**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Seleção de leveduras pectinolíticas para melhoria da fermentação
do cacau**

Marcos Pinto Monteiro de Oliveira

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Marcos Pinto Monteiro de Oliveira
Licenciado em Ciências Biológicas

Seleção de leveduras pectinolíticas para melhoria da fermentação do cacau

Orientador:
Dr. **LUIZ HUMBERTO GOMES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Oliveira, Marcos Pinto Monteiro de
Seleção de leveduras pectinolíticas para melhoria da fermentação do cacau / Marcos
Pinto Monteiro de Oliveira. - - Piracicaba, 2015.
66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2015.

1. Cacau 2. Fermentação 3. Pectinase 4. Levedura I. Título

CDD 589.23
O46s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo aos meus pais, minha mãe Maria Inês e meu pai Fernando (in memoriam) que sempre primaram pela minha educação. Obrigado mãe por me incentivar a realizar este trabalho.

Agradeço aos meus irmãos Marcela e Gustavo, por fazerem parte da minha vida.

Agradeço aos meus queridos amigos e amigas da ESALQ: Felipe, Sérgio, Flávio, Luciana, Joze, Isabela, Andrea, Jeane, Pipoca, Diana, Amanda, Gislaine e tantos outros da pós-graduação da ESALQ por me proporcionar o bom convívio e troca de informações indispensáveis para a realização deste projeto.

Agradeço a Profa. Dra. Simone Possedente de Lira pelos grandes conhecimentos transmitidos.

Agradeço em especial ao meu orientador Luis Humberto Gomes por me apresentar o mundo científico/acadêmico, obrigado pela força e pela confiança depositados em mim.

Agradeço aos professores Antônio Vargas de Oliveira Figueira pelo incentivo a cultura e pela boa companhia; a Profa. Dra. Irene da Silva Coelho pela troca de informações e ensinamentos preciosos; ao Prof. Marcos Kamogawa por ser uma pessoa que presa pela cultura; ao Prof. Luis Carlos Basso pelas tardes de bate-papo científicos e confiança.

Por fim agradeço a minha eterna namorada Zilda por seu carinho e afeto, agradeço pela ajuda nos momentos difíceis, e por estar sempre ao meu lado, sem você nada disso valeria a pena, Muito Obrigado!

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,
portanto hoje é o dia certo para amar,
acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)	15
2.2 Fermentação do cacau.....	16
2.3 A formação do sabor	17
2.4 A formação da cor nos cotilédones	18
2.5 Pectina	18
2.6 Pectinases.....	19
2.7 Chocolate de alta qualidade	20
2.8 Inóculo Inicial de culturas de micro-organismos conhecidos.....	21
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivos específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Coleta das Amostras	27
4.2 Isolamento das Leveduras	27
4.3 Classificação por meio de cultivo seletivo	28
4.4 Ensaio de crescimento em pectina.....	28
4.5 Ensaio de avaliação de Açúcar Redutor Total Livre (ARTL).	29
4.6 Ensaio da Atividade Enzimática Indireta	29
4.7 Fermentação <i>in locu</i>	30
4.8 Amostragem e Análises.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Isolamento de leveduras da fermentação de cacau	35
5.2 Classificação através de meios de cultivo seletivos	37
5.3 Seleção por crescimento em pectina como única fonte de carbono	40
5.4 Seleção pela produção de ART livre	42
5.5 Seleção pela atividade pectinolítica indireto.....	43
5.6 Ensaio <i>in locu</i>	45
5.6.1 Drenagem do Mel.....	45
5.6.2 Açúcares	47

5.6.3 Etanol.....	49
5.6.4 Ácido Acético	50
5.6.5 Ácido Láctico	51
5.6.6 Temperatura	52
6 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	59

RESUMO

Seleção de leveduras pectinolíticas para melhoria da fermentação do cacau

As principais matérias-primas do chocolate, obtidas a partir das sementes secas do fruto do cacaueiro (*Theobroma cacao*), são a manteiga e o líquido de cacau. Para se obter matérias-primas de alta qualidade é necessário que o processo que antecede a industrialização, no caso a fermentação, seja padronizado para que sejam formados nas sementes os precursores de aroma, sabor e cor característica do chocolate. No interior do fruto do cacaueiro são encontradas as sementes envoltas por uma mucilagem composta por: água, pectina, sacarose, glicose, frutose, proteínas, ácidos e sais. O processo fermentativo do cacau ocorre sem qualquer tipo de inóculo ou padronização. Devido a este fato, os padrões de qualidade das sementes obtidas são as mais adversas e muitas vezes a presença de compostos interferentes e não desejáveis são formados ao longo desse caminho. Visando a otimização do processo fermentativo este trabalho teve por objetivo selecionar leveduras de ocorrência espontânea presentes na fermentação do cacau, reinoculá-las no processo natural *in locu* e comparar com o processo de ocorrência espontânea, avaliando assim o potencial do coquetel de leveduras a ser utilizado futuramente para padronizar o processo. Para tanto, foram isoladas 367 linhagens de leveduras de ocorrência espontânea em duas fazendas no sul da Bahia. As linhagens passaram por uma seleção onde foi implementado um programa de seleção composto por três ensaios: ensaio de crescimento em pectina; análise de Açúcar Redutor Total livre (ART); e avaliação de atividade enzimática. Foi possível selecionar três linhagens de leveduras promissoras com potencial pectinolítico as quais foram testadas *in locu* no município de Itabuna-BA. O processo de isolamento, seleção e reintrodução das linhagens selecionadas no processo fermentativo do cacau se mostrou uma prática altamente eficaz. Os resultados obtidos com a inoculação inicial de leveduras selecionadas, antecipou os eventos como produção de etanol, ácido acético, drenagem do mel e elevação da temperatura em 24 horas em relação ao controle.

Palavras-chave: Cacau; Fermentação; Pectinase; Levedura

ABSTRACT

Selection of pectinolytic yeast to improve the cocoa fermentation

The fundamental raw material to produce chocolate, obtained from dried seeds of cocoa fruit (*Theobroma cacao*), are butter and cocoa liquor. In order to obtain high quality of raw materials, it is necessary standardize the procedure before industrialization, known as fermentation, so that the aroma, taste and color precursors of chocolate must be formed in the seeds. Inside the fruits exists a white mucilaginous pulp, which covers the beans, it contains water, pectin, sucrose, glucose, fructose, proteins, acids and salts. The fermentation of cocoa seeds occurs in wooden boxes or piles on the ground without any control or standardization. Due to this fact, the quality of the seeds are the most adverse, the presence are often of interfering compounds and undesirable products could be formed along the way. To optimize the fermentation process this study aimed to select pectinolytic yeasts of spontaneous occurrence from cocoa fermentation, re-inoculate them in the natural process and compare with the spontaneously occurring process. Consequently evaluate the yeast cocktail potential as a standard inoculum. Therefore, we isolated 367 yeast strains from spontaneous cocoa fermentation in two different farms in southern Bahia - Brazil. The strains were analyze to a selection-screening program, which consists of three tests: ability to grow in pectin medium; Total free Reducing Sugar Analysis (ARTL); and evaluation of enzyme activity. It was possible to select three yeast strains with promising pectinolytic potential. Those strains were tested *in locu* in Itabuna-BA, Brazil. The results of that program, selection and re-introduction in the fermentation process proved to be a highly effective practice. The results obtained with the initial inoculation of selected yeasts, could anticipate the fermentation events in 24 hours, such as the production of ethanol, acetic acid, sweating drainage and temperature rise when compared with the control.

Keywords: Chocolate; Pectinolytic yeast; Cocoa; Fermentation

1 INTRODUÇÃO

As principais matérias-primas do chocolate, obtidas a partir das sementes fermentadas e secas do fruto do cacaueiro (*Theobroma cacao*), são a manteiga e o liquor de cacau. Após a colheita e quebra dos frutos, as sementes, que estão envoltas por uma mucilagem, são fermentadas, secas, comercializadas e processadas na indústria para obtenção das matérias primas. A fermentação ocorre na própria fazenda e é realizada por micro-organismos presente no ambiente, sem nenhum controle de inoculação. Durante este processo acontecem às transformações bioquímicas na semente que conduzem para a formação dos precursores de aroma, sabor e cor característica do chocolate (LOPES; DIMICK, 1995), fazendo da fermentação um processo determinante para obtenção de sementes adequadas para fabricação de chocolates de qualidade. A sucessão de micro-organismo durante a fermentação é bem estudada sendo comum a presença de leveduras, bactérias lácticas, bactérias acéticas, bacilos e fungos filamentosos (KIM; KEENEY, 1984; SCHWAN, 1998). No processo de fermentação a fonte de nutrientes disponível para os micro-organismos é a mucilagem. A mucilagem, também chamada de polpa, representa 10% do peso das sementes e é constituída por água (84,5%), pentosanas (pectina 2,7%), sacarose (0,7 %), glicose e frutose (10%), proteínas (0,6%), ácidos (0,7%) e sais (0,8%), sendo uma fonte rica de carbono e nitrogênio para os micro-organismos (SCHWAN; WHEALS, 2004). A polpa presente nas sementes dificulta a difusão de oxigênio na massa criando inicialmente uma condição de anaerobiose (SCHWAN et al., 1995). Nesta etapa inicial desenvolvem as leveduras e bactérias lácticas que consomem os açúcares da polpa transformando-os em álcool e ácido láctico. A atividade pectinolítica das leveduras faz com que polpa seja drenada da massa na forma de um líquido denominado mel de cacau, aumentando a difusão de oxigênio (THOMPSON et al., 2001). O aumento da oxigenação permite surgimento de bactérias acéticas que oxidam o etanol produzido pelas leveduras em ácido acético. O ácido acético também é oxidado produzindo gás carbônico e liberando calor, aumento gradativamente a temperatura até atingir cerca de 60°C (SCHWAN; WHEALS, 2004). Os principais produtos, gerados durante a fermentação são o álcool, ácido láctico e acético. O processo de geração destes produtos e ação direta de alguns desses compostos irão causar alterações das características iniciais das sementes *in natura* que irão caracterizar o chocolate (THOMPSON et al., 2001). A primeira alteração que acontece

na semente durante a fermentação é a morte do embrião que pode ser causado pelo calor e pelo ácido acético (BIEHL et al., 1982; FORSYTH; QUESNEL, 1963). O ácido acético percola através da testa da semente e migra para os cotilédones matando as células e o embrião. Com a morte e rompimento das células, enzimas e pigmentos são liberados nos cotilédones, que associados a elevação da temperatura e pH favorecem a atividade enzimática degradando proteínas, antocianinas e pigmentos. Durante este processo também acontece a oxidação, condensação e complexação dos polifenóis. Os aminoácidos gerados durante a proteólise irão se associar a açúcares durante as altas temperaturas no processo de torrefação, através da reação de *Maillard*, compondo as nuances do chocolate (VOIGT et al., 1994). A degradação das antocianinas resulta na coloração típica do chocolate e a oxidação, condensação e complexação dos polifenóis diminuem a adstringência, característica da semente *in natura*, tornando o produto mais palatável (FORSYTH et al., 1958). Estas alterações nas sementes fermentadas que conjuntamente com teores residuais de ácido láctico e acético denominados de acidez fixa e volátil, são utilizados para avaliação do sucesso do processo fermentativo e qualidade das sementes fermentadas (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Sendo a fermentação um processo essencial para a qualidade das sementes do cacau, a mesma ocorre nas fazendas sem nenhum controle do inóculo inicial de leveduras, levando a falta de padronização na qualidade das sementes fermentadas. O inóculo inicial de micro-organismos diferentes da flora natural no processo fermentativo, melhora a qualidade das sementes pela drenagem mais eficiente de líquidos tornando o processo menos trabalhoso e oneroso (SANCHEZ et al., 1985).

A fermentação em larga escala de cacau é um dos poucos processos dependentes de micro-organismos que não tem padronização na indústria alimentícia (MEERSMAN et al., 2013). Por isso na tentativa de padronizar este processo, muitos trabalhos tem buscado o desenvolvimento de tecnologias ligadas a construção de reatores, como também a busca por micro-organismo mais adaptados e eficientes para a realização destas fermentações, o melhoramento de linhagens de leveduras também se tornou uma opção viável e bem sucedida no processo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Cacau (*Theobroma cacao*)

Originário da mesoamérica o cacau foi descoberto há mais de 2.000 anos pelas tribos indígenas ancestrais Astecas e Maias, somente após muito tempo, mais precisamente no ano de 1528 Hernando Cortés introduziu o cacau nas civilizações já estabelecidas no ocidente (COE, 1996). O nome *Theobroma* foi dado pelo botânico Sueco Linnaeus e deriva do grego “Theos” que significa “Deus”, e “broma” que significa “comida” (COOK, 1982).

A indústria chocolateira é uma indústria multibilionária, movimentando US\$ 95 bilhões de dólares por ano no mundo (PIPITONE, 2012). Segundo a ICCO (Boletim de Novembro 2013) a moagem mundial de cacau na safra de 2012/2013 foi de 4,052 milhões de toneladas e a produção mundial foi de 3,891 milhões de toneladas, o Brasil conta com apenas 5% da produção mundial, já a África central e ocidental dominam a produção mundial com 70 %, sendo 90 % dessa produção cultivadas por 2 milhões de pequenas famílias que residem e produzem as sementes em propriedades de 2 a 10 hectares (COCOA FACT SHEET, 2012).

As principais variedades de cacau encontradas no mundo são conhecidas como: Forastero da região amazônica, mais comum e menos rica em aromas; Criollo, raramente cultivada devida a susceptibilidade a doenças, porém rica em aromas; Trinitario, uma espécie híbrida entre Forastero e Criollo, rica e diversa quanto aos aromas e Nacional, produzida no Equador conhecida pelo seu fino “flavour”, ou nuances (LUNA, 2002; BECKETT, 2000).

Os frutos do cacau crescem diretamente no tronco do cacaueiro (*Theobroma cacao*) e contém cerca de 30 a 40 sementes. Cada semente é constituída de dois cotilédones e um embrião cercados por uma membrana (testa). A polpa do cacau, a qual envolve todas as sementes dentro do fruto é também conhecida como mucilagem, uma massa branca e rica em açúcares que corresponde a 40 % do peso seco do fruto e é composta de 82-87 % de água, 10-13 % de açúcares, 2-3 % de pentosanas, 1-2 % de ácido cítrico e 8-10 % de sais (SCHWAN; WHEALS, 2004; LOPEZ, 1995). A semente de cacau (*Theobroma cacao*) é a principal matéria prima para a obtenção do chocolate e ingredientes aromáticos para fabricação de bebidas, sorvetes, confeitos entre outros.

A cadeia de fornecimento de cacau é bastante longa e complexa e pode ser dividida em duas grandes etapas: o preparo da matéria-prima e o seu processamento.

Essa cadeia tem início com o produtor que cultiva o cacaueiro (*Theobroma cacao*) em fazendas de cerca de 10 ha, colhe os frutos, extrai suas sementes, fermenta, seca e ensacada. Então as sementes são vendidas para agentes comerciais que misturam as sementes provenientes de diversos produtores e revendem para as usinas de moagem (SALTINI et al., 2013). Na segunda etapa as sementes são torradas e depois são trituradas e/ou prensadas, na prensagem das amêndoas (ou sementes) é que ocorre a separação da manteiga de cacau e do liquor, estes são destinados a fabricação de chocolate e achocolatados em geral, a manteiga de cacau pode ser destinada a indústria farmacêutica e cosmética também. Atualmente a produção de cacau está voltada para duas grandes categorias, cacau fino de alta qualidade e o cacau padrão, estando o cacau fino com apenas 5 % da produção mundial (THE INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013).

2.2 Fermentação do cacau

Após colheita dos frutos estes são abertos com ferramentas cortantes e então as sementes envoltas pela polpa são expostas, essa massa branca também chamada de mucilagem é extraídas do interior do fruto e transferidas para caixas de madeira com capacidade que variam de 0,5 a 1,5 toneladas, então os micro-organismos de ocorrência espontânea no ambiente acabam por colonizar a massa rica em açúcares e realizam as biotransformações que ocorrem durante a fermentação que pode variar de 4 a 7 dias. Cada micro-organismo tem papel fundamental durante o processo (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Nas primeiras 24 horas de fermentação a massa cacaueira apresenta pH ácido (3,6) devido a baixa concentração de oxigênio e a presença de ácido cítrico, estas condições favorecem a proliferação de espécies de leveduras (ARDHANA, 2001), as espécies mais comuns são: *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida Glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida stellimalicola*, *Schizosaccharomyces pombe*, (ILLEGHEMS, 2012), essas leveduras consomem os açúcares fermentáveis presentes na polpa como a glicose (2,4 – 4,1%), frutose (4,2 – 6,2%) e sacarose (2,1 – 3,2%) produzindo etanol e enzimas pectinolítica (SCHWAN, 1998), a quebra da pectina libera açúcares para o meio favorecendo a produção de

ácido láctico por bactérias lácticas em sua maioria as espécies *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*, tais transformações fazem com que parte da massa cacaueira se liquefaça e seja drenada para fora das caixas facilitando a difusão de oxigênio na massa. Após 48 horas de fermentação a disponibilidade de etanol, produzido pelas leveduras e a entrada de oxigênio, induz a proliferação de bactérias acéticas - *Acetobacter pasteurianus* -, que ao produzir ácido acético a partir do etanol, elevam a temperatura da massa cacaueira até cerca de 50° C (SCHWAN, 1995, 2004; ILLEGHEMS, 2012), essa elevação de temperatura associada a entrada de ácidos voláteis nos cotilédones causa o rompimento das barreiras citoplasmáticas interna dos cotilédones, originando uma série de transformações bioquímicas dentro dos cotilédones alterando a composição química na coloração, que passa de violeta para marrom (ALMEIDA, 1999; AFOAKWA, 2008), todas essas transformações culminam também na morte do embrião. Segundo Biehl e Voigt (1999), durante a fermentação a taxa de difusão dos ácidos orgânicos para os cotilédones e a duração do período ótimo de pH, são cruciais para a formação do sabor de chocolate.

2.3 A formação do sabor

Os cotilédones são os protagonistas da obtenção do chocolate, sem as transformações químicas ocorridas dentro dele devido a diversos fatores como a morte do embrião, a quebra das barreiras internas dos cotilédones durante a fermentação, os compostos responsáveis pelo sabor, aroma e cor do chocolate não se formarão (OWUSU et al., 2012). A composição dos cotilédones é basicamente gordura, representando cerca de 54,0 % do peso seco total, é formado por dois tipos de células: células do parênquima (de estocagem) o qual contém glóbulos de lipídios, proteínas e amido, já as células pigmentativas, armazenam os polifenóis e metilxantinas (BIEHL et al., 1977; DEL BOCA, 1962; FERRÃO, 2002), os polifenóis representam 12 a 20 % do peso seco e são responsáveis pela adstringência no sabor final do chocolate, esses estão divididos em três grandes grupos: Antocianinas (4 % do peso seco), Catequinas (37 % do peso seco) e Protocianidinas (58 % do peso seco) (KIM; KEENEY, 1984). A teobromina e cafeína responsáveis pelo amargor das sementes constituem cerca de 1,5 % do peso seco das sementes.

As biotransformações ocorridas dentro dos cotilédones durante a fermentação que pode durar de cinco a sete dias, causa a liberação de aminoácidos, açúcares redutores e peptídeos nos cotilédones (SCHWAN, 1998). Após a fermentação as

sementes são dispostas ao sol para a perda de umidade, elas são dispostas em estruturas de madeira chamadas de “barcaças”, a umidade das sementes pós fermentadas é cerca de 50%, após um período de sete a dez dias no sol e com revolvimentos constantes, a umidade atinge cerca de 7-8%, então as sementes são ensacadas e vendidas a indústria. No processo industrial a torrefação é realizada em fornos ultrapassando temperaturas de 100°C, neste processo as reações de formação do sabor do chocolate são finalizadas, todos os compostos formados durante a fermentação serão agora completados através da reação de Maillard (OWUSU et al., 2012).

2.4 A formação da cor nos cotilédones

Os polifenóis são armazenados nas chamadas células pigmentativas de estocagem dentro dos cotilédones, que possuem uma coloração do branco ao roxo-escuro – depende da quantidade de antocianina (uma classe pequena dos polifenóis) (EFRAIM et al., 2001). Durante a fermentação os polifenóis se difundem nos compostos da semente e sofrem uma oxidação, complexando-se com moléculas de peso molecular maior. As antocianinas são rapidamente hidrolisadas pelas glicosidases a antocianidina e monossacarídeos (galactose e arabinose) isso conta para o branqueamento da cor roxa dos cotilédones. Os polifenóis (epicatequina e antocianidinas livres) são oxidados em quinona, ou formam complexos com proteínas e peptídeos, isso diminui a solubilidade e adstringência e faz aparecer a coloração marrom típica das sementes bem fermentadas. A quantidade de antocianina é usada como um bom marcador de qualidade nas sementes (CAMU; DE VUYST, 2008; EFRAIM et al., 2001).

Após a fermentação os aromas do chocolate são formados com a torrefação dos cotilédones sem casca, estes são então processados para extrair o líquido, a manteiga e o pó de cacau. Na “conchagem” (processo de mistura da massa de cacau com açúcar) os ácidos voláteis são eliminados. As sementes de cacau e seus derivados são ricos em antioxidantes, incluindo catequinas, epicatequinas e procianidinas – como os polifenóis encontrados em vinhos, vegetais e chás (KIM; KEENEY, 1984; HATANO et al., 2002; NAZARUDDIN, 2006).

2.5 Pectina

A Pectina é um polímero de alta massa molecular responsável pela integridade dos tecidos vegetais superiores, juntamente com outros componentes (celulose e

hemicelulose), são responsáveis pela organização da parede celular (MOHNEN, 2008). É composta por monômeros de ácido 1,4 β -D-galacturônico esterificado unidos através de ligações glicosídicas do tipo α -1-4. Esta cadeia apresenta-se em forma helicoidal devido à presença da ramnose que produz a rotação da estrutura molecular. Os grupos ácidos estão combinados com sais de cálcio ou com ésteres de metil e lateralmente estão associados à D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-frutose, ou funções diferentes (VAN SOEST, 1994; GIRALDO MEJÍA, 2000; WASCHECK et al., 2008).

A pectina tem papel estrutural na polpa do cacau (mucilagem), similar a uma rede que mantém os componentes da estrutura íntegros, a degradação pelos micro-organismos durante a fermentação rompe a estrutura física da mucilagem e então os açúcares e demais componentes ligados a ela se desprendem e são liberados para o meio, parte desses compostos são degradados e transformados em outros compostos, parte desses permanece em excesso fluindo para fora das caixas fermentativas de cacau, essa drenagem de líquidos é chamado de mel do cacau, ou “sweatings”.

2.6 Pectinases

As pectinases apresentam largo potencial biotecnológico na indústria têxtil, de papel, química e alimentícia. São amplamente utilizadas na clarificação e despectinização na indústria de sucos de frutas e fabricação de vinhos, extração de óleos vegetais, bem como na produção de alimentos para bebês (PEREIRA, 2002; MARQUARDT, 2003). São classificadas de acordo com o modo que atuam sobre a pectina e podem ser divididas em dois grandes grupos: Enzimas despolimerizantes, as quais quebram as ligações α 1-4 entre os ácidos galacturônicos que formam a cadeia principal de pectina (poligalacturonases (PG), Pectina-Liase (PL) e Pectato-Liase) e Enzimas Desesterificantes, que desesterificam a pectina removendo os radicais metoxil da cadeia principal (Pectina-metilesterase, PME). (ROMBOUTS; PILNIK, 1980; MALVESSI; DA SILVEIRA, 2004; ALKORTA et al., 1998). A sua principal fonte para a indústria vem do crescimento de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (PANDEY et al., 2000; OLIVEIRA, 2006). Uma das diferenças em utilizar leveduras e não bactérias para produção de pectinases é que as leveduras produzem diferentes enzimas (PG, PL e PME) de acordo com o ambiente, condições de temperatura, pH e da disponibilidade do substrato e também

da sua origem genética. Segundo Blanco et al. (1999) leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Candida utilis* são capazes de produzir somente poligalacturonases (PG) não apresentando atividade PME, essa característica as diferencia de outros micro-organismos produtores de pectinases, pois suas enzimas podem ser utilizadas para clarificar suco de fruta e vinho sem a liberação de metanol, efeito causado pela presença da enzima PME (FERNÁNDEZ-GONZALÉZ et al., 2004).

2.7 Chocolate de alta qualidade

Uma semente de alta qualidade está relacionada com diversos fatores como a colheita realizada com boas práticas de higiene, genótipo da planta, remoção eficiente da placenta do fruto antes da fermentação, correta homogeneização da massa de cacau durante a fermentação, secagem adequada e manutenção e limpeza dos equipamentos envolvidos em todas as etapas (PAPALEXANDRATOU, 2011). Muitas empresas produtoras de chocolate e organizações estão investindo em programas intensivos de treinamento em práticas sustentáveis da produção do cacau para suprir a demanda da indústria por cacau e chocolates de qualidade superior (ICCO, 2009).

Sementes mal fermentadas são processadas a fim de extrair apenas a manteiga de cacau, pois os sólidos da semente não são afetados pela má fermentação (KEALEY et al., 2001), além do mais as sementes de cacau são ricas fontes de polifenóis, principalmente de flavonóides (catequina, epicatequina, galocatequina, epigallocatequina e oligômeros derivados) que são armazenados nas células de pigmento dos cotilédones dentro das sementes (AFOAKWA, 2010), eles dão um aroma amargo ao cacau e são responsáveis pela adstringência no gosto (FENG et al., 2012).

Os produtores ao controlarem melhor a fermentação, por exemplo pelo inóculo inicial de culturas de micro-organismos conhecidos, estarão aptos a fornecer uma semente de alta qualidade ao mercado, pois conseguirão padronizar a produção, ainda poderão vender as sementes por um preço acima do mercado melhorando também sua condição de vida (DE VUYST et al., 2010).

O aroma e sabor característico do chocolate vêm da presença de ricas frações voláteis compostas por centenas de compostos. Sua complexa composição depende tanto do genótipo da semente quanto dos diversos processos que ocorrem durante a

produção do chocolate: fermentação, secagem, torrefação e conchagem (AFOAKWA, 2010).

Durante a fermentação a maior parte da fração volátil (ésteres, álcoois e ácidos graxos) é formada, assim como os precursores de sabor (açúcares redutores e aminoácidos), esse é um passo fundamental para a obtenção do chocolate, se a fermentação não ocorrer ou for incompleta, o aroma e sabor típicos do chocolate não serão formados na torrefação e o sabor final será demasiadamente adstringente e amargo, devido a alta concentração de polifenóis (MISNAWI, 2004).

Segundo Reineccius et al. (1972) as sementes da variedade de cacau Criollo apresentam uma grande quantidade de pirazinas, a qual compreende mais de 40 % da essência do pó de cacau, dando uma característica de nozes para as sementes e um aroma torrado (BOEKEL et al., 2006). As pirazinas são formadas nas sementes no processo de torrefação, onde ocorre a reação de Maillard entre os amino-ácidos e açúcares redutores, os precursores dessa reação são formados durante a fermentação (KEENEY, 1972).

2.8 Inóculo Inicial de culturas de micro-organismos conhecidos

A fermentação em larga escala de cacau é um dos poucos processos dependentes de micro-organismos que não tem padronização na indústria alimentícia (MEERSMAN et al., 2013). Frente a uma resposta para este problema, inúmeros trabalhos vêm demonstrando a necessidade da domesticação do processo fermentativo das sementes de cacau, sendo o chocolate um produto tão nobre e sua obtenção algo tão primitivo, existindo uma grande lacuna de conhecimento em sua cadeia de produção.

A falta de padronização deste processo tem levado muitos pesquisadores ao desenvolvimento tanto de tecnologias ligadas a construção de reatores, como também a busca por micro-organismo mais adaptados e eficientes para a realização destas fermentações, o melhoramento de linhagens de leveduras também tem demonstrado resultados positivos para esse processo. Meersman et al. (2013) encontrou na fermentação de cacau diferentes espécies de leveduras e as dividiu em população central e população variável, uma das espécies centrais encontrada e muito conhecida foi a *Saccharomyces cerevisiae*, predominando no processo até o final.

Em 1998, Schwan et al. publicou o primeiro trabalho bem sucedido com uma fermentação conduzida com o inóculo inicial de micro-organismos. Foi preparado um coquetel contendo integrantes dos 3 principais grupos de micro-organismos atuantes

na fermentação do cacau: levedura, bactéria acética e bactéria láctica. Mais tarde Schwan e Wheals (2004) descreveram a sucessão microbiológica que ocorre durante uma fermentação típica de cacau com a atuação principal de leveduras, bactérias lácticas, bactérias acéticas. Neste trabalho os autores ainda sugeriram que o inóculo inicial de micro-organismos na fermentação de cacau, poderia render aos agricultores ganhos significantes com a qualidade da semente. Os autores ainda acreditam que somente com a padronização da fermentação o chocolate poderá ser equiparado aos níveis de reconhecimento que cervejas e vinhos tem no mundo moderno.

Nielsen et al. (2005) em trabalho realizado no oeste africano concluiu em seu trabalho que para definir um coquetel de micro-organismos inicial é imprescindível conhecer a diversidade que ocorre naturalmente nas fermentações para descobrir o papel de cada uma e assim mimetizar o natural para ter uma reprodutibilidade aceitável, o autor elogia os trabalhos desenvolvidos no Brasil, sendo um avanço importante nessa área. Em trabalho semelhante Leal et al. (2008) realizou uma inoculação inicial da linhagem de *Kluyveromices Marxianus* melhorada geneticamente para a produção de pectinases, no processo de fermentação das sementes do cacaueiro e conseguiu resultados positivos, reduzindo o tempo de fermentação em um dia, quando comparado ao controle, além de conseguir sementes de qualidade superior em relação ao controle.

Jespersen et al. (2005) identificou leveduras através de técnica denominada polimorfismo do comprimento dos cromossomos (CLP do acrônimo em inglês), e sugeriu esta técnica a ser implantada na busca por leveduras que componham um coquetel de culturas iniciais. Nessa mesma linha de pesquisa Samagaci et al. (2014) realizou uma seleção de leveduras pectinolíticas através de testes sob estresse controlado. Outros autores vem contribuindo fortemente para a domesticação deste processo e consequente padronização das sementes fermentadas, em seus trabalhos já foram desvendados os micro-organismos presentes, as condições ótimas de pH, temperatura e concentração de nutrientes, em todos esses trabalhos o papel da inoculação inicial de leveduras é defendido para que se consiga uma padronização das sementes.

O Brasil e EUA já possuem registro de patentes para a inoculação de leveduras no início da fermentação (patente: USA - US2014/0271889). Estas patentes, aliadas aos trabalhos realizados nas últimas décadas, vem dando formatação a um futuro processo de fermentação de sementes de cacau, no qual será possível realizar sua

padronização de qualidade tanto pela inoculação inicial de leveduras no processo, como por controles baseados em aspectos já pré-definidos como a análise de indicadores de qualidade onde a formação e/ou degradação compostos como polifenóis, albuminas e vicilinas servem de orientação. (LÍDIA et al., 2011; SAMAH et al., 1992).

3 OBJETIVOS

Esse trabalho teve por objetivo selecionar leveduras com potencial pectinolítico, de ocorrência espontânea na fermentação do cacau e reinoculá-las no processo natural, para desenvolver um coquetel de leveduras a ser usado para padronizar a fermentação das sementes de cacau.

3.1 Objetivos específicos

- Classificar as leveduras isoladas da fermentação natural do cacau provenientes de fazendas do sul da Bahia quanto aos tempos e locais de coleta;
- Classificar as leveduras obtidas da fermentação natural quanto a filogenia através de meios de cultivo seletivos;
- Selecionar leveduras através de ensaio de crescimento em pectina;
- Selecionar leveduras através de análise de Açúcar Redutor Total Livre (ARTL).
- Selecionar leveduras através do ensaio enzimático indireto;
- Avaliar leveduras selecionadas através de programa de seleção em fermentação *in locu* na Bahia;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das Amostras

As coletas para o isolamento de leveduras foram conduzidas pelo grupo da Profa. Dra. Irene da Silva Coelho, docente da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e integrante do projeto universal financiado pelo CNPq intitulado: “Isolamento e caracterização de leveduras presentes na fermentação de cacau e cupuaçu para melhoria desse processo”. As coletas foram realizadas no mês de Julho de 2011 em duas fazendas localizadas em regiões distintas do Sul da Bahia: fazenda Almirante Cacau, em Itabuna e Fazenda Leão de Ouro em Uruçuca. Na fazenda Almirante Cacau foram coletadas amostras da polpa a cada 24 horas durante as 168 horas de fermentação, totalizando 7 amostras, também foram coletadas amostras do mel de cacau que mana das caixas fermentativas nas primeiras 96 horas, totalizando 5 amostras, foi coletado também amostra da madeira do interior da caixa fermentativa a qual foi realizada antes do início da fermentação.

Na fazenda Leão de Ouro as coletas foram conduzidas da mesma maneira, porém nessa fazenda a fermentação se estendeu por apenas 144 horas, por tal motivo amostras da polpa foram coletadas também a cada 24 horas e totalizaram apenas 6, amostras do mel de cacau foram coletadas a cada 24 horas até 72 horas totalizando apenas 4 amostras, amostra da caixa de madeira também foi coletada.

4.2 Isolamento das Leveduras

Todas as amostras foram submetidas a diluições decimais sucessivas em água peptonada 0,1 % e então foram inoculadas em placas de Petri contendo meio sólido MYGP (0,3 % de extrato de levedura; 0,3 % de extrato de malte; 0,5 % de peptona; 1,5 % de glicose; 2 % de ágar; 100 mg/L de clorafenicol e 50 mg/L de clorotetraciclina) e então foram incubadas por 48 horas a 28° C. (CLARK, 1965; SCHORTEMAYER et al., 1996).

Após 48 horas de crescimento as placas foram analisadas e as colônias que apresentavam diferentes conformações morfológicas, tais como: forma, tamanho, cor e aspecto, foram isolados e transferidos para tubos de ensaio contendo 800 µL de meio de crescimento MYGP sem ágar. Os tubos foram incubados a 28° C por 24 horas. Após esse crescimento foi acrescentado 400 µL de glicerol a 45% (v/v) e armazenado a -70 °C.

4.3 Classificação por meio de cultivo seletivo

Foi proposto um método onde se pudesse diferenciar leveduras *Saccharomyces cerevisiae* das demais espécies, através da análise do crescimento das leveduras em meio de cultivo contendo compostos tóxicos. Para tanto foram utilizados 3 meios seletivos:

- YEPD (1% de Extrato de levedura, 1% de Peptona e 2 % Dextrose e 2% de ágar) contendo 100 µg/mL de Ciclohexamida;
- YEPD (1% de Extrato de levedura, 1% de Peptona e 2 % Dextrose e 2% de ágar) contendo 400 mg L⁻¹ de Metabissulfito de Potássio;
- WLN (*Wallerstein Laboratories Nutrient DIFCO*®), utilizado nas concentrações indicadas pelo fabricante (5 g. L⁻¹) este meio seletivo é um indicador colorimétrico (PALLMANN et al., 2001).

Os meios seletivos foram dispostos em placas de Petri e 10µL de cada linhagem foi inoculado a partir das culturas armazenadas em ultra freezer -70°C, as placas foram incubadas por 24 horas a 30°C e então foi feita a documentação em fotografia com a colaboração da assessoria de comunicação da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) Créditos: Gerhard Waller.

4.4 Ensaio de crescimento em pectina

A fim de selecionar as linhagens mais eficientes para cacau foi proposto dois métodos de seleção: selecionar as leveduras através da capacidade de crescimento em pectina como única fonte de carbono, denominado ensaio de crescimento, e seleção através da degradação de pectina por consumo de ART livre denominado ensaio enzimático. Um terceiro método foi utilizado porém com finalidade classificatória apenas, seleção com meios seletivos.

Para realizar o ensaio de crescimento em pectina as leveduras foram ativadas em microtubos contendo 1,5 mL de meio de crescimento YEPD (1% de Extrato de levedura, 1% de Peptona e 2 % Dextrose) e incubados à temperatura de 30°C por 24 horas; após o período de ativação das linhagens 100 µL de cada cultura foi transferido para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de crescimento mínimo YNBP (*Yeast Nitrogen Based (DIFCO)*; 2% de Pectina) e incubados à 30°C por 48 horas; então as culturas foram homogeneizadas em agitadores de tubo e analisadas por Densidade Óptica a 520 nm (GREEN; SAMBROOK, 2014)

4.5 Ensaio de avaliação de Açúcar Redutor Total Livre (ARTL).

O ensaio da avaliação de Açúcar Redutor Total Livre (ARTL) consiste em analisar indiretamente a produção de enzimas pectinases através da determinação dos açúcares redutores formados em reação enzimática em meio contendo pectina.

Para conduzir o ensaio de ART livre as linhagens foram ativadas em microtubos contendo 1,5 mL de meio de crescimento YPS (1% de Extrato de levedura, 1% de Peptona e 2 % de Sacarose) a temperatura de 30°C por 24 horas; após esse período 100 µL de cada cultura foi inoculado em frasco contendo 10 mL de meio de crescimento YPS, e incubado por 48 horas a 30°C sob agitação de 150 rpm. Após esta etapa o meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante contendo as enzimas pectinases foi analisado. Para analisar as enzimas pectinases indiretamente, 500 µL do sobrenadante de cada linhagem foi transferido para um tubo de ensaio contendo 2,5 mL de solução tampão de pectina (0,1 % de pectina cítrica; 0,68 % de fosfato monobásico de potássio; ajuste de pH para 7,0) e incubados por 12 minutos a 40°C. Imediatamente 500 µL dessa solução foi transferido para outro tubo de ensaio contendo 500 µL de reagente de Somogyi (SOMOGYI, 1954). A solução foi incubada por 15 minutos a 100°C e após a fervura e posterior resfriamento foi adicionado 500 µL de reagente Nelson (NELSON, 1955) juntamente com 3,5 mL de água destilada. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis à 520nm.

4.6 Ensaio da Atividade Enzimática Indireta

O ensaio enzimático consiste em analisar indiretamente a produção de enzimas pectinases através da determinação dos açúcares redutores formados em reação enzimática em meio contendo pectina.

Para conduzir o ensaio enzimático, as linhagens foram reativadas em microtubos contendo 1,5 mL de meio de crescimento YPS (1% de Extrato de levedura, 1% de Peptona e 2 % de Sacarose) a temperatura de 30°C por 24 horas; após esse período 100 µL de cada cultura foi inoculado em frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de crescimento YPS, e incubado por 48 horas a 30°C sob agitação de 150 rpm. Após esta etapa o meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante contendo as enzimas pectinases foi analisado em triplicata. Segundo Blanco et al. (1999) leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e

Candida utilis são capazes de produzir pectinases excretando-as para o meio extracelular.

Para analisar as enzimas pectinases indiretamente, 500 µL do sobrenadante de cada linhagem foi transferido para três tubos de ensaio (realizada em triplicata) contendo cada um 2,5 mL de solução tampão de pectina (0,1 % de pectina cítrica; 0,68 % de fosfato monobásico de potássio; ajuste de pH para 7,0) e incubados por 12 minutos a 40°C. Imediatamente 500 µL dessa solução foi transferido para outros três tubo de ensaio contendo 500 µL de reagente de Somogyi (SOMOGYI, 1954). As soluções foram incubadas por 15 minutos a 100°C e após a fervura e posterior resfriamento foi adicionado 500 µL de reagente Nelson (NELSON, 1955) juntamente com 3,5 mL de água destilada nos três tubos. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis à 520nm.

Em paralelo foi preparado para cada amostra, em triplicata também uma amostra de referência denominada “branco”, realizada do mesmo modo porém com uma única diferença, a amostra “branco” foi submetida a uma desnaturação prévia por calor, aquecida a 100°C por 15 minutos, com esse procedimento ao incubar essa amostra de referência a 40°C com o tampão de pectina a reação enzimática não ocorre. Esse branco foi utilizado para “zerar” o espectrofotômetro antes da leitura da amostra com a enzima ativa, evitando assim desvios ou erros analíticos.

4.7 Fermentação *in locu*

A fim de avaliar o desempenho das leveduras selecionadas em laboratório em uma fermentação *in locu*, um experimento foi montado na Bahia no município de Itabuna (fazenda Almirante Cacau). Para obter um volume de levedura adequado para realizar os ensaios, as leveduras foram propagadas em laboratório. Primeiramente foram ativadas em microtubos contendo 1,5 mL de meio de crescimento YPD à temperatura de 30°C por 24 horas, em seguida esse conteúdo foi inoculado em 40 mL de meio YPS e incubas a 30° C por 24h sob agitação de 150 rpm, novamente esse conteúdo foi transferido para frascos maiores contendo 1.200 mL de meio YPS e incubados a 30° C sob agitação de 150 rpm por 48 horas.

Após esse processo, os frascos foram transferidos para geladeira por 24 horas para decantação das células. O sobrenadante foi descartado e as células foram concentradas por centrifugação a 5.000 rpm durante 3 minutos.

Para realização dos ensaios no município de Itabuna-BA, foram colhidos aproximadamente 5.000 frutos de cacau, a quebra dos mesmos ocorreu no mesmo dia da colheita. Após a quebra, as sementes com a polpa foram pesadas e transferidas para as caixas fermentativas, ver Figura 2.

Figura 1 - Quebra dos frutos de cacau separação da polpa, juntamente com as sementes do fruto

O experimento foi realizado em duas condições distintas (Figura 2), condição primeira em caixas de madeira com 120 Kg de sementes frescas de cacau e condição segunda em reatores de aço inox com 35 Kg de sementes frescas de cacau. Foram comparados dois diferentes tratamentos em ambas as situações. No primeiro tratamento denominado SEL, foi realizada a inoculação de um coquetel composto por três linhagens de leveduras no proporção de 0,02% de massa fresca de leveduras por quilograma de massa de cacau, em partes iguais de cada linhagem (0,0066 g de cada linhagem). O segundo tratamento denominado SK, foi inoculado 0,02% de massa fresca de leveduras na forma de um coquetel composto por duas linhagens conhecidas de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) e *Kluyveromyces marxianus* (MMIII-41), (Figura 3).

Figura 2 - Esquema das fermentações realizadas no Sul da Bahia-BA. Três caixas de Madeira e três de Inox

A inoculação das leveduras foi feita com ajuda de um pulverizador, contendo uma suspensão de leveduras em água estéril, na concentração final de 0,1% peso fresco de leveduras. Para obter uma melhor uniformidade na inoculação das leveduras, o inóculo foi realizado gradativamente conforme as caixas eram completadas, vide Figura 4.

Figura 3 - Inoculação das leveduras em suspensão aquosa nos reatores de Inox com a ajuda de um aspersor

As caixas de madeira foram tampadas com folhas de bananeira para minimizar a perda da umidade e calor, e os reatores de inox tampados com tampas de fibra de vidro. Uma sonda foi colocada no meio da massa de cacau nas caixas de madeira para avaliar a temperatura ao longo do processo. O processo fermentativo durou sete dias e após a fermentação, as sementes foram secas em estruturas de madeira

chamada de barçaças até que reduzissem a umidade de 40%-60% até 7%-8% de umidade.

Durante a fermentação foram monitorados na polpa: temperatura da massa fermentativa, mel drenado, etanol, ácido acético e ácido láctico. As sementes também foram analisadas e os parâmetros monitorados foram somente etanol, ácido acético e ácido láctico.

4.8 Amostragem e Análises

Foram coletados 100 g de amostras da polpa junto com as sementes nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Para analisar o teor de: etanol, sacarose, frutose, glicose, ácido acético, e ácido láctico foi utilizado técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras foram preparadas da seguinte forma: 25 gramas de semente com polpa foram adicionadas em frascos contendo 100 mL de água destilada e foram submetidas a um processo de despolpação feito em homogeneizador não triturante por 90 segundos, em seguida apenas o líquido sem as sementes foi transferido para novo frasco onde foi adicionado mais 80 mL de água e homogeneizado por 1 minuto, todo esse conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL, a partir desse volume apenas 10 mL foi transferido para tubo Falcon e enviado para análise em CLAE.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de leveduras da fermentação de cacau

Em 2011 foram isoladas 367 leveduras pela equipe da Profa. Dra. Irene Coelho, provenientes de duas fermentações de diferentes localidades do sul da Bahia, a fazenda Almirante Cacau e a fazenda Leão de Ouro. As leveduras foram isoladas a cada 24 horas durante as 168 horas de fermentação de três locais diferentes: da polpa, mel e de raspas de caixas de fermentação. A seleção das leveduras foi feita com base nas diferenças morfológicas das colônias. Esses isolamentos tiveram por objetivo, buscar leveduras pectinolíticas já adaptadas ao processo de fermentação do cacau. A motivação para esta busca vem de trabalhos que demonstram que leveduras pectinolíticas contribuem significativamente para o processo de fermentação de sementes de cacau (LEAL et al., 2010; SAMAGACI et al., 2014).

Ao todo foram isoladas 367 leveduras nas duas fazendas sendo 191 da fazenda Almirante Cacau divididos entre 111 isolados da polpa, 60 isolados do mel e 20 isolados da caixa. Da fazenda Leão de Ouro um total de 176 isolados divididos em 125 isolados da polpa, 41 isolados do mel e 10 isolados da caixa.

Após o isolamento, as leveduras foram submetidas a um programa de seleção no laboratório de Produtos Naturais, no setor de Química do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ.

Primeiramente as leveduras isoladas foram divididas por localidade (Fazenda), tipo de amostra (polpa, mel ou das caixas de fermentação) e tempo, que podem ser observados Tabela 1.

Tabela 1 - Número de leveduras isoladas, com base na morfologia, nos três pontos de coleta (polpa, mel e caixa) nas fazendas Almirante Cacau e Leão de Ouro no ano de 2011, dispostas em períodos de 24 horas

Tempo (h)	Fazenda Leão de Ouro			Fazenda Almirante Cacau		
	Polpa	Mel	Caixa	Polpa	Mel	Caixa
0	18	16	10	1	3	20
24	12	13		9	19	
48	19	12		19	20	
72	19			18	18	
96	16			15		
120	21			20		
144	20			16		
168				13		
TOTAL	125	41	10	111	60	20
		176			191	

Observando a Tabela 1 nota-se que nas primeiras horas do processo de fermentação o número de leveduras isoladas na fazenda Leão de ouro (18 na polpa e 16 no mel), é superior quando comparadas com a fazenda Almirante Cacau (1 na polpa e 3 no mel). A maior diversidade inicial de leveduras na Fazenda Leão de Ouro, pode ser explicada devido ao fato da sua fermentação terminar 24 horas antes da fazenda Almirante Cacau, resultados semelhantes foram obtidos por Ardhana e Fleet (2003) em trabalho realizado na Indonésia, onde comparou a diversidade de leveduras em três fermentações distintas, as duas fermentações que terminaram com apenas quatro dias de fermentação tinham uma diversidade maior em relação a terceira, que terminou somente após seis dias de fermentação.

Segundo Schawn e Wheals (2004) as leveduras são mais abundantes no processo fermentativo até as 48 horas, tendo desenvolvido seu papel mais importante na fermentação como a quebra das pectinas e produção de etanol. Após esse período as bactérias acéticas assumem a protagonização do processo fermentativo (SCHAWN; WHEALS, 2004). No entanto, conforme os dados da Tabela 1 as leveduras ainda estão presentes no processo após as 48 horas.

5.2 Classificação através de meios de cultivo seletivos

A fim de classificar as leveduras isoladas pela Profa. Dra. Irene da Silva Coelho, foi proposto um método onde se pudesse diferenciar as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* das demais espécies, através do crescimento das linhagens em meios seletivos. Para este ensaio foram utilizados 3 meios de cultivo diferenciais.

O primeiro meio seletivo utilizado foi o YEPD contendo 100 µg/mL de ciclohexamida, de acordo com os padrões estabelecidos por Kurtzman et al. (2011). Esta substância impede o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* devido a inibição da síntese de proteínas alongases ligadas ao fuso de divisão celular de organismos eucariotos. A resistência a esta droga se deve a alterações no gene CYH2, responsável pela síntese dessas proteínas alongases (DEHOUX et al., 1993).

O segundo meio utilizado foi o YEPD contendo metabissulfito de potássio, o qual impede o crescimento de leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae*, através da dissociação de íons SO₂ no meio intracelular sendo responsável por desorganizar o metabolismo celular, principalmente a produção de piruvato, glicerol e acetaldeído. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a seletividade de parede e membrana impedem a entrada do SO₂, entretanto essa entrada é possível quando esse composto está em altas concentrações ou em se encontram em condições de pH muito baixo (ROMANO; SUZZI, 1993; FLEET, 1992).

O terceiro meio utilizado foi o WLN (*Wallerstein Laboratories Nutrient*), usado como indicador colorimétrico pois contém verde de bromocresol, composto o qual a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de metabolizar deixando as colônias com uma coloração branca ou verde-clara, ao passo que os demais gêneros e espécies incorporam esse composto permanecendo com coloração verde escura (PALLMANN et al., 2001).

Na Figura 5 vemos um exemplo de algumas linhagens provenientes da coleção de 367 leveduras isoladas, inoculadas no meio WLN, onde observa-se as diferentes colorações e aspectos de cada linhagem.

Figura 4 - Placa de Petri contendo meio sólido WLN com algumas das diferentes espécies de leveduras provenientes da coleção de leveduras isoladas na fazenda Almirante cacau em 2011

Cavazza et al. (1992), publicou uma Tabela com a descrição da morfologia das diferentes espécies quando inoculadas em meio WLN, que pode ser visualizada na Tabela 2.

Tabela 2 - Tabela descrita por Cavazza et al., 1992 classificando as diferentes espécies de leveduras quanto a morfologia quando inoculadas em meio WLN

Strain	Colony color	Colony topography
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cream to green	Knoblike, surface: smooth, opaque Consistency of cream
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Cream, can have a hint of green	Knoblike, surface: smooth, opaque Consistency of cream
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (<i>Kloeckera apiculata</i>)	Intense green	Flat, surface: smooth, opaque Consistency of butter
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Bright green	Knoblike, convex, surface: smooth, opaque Consistency of cream
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Intense green	Very small size, surface: smooth, opaque Consistency of butter
<i>Rhodotorula</i> species	Red	Knoblike, convex surface: smooth, mucoid Consistency of butter
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Cream with hint of red; red-brown from bottom	Small size, convex Consistency of flour
<i>Pichia membranefaciens</i>	Gray-green with hint of blue	Elevated and convex, surface: wrinkled Consistency of flour
<i>Hansenula anomala</i>	Cream to blue gray; blue after 8 days	Flat, surface: smooth Consistency of cream
<i>Brettanomyces intermedius</i>	Cream, appears after 8 days	Small, elevated to a dome, surface: smooth Consistency of cream
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Cream	Small, elevated dome, surface: smooth Consistency of cream

Na fazenda Leão Ouro das 125 linhagens isoladas da polpa, 46 se desenvolveram em meio contendo ciclohexamida, resultando em 36,8 % de leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae*. As demais linhagens cresceram em meio contendo metabissulfito de potássio e portanto classificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, representando 63,2 % do total das linhagens (Figura 6).

Na fazenda Almirante cacau, a mesma dinâmica de diversidade foi observada (Figura 6). Das 111 linhagens de leveduras isoladas da polpa, apenas 23 se desenvolveram em meio contendo ciclohexamida, ou seja, 20,7 % das leveduras não pertencem a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, ao passo que as demais linhagens cresceram em meio contendo metabissulfito de potássio, resultando em 79,3 % de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Ao confrontar os dados obtidos nos dois meios diferenciais com os obtidos pelo crescimento das linhagens no meio WLN os resultados se complementam, dando maior credibilidade a esta técnica de diferenciação de espécies.

Figura 5 - Número de linhagens isoladas da polpa ao longo dos tempos de isolamento crescidas nos meios seletivos ciclohexamida (*Não-Saccharomyces cerevisiae*) e metabissulfito de potássio (*Saccharomyces cerevisiae*)

A predominância de espécies não-*Saccharomyces cerevisiae* no início da fermentação nas duas fazendas pode ser devido a maior disponibilidade de diferentes compostos como açúcares, ácidos orgânicos, vitaminas e etc. proporcionam um ambiente rico para micro-organismos colonizem a massa cacaueira e entrem uma batalha por recursos a medida que este se esvai. Esses fatores proporcionam a maior diversidade de micro-organismos no início da fermentação, porém com o gradual consumo e menor disponibilidade de açúcares e outros compostos, juntamente com a difusão de oxigênio no meio, ajuda a proliferação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, que passa a colonizar a fermentação de cacau.

Conforme a Figura 6, as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* representam 64,06% na Almirante Cacau e 78,09% na Leão de Ouro. Essa levedura tem um importante papel na conversão dos açúcares em etanol, para que posteriormente este seja convertido em ácido acético, e assim penetre dentro dos cotilédones da semente desencadeando diversas reações químicas que por fim originarão precursores de aroma, sabor e cor do chocolate (DE BRITO et al., 2000).

5.3 Seleção por crescimento em pectina como única fonte de carbono

As 367 linhagens isoladas passaram por uma avaliação da capacidade de crescimento em meio mínimo contendo pectina como única fonte de carbono, visto

que a degradação eficiente da pectina, um dos principais compostos contidos na polpa do cacau, e uma das maiores responsáveis pela umidade externa da semente.

O crescimento das linhagens foi avaliado mediante a observação da biomassa formada através da Densidade Ótica ($D.O_{520nm}$). A linhagem IZ-619 (SERRAT et al., 2006) conhecida por sua atividade pectinolítica foi utilizada como padrão. Essa linhagem quando analisada em espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis à 520nm, apresentou uma absorção de 1.000 ABS, assim foi delimitada a linha de corte para avaliar as demais leveduras.

De acordo com a Tabela 3, das 367 leveduras analisadas 203 apresentaram crescimento maior que o padrão. Na fazenda Leão de Ouro foram selecionadas 103 leveduras, sendo 91 da polpa e 12 do mel. Já na fazenda Almirante Cacau foram selecionadas 100 linhagens, sendo 79 da polpa e 21 do mel.

De acordo com a Tabela 3 foi observado que no início da fermentação nas duas fazendas, ou seja, as primeiras 24 horas, as leveduras apresentaram crescimento inferior quando comparadas com a levedura padrão, não sendo selecionada nenhuma linhagem nesse período. A partir das 48 horas foram selecionadas de ambas as fazendas linhagens com crescimento superior ao padrão.

Em trabalho semelhante Uenojo & Pastore (2006) na tentativa de isolar leveduras pectinolíticas de resíduos agroindústrias também utilizou a pectina como única fonte de carbono no crescimento de isolados obtendo grande sucesso com essa técnica.

Tabela 3 - Leveduras selecionadas através do ensaio de crescimento, utilizando pectina como única fonte de carbono, dispostas por fazendas e tempos de coleta

Tempo (h)	Fazenda Leão de Ouro			Fazenda Almirante Cacau		
	Polpa	Mel	Caixa	Polpa	Mel	Caixa
T0	0	0	0	0	0	0
T24	0	0		0	0	
T48	19	12		0	6	
T72	16			18	15	
T96	16			15		
T120	21			19		
T144	19			14		
T168				13		
TOTAL	91	12	0	79	21	0
		103			100	

5.4 Seleção pela produção de ART livre

Assim como no ensaio de crescimento a levedura IZ-619 (SERRAT et al., 2006) foi utilizada como padrão para o ensaio de ART livre, a qual foi analisada em espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis à 520nm, apresentando uma absorção de 0,500 ABS. Novamente uma linha de corte foi estabelecida para selecionar as linhagens. Também foi utilizada como teste controle do teste uma linhagem de *Kluyveromyces marxianus* melhorada geneticamente para a produção de pectinases conhecida como MMIII-41 (LEAL et al., 2008).

Baseados nas leituras espectrofotométricas de absorção molecular UV-Vis à 520nm, as 367 leveduras foram analisadas com resultados de absorbâncias variando de 0,067 ABS até 1,682 ABS. Das 367 linhagens analisadas apenas 85 foram selecionadas por apresentarem absorbância maior que a linha de corte estabelecida em 0,500 ABS.

Conforme mostrado na Tabela 4, na fazenda Leão de Ouro foram selecionadas 38 linhagens, pela produção de ART livre, onde todas foram selecionadas na polpa. Na fazenda Almirante Cacau, foram selecionadas através da produção de ART livre 47 linhagens, sendo 31 da polpa (65,95%) e 16 do mel (34,05%).

Tabela 4 - Linhagens selecionadas segundo ensaio de Produção de ART Livre, dispostas por fazendas e por tempos

Tempo (h)	Fazenda Leão de Ouro			Fazenda Almirante Cacau		
	Polpa	Mel	Caixa	Polpa	Mel	Caixa
T0	0	0	0	0	0	0
T24	0	0		0	0	
T48	8	0		0	9	
T72	9			4	7	
T96	0			1		
T120	21			13		
T144	0			0		
T168				13		
TOTAL	38	0	0	31	16	0

Nas duas fazendas pode-se verificar que as de leveduras selecionada através do ensaio de produção de ART livre com atividade pectinolítica aparecem na fermentação somente após 48 horas de fermentação. Esse dado nos mostra que leveduras com atividade pectinolítica se desenvolvem em relação as não pectinolíticas após o termino

da disponibilidade de açúcar como a glicose e frutose presentes nas primeiras 48 horas.

Das 367 linhagens avaliadas 85 linhagens foram selecionadas através da produção de ART livre e 203 foram selecionadas através da análise de crescimento em Pectina. Quando comparados os resultados dos dois ensaios de seleção: crescimento em pectina, o qual foram selecionadas 203 leveduras, e o ensaio de produção de ART livre, o qual foram selecionadas 85 linhagens, observamos que apenas 10 linhagens selecionadas no ensaio de crescimento não foram selecionadas no ensaio de produção de ART livre (165, 166, 167, 171, 176, 177, 180, 181, 339 e 385). Esse resultado nos mostra que velocidade de crescimento não apresenta uma ligação direta com atividade enzimática, pois leveduras com menor taxa de crescimento podem apresentar uma excelente produtividade de enzimática, como podemos observar pelos selecionados neste ensaio.

5.5 Seleção pela atividade pectinolítica indireto

Para o ensaio de atividade pectinolítica indireto, foi utilizado a mesma estratégia para a classificação e seleção de leveduras produtoras de pectinases empregada por Fernández-González et al. (2004) na seleção de leveduras produtoras de pectinases presentes na fermentação de vinhos.

Para tanto foram utilizadas as 85 leveduras selecionadas no ensaio de ART livre, Entre os 85 isolados de levedura selecionados anteriormente, três se destacaram quanto a atividade pectinolítica (Figura 9), as linhagens 184, 331 e 365 produzindo respectivamente 13,9 mg.min⁻¹; 11,2 mg.min⁻¹ e 8,3 mg.min⁻¹ de açúcar redutor. Apesar dos valores de atividade dessas linhagens serem superiores em relação as demais, a linhagem usada como padrão para este ensaio, a MMIII-41 obteve uma atividade de 20,12 mg.min⁻¹. Este resultado já era esperado visto que a linhagem MMIII-41 foi melhorada geneticamente para produção de pectinases (LEAL et al., 2008). A Tabela 3 mostra os resultados em absorbância para as três leveduras selecionadas.

Tabela 3 - Resultados do ensaio de crescimento e ensaio de ART livre, das linhagens 184, 331 e 365, divididas por localidade de isolamento e classificação de espécie segundo a metodologia empregada de meios seletivos

Linhagem	Local/tempo	D.O	ART Livre	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
184	Polpa Leão de Ouro	1,416	0,618	Não
331	Polpa almirante	1,450	1,364	Não
365	Polpa almirante	1,450	1,521	Não

As três linhagens selecionadas através do ensaio enzimático foram isoladas da polpa, a linhagem 184 foi isolada com 48 horas de fermentação na fazenda Leão de Ouro, enquanto que a linhagem 331 foi isolada em 120 horas da fazenda Almirante Cacau e a linhagem 365 isolada da mesma fazenda após 168 horas de fermentação. Os resultados podem ser observados na Figura 7.

Figura 6 - Atividade pectinolítica analisada indiretamente das linhagens oriundas de fermentações de cacau, expressa em Absorbância a 520nm. Destaque em vermelho para as linhagens 184, 331 e 365

Portanto, das 367 leveduras isoladas da fermentação espontânea de cacau, três linhagens foram eleitas para serem reinoculadas no processo, após todas elas passarem por três ensaios de seleção: ensaio de crescimento, ensaio de ART livre e Ensaio da Atividade Enzimática Indireta, resultados semelhantes e metodologia foram obtidos e utilizado por Serrat et al. (2002), no isolamento e seleção de leveduras pectinolíticas isoladas da fermentação do café.

5.6 Ensaio *in locu*

Para comparar os efeitos de uma fermentação com inóculo inicial de leveduras e uma fermentação de ocorrência espontânea de micro-organismos, um ensaio foi delineado no município de Itabuna no sul da Bahia (fazenda Almirante Cacau), para tal foram preparadas caixas de fermentação de madeira com capacidade para 120 Kg de cacau, e também caixas de fermentação de inox com capacidade para 40 Kg de cacau, foram feitos 2 tratamentos diferentes, o primeiro com inóculo de um coquetel de leveduras selecionadas previamente pelo programa de seleção – 184, 331 e 365, e o segundo tratamento foi inoculado um coquetel de leveduras conhecidas: *Sachharomyces cerevisiae* e a linhagem MMIII-41, uma espécie de *Kluyveromyces marxianus* melhorada geneticamente para produção de pectinase, o terceiro tratamento foi utilizado como controle. Amostras foram coletadas a cada 24 horas durante 168 horas e o resultados para drenagem do mel, etanol, açúcares, ácido acético, ácido láctico e temperatura. A Figura 8 ilustra o esquema do experimento.

Figura 7 - Esquema das fermentações realizadas no Sul da Bahia-BA. Três caixas de Madeira e três Tanques de Inox com 2 tratamentos diferentes mais o controle

5.6.1 Drenagem do Mel

Nas primeiras horas de fermentação o principal papel das leveduras é o de consumir os açúcares presentes na mucilagem convertendo-os em etanol e gás carbônico (SCHWAN; WHEALS, 2004), concomitantemente leveduras produtoras de

pectinases atuam sobre a massa do cacau degradando a pectina, a qual é constituída por uma cadeia de ácidos galacturônicos ligados entre si e a presença de monossacarídeos interligados (WASCHECK et al., 2008). Com a quebra da pectina, os componentes atrelados a cadeia são liberados para a massa cacaueira ficando disponíveis para leveduras e outros micro-organismos como as bactérias lácticas (SCHWAN, 1998). No entanto a quebra acelerada da pectina pelas leveduras no início da fermentação, disponibiliza açúcares em excesso para o meio, o qual acaba fluindo para fora das caixas fermentativas originando o mel de cacau. Portanto um importante indicativo da velocidade de fermentação se dá pelo volume de mel drenado durante os primeiros dias de fermentação. A fim de avaliar as velocidades das fermentações os volumes de mel drenado entre os tratamentos foram aferidos e estão demonstrados na Figura 9, aferições dos volumes foram feitas nas caixas de madeira e tanques de inox nos três tratamentos: SK, SEL e Controle.

Figura 8 - Drenagem do Mel aferido nas caixas de madeira e tanques de inox durante as primeiras 96 horas de fermentação nos três tratamentos – SK, SEL e Controle

Conforme a Figura 9 podemos observar que nas primeiras 24 horas de fermentação a quantidade de mel de cacau coletado nas caixas de madeira para o tratamento SK (10,7 Litros) e tratamento SEL (8,9 Litros) foram superiores ao tratamento Controle (6,2 Litros), esses dados podem ser reflexo dos efeitos causados pela inoculação inicial de leveduras, a qual acelerou a degradação dos açúcares iniciais contidos na polpa do cacau.

Os dados de volume de drenagem do mel para os tanques de inox com os tratamentos SK e Controle são praticamente os mesmos durante as primeiras 96 horas, o único tratamento que obteve destaque foi o tratamento SEL com 6,3 Litros logo nas primeiras 24 horas, enquanto SK e Controle tiveram 5,0 litros, o tratamento SEL mantém-se com leve aumento de volume nas próximas medições em relação aos outros dois tratamentos. Levando em consideração que o inóculo inicial foi igual para os tanques de inox e caixas de madeira (ambos com 0,2 mg de levedura por quilo de cacau), a mesma matéria prima foi utilizada em todos os tratamentos – os frutos foram quebrados e distribuídos aleatoriamente entre os três tanque de inox e três caixas de madeira - a temperatura ambiente foi a mesma, visto que todos recipientes estavam no mesmo local, então pode inferir que no início da fermentação as leveduras utilizam o oxigênio disponível para se multiplicar, realizando a respiração celular, como nas caixas de madeira há uma maior entrada de ar pelas laterais, base e topo da caixas (cobertas com folhas de bananeira), as leveduras permanecem em um ambiente propício para se multiplicar, já nos tanques de inox essa entrada de ar é prejudicada, retardando a multiplicação e consequentemente a atividade enzimática, levando assim a uma drenagem de mel reduzida (PEREIRA et al., 2013).

5.6.2 Açúcares

Amostras da polpa do cacau foram coletadas a cada 24 horas nos 3 tratamentos, nas caixas de madeira e nos tanques de inox durante todo o período de fermentação.

No tempo zero a concentração de Sacarose nas caixas de madeira foi de 67,14 mg/g, Glicose 151,21 mg/g e Frutose 175,68 mg/g para os três tratamentos (SK, SEL e C), ao longo da fermentação esses açúcares foram consumidos gerando outros produtos como o etanol, CO₂ e ácido láctico. A Figura 10 mostra que os tratamentos SEL e Controle necessitaram de 96 horas para consumir toda sacarose, enquanto que, no tratamento SK a Sacarose foi esgotada com 24 horas. Esse fato pode ser o efeito das leveduras inoculadas inicialmente – *MMIII-41* especializada na produção de pectinase e *S. cerevisiae* especializada em consumir açúcares em alta velocidade. Tal ocorrência pode ser verificado na Figura 9 onde a produção de mel de cacau no tratamento SK e SEL foi superior ao controle e também na Figura 11, onde a produção de etanol nos tratamentos SK e SEL também foram superiores quando comparadas ao controle.

As concentrações de açúcar nos tratamentos SK e SEL para os tanques de INOX seguem os mesmos padrões do tratamento controle.

Figura 9 - Concentrações de Sacarose, Glicose e Frutose nas caixas de madeira e tanques de inox ao longo das 168 horas de fermentação entre os diferentes tratamentos (SK, SEL e Controle)

Nos tanques de inox a concentração de sacarose para os tratamentos SK e SEL no tempo zero foi de 67,14 mg/g, no entanto em 24 horas a concentração de ambos foi pra zero, voltando a subir em 48 horas e se mantendo abaixo de 10 mg/g até o término da fermentação.

5.6.3 Etanol

A produção de etanol por leveduras na fermentação de cacau tem um papel fundamental, quanto mais rápido ocorre a bioconversão dos açúcares em etanol, menor será a disponibilidade de carboidratos para que outros micro-organismos produzam metabólitos não desejáveis na fermentação, além do etanol estar disponível antes para as bactérias acéticas iniciem a oxidação e o transformem em ácido acético, elevando a temperatura da massa cacaueira culminando na morte do embrião, toda essa cadeia de acontecimentos faz com que a fermentação termine antes. Outro ponto importante a ser destacado é a produção do ácido láctico, que pode ser produzidos no início da fermentação ou não, pela disponibilidade de açúcares por bactérias lácticas, o ácido láctico compõe a acidez fixa nas sementes, a qual é considerada indesejável pela indústria chocolateira (EFRAIM et al., 2011; PEREIRA et al., 2013).

A produção de etanol na fermentação de cacau nos tratamentos SK e SEL se antecipa em 24 horas em relação ao controle, esse resultado repete o mesmo fenômeno observado na drenagem do mel e temperatura como vistos anteriormente.

Conforme a Figura 11 os tratamentos SK e SEL apresentam pico de produção de etanol nas caixas de madeira após 48 horas de fermentação, atingindo 44,57 mg/g e 45,23 mg/g respectivamente de etanol, enquanto o pico de produção para o controle se dá em torno de 96 horas com produção de 37,94 mg/g. Mais uma vez os resultados demonstram que a prática da inoculação inicial de leveduras no processo pode reduzir o tempo de fermentação, conforme trabalho realizado por Leal et al. (2010) onde a inoculação inicial de leveduras acelerou o processo e produziu chocolate com qualidade superior ao controle não inoculado. Resultados semelhantes na produção de etanol na fermentação de sementes de cacau foram obtidos por Pereira et al. (2013) em trabalho realizadas no sul da Bahia.

Figura 10 - Concentração de Etanol na Polpa, durante 168 horas de fermentação nas caixas de madeira e tanques de inox

5.6.4 Ácido Acético

A produção de ácido acético na polpa nas caixas de madeira teve início em 96 horas de fermentação nos tratamentos SK e SEL com concentrações de 20,82 mg/g e 27,29 mg/g respectivamente, ao passo que o Controle iniciou a produção 24 horas depois, com uma concentração de 24,85 mg/g. Isso já era esperado devido a produção tardia de etanol no tratamento controle. Ver Figura 12.

Figura 11 - Concentração de ácido acético nas caixas de madeira e tanques de aço inox para os três tratamentos SK, SEL e Controle

Ainda na Figura 12 as concentrações de ácido acético nos tanques de Inox tiveram início em 96 horas também para os tratamentos SK e SEL com concentrações de 27,07 mg/g e 8,56 mg/g respectivamente, repetindo o ocorrido nas caixas de madeira porém com concentrações mais altas. Essas concentrações são mais elevadas devido a vedação dos tanques de inox que diminui a volatilização do ácido acético, ao contrário do que ocorre nas caixas de madeira.

5.6.5 Ácido Lático

O ácido láctico é considerado indesejável nas sementes de cacau, por ser um ácido não volátil persistindo nas sementes até o fim da cadeia produtiva: secagem, torrefação e conchagem. O ácido láctico deixa um gosto adstringente e amargo ao chocolate, indesejável para a indústria chocolateira (THOMPSON et al., 2001; SANTINI et al., 2013).

Observando a Figura 13 pode-se notar que a produção de ácido láctico na polpa nas caixas de madeira para os tratamentos SK e SEL é precoce em relação ao tratamento controle, ocorrendo com 24 horas, e após 48 horas de fermentação atingem o pico com concentrações de 19,48 mg/g e 20,82 mg/g respectivamente, a partir desse ponto em ambos os tratamentos as concentrações diminuem gradativamente até o final das 168 horas de fermentação.

Lagunes-Galvez et al. (2007) demonstrou que o maior desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido láctico foi encontrada após 24h do início da fermentação, o mesmo foi constatado por Beckett (2009) onde demonstraram que as bactérias lácticas estão presentes desde o início da fermentação, mas só se tornam dominante entre 48 e 96 h, convertendo açúcares em ácido láctico.

Figura 12 - Concentração de Ácido Lático na polpa e na semente nos três Tratamento: SK, SEL e Controle, durante 168 horas de fermentação

Na Figura 13 observa-se que a produção de ácido lático na polpa dos tanques de Inox seguiu os mesmos padrões da fermentação realizada nas caixas de madeira, ou seja a produção de ácido lático durante 24 e 96 horas de fermentação foi muito baixo quando comparado a trabalhos que também mediram a produção desse composto ao longo da fermentação (SCHWAN; WHEALS, 2004), provavelmente pelo baixo inóculo de leveduras no início da fermentação ou por erros ocorridos no processo, principalmente no que se refere ao revolvimento da massa.

5.6.6 Temperatura

A temperatura é fundamental para a qualidade final das sementes pois além de ser responsável pela causa da morte do embrião, quando associada ao ácido acético é responsável pela degradação das proteínas internas das sementes que darão origem as características organolépticas intrínsecas ao chocolate de boa qualidade, (SCHWAN et al., 1995). Durante o experimento a temperatura da fermentação nas caixas de madeira variou de 23° a 55°C, onde os picos ocorreram após as 96 horas de fermentação devido a biotransformação do etanol em ácido acético pelas bactérias acéticas (CAMU et al., 2007). As altas temperaturas são extremamente dependentes da quantidade de massa presente nas caixas fermentativas, pois a formação do centro de calor dependem não só das reações que originam o calor para a massa, quanto do isolamento térmico que as sementes proporcionam quando em grandes quantidades

(CAMU et al., 2007; SCHWAN; WHEALS, 2004). Quando comparadas as fermentações realizadas em tanques de inox com capacidade para apenas 35 Kg de cacau, com as fermentações realizadas em caixas de madeira com capacidade para 120 Kg vemos uma diferença no centro de formação de calor, os picos de temperatura nas caixas de madeira atingiram 50,8° C ao passo que os picos dos tanques de inox não passaram de 44° C – ver Figura 14.

Figura 13 - Temperaturas Médias das caixas de madeira e tanques de Inox ao longo da fermentação

Como as temperaturas das caixas de madeira foram aferidas por sistema eletrônico e captadas a cada 10 minutos, foi possível acompanhar com maior eficácia as temperaturas nos três diferentes tratamentos, a Figura 15 mostra as temperaturas com maior resolução.

Figura 14 - Temperaturas das fermentações nas caixas de madeira. As setas representam os revolvimentos da massa de cacau

A temperatura nas caixas de madeira segundo a Figura 15 nos tratamentos SK e SEL apresentaram um aumento após 36 horas do início da fermentação, o qual foi interrompido pelo revolvimento da massa com rápida retomada nas horas seguintes. Essa elevação inicial foi devida a biotransformação dos açúcares contidos na polpa em etanol pelas leveduras (CAMU et al., 2007) mostrada na Figura 11 (gráfico de produção de etanol). Diferentemente o tratamento controle iniciou a elevação de temperatura somente após 60 horas de fermentação, os dados de temperatura juntamente com os dados da produção de etanol na polpa demonstram que a inoculação inicial de leveduras acelerou as biotransformações em aproximadamente 48 horas em relação ao tratamento controle, a antecipação dos processos fermentativos indicada pela temperatura nos tratamentos SEL e SK pôde levar a redução no tempo de fermentação total, como mostra a Figura 15 em que a queda de temperatura por volta de 130 horas nos tratamentos SEL e SK indicam o final da fermentação. Quando comparado ao tratamento controle o mesmo continua em processo de elevação de temperatura, indicando que os micro-organismos estão ativos no processo.

Nota-se que também que por volta das 130 horas houve um revolvimento da massa nos três tratamentos fazendo com que a retomada da temperatura ocorresse somente para o tratamento controle, e nos tratamentos SK e SEL observa-se um

declínio indicando o final da fermentação. Resultados semelhantes aos apresentados nesse trabalho pelo tratamento controle foram obtidos por Schwan e Wheals (2004), onde a elevação de temperatura ocorreu por volta das 100 horas.

6 CONCLUSÕES

Foi concluído que leveduras selecionadas previamente em laboratório através de um programa de seleção, quando inoculadas em abundância no início de um processo fermentativo das sementes do cacau, afetam positivamente a fermentação. A prática acelera as biotransformações da massa cacaueira em 24 horas, aumenta a produção de etanol e ácido acético, aumenta o volume de mel drenado, diminuindo o tempo total de fermentação, deixando o processo mais eficiente.

REFERÊNCIAS

- AFOAKWA, E. **Chocolate science and technology**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. 296 p.
- AFOAKWA, E.O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.F.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 48, p. 840–857, 2008.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, Barking, v. 33, p. 21-28, 1998.
- ALMEIDA, M.H.G. **Cacau. Tecnologia pós-colheita. A fração volátil no flavour a cacau**. 1999. p 89. Tese (Doutorado em Engenharia Agroindustrial) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade técnica de Lisboa, Lisboa, 1999.
- ANNUAL REPORT 2008/2009, Londres: International Cocoa Organization,,. Disponível em: <http://www.icco.org/about-us/icco-annual-report.html>. 2009>. Acesso em: 01 ago. 2014.
- ARDHANA, M.M.; FLEET, G.H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International journal of food microbiology**. Amsterdam, v. 86, p. 87–99. 2003.
- BECKETT, S.T. **The Science of Chocolate**. Londres: Royal Society of Chemistry Paperbacks, 2000. 175p.
- BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Ed.). **Food Microbiology - Fundamentals and frontiers**. Washington: Elsevier, 2001. p. 721–733.
- BIEHL, B.; PASSERN, U.;PASSERN, D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 28, p. 41–52, 1977.
- BIEHL, B.; VOIGT, J. **Biochemistry of cocoa flavour precursors**. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE,12., 1996. Salvador. **Proceedings...** Lagos: Cocoa Producers Alliance, 1999. p. 929–938.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T.G. Production of pectic enzymes in yeast. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 175, p. 1-9, 1999.
- COUNET, C.; CALLEMIEN, D. ; OUWERX, C. ; COLLIN, S. Use of Gas Chromatography-Olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 50, p. 2385–2391, 2002.
- CAMU, N.; LUC DE VUYST; Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the science of food and agriculture**, Chichester, v. 88, p. 2288–2297, 2008.

CAMU, N.; DE WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, p.1809–1824, 2007.

CAVAZZA, A.; GRANDO, M. S.; ZINI, C. Rilevazione della flora microbica in mosti e vini. **Vignevini**, Bologna, v. 9, p. 17–20, 1992.

CLARK, F.E. Agarplate method for total microbial count. In: BLACK, C.A.; EVANS, D.D.; ENSMINGER, L.E.; WHITE, J.L.; CLARK, F.E. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. v.2, p.1460-1466. (ASA, 9).

COCOA FACT SHEET, Wageningen, **Commodity research**. Wageningen: Wageningen UR Centre for Development Innovation, 2012. 12p.

COE, S.D.; COE, M.D. **The true history of chocolate**. London: Thames and Hudson, 1996. 230p.

COOK, L.R. **Chocolate Production and Use**. 3rd ed. Magazines for Industry, 1982. 463p.

DE BRITO, E.S.; GARCIA, N.H.P.; GALÃO, 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**, London, , v. 81, p. 281-288, 2000.

DE VUYST, L.; LEFEBER, T.; PAPALEXANDRATOU, Z.; CAMU, N. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In: MOZZI, F.; RAYA, R.R.; VIGNOLO, G.M. (Ed.). **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. p. 301–325.

DEHOUX, P.; DAVIES, J.; CANNON, M. Natural cyclohexamide resistance in yeast The role os ribosomal protein L41. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 213, p. 841-848,1993.

DEL BOCA, C. Cocoa beans: Quality requirements and methods of assessment. **Review International Chocolaterie**, Paris, v.17, p.218–221, 1962.

EFRAIM, P.; ALVES, A.D.; JARDIM, D.C.P. Review: Polyphenols in cocoa and derivatives: factors of variation and health effects. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, p. 181-201, 2011.

PATENT APPLICATION PUBLICATION (USA). SAERENS, S.; SWIGERS, J. H. **Enhancement of cocoa quality and flavor by using *Pichia Kluyveri* yeast starter culture for cocoa fermentation** US2014/0271889. 18 set. 2014.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do processamento de alimentos. Princípios e prática**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p.183-205.

FERNÁNDEZ-GONZALÉZ, M.; ÚBEDA, J.F.; VASUDEVAN, T.G.; OTERO, R.R. C.; BRIONES, A.I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 237, p. 261-266. 2004.

FERRÃO, J.E.M. **Cacau: tecnologia pós-colheita**. Lisboa : Instituto de Cooperação Portuguesa- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2002. p.348.

FLEET, G. Spoilage yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 12, p. 1-44, 1992.

FORSYTH, W.G.C.; QUESNEL, V.C. Mechanisms of cocoa curing. **Advances in Enzymology**, New York, v. 25, p. 457-492, 1963.

FORSYTH, W.G.; HAYWARD, A.C.; ROBERTS, J.B.; Occurrence of poly-beta-hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. **Nature**, London, v. 182, n.4638, p. 800–801, 1958.

GIRALDO MEJÍA, A.M. Produção e caracterização bromatológica da polpa cítrica seca. **Conselho Federal de Medicina Veterinária**. Brasília, v.19, p. 23-33, 2000.

GREEN, M.R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Disponível em: <<http://www.molecularcloning.com>>. Acesso em:15 jul. 2014.

GREEN, S.R.; GRAY, P.P. A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. **Wallerstein Laboratories Communications**, New York, v. 13, p. 357, 1950.

HATANO, T.; MIYATAKE, H.; NATSUME, M.; OSAKABE, N.; TAKIZAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 59, p.749–758, 2002.

ILLEGHEMS, K.; DE VUYST, L.; PAPALEXANDRATOU, Z.; WECKX, S. Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity. **Plos one**. Bruxelas, v.7, p. 1-11. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INTELECTUAL (Brasil). TAVARES, F C. A.; GOMES, L.H.; FIGUEIRA, A.V.O.; LEAL, G.A. **Estojo de fermentação e processo de fermentação de sementes de cacau em fase sólida PI 0801104-4**. 19 mar. 2008.

ISENBERG, H.D. (ED.). Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. Washington. v. 1, p. 161-167, 1992.

KIM, H.; KEENEY, P.G. Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of food science**. Champaign, v. 49, p.1090–1092, 1984.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, J. **The yeasts, a taxonomic study**, New York: Elsevier Science, 2011. 1873 p.

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

LEROY, F., DE VUYST, L., Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.15, p.67 e 78, 2004.

LI, Y.; FENG, Y.; ZHU, S.; LUO, C.; MA, J.; ZHONG, F.; The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. **Journal of food composition and analysis**. San Diego, v. 25, p.17–23, 2012.

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

LOPEZ, A.S.; DIMICK, P.S. Cocoa Fermentation. In: REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Biotechnology**, Amsterdam: Elsevier, 1995. v. 14, p.562-577.

LUNA, F.;CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3527– 3532, 2002.

MALVESSI, E.; da SILVEIRA, M.M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 693–702, 2004.

MARQUARDT, M.M. **Estudo da atividade proteolítica de *Bacillus cereus* em biorreator**. 2003.111p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2003.

MARS INCORPORATED (United States). KEALEY, K.S.; SNYDER, R.M.; ROMANCZYK, L.J.; GEYER, H.M.; MYERS, M.E.; WITHCARE, E.J.; HAMMERSTONE, J.F.; SCHMITZ, H.H. **Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses**. USA Patent 6312753. 2001.

MEERSMAN, E.; STEENSELS, J.; MATHAWAN, M.; PIETER-JAN, W.; SAELS, V. Detailed Analysis of the Microbial Population in Malaysian Spontaneous Cocoa Pulp Fermentations Reveals a Core and Variable Microbiota. **Plos one**, Leuven, v. 8, p. 1-10, 2013.

MISNAWI, J.; JINAP, S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S.; Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. **Food Quality and Preference**, Harlow, v. 15, p. 403–409, 2004.

MISNAWI, J.; JINAP, S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S.; Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. **Food chemistry**. Barking, v. 85, p. 73–80, 2004.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**. London, v. 11, p. 266-277. 2008.

NAZARUDDIN, R.; AYUB, M.Y.; MAMOT, S.; HENG, C.H. HPLC Determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products. **Malaysian Journal Analytical Science**, Bangi, v. 7, p. 377—386, 2001.

NAZARUDDIN, R.; SENG, L.K.; HASSAN, O.; SAID, M. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. **Industrial Crops Products**, Amsterdam, v. 24, p. 87–94. 2006.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Amazonas, v.26, p.853-860, 2006.

OWUSU, M.; PETERSEN, M.A.; HEIMDAL, H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. **Journal of Food Processing and Preservation**, Malden, v. 36, p. 446–456, 2012.

PALLMANN C.L.; BROWN J.A.; OLINEKA T.L.; COCOLIN L.; MILLS D.A. MILLS;BISSON L.F. Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 52, p.3, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. ; Biotechnological potential of agro-industrial residues in: sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, Barking, v. 74, p. 69–80, 2000.

PAPALEXANDRATOU, Z.; FALONY, G.; ROMANENS, E.; JIMENEZ, J. C.; AMORES, F.; DANIEL, H. M.; VUYST, L.; Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Process Worldwide. **Applied Environmental Microbiology**, Bruxelas, v. 77, p. 7698–7714, 2011.

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

PEREIRA, A.M.; SATO, H.H. **Purificação e Caracterização de Peroxidase do Taperebá (*Spondias lutea*)**. 2002. 131p. Tese (Doutorado na area de) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

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

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

POROSKE, L.H. Industrial-Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 61, p. 1758-1765, 1984.

QUESNEL, V.C. Cocoa curing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 67, p. 41–50. 1967.

REINECCIUS, G.A.; KEENEY, P.G.; WEISSBERGER, W. Factors Affecting the Concentration of Pyrazines in Cocoa Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 20, p. 202–206, 1972.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Sulfur dioxide and wine microorganisms. **Wine Microbiology and Biotechnology**, London, v. 7, p.373-393,1993.

ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. "Pectic enzymes," in Economic Microbiology. **Microbial Enzymes and Bioconversions**. London, v.5, p.227–282, 1980.

SABIK, H.; FORTIN, J.; MARTIN, N. Identification of pyrazine derivatives in a typical maple syrup using headspace solid-phase microextraction with gas chromatography–mass spectrometry. **Food chemistry**, Barking, v. 133, p.1006–1010. 2012.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCH, S. Optimizing chocolate production through traceability: a review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, Kidlington, v. 29, p.167–187, 2013.

SAMAGACI, L.; OUATTARA H.G.; GOUALIÉ, B.G.; NIAMKE, S.L. Growth capacity of yeasts potential starter strains under cocoa fermentation stress conditions in Ivory Coast. **Food Science & Nutrition**, United States, v. 26, p. 861-870, 2014.

SAMAH, O.A.; PTIH, M.F.; SELAMAT, J. Biochemical changes during fermentation of cocoa beans inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* (wild strain). **Journal of Food Science and Technology**, Campinas, v. 29, p. 341–343, 1992.

SÁNCHEZ, E.H.; I. VERNÓS, I.; MARCO, R.; MORATA, G.; Genetic organization of *Drosophila bithorax* complex. **Nature**, New York, v. 313, p. 108-113, 1985.

SCHORTEMEYER, M.; HARTWIG, U.A.; HENDREY, G.R.; SADOWSKY, M.J. Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (face). **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.28, p.1717-1724, 1996.

SCHWAN, R.F.; ROSE, A.H.; BOARD, R.G. Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. **Journal of Applied Bacteriology - Symposium Supplement**, Oxford, v. 79, p. 96S–107S, 1995.

SCHWAN, R.F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.1477–1483, 1998.

SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London,, v. 44, p. 205–221, 2004.

SERRAT, M.; BERMÚDEZ, R.C.; VILLA, T.G.; Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing waste-water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 97, p. 193-208, 2002.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry**. Iowa, v. 95, p. 262-272, 1952.

STARK, T.; BAREUTHER, S.;HOFMANN, T. Sensory-guided decomposition of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) and structure determination of taste active polyphenols. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, Washington, v. 53, p.5407–5418, 2005.

THE INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **Categories of Cocoa Beans**. Disponível em: <<http://www.icco.org/about-cocoa/growing-cocoa.html>>. Acesso em: 25 Jan. 2013.

THOMPSON, S.S.; MILLER, K.B.; LOPEZ, A.S. Cocoa and coffee. In: DOYLE, M.J.; UENOJO, M.; PATIRE, G.M. Isolamento e seleção de micro-organismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes da agroindústria para a produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.3, p. 509-515, 2006.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 24, p. 230–233, 2006.

VAN DER VORST, J.G.A.J. Product traceability in food-supply chains. **Accreditation and Quality Assurance**, Berlin, v.11, p. 33-37, 2006.

VAN SOEST, P.J. Soluble carbohydrates and the non-fiber components of feeds. **Large Animal Veterinarian**, Oxford, v.2, p.42-44. p1987.

VITOLO, M. Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos. In: AQUARONE, E.; **Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2001. v.4, p.387-420.

WASCHECK, R.C.; DUTRA, A.R.; GRANDSIRE, C.; ALMEIDA, O.C.; MOREIRA, S.O.L. Pectina: um carboidrato complexo e suas aplicações. **Estudos**, Goiânia, v. 35, p. 343-355, 2008.