase. A pectinase é uma enzima de frequente produção pelos microrganismos (especialmente, os fungos), e isso é atribuído pelas condições de cultivo (composição do meio, fonte de carbono, pH, temperatura, etc). Portanto, a fermentação se trata de um meio que favorece a produção dessa enzima, assim como a invertase pela maioria dos microrganismos (ARAÚJO, A. M. A. 2015; GARGEL, C. A. 2011). Dessa forma é de se esperar que o ambiente fermentativo da polpa de cacau (rico em pectina e sacarose) induza as leveduras na produção dessas enzimas, visto que todos os isolados foram positivos.

Dentro da classe das esterases, temos a lipase, que no presente estudo as leveduras foram positivas em 98,3%. Gêneros são citados com habilidade de secretar lipase como *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulopsis*, *Yarrowia* (COLEN, G. 2006) e *Candida* (COLEN, G. 2006; SILVA, M. S. 2011). O gênero *Candida* é bastante citado como encontrado nos estudos de diversidade de microrganismos em fermentações do cacau, inclusive, este e outros citados como bons produtores de lipase foram identificados neste estudo. A *Candida rugosa* tem papel de destaque em aplicabilidade em diversos processos industriais, porém, a *Candida parapsilosis* foi uma espécie encontrada neste estudo e já relatada como

utilizada em inoculo *starter* de fermentação do cacau, onde mostrou influência positiva nas alterações físico-químicas do processo (SILVA, S. C. 2010).

Em relação à protease, apenas 8% das leveduras foram positivas para a atividade proteolítica. Sendo essas leveduras coletadas da fermentação com o cacau do tipo Forasteiro. A composição, o pH e a temperatura do meio de crescimento, assim como, o tipo de ensaio usado influenciam diretamente a produção de protease extracelular de leveduras (SIQUEIRA, A. A. D. 2012). Por exemplo, meios com sulfato de amônio reprime a síntese de protease. Logo, a utilização desses meios pode mascarar o resultado de atividade proteolítica. Apesar dos poucos estudos em relação a produção de protease por leveduras (proteases produzidas por fungos filamentosos e bactérias são mais estudados), elas são ótimas produtoras de protease. O desinteresse de estudos em relação a produção de protease pelas leveduras, se deu devido a *S. cerevisiae* apesar de ser a levedura mais estudada, produzir pouca ou nenhuma protease (FARIAS, M. V. 2008).

E a enzima que teve menor número de amostras positivas foi a amilase com apenas 4,8% do total, sendo sua maioria identificada no banco de leveduras coletadas da fermentação de cacau Scavina. Os resultados sugerem que leveduras tem pouca capacidade em degradar amido. Resultados semelhantes foram relatados quando pesquisado a capacidade de produção de amilase por leveduras da produção de vinhos. Onde de 245 linhagens, apenas 3,7% mostraram-se positivas (STRAUSS et al., 2001). Enzimas amilolíticas mais conhecidas são produzidas por fungos filamentosos como o *Aspergillus*. São escassos trabalhos que estudem e verifiquem secreção de amilase por leveduras. De maneira geral, as enzimas secretadas por leveduras coletadas da fermentação com cacau tipo Forasteiro não tiveram diferenças entre os bancos, sendo que todos os bancos apresentaram um padrão de produção semelhante. Sua diferença em comparação com as leveduras coletadas da fermentação com cacau tipo Scavina, se deve a ausência de produção da enzima protease por todos isolados.

Os resultados do PCR com o (GTG)₅ mostraram de maneira geral a diferença no padrão de bandas entre as leveduras de cada banco. Porém, quando comparados os padrões de bandas das leveduras identificadas como mesma espécie, notou-se que apesar do padrão ser semelhante, havia variação intra-específica em relação a algumas bandas. Portanto apresentam características

genéticas distintas e, assim também, potencial para inoculo distinto, mesmo produzindo as mesmas enzimas, a expressão e atividade dessas enzimas e a presença de outras enzimas não avaliadas no presente trabalho podem ser possíveis devido a variação observada na tipagem molecular. Isso é evidenciado no padrão de bandas do perfil (GTG)₋₅, que pode ser utilizado para acompanhar o inoculos no decorrer de fermentações controladas (DA SILVA-FILHO et al., 2005; BASÍLIO et al., 2008; SILVA-BEDOYA et al., 2014; NOVA et al., 2009).

Entre os microrganismos identificados neste trabalho, tivemos identificados àqueles que se destacaram na produção de protease e amilase. Alguns isolados foram identificados como a mesma espécie, porém, suas diferenças genéticas são evidenciadas quando observadas no PCA onde os isolados se apresentam em localizações de quadrantes diferentes. O banco que obteve maior número de gêneros diferentes foi o CII, sendo eles *Yarrowia lipolytica*, *Pichia manshurica*, *Zygoascus hellenicus* e *Schwanniomyces etchellsii*. Ainda que sejam ensaios iniciais (qualitativos), acredita-se que a levedura *Pichia manshurica* (CII 87b) se mostrou um isolado potencial para inoculo *starter*, pois se apresentou positivo para todos os testes enzimáticos. Outra levedura indicada como potencial é a *Pichia manshurica* (S357), pois se apresentou positivo para a maioria dos testes enzimáticos qualitativos (em exceção da amilase), além de ser relatada como levedura com atividade *killer* por Díaz (2016).

Na fermentação espontânea, essas leveduras quando inoculadas sozinhas ou em conjuntos, podem otimizar e influenciar diretamente na qualidade do produto final, sejam mudanças nas características do sabor ou do aroma. Uma vez que já tenha sido relatado inoculos onde essas características foram alteradas com a produção do chocolate a partir de amêndoas fermentadas com inoculo que envolveu o gênero *Pichia* (BATISTA et al., 2016). A apresentação das características de produção de pectinase, invertase, lipase, protease e amilase no mesmo microrganismo é muito promitente. E ainda, quando se tem todas essas características juntamente com a capacidade de produzir toxinas (atividade *killer*) a torna mais promissora ainda, uma vez que essa qualidade pode ser usada como controle de contaminantes durante o processo de fermentação. Portanto, temos uma boa candidata a inoculo *starter* com bons indícios de aplicabilidade na fermentação do cacau.

7. CONCLUSÕES

Os métodos de manutenção dos microrganismos se mostraram mais que eficientes, pois os isolados foram armazenados a mais de dois anos e ainda assim o percentual de recuperação desses isolados chegou a quase 50% do total.

Nas análises de similaridade, foram observados os poucos agrupamentos em cada nível de porcentagens de similaridade indicando a grande diversidade de espécies de cada banco e entre os bancos no processo fermentativo do cacau.

Os testes de *cup plate* permitiram avaliar a produção ou não das enzimas pesquisadas neste estudo, onde foi selecionada com melhor desempenho a *Pichia manshurica* que se apresentou positiva para amilase, pectinase, protease, invertase e lipase sendo a levedura candidata para inóculo *starter* em fermentações espontâneas em trabalhos futuros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M.A.M. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado**. Campo Grande: UCDB, 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.

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.

BAKER, D. M.; TOMLINS, K. I.; GAY, C. Survey of Ghanaian cocoa farmer fermentation practices and their influence on cocoa flavour. **Food Chemistry - Journal - Elsevier**, v. 51, p. 425–431, 1994.

BASÍLIO, A. C. M. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322–326, 2008.

BASTOS, V. S. et al. Analysis of the cocobiota and metabolites of *Moniliophthora perniciosa* - resistant *Theobroma cacao* beans during spontaneous fermentation in Southern Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 13, p. 4963–4970, 2018.

BATISTA, A. P. S. A. **Chocolate: sua história e principais características**. Brasília: UnB, 2008. 48 f. Monografia (Especialista em Gastronomia e Saúde) - Pós-graduação Lato Sensu Curso de Especialização em Gastronomia e Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BATISTA, N. N. et al. The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. February, p. 1101–1110, 2016.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 239–245, 2006.

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.

COSTA, E. C. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v. 19, p. 111-122, 2009.

CRUZ, J. F. M. **Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem**. Salvador: UFBA, 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. **Importância Econômica e Evolução da Cultura do Cacau no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002**. 1 ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004.

DA SILVA-FILHO, E. A. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 13–23, 2005.

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

DEAN, W. A. **Botânica e a Política Imperial: Introdução e Adaptação de Plantas no Brasil Colonial e Imperial**. IEA/USP: Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo. 2012.

DELLARETTI, E. M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. Sete Lagoas: UFSJ, 2014. 36 f. Monografia (Bacharel Interdisciplinar em Biosistemas) - Programa de Graduação do Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas, Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, 2014.

DÍAZ, A. M. **Sucessão Microbiana Durante a Fermentação Espontânea do Cacau Para Caracterização e Isolamento de Linhagem Starter**. Ilhéus: UESC, 2016. 46 f. Dissertação (Mestre em Genética e Biologia Molecular) – Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2016.

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

ENGLEZOS, V. et al. International Journal of Food Microbiology Exploitation of the non- *Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 199, p. 33–40, 2015.

The International Cocoa Organization (ICCO). **Produção de cacau (mil toneladas)**. Boletim Trimestral da ICCO de Estatísticas do Cacau, vol. XLIII, nº 3, ano cacau 2016/17. 2017.

FERREIRA, A. C. R. **Caracterização Taxonômica Polifásica da Diversidade de Leveduras Associadas à Fermentação de Cacau do Sul da Bahia**. Ilhéus: UESC, 2007. 77 f. Dissertação (Mestre em Genética e Biologia Molecular) – Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

FERREIRA, A. C. R. et al. DGGE and multivariate analysis of a yeast community in spontaneous cocoa fermentation process. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18465–18470, 2015.

GÁLVEZ, S. L. et al. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 124–130, 2007.

GANDRA, E. Á. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum**, v. 30, n. 1, p. 109–118, 2008.

HAMDOUCHE, Y. et al. Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: towards the identification of molecular markers. **Food Control**, 2014.

HANSEN, C.E.; OLMO, M.D.; BURRI, C. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, p. 273-281, 1998.

ILLEGHEMS, K. et al. Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012.

JESPERSEN, L. et al. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. January, p. 441–453, 2005.

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

LEE, A. H. et al. Model Fermentation of Cocoa (*Theobroma cacao*) can Produce Similar Microbial and Chemical Quality of Cocoa Compared to Conventional On-Farm Cocoa Fermentation. **The FASEB Journal**, v. 30, n. Apr, 2016.

LEFEBER, T. et al. Kinetic Analysis of Strains of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria in Cocoa Pulp Simulation Media toward Development of a Starter Culture for Cocoa Bean Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 23, p. 7708–7716, 2010.

LEFEBER, T. et al. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 457–464, 2011.

LEFEBER, T. et al. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. **Food Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 379–392, 2012.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 413–425, 1993.

MAI, N. T. T.; HO, T. L.; TRAN, N. T. Fermentation of cocoa bean with addition of lactic acid bacteria. **Khon Kaen Agricultural Journal**, n. 4, p. 211–217, 2014.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 2011**. 1. ed. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MARIANO, P. L. S. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudo sobre a variabilidade fenotípica e genotípica**. Piracicaba: UNICAMP, 2006. 112 f. Tese (Doutor em Biologia Buco-Dental - Área de Microbiologia e Imunologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2006.

MARTINS, A. G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 1, p. 21–30, 2005.

MEERSMAN, E. et al. Detailed Analysis of the Microbial Population in Malaysian Spontaneous Cocoa Pulp Fermentations Reveals a Core and Variable Microbiota. **plos one**, v. 8, n. 12, 2013.

MEERSMAN, E. et al. Breeding Strategy To Generate Robust Yeast Starter Cultures for. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6166–6176, 2015.

MEERSMAN, E. et al. Tuning Chocolate Flavor through Development of Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Starter Cultures with Increased Acetate Ester. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 732–746, 2016.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, n. 5, p. 09-23, 2009.

MOREIRA, I. M. DA V. et al. Impact of a Microbial Cocktail Used as a Starter Culture on Cocoa Fermentation and Chocolate Flavor. **Molecules**, v. 22, 766;, 2017.

NIELSEN, D. S. et al. 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.

NOVA, M. X. V. et al. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 460–466, 2009.

OLIVEIRA, M. P. M. DE. **Seleção de leveduras pectinolíticas para melhoria da fermentação do cacau**. Piracicaba: USP, 2015. 66 f. Dissertação (Mestre em Ciências, área de microbiologia agrícola) – Programa de Pós-graduação em Ciências, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

PAPALEXANDRATOU, Z. et al. Species Diversity , Community Dynamics , and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional Ecuadorian Spontaneous Cocoa Bean Fermentations Species Diversity , Community Dynamics , and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated wi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 7698–7714, 2011.

PAPALEXANDRATOU, Z. et al. Acetobacter pasteurianus predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations , underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. **Food Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 73–85, 2013.

PAPALEXANDRATOU, Z.; NIELSEN, D. S. It's Gettin ' Hot in Here : Breeding Robust Yeast Starter Cultures for Cocoa Fermentation. **Trends in Microbiology**, v. xx, p. 1–3, 2016.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 121–133, 2013.

SAMAGACI, L. et al. 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.

SANTOS, D.S. **Inoculação De Leveduras Start Na Fermentação Do Cacau Para Melhoria Do Flavor**. ILHÉUS: UESC, 2010. 83 f. Dissertação (Mestre em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos) - Programa de Pós - Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos, Universidade Estadual De Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

SCHWAN, R. F. Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, 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, n. 4, p. 205–221, 2004.

SERRA, J. L. et al. QUANTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A FERMENTAÇÕES DE CACAU NO ESTADO DO PARÁ. **VVX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2016.

SILVA-BEDOYA, L. M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; OSORIO-CADAVID, E. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 135–142, 2014.

SILVA, A.B.C. **Determinação Da Atividade Das Enzimas Invertase E Polifenoxidase Durante A Fermentação De Dois Cultivares De Cacau (Theobroma Cacao L.)**. Salvador: UFBA, 2016. 81 f. Dissertação (Mestre em Ciência De Alimentos) - Programa De Pós-Graduação Em Ciência De Alimentos, Universidade Federal Da Bahia, Salvador, 2016.

SILVA, J. O. COSTA, P. P. RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a - 20°C. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SILVA, M.S. **Atividade Enzimática Extracelular De Leveduras Isoladas Da Fermentação Do Cacau**. Feira de Santana: UEFS, 2011. 83 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

SOLA, M.C.S. et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera, centro científico conhecer**, v. 8, n. 14, p. 1398, 2012.

STRAUSS, M. L. A. et al. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non- *Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, p. 182–190, 2001.

VISINTIN, S. et al. 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.

VISINTIN, S. et al. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, n. 2016, 2017.

VUYST, L. DE; WECKX, S. The cocoa bean fermentation process : from ecosystem analysis to starter culture development. **Journal of Applied Microbiology**, p. 5–17, 2016.

WICKRAMASURIYA, A. M.; DUNWELL, J. M. Cacao biotechnology : current status and future prospects. **Plant Biotechnology Journal**, p. 4–17, 2018.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4. ed. Estados Unidos: Osney Mead, Oxford OX2 OEL, 2001.