

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

DENISE SANDE SANTOS

**INOCULAÇÃO DE LEVEDURAS *STARTERS* NA FERMENTAÇÃO DO CACAU
PARA MELHORIA DO *FLAVOR***

**ILHÉUS-BAHIA
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DENISE SANDE SANTOS

**INOCULAÇÃO DE LEVEDURAS *START* NA FERMENTAÇÃO DO CACAU PARA
MELHORIA DO *FLAVOR***

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

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: João Carlos Teixeira Dias

**ILHÉUS-BAHIA
2010**

S237

Santos, Denise Sande.

Inoculação de leveduras starters na fermentação do cacau para melhoria do flavor/ Denise Sande Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2010.
74f. : il.

Orientador: João Carlos Teixeira Dias.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós - Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microorganismos.
Inclui bibliografia.

1. Leveduras. 2. Biotecnologia vegetal. 3. Cacau.
4. Fermentação. I. Título.

CDD 579.563

DENISE SANDE SANTOS

**INOCULAÇÃO DE LEVEDURAS *STARTERS* NA FERMENTAÇÃO DO CACAU
PARA MELHORIA DO *FLAVOR***

Ilhéus-BA, 26/02/2010

João Carlos Teixeira Dias - Orientador

Martin Brendel

Cíntia Alessandra Matiucci Pereira

DEDICATÓRIA

Dedico a todos aqueles que usam a vida para tornar o mundo melhor.

**Escrever é sinônimo de liberdade
Exteriorizar a alma,
Alegria, tristeza, angústia ou maldade,
que a vida em sua longevidade nos crava.**

AGRADECIMENTOS

Dizem que ser pesquisador é aprender a desvendar o mundo sob o olhar criterioso e cético da ciência. Concordo. Mas ser pesquisador brasileiro, vai muito além disso... Os reagentes importados que nunca chegam, os cortes de verba dos estados, a falta de administração dos laboratórios, a burocracia das Universidades Públicas... Bom, as dificuldades da carreira acadêmica mostram-se desde cedo, desde a iniciação científica. Deve ser por isso que é “obrigatório” um tópico de agradecimentos em todas as monografias, dissertações e teses no Brasil. Porque é impossível realizar pesquisa com qualidade no Brasil sem apoio, seja ele, intelectual, financeiro ou político.

Assim, tenho a convicção que a realização deste trabalho só foi possível graças a uma série de instituições, colegas, professores, amigos e familiares, que contribuíram, cada um a seu modo para a idoneidade e desfecho da pesquisa.

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. À FAPESB, CAPES e CNPQ pelo comprimento do seu papel de órgão de fomento, apoiando financeiramente o projeto e os intercâmbios realizados, à Pós-graduação de Microbiologia da Universidade São Paulo pela troca de conhecimentos, ao professor Benedito Corrêa e a doutoranda Tatiana Reis pelo apoio na USP, à professora Carla Cristina Romano por tudo que ela tem feito à Biomedicina, por sempre acreditar no nosso potencial, incentivar a nossa criatividade “construtiva” e por sem minha orientadora adotiva vez em quando, à Vanny Ferraz e Samuel Saito pelo apoio nas técnicas de cromatografia, ao professor Luiz Gustavo Braga e à química Geórgia Xavier pelo suporte com algumas análises químicas, ao professor Carlos Priminho Pirovani e o laboratório de proteômica na figura de André Santiago, Camila e Juliano pelo suporte nas análises de proteínas, ao professor Eduardo Gross e os alunas Hellen Martins, Ana Cácia e Elizabeth pelo “apoio genético”, ao adorável e divertido professor Martin Brendel pelas contribuições na correção do paper, aos anexos da UEFS Maíra e Iraíldes pela prontidão e apoio, aos alunos de iniciação científica que contribuíram neste trabalho, em especial Daniel Sampaio pela dedicação nos momentos necessários e Louise “oh não!” nos momentos de desespero, á Gis, fiel escudeira, por não ter me deixado desistir quando meu conceito de laboratório não se encaixava na UESC e por ter me feito sorrir por dois anos sem parar, à Thalís pela cumplicidade nas inúmeras análises, extrações, revolvimentos, redações e famigeradas “vésperas de entrega de qualquer coisa”, Salatiel pela firmeza e atitude no laboratório e por tornar engraçado os “ossos do ofício”, às minhas amiguinhas Luluzinhas que não estavam perto mas ouviam minhas reclamações e sempre ajudavam animando-me (e fazendo previsões de aprovações), à Keu pelo pontapé inicial, além dos inúmeros colegas que tornaram a jornada do mestrado menos árdua e mais divertida: Fernanda, Tauá, Tharcila, Miguel, Danny, Tércia, Cris, Bianca Maciel, Bianca Cintra, Fabiana, Sarinha, Tia Lú, Samuel, Lizzy, Marcus (Almeida ou não), o pessoal (tão bonzinho) da GERLAB, o pessoal do laboratório de microbiologia, a primeira turma do PPGBBM, entre outros tantos colegas, o meu mais sincero MUITO OBRIGADA.

Em especial, agradeço a Deus pela força e coragem, à Maria de Lourdes Sande (minha mainha) e Danilo Sande (irmão agora também acadêmico!) pelo apoio incondicional, à Iuri Oliveira Carvalho (meu conselheiro, companheiro, tradutor da impossível linguagem computacional, o meu amor e o meu *Kindinho fofo*!) pelo amor e compreensão, aos eternamente serenos João Dias (um orientador pai e estrategista!!!) e Rachel Rezende (a grande mãe do PPGBBM) pela oportunidade e acolhimento.

INOCULAÇÃO DE LEVEDURAS *START* NA FERMENTAÇÃO DO CACAU PARA MELHORIA DO FLAVOR

RESUMO

O aroma e sabor característicos do chocolate começam a ser formados antes de seu processamento industrial. Os precursores químicos do *flavor* são gerados nas etapas após a quebra do fruto, fermentação e secagem, sofrendo grande influência da microbiota presente durante a fermentação das amêndoas. Cento e doze leveduras previamente isoladas de fermentação do cacau foram avaliadas quanto à sua capacidade de degradar constituintes da polpa (pectina, proteína, ésteres, lipídeos e amido) e quanto à sua sobrevivência em meio à competição (através de testes de produção de micocinas - fenótipo *killer*). Fenótipo *Killer* (14%), atividade proteolítica (5%), estereolítica (9.9%), amilolítica (3.3%), pectinolítica (9.9%) e lipolítica (98.2%) foram encontradas nas 112 leveduras, sendo 109 positivas para pelo menos uma atividade. Entre as linhagens positivas para as atividades acima descritas, 32 tiveram sua região D1/D2 do 26S rDNA seqüenciadas, e, dentre estas, oito leveduras (A - *Rhodotorula mucilagenosa*, B - *Torulaspora delbreckii*, C - *Candida parapsilosis*, D - *Pichia galeiformis*, E - *Pichia Kluyveri*, F - *Issatchenkia orientalis*, G - *Saccharomyces cerevisiae*, H - *Pichia membranifaciens*) foram escolhidas e inseridas em processos fermentativos de amêndoas de cacau à concentração de $3,26 \times 10^8$ células microbianas/kg de cacau e sob condições específicas (revolvimento a cada 48 h e inversão da caixa de fermentação a cada 24 h). Fermentações sem inóculo foram usadas como controle negativo e, procedeu-se uma investigação das propriedades físico-químicas das amêndoas de cacau resultantes das fermentações com e sem inóculo. Não foram encontradas diferenças significativas entre temperatura e pH entre as fermentações com e sem inóculos. No entanto, a influência dos inóculos *starts* foi observada na acidez final (entre 8,3 e 11,5 mEq NaOH 100 g⁻¹, com diferença significativa dos controles 14 e 14,2 mEq NaOH 100 g⁻¹), na concentração de açúcares (nos inóculos B, C, F, G e H, concentrações entre 10,3 e 14,3 g kg⁻¹ com diferença significativa dos controles 8,9 e 16,8 g kg⁻¹) e nos aminoácidos livres (entre 869,7 e 1182,0 g.Kg⁻¹ estatisticamente diferentes dos controles 864,6 e 1165,4 g.Kg⁻¹). A linhagem *Candida parapsilosis* (inóculo C) que apresentou atividade pectinolítica, seguido por *Torulaspora delbreckii* (B) e *Pichia kluyveri* (E) demonstraram maiores alterações físico-químicas nas amêndoas de cacau após fermentação. Esses resultados ratificaram a capacidade dos inóculos com leveduras *start* em modificar a condição final e a qualidade das amêndoas.

Palavras-chave: Leveduras, biotecnologia, fermentação, cacau fino.

STARTERS YEAST INOCULATION ON COCOA FERMENTATION TO FLAVOR IMPROVEMENT.

ABSTRACT

Chocolate flavor starts its formation before the industrial processing. The flavor precursors are generated in steps after fruit opening, fermentation and drying, under influence of the microorganisms present during the beans fermentation. One hundred and twelve yeasts isolated from cocoa fermentation were evaluated for their ability to degrade pulp constituents (pectin, protein, esters, lipids and starch) and survival rate in the face of competition (through production test of mycocins - killer phenotype). Killer phenotype (14%), proteolytic (5%), estereolitic (9.9%), amylase (3.3%), pectinolytic (9.9%) and lipase activity (98.2%) were found in 112 yeasts, 109 positive for at least one activity. Among the strains positive for the above described uses, 32 had their D1/D2 region of 26S rDNA sequenced, and among these, eight yeast (A - *Rhodotorula mucilagenosa*, B - *Torulaspora delbreckii*, C - *Candida parapsilosis*, D - *Pichia galeiformis*, E - *Pichia Kluyveri*, F - *Issatchenkia orientalis*, G - *Saccharomyces cerevisiae*, H - *Pichia membranifaciens*) were selected and inserted into cocoa beans fermentation in a concentration of 3.26×10^8 microbial cells / kg of cocoa and under specific conditions (revolving every 48 hours and inverted box fermentation every 24 hours). Fermentation without inoculum were used as negative control and a investigation of cocoa beans physico-chemical properties resulting from fermentation with and without inoculum was done. There were no significant differences between temperature and pH of the fermentations with and without inocula. However, the influence of inocula had been observed in the final acidity (between 8.3 and 11.5 mEq NaOH 100 g⁻¹, with significant differences between the controls 14 and 14.2 mEq NaOH 100 g⁻¹) at a sugars concentration (in the inoculum B, C, F, G and H, concentrations between 10.3 and 14.3 g kg⁻¹ with a significant difference in controls 8.9 and 16.8 g kg⁻¹) and amino acids (between 869.7 and 1182, 0 g.Kg⁻¹ statistically different from controls 864.6 and 1165.4 g.Kg⁻¹). The strain *Candida parapsilosis* (inoculum C) that showed pectinolytic activity, followed by *Torulaspora delbrueckii* (B) and *Pichia Kluyveri* (E) showed significantly higher physical and chemical changes in cocoa beans after fermentation. These results confirm the ability of yeast inocula with start to modify the final condition and quality of the beans.

Keywords: Yeasts, biotechnology, fermentation, cocoa fine.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1	Leveduras e sua aplicação biotecnológica.....	12
2.1.1	Características gerais.....	12
2.1.2	Atividade micocinogênica.....	13
2.1.3	Produção biotecnológica de enzimas.....	14
2.2	Cacau.....	15
2.2.1	Origem e economia.....	15
2.2.2	Manejo do cacau.....	19
2.2.2.1	O fruto e a colheita.....	19
2.2.2.2	Fermentação.....	20
2.2.2.3	Bioquímica dos precursores do <i>flavor</i> do cacau.....	23
2.2.2.4	Secagem.....	25
2.2.2.5	Torrefação.....	26
2.2.2.6	Avanços tecnológicos relacionadas à fermentação do cacau.....	27
3	CAPÍTULO I.....	31
3.1	Introduction.....	33
3.2	Material And Methods.....	34
3.3	Results.....	38
3.4	Discussion.....	39
3.5	Conclusion.....	43
3.6	References.....	44
4	CAPÍTULO II.....	53
4.1	Introdução	
4.2	Material e métodos	
4.3	Resultados e discussão	
4.4	Referências	
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

O Cacau e chocolate, originários da América central, remontam três mil anos de consumo e ocupam atualmente vários nichos no mercado, variando desde alimento funcional até as mais elaboradas e luxuosas formulações cosméticas, levando à demanda estimada em 3.5 milhões de toneladas em 2008. A popularidade e atração exercidas pelo chocolate devem-se ao seu sabor e aroma únicos, os quais são obtidos após fermentação secagem e torrefação das sementes do cacau.

A fermentação do cacau é um processo espontâneo iniciado após a colheita e quebra dos frutos. A polpa, rica em açúcares é solubilizada pela atividade microbiana (leveduras, bactérias ácido láctica e acéticas além de bacilos formadores de esporos) escoando da dorna e levando a uma maior aeração da massa fermentativa. Etanol e ácidos orgânicos, resultantes da ação microbiana difundem-se nas sementes e causam a morte do embrião. São desencadeadas, ainda, várias alterações físico-químicas como o rompimento das paredes celulares com descompartimentalização de enzimas e substratos, ativação de enzimas endógenas (carboxipeptidase, aminopeptidases invertase, polifenol oxidase), oxidação de proteínas de estocagem, formação dos precursores químicos (peptídeos, aminoácidos livres, açúcares redutores) que interagem durante a torrefação (reação de Maillard) convertendo-se no aroma e sabor do chocolate. Há, ainda, difusão dos polifenóis, sua polimerização oxidativa e condensação com proteínas gerando redução de amargor e adstringência e modificando a cor das amêndoas – amarronzamento.

A fermentação do cacau é um processo antigo e tradicional, aplicado pelos cacaucultores a fim de modificar o *flavor* desagradável, adstringente e amargo característico da matéria-prima do chocolate. Está bem estabelecido que este processo, tal qual a microbiota

presente, é responsável pela qualidade do produto final, entretanto, seu procedimento arcaico, artesanal, empírico e imprevisível perdura até hoje, requerendo contínuas mudanças para garantir uma amêndoa com reprodutível alta qualidade.

Na fermentação do cacau as leveduras iniciam o processo que culmina na redução do amargor e adstringências das sementes. A presença de algumas enzimas extracelulares em leveduras auxilia no melhor aproveitamento da fonte de carbono disponível favorecendo o estabelecimento e manutenção das comunidades no cacau. A presença de fenótipo *killer* também confere-lhe vantagens adaptativas sobre as linhagens sensíveis, pois permite usufruir da maior parte dos recursos comuns disponíveis no ecossistema. Nesse intuito, este trabalho objetivou realizar a prospecção de leveduras produtoras de enzimas e substâncias micocinogênicas (fenótipo *killer*) isoladas da fermentação do cacau visando seu uso como linhagens *start* nesse processo para melhoria do flavor.

2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leveduras e sua aplicação biotecnológica

2.1.1 Características gerais

As leveduras são fungos unicelulares cujas células variam entre 5 e 8 μm geralmente esféricas, ovais ou cilíndricas e a divisão celular ocorre por brotamento. Podem formar filamentos, e, em algumas espécies, características bioquímicas só podem ser expressas quando nesta forma. Podem reproduzir-se também de forma sexuada, quando há fusão de duas células, com eventual formação de ascósporos (Madigan *et al.* 2004).

A fisiologia e diversidade das leveduras favorecem sua sobrevivência e ubiquidade em diferentes ambientes. Segundo Abranches *et al.* (1997), a presença de algumas enzimas extracelulares em leveduras desempenha um importante papel na utilização das fontes de carbono e nitrogênio disponíveis promovendo assim sua manutenção e propagação.

As leveduras crescem abundantemente em habitats onde há a presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores e podem viver em simbiose com animais e insetos, sendo patogênica para homens e animais. Atualmente, são aplicadas em diversos processos fermentativos, pois, possuem algumas vantagens tecnológicas em relação a outros microrganismos como, a capacidade de assimilar grande variedade de substratos, alta velocidade de crescimento e a facilidade de separação de sua biomassa. As principais leveduras de importância econômica correspondem ao gênero *Saccharomyces*, utilizadas na panificação e na produção de bebidas alcoólicas (Madigan *et al.* 2004).

2.1.2 Atividade micocinogênica

Segundo Vadkertiová e Slaviková (2007), o fenótipo *killer* é largamente distribuído entre linhagens de leveduras. O fenômeno *killer* caracteriza-se por produzir exotoxinas com atividade antimicrobiana, que são mediadas por receptores de parede específicos da célula em microrganismos suscetíveis. Estas leveduras estão aptas a destruir células e atuam em organismos da mesma espécie ou espécies distintas, que são caracterizadas por estarem presentes em substratos com alta concentração de açúcar e baixo pH. (Polonelli *et al.* 1993). A atividade *killer*, de acordo com Somers e Bevan (1969), corresponde a produção de proteínas de baixo peso molecular que são letais às leveduras sensíveis. As toxinas produzidas pelas leveduras *killer* são sensíveis ao calor e a protease e dependentes das condições do pH e oxigênio.

A presença do fenótipo *killer*, ou seja, a capacidade de produzir substâncias micocinogênicas confere vantagens adaptativas sobre as linhagens sensíveis, uma vez que permite ao maquinário bioquímico do competidor usufruir de maneira desigual das poucas fontes de alimento disponíveis no ecossistema (Czárán e Hoekstra 2003).

Segundo YAP *et al.* (2000) leveduras *killer* podem promover um método alternativo para prevenir o crescimento de leveduras indesejáveis. Elas interferem na competição entre as

espécies. Esse atributo pode ser usado em inúmeras aplicações biotecnológicas, como por exemplo, controle de contaminantes em dornas de fermentação de vinho.

2.1.3 Produção biotecnológica de enzimas

O uso de enzimas microbianas em diversos ramos industriais, bem como o emprego dos próprios microrganismos em indústrias alimentícias e em processos de biorremediação têm sido notável nas últimas décadas, ajudados principalmente pelo uso de proteômica e engenharia genética na geração de microrganismos com alta produtividade para determinados metabólitos.

Devido à plasticidade metabólica e genética, as leveduras são alvos comuns em estudos visando à obtenção de novas fontes potenciais de enzimas com relevante valor comercial (Buzzini e Martini 2002, Charoenchai *et al.* 1997, Strauss *et al.* 2001, Ganga e Martinez 2004, Oliveira *et al.* 2006, Brizzio *et al.* 2007).

Enzimas são biocatalisadores ativos e versáteis que executam reações de maneira rápida, específica, em condições brandas de reação além de serem passíveis de fácil controle - modificação de pH ou adição de cofator inibidor (Gonçalves 2007). As enzimas microbianas têm grande potencial biotecnológico, sendo empregadas na indústria têxtil (amilase, celulase, pectinase), de papel (lípase, xilanase, oxiredutase), de detergentes (celulase, lípase, protease), alimentícia (pectinase, lípase, protease), entre outras (Van Beilen e Li 2002, Kirk *et al.* 2002, Oliveira *et al.* 2006, Joseph *et al.* 2008).

Alguns metabólitos microbianos secundários também têm sido aproveitados industrialmente. Lopes *et al.* 2007 utilizaram leveduras *killer* como inóculo *start* para a produção de vinho, visando a manutenção da monocultura por sobreposição à outras espécies e impressão dos caracteres bioquímicos e sensoriais da linhagem selecionada.

Avanços em genética e fisiologia microbiana têm impactado sobre a produção enzimática. No entanto, entre vários pesquisadores o teste de atividade enzimática em placas

com diferentes substratos - *screening* enzimático - continua sendo uma importante ferramenta da biotecnologia na seleção inicial de microrganismos produtores de moléculas bioativas de interesse industrial e com potencial para produção em larga escala (Buzzini e Martini 2002; Steele e Stowers 1991; Bull *et al.* 1992 Gopinath *et al.* 2005).

Para a utilização de enzimas microbiana alguns cuidados em relação ao microrganismo produtor devem ser tomados. A identificação molecular através de sequenciamento dos microrganismos com potencial biotecnológico é uma ferramenta útil para verificar, através da filogenia, características bioquímicas e de patogenicidade da família ou gênero dos microrganismos de interesse, permitindo assim discernir, de maneira geral, pelo uso ou não dos microrganismos em determinados ramos da indústria. Permitindo vedar, por exemplo, o uso de microrganismo patogênicos em indústrias de probióticos ou de alimentos.

2.2 Cacau

2.2.1 Origem e economia

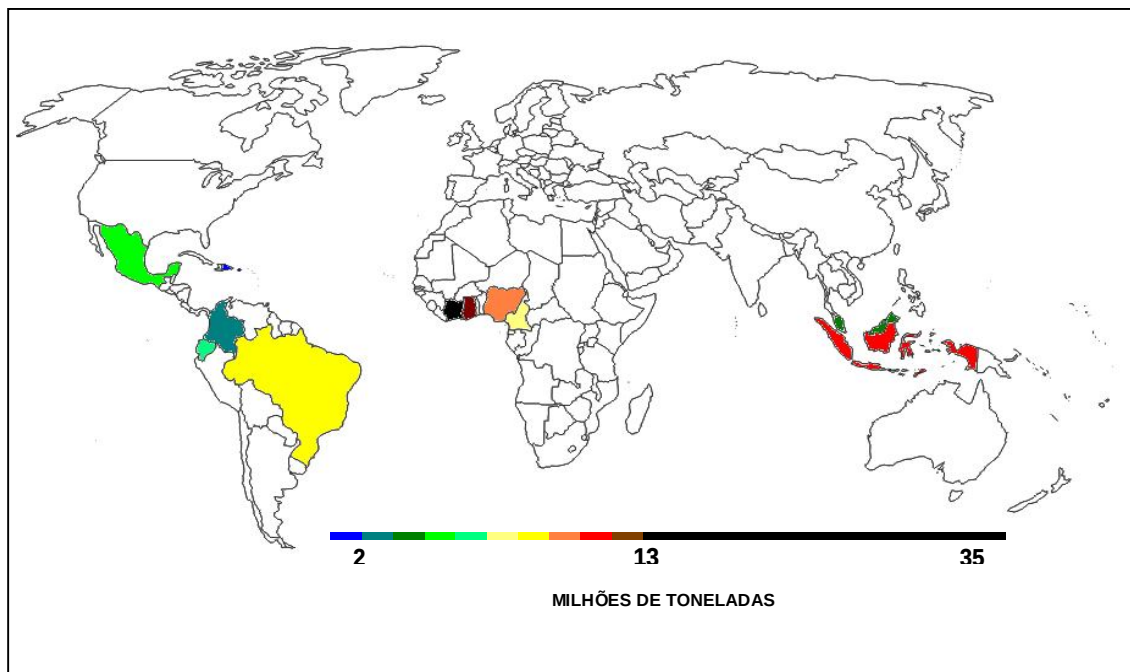
O cacau e seus derivados são conhecidos há mais de três milênios como uma bebida forte, amarga e apimentada originária da América central. Era usado pela civilização Asteca em rituais religiosos e políticos da alta sociedade quando, os europeus invasores apreciaram a bebida e levaram-na para Europa no século XVI (Schwan e Wheals 2004, Henderson *et al.* 2007, MCshea *et al.* 2008). Em meados do século XIX, foi modificada com adição de açúcar e leite, moldada e industrializada, caindo no gosto dos europeus de maneira irrefutável.

Da Europa para o mundo foram passos rápidos, elevando esse produto ao patamar de quase ubiquidade na dieta ocidental. O produto, ainda hoje, está associado a propriedades “mágicas” e saudáveis, algumas das quais são sabidamente efeitos farmacológicos de seus constituintes (polifenóis). O consumo mundial de chocolate ocupa um nicho multifaceado no mercado, indo desde alimento funcional até cosméticos, brinquedos e acessório de desejo em

tratamentos de beleza, chegando hoje à estimativa de 5-10kg por pessoa por ano, demandando 3,5 milhões de toneladas de cacau em 2008. (MCshea *et al.* 2008).

O chocolate tem como principal matéria prima as amêndoas de cacau, proveniente do fruto da árvore *Theobroma cacao*, o qual é cultivado em regiões tropicais ao redor do mundo (Ardhana e Fleet 2003). Esse cultivo requer temperaturas máxima e mínima de 32 e 18° C, um período de seca inferior à três meses e um índice pluviométrico entre 1000 e 4000 mm/ano. Os principais países produtores localizam-se em uma região de até 15° a 20° de latitude em torno da linha do equador, onde as condições climáticas encontram-se mais favoráveis ao desenvolvimento do fruto (Thompson *et al.* 2001, McShea *et al.* 2008).

Fig1 Faixa tropical de países produtores, em torno da linha do equador.



Fonte: Dados da FAO 2008. Elaboração gráfica: Iuri Oliveira Carvalho.

No Brasil, a maior área cultivada encontra-se na região Sul da Bahia abrangendo 90 municípios e gerando aproximadamente 85% de todo o cacau nacional. Até os anos 70 o cacau foi o principal gerador de divisas do estado, responsável por quase 60% de toda a sua

arrecadação. Na década de 80, o Brasil respondia pela segunda maior produção mundial, atrás apenas da Costa do Marfim (Meneses e Carmo-Neto 1993). Hoje, porém, as 170 mil toneladas colhidas em 2003/2004 (FAO 2008), que colocam o país na quinta posição mundial, são insuficientes inclusive para atender a demanda interna.

Tabela1 Principais países produtores dos últimos sete anos (2001-2007) ranqueados pela FAO (Food And Agriculture Organization Of The United Nations).

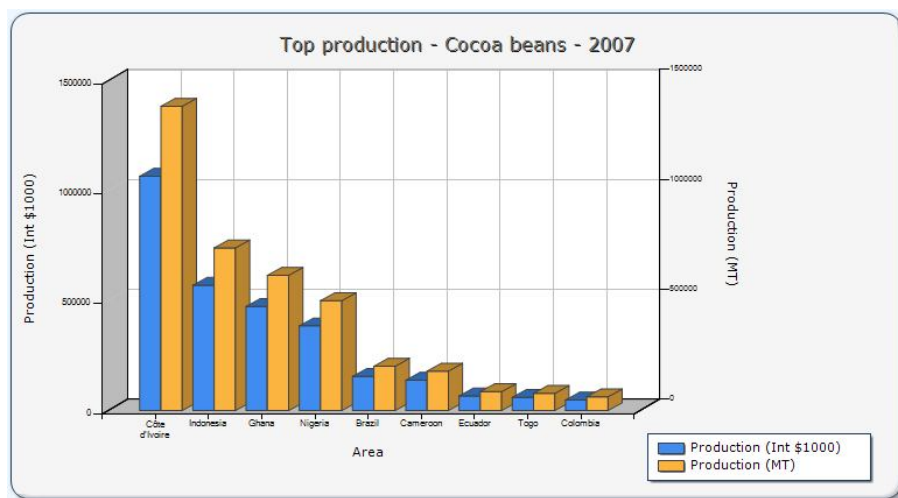
Area	Produção em milhões de toneladas						
	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001
Costa do Marfim	1384000	1372000	1360000	1083807	1351546	1264708	1212428
Indonésia	740006	769386	642900	494224	572640	571155	428263
Ghana	615000	734000	740000	567622	497000	340562	389591
Nigéria	500000	485000	441000	317314	385000	362000	340000
Brasil	201651	212270	208620	150959	170004	174796	185662
Camarões	179239	164553	178500	128430	154965	125000	122100
Equador	85891	87561	93658	69069	88263	87986	76030
Togo	78000	73000	53000	21700	5100	7500	10200
Colômbia	62358	52014	37099	36356	41704	48187	43694
Papua-Nova Guiné	47300	51100	47800	29960	42500	42400	38800

Fonte: FAO, principais países produtores entre 2001 à 2007.

A saturação de recursos naturais gerados por erros de manejo como queimada nas florestas e subsequente ausência de sombras no plantio, envelhecimento sem replantio ou plantação espacialmente desorganizada, além de capinado e poda insuficiente e ausência de controle de pragas levaram a uma grande redução da produtividade caucueira no Brasil (Leiter e Harding 2004). A *Moniliophthora perniciosa* ou vassoura-de-bruxa como é conhecido popularmente, associada às longas estiagens (93/97), concorrência com a emergente grande produtividade dos países africanos e flutuações do câmbio internacional (FAO 2008) foram decisivos também na queda de 60% do índice de produtividade do cacau entre o final da década de 80 e início dos anos 90.

Relações sociais da produção de cacau também influenciaram na redução da produtividade nas terras baianas. Por um lado, os trabalhadores de fazendas de cacau na Bahia recebiam conforme as pesagens do cacau processado, assim, freqüentemente negligenciavam a qualidade pela quantidade, por outro lado, os produtores que fizeram fortuna no cultivo do cacau, nunca se preocuparam em investir na lavoura, apenas no tocante á expansão (embora muitas vezes ilegal) das terras de cultivo. Por isso, a qualidade do cacau baiano declinou ao mesmo tempo em que a do competidor africano aumentava (Leiter e Harding 2004).

Em meados de 2000/2001 houve uma sensível melhora na produtividade gerada principalmente pela amenização das condições climáticas e substituição de um terço do plantio por alguns clones resistente à *M. perniciosa*. Entretanto, tornou-se clara a necessidade de modernização da lavoura cacaueira tanto do ponto de vista administrativo quanto tecnológico, com o aprimoramento do manejo pós - colheita visando à melhoria da qualidade e sua padronização com conseqüente valorização do produto de modo a continuar uma atividade econômica, social e ecologicamente adequada.



Legenda: MT = milhões de toneladas. Fonte: FAO.

2.2.2 Manejo do cacau

2.2.2.1 O fruto e a colheita

As amêndoas de cacau são naturalmente amargas, desagradáveis e adstringentes e precisam ser fermentadas, secas e torradas para adquirirem o aroma característico do chocolate (Nielsen *et al.* 2007).

O fruto do cacau tem entre 30 e 40 sementes. Estas são compostas por dois cotilédones e um gérmen envoltos em um fino tegumento, a casca. A semente fresca possui 32-39% de água, 30-32% de lipídeos, 8-10% de proteínas, 5-6% de polifenóis, 4-6% de amido, 4-6% de pentoses, 2-3% de celulose, 2-3% sacarose, 1-2% de teobromina, 1% de ácidos e 1% de cafeína (Nielsen *et al.* 2008). Em volta das sementes há uma polpa mucilagínosa de cor branca, com pH abaixo de 4.0 e composta por amido, pectina, glicose, frutose, sacarose, ácido cítrico e outros ácidos orgânicos como láctico, acético e água (Jespersen *et al.* 2005, Nielsen *et al.* 2005, Nielsen *et al.* 2007).

A concentração dos constituintes da polpa e das sementes varia conforme o tipo genético do cacaueiro, as condições climáticas da estação da colheita (principal ou temporã), a integridade dos frutos, seu grau de maturidade, o tempo de armazenamento entre a colheita e a abertura e podem influenciar na qualidade final do chocolate (Kattemberg e Kemming 1993, Thompson *et al.* 2001, Counet *et al.* 2004).

Um cuidadoso processamento e seleção de ingredientes são necessários para produzir atributos desejáveis (Hoskin 1994). Quanto à contribuição gênica para o cacau de qualidade, Hoskin e Dimick (1981) e Schwan e Wheals (2004) citam três variedades gênicas de cacau prevalentes no mundo, o forasteiro, que representa 70% da produção mundial e proveniente da região amazônica, o crioulo, proveniente da América do sul e central e predominante até o século XVII, sucumbindo devido a sua grande suscetibilidade a doenças e baixa produtividade, e, o híbrido dos dois, o trinitário. As variedades forasteiro são comuns e geram

um *flavor* mais áspero, enquanto crioulo e híbrido são mais aromáticos e palatáveis (Counet *et al.* 2004).

A seleção dos frutos para a fermentação pode ser considerado um ponto crítico de controle do beneficiamento primário do cacau (antes da torrefação), pois a inserção de grãos imaturos (“verdoeiros”), apodrecidos e restos de folha podem impedir a boa homogenização dos grãos e gerar sementes parcialmente fermentadas, reduzindo a qualidade do produto final e o valor comercial do lote.

As características inerentes do fruto e da sua variedade genética que poderiam representar um fator limitante para a qualidade do cacau podem ser perpassadas pela aplicação de técnicas corretas de processamento, convertendo-lhes em matéria prima de qualidade superior (Thompson *et al.* 2001).

2.2.2.2 Fermentação

Acreditava-se que a fermentação era realizada apenas para ajudar a remoção da polpa ao redor das sementes e para facilitar sua secagem, assim como para o café (Thompson *et al.* 2001). Entretanto, vários estudos já demonstraram que esse processo alavanca transformações bioquímicas no interior das sementes que culminam na formação dos precursores do aroma, cor e sabor do chocolate (counet *et al.* 2004).

Uma fermentação espontânea na polpa ao redor das amêndoas de cacau inicia-se imediatamente após a colheita, abertura e remoção das amêndoas do fruto, devido à contaminação por microrganismos naturalmente presentes na casca do próprio fruto, no ar, no cocho e na mão dos operadores (Nielsen *et al.* 2007, Leal *et al.* 2008). No Brasil, as sementes são colocadas em grandes caixas de madeira que podem comportar até 800 Kg e a fermentação dura entre três e sete dias, no entanto, a fermentação também pode ser realizada em montes, buracos no chão cobertos com folhas de bananeira e em bandejas (Keeney 1972, Schwan 1998).

Durante a fermentação, o revolvimento da massa é necessário para promover a homogeneidade da diversidade microbiana, da concentração de polpa e da temperatura na massa de cacau, a fim de garantir o mesmo grau de fermentação no lote (Gálvez *et al.* 2007).

Devido às condições iniciais da polpa, pH abaixo de 4.0, limitada disponibilidade de oxigênio e alta concentração de açúcares, as leveduras são favorecidas e estabelecem-se rapidamente nas primeiras 36 horas da fermentação do cacau. Suas enzimas pectinolíticas reduzem a viscosidade da polpa, permitindo seu escoamento em forma de mel de cacau. Isso permite uma maior aeração da massa fermentativa e contribui para o surgimento de microrganismos aeróbios (Nielsen *et al.* 2007, Jespersen *et al.* 2005, Thompson *et al.* 2001, schwan e wheals 2004). As leveduras são responsáveis também pela assimilação do ácido cítrico da polpa promovendo um suave aumento de pH (3.5 para 4.2, aproximadamente) que favorece o aparecimento de bactérias lácticas, pela produção de etanol e ácidos orgânicos que participam da aromatização da amêndoa (Lehrian e Patterson 1983, Lopez e Dimick 1985, Ardhana e Fleet 2003).

Muitas espécies de leveduras estão envolvidas na fermentação do cacau. Alguns estudos têm sido realizados para explorar essa diversidade e, autores demonstraram predominância de algumas espécies como *Kloeckera apiculata*, *K. corticis* e *Saccharomyces cerevisiae* na Costa do Marfim (Sanchez *et al.* 1985); *K. apis*, *S. cerevisiae* e *Candida tropicalis*, na Indonésia (Ardhana e Fleet 2003); *C. inconspicua* na república Dominicana (Gálvez *et al.* 2007); *C. krusei*, *P. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *H. guilliermondii* nas fermentações de montes e de bandejas em Gana (Jespersen *et al.* 2005) e posteriormente, *P. membranifaciens* e *H. guilliermondii* foram confirmadas como leveduras predominantes na fermentação do cacau em Gana (Nielsen *et al.* 2007); *C. Krusei*, *Geotrichum candidum*, *C. mycoderma* (*C. vivi*) na Bahia (De Camargo *et al.* 1963) e, mais recentemente também na

Bahia, *S. cerevisiae*, *K. apiculata*, *Kluyveromyces marxianus* e *C. rugosa* foram isoladas de maneira prevalente (Schwan *et al.* 1995).

As bactérias lácticas também fermentam os açúcares e utilizam o ácido cítrico da polpa, exibindo um rápido crescimento entre 16 e 48 horas de fermentação e alcançando seu máximo quando as leveduras declinam (Ardhana e Fleet 2003, Kostinek *et al.* 2008). Esses microrganismos produzem ácido láctico e outros ácidos orgânicos que contribuem para aromatização das amêndoas e acidificação do ambiente fermentativo. Têm sido verificada a predominância do grupo *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. brevis*) e *Pediococcus acidilactici* na Nigéria (Kostinek *et al.* 2008), *L. casei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. brevis* no Brasil (passos *et al.* 1984), *Lactobacillus fermentum* e *L. plantarum* em Ghana (Nielsen *et al.* 2005, Camu *et al.* 2008) além de *L. cellobiosus*, *L. plantarum* e *L. hilgardii* na Índonesia (Ardhana e Fleet 2003).

Na fermentação do cacau também se observa a presença de bactérias acéticas a partir de 24 horas (Nielsen *et al.* 2007). Os revolvimentos das amêndoas promovem seu crescimento, e, uma vez presente no curso da fermentação, estes procariotos oxidam o etanol produzido pela fermentação alcoólica a ácido acético em uma reação exotérmica, 496 KJ por molécula de etanol oxidada (Gálvez *et al.* 2007). Esse aquecimento na temperatura do cocho auxilia na inibição do crescimento de outros microrganismos, inclusive fungos filamentosos que poderiam perdurar durante a secagem levando a problemas no *flavor* das amêndoas. *Acetobacter pausterianus* é a espécie mais prevalente em fermentações de Gana, Índonesia e Brasil (Ardhana e Fleet 2003, Schwan e Wheals 2004, Nielsen *et al.* 2007).

Alguns *Bacillus* formadores de esporo aparecem ao final da fermentação quando a pH da massa de amêndoas não está tão ácido e sua temperatura está em torno de 40-50° C (Thompson *et al.* 2001, Schwan e Wheals 2004). Suas contagens na fermentação nunca são

muito significativas e este microrganismo parece ter maior influência em fermentações em caixas do que em montes (Nielsen *et al.* 2007).

Bacillus subtilis quando em baixa atividade metabólica, durante a fermentação do cacau podem produzir acetoína e amônia, que são intermediários da formação de pirazinas e tetrametilpirazinas (Kosuge e Kamiya 1962, Jinap *et al.* 2008). A maior contribuição desses microrganismos entretanto, parece estar muito mais na síntese de substâncias responsáveis por aspectos desagradáveis no *flavor* das amêndoas (Schwan *et al.* 1986, Schwan 1998, Schwan e Wheals 2004, Nielsen *et al.* 2007).

2.2.2.3 Bioquímica dos precursores do *flavor* do cacau

Os subprodutos da fermentação como os ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico, butírico, isobutírico e isovalérico), não voláteis (cítrico, láctico, málico, succínico, oxálico e tartárico) etanol e aquecimento acarretam a permeabilização da casca e penetração dos cotilédones gerando a morte do embrião, modificação do pH, inativação das enzimas da germinação, ativação de outras enzimas endógenas e perda da integridade celular das amêndoas (Hansen *et al.* 1998, Thompson *et al.* 2001). Estes eventos permitem o contato de enzimas e substratos antes separados em diferentes compartimentos e são a chave da bioquímica das mudanças na composição dos cotilédones e, conseqüentemente, da formação dos precursores químicos do *flavor* do cacau.

Os polifenóis presente nas sementes são perdidos por difusão e sofrem degradação através das polifenoloxidase à quinonas - escurecimento enzimático, com posterior polimerização com grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e fibras - escurecimento não enzimático (Brito 2000, Efraim 2004). Essas alterações são responsáveis pela diminuição da adstringência e amargor, características dos compostos fenólicos do cacau (Counet *et al.* 2004).

Teobromina, cafeína e seus complexos são os maiores responsáveis pelo amargor das sementes. Com a perda da permeabilidade seletivas das membranas das sementes eles difundem-se e são oxidados, tornando as amêndoas mais palatáveis. A difusão também acontece com pigmentos purpúreos das sementes, como as antocianinas que sofrem ação de glicosidases e α -arabinosidase levando à liberação de açúcares redutores (precursores do *flavor*) e ao amarronzamento dos cotilédones (Thompson *et al.* 2001, Schwan e Wheals 2004).

A concentração dos açúcares do cotilédone também sofre alterações durante a fermentação. A sacarose é o principal carboidrato presente nas sementes, sendo degradado sob a ação de invertases ativadas pela alteração do pH do cotilédone durante a fermentação. A sacarose é hidrolisada em moléculas de glicose e frutose (açúcares redutores), os quais, junto com os aminoácidos livres são substratos da reação de Maillard que culmina na formação do aroma específico do cacau - pirazinas, metilpirazinas, tiazoles, oxazoles, entre outros. (Misnawi *et al.* 2002).

A porção protéica das sementes de cacau é constituída por globulinas e albuminas. Globulinas são proteínas de estocagem e sua degradação em peptídeos e aminoácidos livre durante a fermentação é imprescindível para a formação do *flavor* (Buyukpamukcu *et al.* 2001). Essa proteína é degradada em três porções de vicilina (classe das globulinas) - 16, 37 e 41kDa - sob a ação de endoproteases (Amin *et al.* 1997, Hansen *et al.* 1998). As albuminas também estão presentes nos cotilédones, entretanto não sofre clivagem ao longo do processo fermentativo, não contribuindo, portanto, para o aroma final das amêndoas.

A interação de enzimas proteolíticas específicas com as vicilinas do cacau é imprescindível para a geração dos precursores aminoacídicos do aroma do chocolate e, já foi demonstrada *in vitro* (voigt *et al.* 1994). Aspartico endoproteases clivam substratos protéicos gerando preferencialmente oligopeptídeos hidrofóbicos (Amin *et al.* 1997) e a porção

carboxiterminal desses substratos é clivada por carboxipeptidases gerando oligopeptídicos hidrofílicos e aminoácidos livres hidrofóbicos - leucina, alanina, fenilalanina e tirosina (Amin *et al.* 1998, Hansen *et al.* 1998, Misnawi *et al.* 2002).

Para fabricantes de chocolate ou pó de cacau o grau de fermentação das sementes é o maior critério de qualidade. Isso deve - se à relação entre a formação dos precursores químicos do *flavor* (peptídeos, aminoácidos livres e açúcares redutores) dentro da semente e perda de compostos responsáveis pelo amargor e adstringência (polifenóis) durante a fermentação. Sementes parcialmente ou não fermentadas resultam na perda de *flavor* no produto final (Caligiani *et al.* 2007). Amêndoas não fermentadas têm um *flavor* muito ácido e adstringente, enquanto as parcialmente fermentadas causam um *flavor* amargo (Kattenberg e Kemmink 1993).

As interações enzimas-substratos requeridas para a formação do *flavor* só acontecem nas amêndoas onde a fermentação foi completa, pois a ação dessas enzimas é dependente do contato com o substrato, da temperatura da massa de amêndoas e do pH dos cotilédones (ideal entre 5.0 - 5.5), fatores intrinsecamente relacionados à ação microbiana proveniente da polpa do cacau (Amin *et al.* 1998).

2.2.2.4 Secagem

Ao final da fermentação, o tecido das amêndoas fica degradado sendo seco mais facilmente. Esse processo deve ser iniciado imediatamente, com a exposição das amêndoas ao sol em plataformas móveis, de madeira, camadas de polipropileno ou andares de concreto com revolvimentos constantes para homogenizar a secagem, permitindo com isso a volatilização de ácidos orgânicos, oxidações e a redução da umidade das amêndoas de 35 para 5-8% para evitar uma proliferação fúngica, que é favorecida pelas condições ambientais desse processo (Thompson *et al.* 2001, Schwan e wheals 2004).

Equipamentos envolvendo queima de madeira devem ser evitados para a promoção da secagem, haja visto que podem incurtir nas amêndoas o cheiro desagradável de fumaça e a elevada temperatura gerada pode levar à reações indesejáveis na manteiga de cacau. (Hoskin 1994, Thompson *et al.* 2001).

Durante esse processo uma série de enzimas ativadas na fermentação permanecem funcionais e perseveram gerando precursores químicos do *flavor*. Endoproteases e glicosidases são ativas nesta fase, enquanto polifenoloxidase é fortemente inativada (Hansen *et al.* 1998).

2.2.2.5 Torrefação

O aroma único do cacau e o mercado elicitado por suas vendas nos mais diversos setores da economia têm tornado o cacau um dos aromas mais estudados no mundo. Os primeiros textos sobre substâncias responsáveis pelo aroma do cacau datam de 1912, e vários estudos continuam sendo feitos no intuito de desvendar os verdadeiros agentes desse aroma (Frauendorfer e Schieberle 2006).

A torrefação é imprescindível para a conversão dos precursores químicos em aroma cor e sabor específicos de chocolate (Amin *et al.* 1997, Noor-Soffalina *et al.* 2009). É um fenômeno térmico cujo regimento de tempo e temperatura pode influenciar significativamente o tipo de aroma formado (Frauendorfer e Schieberle 2006). Esse processo é responsável por proporcionar perda do teor de água; diminuição dos ácidos voláteis indesejáveis (principalmente acético); desenvolvimento de aromas desejáveis através da reação de Maillard partindo dos precursores formados na etapa de fermentação e desenvolvimento da coloração típica do chocolate (Mcshea *et al.* 2008).

A torrefação leva ao aumento do nível de pirazinas em sementes bem fermentadas (Reineccius *et al.* 1972). Em 1986, Carlin *et al.* concluiu que haviam 83 componentes básico envolvidos no *flavor* da manteiga e do cacau torrado, derivados de pirazinas, tiazoles,

oxazoles e piridinas. Entretanto, Brunetto *et al.* (2009), em um dos trabalhos mais recentes sobre o tema propõe um método quantitativo para detecção de componentes do *flavor* do cacau utilizando a técnica headspace de injeção de amostras associada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas, demonstrando assim que a caracterização do *flavor* ainda não está completa e que ainda são necessárias mais pesquisas para acessar sua complexidade.

2.2.2.6 Avanços tecnológicos relacionadas à fermentação do cacau.

Uma vez que o mercado de venda de amêndoas de cacau está tornando-se saturado e inúmeros países estão concorrendo pelo mesmo nicho de produto, torna-se necessário investir em inovações de tecnologias que possibilitem o aumento da produtividade e da qualidade para obter novas fatias de mercado e manter-se competitivo. Assim, o Brasil além de desenvolver tecnologias gênicas para a resistência do fungo que quase devastou a produtividade cacaueira deve concentrar-se também em avançar no conhecimento sobre produção de cacau de qualidade superior.

Alguns autores acreditam que o caminho a ser seguido para a produção do chocolate é a “domesticação” ou semi-padronização das técnicas, semelhante ao que já aconteceu com outras fermentações naturais como vinho e a cachaça. A indústria de bebidas alcoólicas tem trocado fermentações naturais pelo uso de inóculos iniciadores, além de preconizarem o uso de matéria-prima de alta qualidade, garantirem o controle rigoroso da fermentação, darem melhor tratamento ao produto final e alçarem diversificações do mercado (Schwan 1998).

Está claro que há espaço no mercado para o desenvolvimento de produtos mais rebuscado e com preço diferenciado. Atualmente, existe um apelo no mercado chocolateiro por produtos de maior qualidade que possuam características cada vez mais raras e específicas, como *flavor* associado à territorialidade, como acontece no vinho. Especialistas

em chocolate podem detectar aromas diferentes relacionados à origem geográfica, variedade e até práticas agronômicas (Keeney 1972).

A venda de produtos alimentícios hoje também valoriza atributos relacionados à preocupação ambiental associada ao plantio, bem como a geração de alimentos orgânicos, sem utilização de pesticidas ao longo de sua cadeia produtiva. Nesses requisitos, o cacau brasileiro larga na frente, haja visto o selo verde que o sistema de cabruca, e suas implicações de conservação de parte do bioma nativo, permitem dar ao cacau nacional.

A produção de cacau fino introduziu no Brasil os primeiros conceitos de controle de qualidade nas lavouras deste *commodity*. Estabelecimento de boas práticas de fabricação como a seleção apenas de frutos intactos com o correto grau de maturação, procedimentos de higienização do fruto, bem como dos equipamentos de fermentação, secagem e estocagem, entretanto, são os primeiros passos em busca do produto superior.

Estudos diversos têm avançado na compreensão dos aspectos microbianos da fermentação. Martielli e Dittmar (1960) avaliaram a diversidade de leveduras na fermentação de amêndoas da Bahia, seguidos por De Camargo *et al.* (1963), Passos *et al.* (1984) e Schwan (1986, 1995, 2004). Outros autores também fizeram essa avaliação recentemente em diferentes países produtores como Ardhana e Feet (2003) na indonésia, em Gana Jespersen *et al.* (2005), Camu *et al.* (2008) e Nielsen (2005, 2007), Galvez *et al.* (2007) na república Dominicana, Kostinek *et al.* (2008) na Nigéria.

Uma exaustiva investigação têm sido feita quanto aos aspectos bioquímicos de geração do *flavor* do chocolate, tanto durante a fermentação e os precursores e pirazinas (Keeney 1972; KAttemberg e Kemmink1993; Voigt *et al.* 1994; Amin 1997,1998; Hoskin *et al.* 1981, 1994; Hansen *et al.* 1998; Hashim *et al.* 1998a e b; Buyukpamukcu *et al.* 2001; Misnawi *et al.* 2002; Jinap *et al.* 1994, 2008; Noor-Saffalina *et al.* 2009), quanto na torrefação e os aromas

específicos (Carlin *et al.* 1986, Jinap *et al.* 1995; Luna *et al.* 2002; Counet *et al.* 2004; Frauendorfer Schieberle *et al.* 2006).

A despeito da grande quantidade de trabalhos sobre a microbiota do cacau e sobre o monitoramento da fermentação, seja do ponto de vista qualitativo ou quantitativo, pouco estabeleceu-se sobre a fórmula correta de produzir de maneira reprodutível amêndoas de cacau com sabor característico e superior. Atualmente duas linhas parecem destacar-se dentro das perspectivas para a padronização do chocolate com *flavor* superior: a inserção de enzimas diretamente sobre a massa fermentativa e a modificação da fermentação através de inoculação de microrganismos *starts* metabolicamente selecionados.

A utilização de enzimas endógenas autolíticas como endopeptidases, carboxipeptidases e invertases sobre a massa fermentativa podem intensificar as degradações dentro dos cotilédones aumentando a concentração de precursores como açúcares redutores, peptídeos e aminoácidos livres, entretanto, um aumento no custo da produção (produção e purificação enantiomérica dessas enzimas) pode não ser compatível com o resultado obtido, ou seja, o preço final do cacau não compensaria o custo enzimático, uma relação de custo benefício que inviabiliza o projeto. Alguns estudos indiretos têm sido empreendidos para verificar as implicações químicas dessa linha (Hansen *et al.* 1998, Misnawi *et al.* 2002, Brito *et al.* 2004, Jinap *et al.* 2008).

A utilização de inóculos microbianos iniciadores, entretanto é uma prática observada em várias indústrias alimentícias como, por exemplo, na fabricação de iogurtes, vinhos, cerveja e queijo. Consiste em inserir uma ou várias cepas de microrganismo previamente selecionados quanto à características úteis à fermentação, como alta taxa de reprodução, resistência à competição, resistência à altas concentrações de etanol (indústria de cerveja e vinho) ou para o cacau, produção de enzimas pectinolíticas (aeração da massa), amilolíticas

(aumento da concentração de açúcares redutores), proteolíticas (concentração de aminoácidos livres). Algumas tentativas bem sucedidas têm sido feitas com inóculos *start* na fermentação, com resultados positivos (Schwan 1998 e Leal *et al.* 2008).

A padronização da técnica de inserção de um inóculo específico com a capacidade de sobreviver e imprimir características bioquímicas de interesse e, em última instância, sensoriais, promoverá uma revolução na maneira de produzir cacau e chocolate.

Extracellular Enzymatic Activity Profile, Killer Toxins and Yeast Diversity in Fermented
Brazilian Cocoa

Denise Sande¹, Adriana Cristina Reis Ferreira², Thalís Ferreira dos Santos¹, Ana Paula Trovatti Uetanabaro¹,
Carlos Augusto Rosa³, Rachel Passos Rezende¹, Martin Brendel², João Carlos Teixeira Dias^{1*}.

¹Department of Biological Sciences, PPGBBM, State University of Santa Cruz, BRAZIL

²Department of Biological Sciences, PPGBBM, State University of Santa Cruz, BRAZIL

³Departamento of Biological Sciences, ICB, Federal University of Minas Gerais, BRAZIL

** Correspondence and proofs should be addressed to:*

Dr. João Carlos Teixeira Dias

Department of Biological Sciences

UESC – State University of Santa Cruz

Rod. Ilhéus-Itabuna, Km 16

Ilhéus-BA, 45650-000, Brazil

phone: 011 55 73 3680 5151

fax: 011 55 73 3680 5226

e-mail: jctdias@uesc.br

ABSTRACT

Aims: To investigate diversity, extracellular enzyme activity (EEA) profile and killer toxin production of yeasts isolated during cocoa fermentation in Bahia.

Methods and Results: Isolated yeasts colonies (197) were morpho-physiologically identified as 12 genera and 28 species, with *Candida krusei* and *Pichia membranifaciens* as predominant. Chosen yeasts (112) were tested for amylase, esterase, lipase, protease and pectinase activities on YEPG or YNB containing different substrates, and for killer phenotype using NCYC1006 and NCYCY55 as sensitive strains. Killer phenotype (14%), proteolytic (5%), estereolytic (9.9%), amylolytic (3.3%), pectinolytic (9.9%) and lipolytic (98.2%) activity were detected in two thirds of yeasts isolated during the first 72 h of fermentation, characterizing this period as the one with greatest metabolic and enzymatic activity. The 32 selected yeasts strains positive for one or more of above-described characteristics had their morpho-physiological identification confirmed by sequencing the D1/D2 region of their 26S rDNA.

Conclusions: The order of appearance of yeasts with individual EEA profile during fermentation appears to be correlated to biochemical changes in the cocoa beans that are important for the formation of chocolate flavor precursors.

Significance and Impact of the Study: This paper shows the potential of yeasts isolated during cocoa fermentation as source of lipases, esterases, pectinases and proteases that are interesting for industrial and biotechnological applications. It also improves our biochemical understanding of cocoa flavor formation during the fermentation process

Keywords: lipase, esterase, protease, pectinase.

3.1 Introduction

The physiological diversity of yeasts favors survival and ubiquity in different environments. According to Abranches *et al.* (1997), the presence of some extracellular enzymes in yeast could play an important role in the utilization of available carbon sources, thus promoting cell maintenance and propagation. The presence of killer phenotype also confers adaptive advantages over sensitive strains, since the competitor's biochemical machinery allows it to use most common resources available in the ecosystem (Czárán and Hoekstra 2003). These microorganisms are usually targets for studies aimed at obtaining new enzymes with potential commercial value, due to their metabolic and genetic plasticity (Charoenchai *et al.* 1997; Strauss *et al.* 2001; Buzzini and Martini 2002; Ganga and Martinez 2004; Oliveira *et al.* 2006; Brizzio *et al.* 2007). Yeast are the first microorganisms to establish their presence during the ecological succession in cocoa fermentation (Thompson *et al.* 2001). Initial conditions in cocoa pulp fermented in boxes (low pH, low oxygen availability, high concentration of simple sugars) allow yeasts to use their metabolic and enzymatic arsenal (proteases, lipases, esterases, pectinases, amylases and toxins) to quickly propagate, overgrowing the other microorganisms present (Schwan and Wheals 2004). Yeasts begin the process of fermentation and reduce the bitterness and astringency of seeds, an essential step of cocoa production and in obtaining fine-quality chocolate.

Spontaneous fermentation of cocoa seeds starts immediately after their removal from the fruits (Nielsen *et al.* 2007). The sugar-rich pulp (Thompson *et al.* 2001) is solubilized by microbial activity (yeasts, lactic and acetic acid bacteria and towards the end of fermentation, some sporulating bacilli) reducing sweetness and leading to greater aeration of the fermentative mass. Ethanol and organic acids, resulting from microbial action, penetrate the seeds and cause the embryo's death (Brito *et al.* 2004). In addition, several physical and chemical changes occur, i.e., breaking of cell walls, oxidation of proteins, formation of free

reducing sugars with subsequent oxidation and polymerization of polyphenols that help to create the "flavor" of cacao (Hansen *et al.* 1998; Jepersen *et al.* 2005; Nielsen *et al.* 2007).

Microbial enzymes have a great biotechnological potential, being employed in the textile (amylase, cellulase, pectinase), paper (lipase, xylanase, oxiredutase), detergents (cellulase, lipase, protease), and food industry (pectinase, lipase, protease), among other applications (Kirk *et al.* 2002; Van Beilen and Li 2002; Oliveira *et al.* 2006; Joseph *et al.* 2008). Some secondary microbial metabolites have also been industrially used. In this context, Lopes *et al.* (2007) used killer yeasts as inoculum in wine production in order to maintain the monoculture by favoring their growth over that of other microorganisms, thus guaranteeing the biochemical and flavor-contributing characteristics from the selected strain.

Advances in microbial genetics and physiology have greatly improved enzyme production. However, many researchers agree that an initial selection of bioactive molecules with potential for large-scale industrial production and application may be achieved by an efficient screening process of natural microbial populations (Steele and Stowers 1991; Bull *et al.* 1992; Buzzini and Martini 2002; Gopinath *et al.* 2005).

This study aimed to investigate diversity and biotechnological potential of yeasts isolated from the cocoa fermentation farms of southern Bahia, by screening for extracellular enzyme activity and for killer phenotype. We also aimed at gaining some insight into the role of these enzymes in the cacao fermentation process.

3.2 Material And Methods

Cocoa bean fermentation

Cocoa pods were obtained from two cocoa farms in the southern region of Bahia state. The first fermentation was carried out on the farm St. George, municipality of Ilheus, during the main crop (October), and the second on the farm Ararauna, municipality of Una, during

the harvest season (July). Cocoa beans were fermented in wood boxes of 800 kg capacity and the mass was turned every 48 h.

Sampling

Cocoa beans were collected from the center fermenting mass, 60 cm from the surface of the wooden boxes during the days of fermentation (5-7 d). Every 12 h interval, the temperature was measured and 200 g of sample was taken. The beans were collected in sterile plastic bags, kept at 4 °C and sent to the environmental monitoring laboratory for further analysis.

Yeasts: collection, identification and storage

Samples were suspended in a buffer (0.1% of peptone, 0.1% Tween 80 and sterile water). The pulp was separated from the beans. An aliquot of the mucilaginous part was removed for analysis of pH and another was used to isolate microorganisms by plating after serial dilution on Sabouraud agar containing chloramphenicol 0.150 g/L. Plates were incubated at 25 °C for 72 h, then the colonies were isolated in pure culture and morpho-physiologically identified according to Yarrow (1998). The isolated yeasts were stored in GYMP (3 g/L yeast extract, 3 g/L malt extract, 5 g/L bacteriological peptone, 10 g/L glucose and 20 g/L agar, with glycerol added at 20% v/ v) at 4 °C under a layer of sterile mineral oil.

Inoculum preparation

Among the isolates, 112 representatives of all genera found were randomly chosen for enzymatical tests. They were grown in Sabouraud medium with chloramphenicol for 24 h at 28 °C. The inoculum was then standardized to 10^6 cells/mL, 10 µL were plated on solid medium containing different carbon sources and tested for various activities during incubation for 2-5 d at 28 °C.

Amylase activity

The ability to degrade starch was tested in a medium containing Yeast Nitrogen Base (YNB, DIFCO) 6.7 g/L, soluble starch 2 g/L and agar 20 g/L, with pH of 6.0 (Ankin and Anagnostakis 1975). After growth, the degradation was revealed by the presence of yellowish halo formed around the colony by the addition of lugol.

Esterase activity

The selected yeasts were inoculated in semisolid agar containing peptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, CaCl₂ x2H₂O 0.1 g/L, Tween 80 10 g/L and agar 20 g/L, pH 6.8 (Atlas and Parks 1993). Esterase activity was confirmed through opaque halo formed around the colonies.

Lipase activity

Evaluation occurred in a medium containing peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L, tributirina 10 g/L and agar 15 g/L, pH 6.0. A clear halo around the colony showed lipase activity (Atlas and Parks 1993).

Protease activity

Determined on casein-containing (20 g/L) YEPG (yeast extract 10 g/L, peptone 10 g/L, glucose 20 g/L and agar 15 g/L, pH 6.5) (Strauss *et al.* 2001). A clear halo around the colony revealed protease activity.

Pectinase activity

Determined on pectin agar medium, which consisted of YNB 6.7 g/L, pectin 10 g/L and agar 20 g/L, pH 7.0 (Strauss *et al.* 2001). The presence of a purple halo around the colony formed after addition of ruthenium red 0.005% (w/v) indicated pectinase activity (McKay 1988).

Killer toxin activity

Killer activity was tested on YEPG (pH 4.2 citrate-phosphate 0.05 mol /L buffered) 0.003% (w/v) methylene blue. *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 and *Candida glabrata* NCYC Y55 yeast strains were used as sensitivity indicators of killer activity. The indicator

strains were grown on Sabouraud agar for 24 h at 28 °C and thereafter cell density was adjusted to 10^6 cells/mL. These suspensions were spread on YEPG-methylene blue using a sterile swab. After 30 min, 10 µL of the yeast culture, isolated from the supernatant of cocoa fermentation, previously cultivated in Sabouraud agar, were inoculated into wells made in the agar surface. The plates were incubated at 25 and 28 °C for 48 h. Killer activity (micocinogenic) was indicated by the growth inhibition halos that had formed around the wells (Young 1987).

Sequencing of the D1/D2 domain of the 26 rDNA

The D1/D2 domain of the large-subunit (26S) ribosomal DNA was sequenced for identification of 32 yeasts, representing all genera found, that had shown biotechnological potential in the 109 EEA and had proven positive for killer toxin activity (Table 3). The analysis was essentially performed as described by Jespersen *et al.* (2005), with the following modifications: primers for the amplification of the D1/D2 domain were: NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). PCR was performed in an automatic thermal cycler (Mastercycler personal-Eppendorf) under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of 95 °C for 1 min, 52 °C for 45 s, 72 °C for 1 min and final extension at 72 °C for 7 min. The amplified products were purified with EXO/SAP-protocol of PCR purification based on Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham Pharmacia Biotech). DNA was adjusted to 50 ng/µL using geneQuant pro (Amersham-Biosciences). PCR products were directly sequenced in the automated sequencer ABI3730XL (Applied Biosystems). The obtained sequences were compared to the sequences reported in GenBank using the BLAST algorithm.

Statistical Analysis

A t test was conducted for data comparison from temperature and pH between samplings, and for diversity within each collection (before and after 36 h and 48 h from the

first and second fermentation, respectively). GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical analysis.

3.3 Results

Temperature and pH changes in cocoa bean fermentation

During the first 36 h of fermentation pH decreased in fermenting mass, followed by a gradual increase that ranged from 4.01 to 4.84 for the main crop and from 3.5 to 4.7 in cocoa beans from the harvest season.

Temperature variations in the cocoa mass were from 32 and 25 °C at onset of fermentation, to 52 and 46 °C at the end of the process for the first and second fermentation experiments, respectively. There was no significant difference ($p < 0.05$) in pH and temperature values between samples (Tables 1 and 2).

Yeast identification

A total of yeast 197 colonies was isolated and morpho-physiologically grouped into 12 genera and 28 species. *Candida*, *Cryptococcus*, *Issatchenkia*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* and *Starmerella* were found in both fermentations. *Kluyveromyces* and *Torulaspora* were present only in the first fermentation and *Pseudozyma* and *Zygoascus* only in the second one (Tables 1 and 2).

In main crop fermentation, diversity of yeast species was 2.5 times higher within the first 48 h than at later times whereas in harvest season fermentation the initial species variety was 1.7 higher during first 36 h.

EEA and killer phenotype in yeasts

Enzymatic activity and killer phenotype from 112 yeasts out of 197 isolated are presented in Table 3. Lipolytic activity was detected in 109 and ester degradation activity in 11 yeasts, distributed within *Torulaspora*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida* and *Issatchenkia*

genera. Lipolytic activity in isolated yeasts was observed from the first to fifth day of fermentation. Among tested yeasts, 98.2% had enzymes with lipolytic or estereolytic activity.

Low activity of extracellular amylase was observed in only four isolates, three of them encountered at the onset fermentation (between 12 and 36 h). Pectinase was observed in eleven isolates and about 90% of this activity was found in yeasts isolated between 72 and 132 h (Fig. 1). Yeast proteolytic activity was seen in only 6 isolates from *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* and *Torulaspora* genera (Table 3) until the third day of fermentation (Fig. 1). Positive strains for killer activity were isolated during the fermentation process (Fig. 1).

The 32 strains that showed biotechnological potential had their D1/D2 domain of the large-subunit (26S) ribosomal DNA sequenced (accession numbers in Table 4). Sequence homology with already deposited genetic information in GenBank allowed reliable identification of the strains.

3.4 Discussion

Temperature and pH variance during cocoa fermentation indicate differences in microbial succession and metabolic activity during this process, most of them contributing essential factors for the development of cocoa flavor. In this study, there was an initial increase in acidity and then a gradual decrease during the fermentation process. According to Lehrman and Patterson (1983) and Ardhana and Fleet (2003), the pulp's citric acid concentration (2 to 2.5%) is responsible for the initial acidity in the fermentation mass (pH 3.5 - 4.0). Association between citric acid degradation and fermentation of cocoa pulp with consequent production of organic acids (acetic and lactic) seems to contribute to pH fluctuations and the lower acidity of fermenting mass at the end of the process.

Turning of the fermenting mass aerates the cocoa beans and homogenizes local fermenting conditions and can cause increases in temperature above 50 °C at about 72 h after

the onset of fermentation (Lehrman and Patterson 1983; Schwan *et al.* 1995; Ardhana and Fleet 2003). Our results showed high temperatures after the third day of fermentation, corroborating with the literature.

Yeast communities associated with cocoa fermentation have been studied by many authors in different cocoa-producing countries (Knapp 1937; Romboust 1953; Schwan *et al.* 1995; Ardhana and Fleet 2003; Jespersen *et al.* 2005; Nielsen *et al.* 2005). Species diversity in our study differed significantly from previous results obtained in Bahia. De Camargo *et al.* (1963) noted *C. krusei*, *Geotrichum candidum* and *C. vini* as predominant species; Schwan *et al.* (1995) observed 12 different species with two *Saccharomyces cerevisiae* strains predominant. Our study found *Pichia membranifaciens* and *Candida krusei* as predominant in the two fermentations, and their presence could be observed throughout almost the entire process (Table 2). Differences in microbial diversity during fermentation of cocoa beans may influence the quality of seeds and lead to differences of flavor.

Although no significant difference was found ($p < 0.05$) in temperature profiles between the two fermentation samples, we found a big variation in yeast diversity. This may be explained by differences of the initial temperature of the fermentation process as the distribution or prevalence of microorganisms is influenced by environmental conditions and variation of processing that cocoa beans are subjected to in various parts of the world.

Yeast is predominant during the first hours of fermentation in Ghana (Nielsen *et al.* 2007). A greater diversity of yeast species at the onset of fermentation suggests higher availability and greater diversity of enzymes, which gives the yeasts more metabolic influence on development of flavors during cocoa bean fermentation.

According to Ardhana and Fleet (2003) fungal lipolytic enzymes can affect the lipid composition of cocoa beans. About 50% of cocoa mass is made up of lipid substrates the degradation of which (during fermentation) will lead to by-products that influence formation

of cocoa flavor (Spoladore *et al.* 1983) once again emphasizing the influence of microbial enzymes on development of cocoa flavor. These lipolytic enzymes might be industrially used to replace some chemical catalytic processes. Lipases have various industrial applications as additives to detergents and in food industry (fermentation, cheese manufacture, meat tenderizer, bakery) besides being employed in environmental bioremediation (Joseph *et al.* 2008).

Amylases are carbohydratases that hydrolyze starch glycosidic linkages. According to Lopez and Dimick (1995) 4- 6% of the cocoa pulp is composed of starch, which makes is highly likely that the found yeast amylases are involved in the conversion of pulp starch to sugars, thus accelerating growth of yeast populations during the onset of the fermentation process.

Amylases are used in industry in the first step to convert starch to fructose, generating oligomaltodextrins, which can in turn be used in biofuel production (Kirk *et al.* 2002). An isolate of *Issatchenkia orientalis* showed a strong amylolytic activity at alkaline pH, revealing itself as a candidate for detergent industries, where enzyme resistance to alkaline conditions and to high temperatures are requested characteristics (Cherry and Fidantsef 2003).

Pectinolytic activity of yeasts improves the pulp drainage during cocoa fermentation and thus contributes to seed quality (Schwan and Wheals 2004). However, this activity was only observed after the third day of fermentation, suggesting that pectinase-producing yeasts are not involved in the initial stages of drainage. Although *Kluyveromyces marxianus* is described as a great pectinase producer (Lim *et al.* 1980; Barnby *et al.* 1990; Schwan and Rose 1994; Schwan *et al.* 1997; Leal *et al.* 2008), we found no strains with this activity in our experiments.

Influence of a nitrogen source-containing environment on the expression of proteases is discussed controversially. While some authors agree that readily usable nitrogen sources may suppress protease production (Charoenchai *et al.* 1997; Strauss *et al.* 2001) others found proteases in several *Cryptococcus* sp. strains grown on agar containing sources of readily usable nitrogen and casein (Buzzini and Martini 2002). Trindade *et al.* (2002) found proteases isolated from yeast from fresh and frozen fruit. Ganga and Martinez (2004) detected proteases in *Metschnikowia pulcherrima* and *Candida* spp. and Chi *et al.* (2007) detected proteases in yeasts isolated from the marine environment, where proteases were detected in media containing readily available sources of nitrogen (YEFG).

A *Torulaspora delbrueckii* isolate showed the highest protease activity, revealing itself as a potential candidate for industrial application. According to Cherry and Fidantsef (2003), proteases are used in meat and soy processing industry, dairy goods processing, leather treatment, waste water treatment, organic synthesis and production of detergents.

According to Vadkertiová and Slaviková (2007), the killer phenotype is widely distributed in yeast communities. The killer characteristic may promote an alternative method to prevent growth of undesirable yeasts (Yap *et al.* 2000). Killer toxin producing yeasts interfere in species competition and may be useful in fermentation start-up, ensuring their contribution to interesting flavor development. However, further controlled studies employing killer yeast for fermentations are required to verify the usefulness of this process in guaranteeing optimal fermentation and flavor development.

Endogenous enzymes play a crucial role in development of flavor precursors (amino acids, peptides and sugars) and in pigment degradation (e.g. tannin degradation that lowers bitterness of cacao seeds) during cocoa fermentation (Hansen *et al.* 1998), Brito *et al.* (2004), showed, however, that the proteolytic hydrolysis occurs naturally in the fermentation involving microorganisms. Therefore, the chocolate flavor characteristic is generated by

Maillard reaction (complexation of free amino acids in presence of reducing sugars) during roasting of the already fermented seeds. Thus, the detected microbial proteolytic enzymes may only act indirectly in formation of cocoa flavor.

Our study suggests that the greater influence of microbial proteolytic enzymes seems to occur until 72 h of fermentation, while lipases and esterases seem to act longer (Fig. 1). Therefore, studies on the factors that induce microbial enzymes and the processes that lead to their secretion are required in order to understand the complex processes of cocoa flavor formation. With this knowledge adjustments in the fermentation process could be made in order to allow the appearance of cocoa flavor precursors in a reproducible form.

Remarkable progress has been made in recent decades in the use of microbial enzymes or whole microbial cells in many food industries and in bioremediation processes. This has been aided by proteomic and genetic engineering that generated genetically modified microorganisms with desired characteristics in production of certain metabolites. The isolation and identification of microorganisms with biotechnological potential is an useful tool to verify, via phylogenetical studies, the main biochemical and pathogenic characteristics of a microbial genus and thus establish a general knowledge of the potential utility of certain microorganisms for industrial applications.

3.5 Conclusion

Microorganisms involved in cocoa fermentation are presented as metabolic resource for biotechnological exploration. Several yeast strains isolated from fermenting cacao seeds showed enzymatic potential for industrial application. Regional diversity in cocoa fermentation thus enhances the chances of screening programs to function as successful tools in providing novel enzyme-producing yeast species for biotechnological applications.

3.6 References

1. Abranches, J., Morais, P.B., Rosa, C.A., Mendonça-hagler L.C. and Hagler, A.N. (1997) The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Can J Microbiol* **43**(4), 328–336.
2. Ankin, L. and Anagnostakis, S.L. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* **67**, 597–607.
3. Ardhana, M.M. and Fleet, G.H. (2003) The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol* **86** (1-2), 87-99.
4. Atlas, R.M. and Parks, L.C. (1993) *Handbook of Microbiological Media*. London, England: CRC Press.
5. Barnby, F.M., Morpeth, F.F. and Pyle, D.L. (1990) Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*: resolution and purification and partial characterization of the enzyme. *Enzyme Microbiol Tech* **12**, 891–897.
6. Brito, E.S., García, N.H.P. and Amancio, A.C. (2004) Use of a Proteolytic Enzyme in Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Braz Arch Biol Technol* **47**, 553-558.
7. Brizzio, S., Turchetti, B., García, V., LibKind, D., Buzzini, P. and Van Broock, M. (2007) Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeast isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Can J Microbiol* **53**, 519 - 525.
8. Bull, A.T., Goodfellow, M. and Slater, J.H. (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu Rev Microbiol* **46**, 219-252.
9. Buzzini, P. and Martini, A. (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J Appl Microbiol* **93**, 1020–1025.
10. Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A. and Todd, B.E.N. (1997) Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust J Grape Wine Res* **3**, 2–8.
11. Cherry, J.R. and Fidantsef A.L. (2003) Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 438–443.
12. Chi, Z., Ma, C., Wang, P. and Li, H.F. (2007) Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour Technol* **98**, 534–538. Czárán, T.L. and Hoekstra, R.F., (2003) Killer-sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms. *Proc Biol Sci* **270**, 1373–1378.

13. De Camargo, R., Leme, J. and Martinelli Filho, A. (1963) General observations on the microflora of fermenting cocoa beans (*Theobroma cocoa*) in Bahia-Brazil. *Food Technol* **17**(10), 116-19.
14. Ganga, M.A. and Martinez, C. (2004) Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J Appl Microbiol* **96**, 76–83.
15. Gopinath, S.C.B., Anbu, P. and Hilda, A. (2005) Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments *Mycoscience* **46**, 119–126.
16. Hansen, C.E., Olmo, M.D. and Burri, C. (1998) Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J Sci Food Agric* **77**, 273-281.
17. Jespersen, L., Nielsen, D.S., Honholt, S. and Jakobsen, M. (2005) Occurrence and diversity of yeast involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res* **5**, 441-453.
18. Joseph, B., Ramteke, P.W. and Thomas, G. (2008) Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv* **26**, 457–470.
19. Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 345-351.
20. Knapp, A. W. (1937) *Cocoa fermentation*. London, England: John Bale, Sons and Curnow press.
21. Leal, G.A., Gomes, L.H., Efraim, P., Tavares, F.C.A. and Figueira A. (2008) Fermentation of cocoa (*Theobroma cocoa* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Res* **8**, 788-798.
22. Lehrian, D. W. and Patterson, G. R. (1983) Cocoa fermentation. In *Biotechnology, a comprehensive treatise* ed. Reed, G. pp.529-575. Switzerland : Verlag Chemie Basel.
23. Lim, J., Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, J. (1980) Multiple forms of endopolygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. *Agric Biol Chem* **44**, 473–480.
24. Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M., Querol, A. and Caballero, A.C. (2007) Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**, 539-546.
25. Lopez, A.S. and Dimick, P.S. (1995) Cocoa Fermentation. In Reed, G. and Nagodawithana, T. W, eds. Enzymes, biomass, food and feed, 2nd ed. *Biotechnology*, 561-577.
26. McKay, A.M. (1988) plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. *FEMS Microbiol Lett* **56**, 355-358.

27. Nielsen, D. S., Honholt, S., Tano-Debrah, K. and Jespersen, L. (2005) Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analyzed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast* **22**, 271-284.
28. Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. and Holzapfel, W.H. (2007) The microbiology of Ghanaian cocoa fermentation analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* **114**, 168–186.
29. Oliveira, A.N., Oliveira, L.A., Andrade, J.S. and Chagas Júnior, A.F. (2006) Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ciênc Tecnol Alimen Campinas* **1**, 204-210.
30. Romboust, J. E. (1953) Contribution to the knowledge of the yeast flora of fermenting cocoa: a critical review of the yeasts species previously described from cocoa. *Trop Agricult* **30**, 34-41.
31. Schwan, R.F. and Rose, A.H. (1994) Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *J Appl Bacteriol* **76**, 62–67.
32. Schwan, R.F.; Rose, A. H. and Board, R. G. (1995) Microbial fermentation of cocoa beans with emphasis, on enzymatic degradation of the pulp. *J Appl Bacteriol Symp Suppl* **79**, 96-107.
33. Schwan, R.F., Cooper, R.M. and Wheals, A.E. (1997) Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme Microbiol Technol* **21**, 234–244.
34. Schwan, R.F. and Wheals, A. (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food, Sci Nutr* **44**, 205-221.
35. Spoladore, D.S., Teixeira, J.P.F., De Moraes, R.M. and Zullo, M.A.T. (1983) Composição química de amêndoas fermentadas de cacau. *Bragantia revista científica do instituto agrônomo Campinas*. **42**, 249-253.
36. Steele, D.B. and Stowers, M.D. (1991) Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Annu Rev Microbiol* **45**, 89-106.
37. Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G. and Van Reuseburg, P. (2001) Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J Appl Microbiol* **91**, 182–190.
38. Thompson, S.S., Miller, K.B. and Lopez, A.S. (2001) Cocoa and coffee. *Food Microbiology — Fundamentals and frontiers*. eds. Doyle MJ, Beuchat LR & Montville TJ, pp. 721–733. Washington, DC: ASM Press.

39. Trindade, R.C., Resende, M.A., Silva, C.M. and Rosa, C.A. (1998) Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps of Brazilian Tropical Fruits. *Syst Appl Microbiol* **25**, 294–300.
40. Vadkertiová, R. and Slaviková, E. (2007) Killer activity of yeast isolated from natural environments against some medically important candidas species. *Pol J Microbiol* **56**, 39-43.
41. Van Beilen, J.B. and Li, Z. (2002) Enzyme technology: an overview. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 338-344.
42. Yap, N.A., Lopes, M.B., Langridge, P. and Henschke, P.A. (2000) The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. *J Appl Microbiol* **89**, 381-389.
43. Yarrow, D. (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In *The yeasts – a taxonomic study*. 4rd. eds. Kurtzman, C. P., Fell, J. W. p. 77–100. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science Publ. B.V.
44. Young, T. W (1987) Killer yeasts. In *The yeasts*. Vol. 2., 2nd ed., Eds. Rose, A. H. and Harrison, J. S., p. 131–164. London: Academic Press.

3.7 Table and figures

Table 1 Yeast species diversity in 1st cocoa fermentation

	Fermentation time (h)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Temperature (°C)	32	30	32	40	40	50	50	50	52	50	52
pH of pulp	4.01	3.7	3.9	4	4	4.2	4.3	4.55	4.7	4.6	4.84
% of Species¹	Isolated²										
<i>Candida bombicola</i>	1	12.5									
<i>Candida gropengiesseri</i>	8		19	29							
<i>Candida krusei</i>	20		24	14	6.7	17		60	25	25	33
<i>Candida parapsilosis</i>	2	12.5									8.4
<i>Candida sp. 3</i>	2	12.5									8.4
<i>Candida sp.4</i>	1		7.2								
<i>Cryptococcus bhutanensis</i>	1	12.5									
<i>Cryptococcus sp.</i>	1								25		
<i>Issatchenkia orientalis</i>	2			6.7	8.3						
<i>Kloeckera apis</i>	5	12.5	9.5	14							
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	3	12.5	4.8	7.2							
<i>Pichia galeiformis</i>	5	12.5								13	25
<i>Pichia kluyveri</i>	7		9.5	7.2	6.7	8.3					16.8
<i>Pichia membranifaciens</i>	19		4.8	7.2	53	17	50	40	50	25	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6			7.2		8.3	100	50		25	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9		14		6.7	42					
<i>Starmerella sp.</i>	1				6.7						
<i>Starmerella sp. 2</i>	6	12.5	4.8	7.2	6.7					13	8.4
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	3		9.5		6.5						
TOTAL	102										

¹ Presence (%) of each species related to fermentation time. ² total of isolates for each species (p <0.05)

Table 2 Diversity of yeasts species in 2nd cocoa fermentation

		Fermentation time (h)													
		0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156
Temperature (°C)		25	28	32	35	38	42	48	45	48	47	47	46	47	46
pH of pulp		3.46	3.5	3.42	3.5	3.62	3.78	3.92	4.03	4.18	4.23	4.5	4.64	4.94	4.71
% of species ¹	Isolated ²														
<i>Candida cf. sorbosivorans</i>	1			20											
<i>Candida floricula</i>	1													20	
<i>Candida krusei</i>	21	25	14.2	20	37.5			28.6	33.4		25		22.7	40	33.4
<i>Candida orthopsilosis</i>	1									16.7					
<i>Candida sp. 5</i>	1											25			
<i>Candida sp. 8</i>	1												4.5		
<i>Cryptococcus sp.</i>	1	25													
<i>Issatchenkia orientalis</i>	3				12.5		33.3								
<i>Kloeckra apis</i>	5	25	14.3	40									4.5		
<i>Pichia galeiformis</i>	1		14.3												
<i>Pichia kluyveri</i>	6		14.3	20			16.7	42.8							
<i>Pichia membranifaciens</i>	41		14.3		12.5	100	50	28.6	55.6	66.7	50	50	63.8	40	50
<i>Pseudozyma antártica*</i>	3	25	14.3		12.5										
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2		14.3								25				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1									16.6					
<i>Saccharomyces exigus</i>	2				25										
<i>Starmerella sp. 1</i>	3								11			25			16.6
<i>Zygoascus steatolyticus</i>	1												4.5		
TOTAL	95														

¹ Presence (%) of each species related to fermentation time. ² total of isolated of each species (p <0.05)

Table 3 Extracellular enzymatic activity profile of selected yeasts isolated from cocoa fermentation

Species	Isolates	Number of positive strains					
		Starch degrading	Esterase	Lipase	Protease	Pectinase	Killer
<i>Candida cf. sorbosivorans</i> ^a	1 ^a	1	1	1	1	-	-
<i>Candida floricula</i>	1	-	-	1	-	-	-
<i>Candida gropengiesseri</i>	6	-	-	6	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	21	-	-	21	-	5	-
<i>Candida orthopsilosis</i> ^b	1 ^b	-	1	1	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> ^c	2 ^c	-	-	2	-	-	-
<i>Candida sp. 3</i>	2	-	-	2	-	-	-
<i>Candida sp.4</i>	1	-	-	1	-	-	-
<i>Cryptococcus bhutanensis</i>	1	-	-	1	-	-	-
<i>Cryptococcus sp.</i>	1	-	-	1	-	-	-
<i>Issatchenkia orientalis</i> ^d	5 ^d	1	2	5	-	-	3
<i>Kloeckera apis</i>	4	-	-	3	-	-	-
<i>Kluyveromices Marxianus</i>	3	-	-	3	-	-	-
<i>Pichia galeiformis</i> ^e	6 ^e	-	1	6	-	1	5
<i>Pichia kluyveri</i> ^f	5 ^f	-	-	4	-	-	3
<i>Pichia membranifaciens</i> ^g	28 ^g	-	1	28	1	2	-
<i>Pseudozyma antarctica</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ^h	5 ^h	1	4	5	2	1	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ⁱ	10 ⁱ	-	-	10	-	1	5
<i>Starmerella sp.</i>	1	-	-	1	-	-	-
<i>Starmerella sp. 2</i>	3	-	-	3	-	1	-
<i>Torulaspora delbrueckii</i> ^j	3 ^j	-	1	3	2	-	1
<i>Zygoascus steatolyticus</i> ^l	1 ^l	1	-	1	-	-	-
Total	112	4	11	109	6	11	17
% of positive on total isolates		3.6	9.9	98.2	5.4	9.9	15.3

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, e l denominate strains molecularly identified via homology to D1/D2 region of 26S rDNA

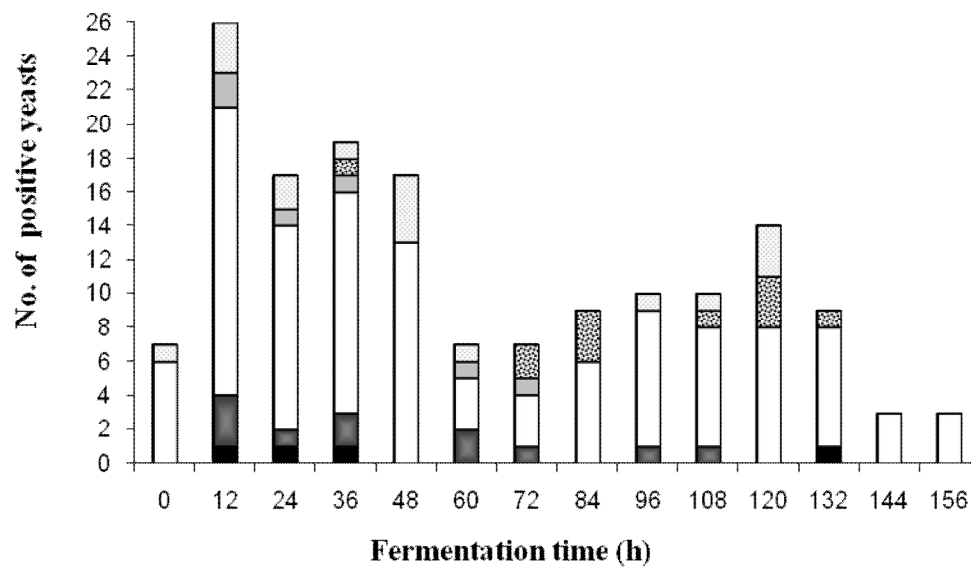


Fig. 1 Extracellular enzymatic activity profile of 112 yeasts selected during cocoa fermentation. Contents: (■) Amylase, (■) Esterase, (□) Lipase, (□) Protease, (▨) Pectinase, (▨) Killer.

Table 4 Identification of 32 selected yeasts with enzymatic or killer activity

Isolated	Activity	Length of D1/D2 sequence	Homology to the original sequence	Identities (F/R)	GenBank accession no.	Closest GenBank fit (species name)
A	ami, est, pro, lip	495	98%	461/469	AY521567.1	<i>Candida cf. sorbosivorans</i>
B	est, lip	602	99%	577/574	FJ746063.1	<i>Candida orthopsilosis</i>
C	lip	599	100%	572/575	FJ746057.1	<i>Candida parapsilosis</i>
D	est, lip	575	99	583/585	DQ466533.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>
D	kil, lip	581	99%	568/582	EU394711.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>
D	kil, lip	581	99%	572/572	EU394711.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>
D	Ami, est, lip	617	99%	568/584	FJ770478.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>
D	kil, lip	621	99%	567/570	FJ770558.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>
E	kil, lip	569	99%	562/564	AM882676.1	<i>Pichia galeiformis</i>
E	kil, lip	569	99%	563/568	AM882676.1	<i>Pichia galeiformis</i>
E	kil, lip	613	99%	564/565	FJ770524.1	<i>Pichia galeiformis</i>
E	kil, lip	613	99%	561/575	FJ770524.1	<i>Pichia galeiformis</i>
E	kil, lip	613	99%	563/575	FJ770524.1	<i>Pichia galeiformis</i>
E	est, lip	613	99%	578/585	FJ770524.1	<i>Pichia galeiformis</i>
F	kil	607	99%	569/573	EU285497.1	<i>Pichia kluyveri</i>
F	kil, lip	607	99%	576/587	EU285497.1	<i>Pichia kluyveri</i>
F	kil, lip	585	93%	566/583	EU809456.1	<i>Pichia kluyveri</i>
G	est, lip	571	100%	584/586	DQ466534.1	<i>Pichia membranifaciens</i>
G	pro, lip	605	89%	577/582	AY529507.1	<i>Pichia membranifaciens</i>
H	est, pro, lip	694	100%	574/575	EF585187.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
H	est, lip	694	99%	586/586	EF585187.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
H	ami, est, pro, lip	600	73%	577/568	FJ515247.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
H	est, lip	600	99%	569/576	FJ515247.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
I	kil, lip	588	99%	577/592	EF192587.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
I	kil, lip	593	99%	572/590	EU556339.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
I	kil, lip	593	99%	572/579	EU556339.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
I	kil, lip	592	99%	584/578	EU884435.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
I	kil, lip	552	80%	570/566	FJ800031.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
J	pro, lip	576	97	590/598	FJ468458.1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
J	kil, lip	576	97%	579/587	FJ468458.1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
J	est, pro, lip	576	99%	575/580	FJ468458.1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
L	ami, lip	867	99%	568/573	FJ176885.1	<i>Zygoascus steatolyticus</i>

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, and l are from Table 3.

Inoculação de leveduras *start* na fermentação do cacau para melhoria do *flavor*Denise Sande¹, Rachel Passos Rezende¹, João Carlos Teixeira Dias^{1*}.

¹Departamento de Ciências Biológicas, PPGBBM, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. BR 415, Km 16, Ilhéus-BA, 45650-000, Brasil.

** Correspondências devem ser endereçadas à:*

Dr. João Carlos Teixeira Dias

Departamento de Ciências Biológicas

UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz

Rod. Ilhéus-Itabuna, Km 16

Ilhéus-BA, 45650-000, Brasil

fone: 011 55 73 3680 5105

fax: 011 55 73 3680 5226

e-mail: jctdias@uesc.br

RESUMO

Oito leveduras selecionadas quanto ao seu perfil enzimático e produção de substâncias micocinogênicas foram utilizadas em fermentações de cacau em caixas de madeira e, avaliou-se a influência dos inóculos quanto às alterações nas propriedades físico-químicas das amêndoas de cacau fermentadas. Não foram encontradas diferenças significativas entre temperatura e pH entre as fermentações com e sem inóculos. No entanto, a influência dos inóculos *starts* foi observada na acidez final (entre 8,3 e 11,5 mEq NaOH 100 g⁻¹, com diferença significativa dos controles 14 e 14,2 mEq NaOH 100 g⁻¹), na concentração de açúcares (nos inóculos B, C, F, G e H, concentrações entre 10,3 e 14,3 g kg⁻¹ com diferença significativa dos controles 8,9 e 16,8 g kg⁻¹) e nos aminoácidos livres (entre 869,7 e 1182,0 g.Kg⁻¹ estatisticamente diferentes dos controles 864,6 e 1165,4 g.Kg⁻¹). A linhagem *Candida parapsilosis* (inóculo C) que apresentou atividade pectinolítica, seguido por *Torulaspora delbrueckii* (B) e *Pichia kluyveri* (E) demonstraram maiores alterações físico-químicas nas amêndoas de cacau após fermentação. Esses resultados ratificaram a capacidade dos inóculos com leveduras *start* em modificar a condição final e a qualidade das amêndoas.

Palavras-chave: Fermentação do cacau, leveduras, *flavor*.

4.1 Introdução

O cacau e seus derivados, originários da América central, têm sido usados como alimento, bebida e fármaco há cerca de três milênios. Em meados do século XIX o processamento das amêndoas sofreu inúmeros melhoramentos e, após a adição de leite e açúcar, o consumo de chocolate elevou-se à quase ubiquidade na dieta ocidental (Schwan e Wheals 2004, Henderson *et al.* 2007).

O chocolate ocupa atualmente um nicho multifaceado no mercado, variando desde alimento funcional até as mais elaboradas e luxuosas formulações cosméticas, levando à demanda estimada em 3.5 milhões de toneladas em 2008 (Mcshea *et al.* 2008). A popularidade e atração exercidas pelo chocolate devem-se ao seu sabor e aroma únicos, os quais são obtidos após fermentação secagem e torrefação das sementes do cacau (Thompson *et al.* 2001).

Uma fermentação espontânea na polpa ao redor das sementes de cacau, fruto do *Theobroma cacao*, inicia-se imediatamente após a colheita, abertura e remoção das sementes, devido à contaminação por microrganismos naturalmente presentes na casca do próprio fruto, no ar, no cocho e na mão dos operadores (Nielsen *et al.* 2007, Leal *et al.* 2008). Esse processo é o principal responsável pela qualidade do produto final, entretanto, continua sendo feito de maneira artesanal, empírica e imprevisível, requerendo contínuas mudanças em seu procedimento para garantir uma amêndoa reprodutível com alta qualidade (Lehrian e Paterson 1983, Schwan 1998, Gálvez *et al.* 2007).

Durante a fermentação, a polpa rica em açúcares é solubilizada pela atividade microbiana, principalmente leveduras nas primeiras 24 horas, seguido por bactérias lácticas e acéticas em uma complexa sucessão ecológica (Thompson *et al.* 2001, Ardhana e Fleet 2003). Enzimas pectinolíticas secretadas por leveduras fluidificam a polpa que é escoada levando a uma maior aeração da massa fermentativa. A ação microbiana gera aquecimento (em torno de

50° C), etanol e ácidos orgânicos, os quais, juntos, penetram na semente e causam a morte do embrião (Schwan e wheals 2004, Brito *et al.* 2004, Jespersen *et al.* 2005, Leal *et al.* 2008).

Uma série de mudanças físico-químicas é desencadeada no interior dos cotilédones durante a fermentação e continuam acontecendo durante a secagem. Essas transformações promovem o rompimento das paredes celulares com descompartimentalização de enzimas e substratos, ativação de enzimas endógenas (carboxipeptidase, aminopeptidases invertase, polifenol oxidase), oxidação de proteínas de estocagem, formação dos precursores químicos (peptídeos, aminoácidos livres, açúcares redutores) que interagem durante a torrefação (reação de Maillard) convertendo-se no aroma e sabor do chocolate (Hansen *et al.* 1998, Büyükpamukcu *et al.* 2001, Luna *et al.* 2002, Misnawi *et al.* 2002, Jepersen *et al.* 2005; Caligiani *et al.* 2007, Nielsen *et al.* 2007). Há, ainda, difusão dos polifenóis, sua polimerização oxidativa e condensação com proteínas gerando redução de amargor e adstringência e modificando a cor das amêndoas – amarronzamento (Counet *et al.* 2004).

A fermentação do cacau é um processo antigo e tradicional, aplicado pelos cacaucultores a fim de modificar o *flavor* desagradável, adstringente e amargo característico da matéria-prima do chocolate. Está bem estabelecido que a técnica aplicada e, principalmente, a presença de microrganismo como as leveduras e seu metabolismo na polpa em torno das amêndoas, influencia grandemente os processos bioquímicos dentro das mesmas (Jinap *et al.* 1994, Nielsen *et al.* 2008). Nesse intuito, este trabalho objetivou realizar a prospecção de leveduras produtoras de enzimas e substâncias micocinogênicas (fenótipo *killer*) isoladas da fermentação do cacau visando seu uso como linhagens *start* nesse processo para melhoria do *flavor*.

4.2 Material e Métodos

Seleção de leveduras

As linhagens de leveduras utilizados neste estudo foram isolados da fermentação do cacau no sul da Bahia e selecionadas quanto ao seu perfil metabólico (Tabela 1).

Preparação dos inóculos Start

As leveduras foram cultivadas de acordo com Leal *et al.* (2008). Todas as linhagens foram previamente crescidas, *overnight*, em 250 mL de meio YEPD (1% peptona, 1% extrato de levedura e 2% dextrose), em mesa agitadora (200 r.p.m.) a 28 °C. Em seguida, esse cultivo foi utilizado como pré - inóculo para 3 L de meio YEPD sob as mesmas condições. Depois de centrifugada, a biomassa obtida foi ressuspensa em 40 mL de meio YEPD a uma concentração de $3,71 \times 10^8$ células mL⁻¹ para ser utilizado como inóculo nos experimentos de fermentação.

Fermentação

Os frutos foram provenientes da fazenda Leolinda, localizada no município de Uruçuca, Bahia-Brasil. As amêndoas foram homogeneizadas e separadas em 15 lotes de 45 kg postos em caixas de madeira. As caixas foram inoculadas com $3,26 \times 10^8$ células de levedura kg⁻¹ de semente de cacau. A fermentação ocorreu por um período de 144 h, com revolvimento da massa a cada 48 horas. A cada 12 horas foi aferida a temperatura do centro da caixa e retirada de 200 g de amêndoas para análises físico-químicas (pH e temperatura). Ao final do processo, as amêndoas foram secas em plataformas de madeira (sistema de barcaças) até atingirem 6-8% de umidade e coletados amostras de 200 g para análises físico-químicas (pH, acidez titulável, quantificação de aminoácidos livres e açúcares redutores, perfil de peptídeos por SDS-PAGE).

As fermentações foram realizadas em triplicata para cada linhagem de levedura testada e uma caixa contendo o mesmo volume de amêndoas sem inóculo (fermentação natural) foi utilizada como controle negativo. As leveduras A, B, C, D (Tabela1) foram usadas em setembro/2008 e E, F, G, H (Tabela1) em dezembro/2008.

Determinação do pH da polpa e das amêndoas secas.

Para determinação do pH da polpa procedeu-se da seguinte forma: 100 g de amêndoas frescas foram despolpadas e acrescidas de 100 mL de água destilada estéril. Sendo em seguida, aferido o pH final da solução (Radiometer pH meter PHM82, Radiometer A/S, Brønshøj, China).

Para aferição do pH das amêndoas secas, as amostras foram trituradas em moedor analítico (A11 basic, IKA), cinco gramas do pó resultante foi ressuspenso em 45 mL de água destilada estéril e homogeneizados em um agitador magnético (C –MAG HS4, IKA) por 10 min,.

Determinação da acidez titulável das amêndoas de cacau.

As amêndoas de cacau secas e trituradas foram desengorduradas usando soxhlet, com éter de petróleo como solvente orgânico por 24 h (AOAC 1990, Noor-Soffalina *et al.* 2009). O pó de cacau desengordurado resultante foi armazenado à - 4 °C para análises posteriores. O éter de petróleo coletado foi evaporado em estufa à 40° C e a gordura residual foi misturada com uma solução 1:1 (v/v) de KOH:ETOH acrescido de duas gotas de fenoltaleína. A acidez da solução final que foi determinada por titulação com NaOH.

Análise de açúcares redutores

O pó de cacau desengordurado (1g) foi ressuspenso em 10 mL de água ultra pura e homogeneizado por 30 min. Em seguida, filtrado com papel Whatman no. 1 e, em membrana de 0.45 µm sob vácuo. Os açúcares redutores presentes no filtrado foram determinados usando o reagente ácido dinitrossalicílico (Miller, 1959). As reações foram ajustadas para volumes de 300 µL em microplaca e a absorbância da solução foi determinada em um leitor

de microplaca (Versa max com o software - Softmax Pro 4.8, EUA) à um comprimento de onda 575 nm.

Extração dos peptídeos e proteínas de cacau.

A extração de proteínas das amêndoas do cacau foi realizada conforme Pirovani *et al.* (2008) modificado. O pó de cacau desengordurado foi triturado com nitrogênio líquido e 200 g do pó resultante foram lavados 2x com 1.2 mL acetona 0.7% β – mercaptoethanol, 3x com TCA 10% em acetona, 1x com TCA 10% em água ultra pura e 1x em acetona 80%, sendo ressuspenso por sonicação (3 pulsos de 5 s cada, 40% amplitude, e 10 s de intervalo em Ultrasonic processor Gex 130, 130 W), centrifugado (10000 g por 3 min a 4 °C) a cada vez, sendo seco à temperatura ambiente por 20 min, a cada troca de solvente. O pó resultante foi ressuspenso em 0.8 ml de tampão de extração SDS denso (sacarose 30%, SDS 2%, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, β -mercaptoethanol 5%) e as proteínas foram separadas pela adição de 0,8 mL de fenol saturado pH 8.0 e precipitadas com AcNH_4 0.1 M em methanol. Ao final de 14 h a -20 °C, as proteínas foram lavadas, secas à temperatura ambiente e ressuspenso em tampão de eletroforese. As proteínas foram quantificadas em triplicata com o kit 2-D Quanti de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare).

Análise por SDS-PAGE

Para o SDS-PAGE, foi utilizado o sistema tampão descrito por Laemmli (1970) contendo 5% e 18% de poliacrilamida para os géis de molde e de separação, respectivamente. Após denaturação a 95 °C por 3 min, as proteínas foram separadas sob a condição constante de 150 V, 280 mA/60 W em um aparato Bio-Rad mini-Protean II até o azul de bromofenol alcançar o final do gel. Após a eletroforese, as proteínas foram visualizadas com uma solução 5% de Coomassie coloidal G 250 (Neuhoff *et al.* 1988).

Análise de aminoácidos livres

A extração dos aminoácidos livre foi feita conforme descrito por Kirchhoff *et al.* (1989). O pó de cacau seco e desengordurado (0.7 g) foi incubado com 1.4 g de polivinilpirolidona (PVPP) e 15 mL de água destilada. Em seguida, foi homogeneizado por 1 h a 4 °C. Ajustou-se o pH para 2.5, com ácido acético glacial, adicionou-se o ácido α -amino butírico como padrão interno e completou-se a mistura para 25 mL. As proteínas foram separadas pela adição de acetona. Após 30 min o precipitado foi separado por centrifugação a 3 °C e descartado. O sobrenadante foi usado para as análises de aminoácidos livres por HPLC.

Antes da quantificação os aminoácidos foram derivatizados com fenilisotiocianato (PITC) (Sigma Chemical Co.). Segundo o método de Heinrikson and Meredith (1984). Os aminoácidos derivatizados foram separados por HPLC de fase reversa com detector UV a 254 nm e coluna 3.9 × 300 mm Waters Pico-Tag free amino acid (Waters Associates, Milford, Mass., U.S.A.). As soluções eluente utilizadas como fase móvel foram A (50 mM tampão acetate de sódio à pH 5.7) e B (acetonitrila:água = 60 : 40). Um gradiente de (1) 0.5 min, 100% (A): 0% (B), (2) 5 min, 75% (A): 25% (B), (3) 6 min, 52% (A): 48% (B), (4) 0.5 min, 0% (A): 100% (B), (5) 14 min, constante 100% (A): 0% (B) foi aplicado. Para expressão dos resultados os aminoácidos foram agrupados em ácidos (ácido aspártico, glutâmico, serina e histidina), hidrofóbicos (alanina, tirosina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina) outros (glicina, arginina, treonina, prolina, metionina, cistina e lisina).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) e um teste de comparação múltipla de Turkey's para verificar diferenças

significativas entre as fermentações com e sem inóculo. O software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.) foi utilizado para as análises.

4.3 Resultados e Discussão

Mudanças na Temperatura e pH da polpa.

A temperatura das fermentações que receberam inóculo *start* não apresentou diferença significativa daquelas sem inóculo em nenhum dos períodos fermentativos (setembro e dezembro). As temperaturas médias da primeira fermentação (setembro) que iniciaram em 24 °C no tempo 0 h e, atingiram o máximo 45,2 °C após 48 h do início da fermentação permaneceram em torno de 43 °C até as 120 h e declinaram drasticamente à 37,2 °C em 132 h, ao final do processo (Figura 1a). Na segunda fermentação (dezembro), a temperatura inicial foi de 27,2 °C alcançou 45 °C a 48 h, manteve a temperatura alta até 120 h e declinou a 34,6 °C ao final do processo fermentativo (Figura 1b).

A cinética da temperatura em função do tempo de fermentação apresentada no presente experimento é corroborada pela literatura. Leal *et al.* (2008) em experimentos no sul da Bahia, com lotes de 45 Kg, não observou diferenças significativas entre fermentações com e sem inóculo, entretanto obteve temperaturas iniciais mais baixas (em torno de 25 °C às 48 h) e que alcançaram o máximo 72 horas mais tarde, à 120 h do início do processo. Schwan *et al.* (1998) em fermentações com e sem inóculos também não encontrou diferenças significativas entre suas temperaturas, no entanto, as temperaturas alcançaram 38 °C após 48 h do início da fermentação. Nielsen *et al.* (2007) e Gálvez *et al.* (2007) em fermentações sem inóculo obtiveram a mesma cinética e temperaturas observadas neste experimento, também com temperaturas altas (entre 33,5 e 46 °C em Gana e 51 °C na república Dominicana) às 48 h. Esses resultados associados ao observado no presente experimento sugerem que a cinética, assim como as médias observadas na fermentação parecem estar mais relacionadas ao local,

modo e tamanho do lote da fermentação, entretanto, independem da presença de inóculos *start*.

As amilases, esterases e lipases extracelulares que facilitam o acesso aos nutrientes, assim como a capacidade de secretar substâncias micocinogênicas das leveduras selecionadas parecem não ter contribuído para uma maior proliferação microbiana ao ponto de causar aumento térmico diferencial na massa fermentativa, entretanto, estudos quanto a alterações na diversidade microbiana devem ser empreendidos para verificar a interferência dessas características nas populações da sucessão ecológica característica da fermentação do cacau.

As médias de pH da polpa do primeiro e segundo períodos dos experimentos de fermentação aumentaram progressivamente de 3,59 e 4,1 no início do processo a 5,60 e 4,9 ao final, respectivamente (Figura 2 a e b). Não foram observadas diferenças significativas nas médias de pH entre as fermentações com e sem inóculo corroborando com resultados prévios em fermentações de cacau com inóculo *start* na Bahia (Schwan *et al.* 1998, Leal *et al.* 2008). A ausência de diferenças significativas no pH entre fermentações com e sem inóculo sugere que assim como a temperatura, essa variável pode estar relacionada a outros fatores como temperatura ambiental, método de fermentação e tamanho do lote, parecendo não ser afetada pela inserção de microrganismos.

pH e acidez das amêndoas.

No primeiro período fermentativo (setembro), os inóculos A e B geraram amêndoas secas com pH menor e significativamente diferente da fermentação sem inóculo enquanto no segundo período fermentativo apenas o inóculo G obteve um pH maior e estatisticamente diferente do branco do período (Tabela 2). Esses resultados sugerem que a fermentação com inóculo G gerou menos ácidos orgânicos durante a fermentação e a aquelas com A e B geraram mais, em relação aos controles respectivos. Ácidos endógenos como málico,

tartárico, oxálico, fosfórico e cítrico têm importância menor para o pH final das amêndoas do que o ácido láctico e acético que são produzidos pela degradação de açúcar por ação microbiana na polpa (Thompson *et al* 2001, Schwan e Wheals 2004, Jinap *et al.* 2008). O pH final das amêndoas é determinado assim pela concentração de açúcares da polpa, pela presença de microrganismos fermentadores e pela difusão de seus metabólitos ácidos da polpa para o cotilédone. Esse ambiente acidificado ativa enzimas do cotilédone (Amin *et al.* 1998).

A despeito do pH, a análise de acidez titulável permite acessar melhor e detectar com mais sensibilidade a composição da acidez das amêndoas. A acidez titulável das amêndoas das fermentações com inóculo foi estatisticamente menor ($p < 0.05$) das realizadas sem inóculo, nos dois períodos fermentativos (Figura 3 a e b). Demonstrando assim, a capacidade dos inóculos A, B, C, D E, F, G e H em reduzir os índices de acidez, aumentando a qualidade das amêndoas. Esses resultados estão de acordo com o encontrado por Leal *et al.* (2008), o qual demonstrou ausência de diferenças de pH e uma redução de acidez significativa em amêndoas fermentadas com inóculo de leveduras.

A fermentação com o inóculo C (*Candida parapsilosis*), apresentou amêndoas com a menor acidez observada. Isso pode ter ocorrido devido à sua atividade pectinolítica, a qual, segundo Thompson *et al.* (2001), Schwan e Wheals (2004) e Nielsen *et al.* (2007) leva à maior aeração da massa fermentativa durante a fermentação e promove redução de bactérias lácticas e lactato, aumento da oxidação do acetato à CO_2 e H_2O , e consequente diminuição da acidez das amêndoas. Essa menor acidez é buscada, pois, vêm a contribuir para redução de aditivos normalmente utilizados na indústria chocolateira para correção da acidez como hidróxidos ou carbonatos de sódio, potássio, amônio ou magnésio, gerando um produto final de qualidade superior. Nesse contexto, amêndoas fermentadas com inóculo proporcionaram maior qualidade e, portanto, um maior potencial comercial à produção cacaueira, ratificando o retorno econômico do investimento em tecnologias para a lavoura do cacau.

Análise de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores das fermentações conduzidas com os inóculos B e C foi significativamente maior que aquelas sem inóculo do primeiro período, enquanto as concentrações nas fermentações conduzidas com F, G e H foram significativamente menores que o controle correspondente. As demais fermentações não foram diferentes estatisticamente do controle dos respectivos períodos (Tabela 3). Durante a fermentação, o açúcar predominante nas amêndoas de cacau (sacarose) é completamente hidrolisado por invertases em açúcares redutores como a glicose e frutose (Misnawi *et al.* 2002), os quais, também são formados pela ação de glicosidases sobre pigmentos como antocianinas. Isso sugere que ocorre uma maior ação microbiana promovendo difusão de metabólitos e desorganização das membranas cotiledonares com conseqüente interação de enzimas-substratos, a qual culmina em degradação de açúcares foi proporcionada pelos inóculos B e C, no primeiro período, demonstrando sua maior capacidade de aumentar a concentração deste precursor químico do *flavor*.

A característica e intensidade do *flavor* formado são primariamente governadas pela variedade genética do cacau e, em última instância, pela composição bioquímica da semente (Thompson *et al.* 2001). As amêndoas usadas no presente experimento foram homogeneizadas e então distribuídas em lotes, diminuindo a interferência de diferença de concentração inicial de açúcar em função da origem gênica das amêndoas. Corroborando com a hipótese que as diferenças observadas estão relacionadas ao processamento microbiano com inóculos, a despeito das características intrínsecas do fruto.

Análise de peptídeos e aminoácidos livres

Assim como a análise de acidez, as somas dos aminoácidos livres de todas as fermentações conduzidas com inóculo apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$) das fermentações controle dos períodos respectivos (Tabela 4). No primeiro período fermentativo (setembro) todas as fermentações com inóculo foram maiores que o controle, enquanto no segundo período (dezembro), apenas com o inóculo E foi maior que o controle do período. Isso sugere a capacidade desses inóculos em contribuir na alteração da concentração de precursores de *flavor*.

A atividade proteolítica da levedura *Torulaspora delbrueckii* (B) pode ter contribuído para a proteólise dentro do cotilédone, pois, esse inóculo gerou a maior concentração de aminoácidos livres no primeiro período. Esse resultado sugere que há difusão de enzimas extracelulares proteolíticas de leveduras para os cotilédones. Os inóculos A e H, no entanto, demonstraram uma menor capacidade de produção de enzima extracelular proteolítica e gerou uma concentração de aminoácidos livres, menor do que as amêndoas fermentadas com o inóculo B e daqueles inóculos que não possuíam essa atividade, sugerindo que a baixa atividade proteolítica das linhagens A e H não foram suficientes para alterar a composição de aminoácidos livres de maneira significativa em relação ao controle e às outras linhagens testadas.

Entre as fermentações com e sem inóculo dos diferentes períodos avaliados, as porcentagens dos aminoácidos hidrofóbicos representavam entre 48 e 55 %, os ácidos, entre 12 e 18 % e outros, entre 26 e 35 %. Esses resultados estão de acordo com Kirchhoff *et al.* (1989), que encontrou a proporção 58% : 16% : 26% em fermentações sem inóculo, mas diferem dos resultados de Hashim *et al.* (1998a e b), cuja proporção foi 46%: 6%: 48% e, de Jinap *et al.* (2008), 67%: 18%: 15%, respectivamente, ambas sem inóculo. Essas variações de predominância de grupos de aminoácidos parecem estar relacionadas não apenas à adição de leveduras, mas também às diferentes condições de fermentação, como duração, tamanho do

lote, revolvimentos, o pH do nibs durante as proteólises da fermentação, além das características próprias da origem genética das amêndoas, ressaltando a necessidade de estudos posteriores destas particularidades do manejo do cacau para definir qual a técnica mais adequada para gerar maior concentração de precursores de flavor.

A porcentagem de aminoácidos ácidos foi maior nas fermentações do segundo período e a de hidrofóbicos naquelas do primeiro período, com leucina e fenilalanina (ambos hidrofóbicos) contando as maiores concentrações em todas as fermentações (Tabela 4). Voigt *et al.* (1994) e Jinap *et al.* (2008) sugerem que o acúmulo de aminoácidos hidrofóbicos deve-se à ação de aspártico proteinases específicas de amêndoas de cacau, as quais quebram as proteínas preferencialmente próximos à peptídeos hidrofóbicos permitindo uma ação das carboxipeptidases, e gerando majoritariamente, peptídeos hidrofílicos e aminoácidos livre hidrofóbicos. Estes são principalmente considerados precursores específicos do aroma do cacau.

A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) não revelou diferenças notórias entre os perfis de degradação das amêndoas secas desengorduradas das fermentações com e sem inóculo nos dois períodos fermentativos (Figura 4 a e b). Todas as fermentações apresentam grande quantidade de bandas finas entre 45 e 30 kDa, sugerindo hidrólise das globulinas do cacau. A única banda proeminente apareceu em todos os experimentos sendo maior em D e F. Essa banda têm aproximadamente 21kDa, e, a partir de seu aparente peso molecular pode-se assumir que trata-se de albumina, a qual é extensivamente descrita na literatura de proteínas do cacau e parece não contribuir para a formação de aroma específico (Buyukpamukcu *et al.* 2001, Misnawi *et al.* 2002, Leal *et al.* 2008).

A avaliação dos inóculos avaliados pelos critérios de acidez e concentração de precursores químicos do flavor (açúcares redutores e aminoácidos livres) permite concluir que

C e B do primeiro período e E do segundo, nessa ordem, são os inóculos mais indicados para gerar amêndoas de qualidade. Embora esteja nítido o potencial desses inóculos em gerar uma amêndoa de melhor qualidade, na maioria dos critérios analisados, as técnicas de fermentação mostraram-se também decisivas na criação do produto com qualidade superior.

4.4 Conclusão

Os inóculos *start* não geraram diferença significativa na temperatura e pH nas fermentações, entretanto, os resultados de açúcares redutores, aminoácidos livres e acidez ratificam a capacidade dos inóculos com leveduras *start* modificarem a condição final e a qualidade das amêndoas. Dentre as características de seleção das leveduras apenas as enzimas proteolíticas e pectinolíticas parecem ter contribuído para as maiores alterações físico-química nas amêndoas fermentadas. As linhagens que acumularam mais alterações físico-químicas relevantes para o flavor neste experimento foram *Candida parapsilosis* (presente no inóculo C), seguido por *Torulaspora delbrueckii* (B) e *Pichia kluyveri* (E).

4.5 Referências

1. Amin, I. Jinap, S. e Jamilah, B. (1998) Proteolytic activity (aspartic endoproteinase and carboxypeptidase) of cocoa bean during fermentation *J Sci Food Agric* **76**, 123-128.
2. AOAC (1990) Official Methods of Analysis (15th edn). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
3. Ardhana, M.M. e Fleet, G.H. (2003) The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol* **86** (1-2), 87-99.

4. Brito, E.S., García, N.H.P. e Amancio, A.C. (2004) Use of a proteolytic enzyme in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Braz Arch Biol Technol* **47**, 553-558.
5. Buyukpamukcu, E., Goodall, D. M., Hansen, C. E., Keely, B. J., Kocchar, S. e Wille, H. (2001) Characterization of peptides formed during fermentation of cocoa bean. *J Agric Food Chem.* **49**, 5822-5827.
6. Caligiani, A., Cirlini, M., Palla, G., Ravaglia, R. e Arlorio, M. (2007) GC-MS detection of chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. *Chirality.* **19**, 329-334.
7. Conselho Nacional do Comércio Exterior (CONCEX) (1998) Especificações da padronização do cacau em amêndoas (*Theobroma cacao* L.) visando a sua classificação e fiscalização na exportação. Resolução no. 160, de 28 de junho de 1988. Diário Oficial da União, Brasília, 29 set. 1988. Seção I, 8pp.
8. Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D. e Collin, S. (2004) Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins *J Agric Food Chem* **52**, 6243-6249.
9. Gálvez, S. L., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M. e Guiraud, J.P. (2007) Study of biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *Int J Food Microbio.* **114**, 124-130.
10. Hansen, C.E., Olmo, M.D. e Burri, C. (1998) Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J Sci Food Agric.* **77**, 273-281.
11. Heinrikson R.L., Meredith S.C. (1984) Amino acids analysis by reversed-phase high performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate (PITC). *Analyt Biochem* **136**:65–74.

12. Henderson, J.S., Joyce, R. A., Hall, G. R., Hurst, W. J e McGovern, P.E. (2007) Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *PNAS* **104**(48), 18939-18940.
13. Jespersen, L., Nielsen, D.S., Honholt, S. e Jakobsen, M. (2005) Occurrence and diversity of yeast involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast res.* **5**, 441-453.
14. Jinap S., Siti, M. H. e Norsiaty M. G. (1994) Formation of methyl pyrazine during cocoa bean fermentation *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* **17**(1), 27-32.
15. Jinap, S. Ykrawan, Y., Bakar, J., Saari, N. e Lioe, H. N. (2008) Aroma precursors and methylpyrazines in underfermented cocoa beans induced by endogenous carboxipeptidase. *J Food Sci* **73**(7), 141-146.
16. Jinap, S., Dimick, P. S. e Hollender, R. (1995) Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control*, **6**(2), 105-110.
17. Kirchhoff, P.M., Biehl, B., Crone, G. (1989) Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chem* **31**:295–311.
18. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage **T4**. *Nature* **227**, 680-685.
19. Lehrian, D. W. e Patterson, G. R. (1983) Cocoa fermentation. In *Biotechnology, a comprehensive treatise* ed. Reed, G. pp.529-575. Switzerland : Verlag Chemie Basel.
20. Luna, F., Ccrouzillat, D. Cirou, L. C. e Bucheli, P. (2002) Chemical composition and flavor of ecuadorian cocoa liquor *J Agric Food Chem* **50**, 3527-3532.

21. McShea, A., Ramiro-Puig, E., Munro, S.B., Casadesus, G., Castell, M. e Smith, M. A. (2008) Clinical benefit and preservation of flavonols in dark chocolate manufacturing *Nutrition reviews* **66**(11), 630–641.
22. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. **31**, 426-428.
23. Misnawi, Jinap, S., Nazamid, S. e Jamilah, B. (2002) Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursors formation. *Food chemistry*. **78**, 407-417.
24. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. e Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. **9**(6), 255-62.
25. Nielsen D. S., Snitkjaer, P. e Van den Berg, F. (2008) Investigating the fermentation of cocoa by correlating denaturing gradient gel electrophoresis profiles and near infrared spectra. *Int J Food Microbiol* **125**(2), 133-40.
26. Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. e Holzapfel, W.H. (2007) The microbiology of Ghanaian cocoa fermentation analysed using culture-dependente and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* **114**, 168–186.
27. Noor-Saffalina, S. S., Jinap, S, Nazamid, S. e Nazimah, S. A. H. (2009) Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavour precursors in a lipidic model system. *Int J Food Sci Technol* **44**, 168-180.
28. Pirovani, C.P., Carvalho, H. A., Machado, R. C., Gomes, D. S., Alvin, F. C., Pomella, A. W., Gramacho, K. P., Cascardo, J. C., Pereira, G. A. e Micheli, F. (2008) Protein

extraction for proteome analysis from cocoa leaves and meristems, organs infected by moniliophthora, the causal agent of witches' broom disease. *Electrophoresis*. 29(11), 2391-2401.

29. Hashim, P., Jinap, S., Sharifah K. S. M. e Asbi A. (1998) Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *J Sci Food Agric*. **78**, 543-550. (a)
30. Hashim, P., Jinap, S., Sharifah K. S. M. e Asbi A. (1998) Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *J Sci Food Agric* **78**, 535-542. (b)
31. Schwan, R.F. (1998) cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl Environ Microbiol* **64**(4), 1477-1483.
32. Schwan, R.F. e Wheals, A. (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food, Sci Nutr* 44 (**17**), 205-221.
33. Thompson, S.S., Miller, K.B. and Lopez, A.S. (2001) Cocoa and coffee. *Food Microbiology — Fundamentals and frontiers*. eds. Doyle MJ, Beuchat LR & Montville TJ, pp. 721–733. Washington, DC: ASM Press.
34. Voigt, J., Heinrichs, H., Voigt, G. e Biehl, B. (1994) Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food chem* **50**, 177-184.

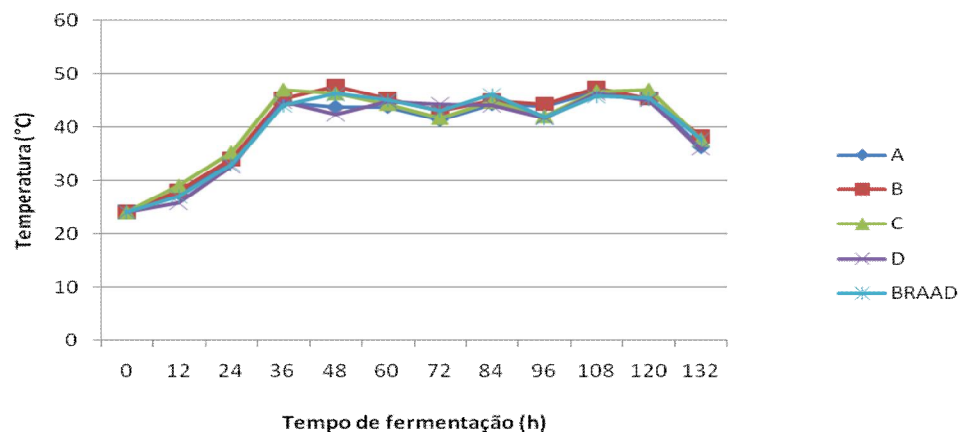
4.6 Tabelas e figuras

Tabela 1 Leveduras *starts*, seu perfil enzimático e fenótipo *killer*.

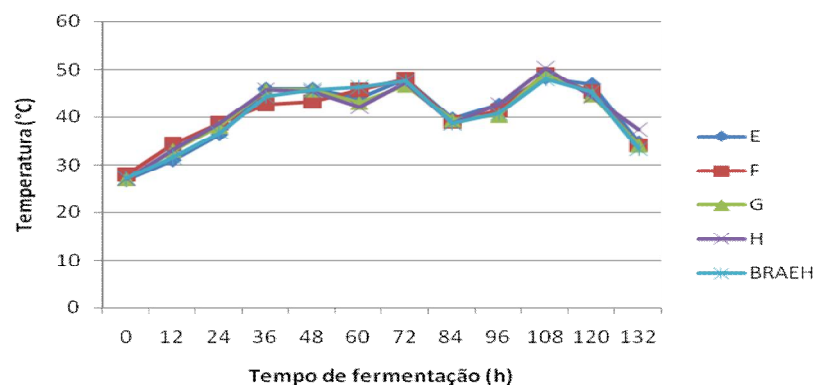
Identidade	Linhagem	Amilase	Esterase	Lipase	Protease	Killer	Pectinase
A	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+	+	+		
B	<i>Torulaspora delbrueckii</i>			+	++		
C	<i>Candida parapsilosis</i>			+			+
D	<i>Pichia galeiformis</i>			+		+	
E	<i>Pichia kluyveri</i>			+		+	
F	<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	+	+			
G	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			+		+	
H	<i>Pichia membranifaciens</i>			+	+		

Figura 1 Temperatura da fermentação das amêndoas de cacau com e sem inóculo em setembro (a) e dezembro (b).

(a)

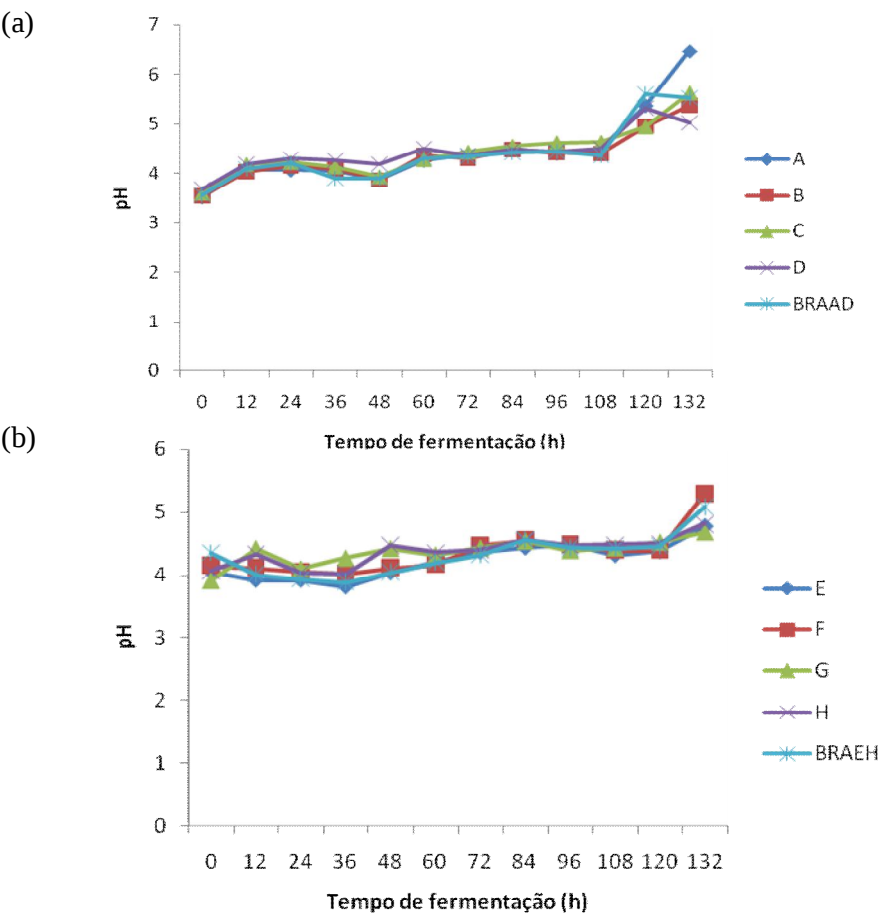


(b)



Não houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre as fermentações e os controles em nenhum dos dois períodos.

Figura 2 pH da polpa das fermentações com e sem inóculos realizadas em setembro (a) e dezembro (b).



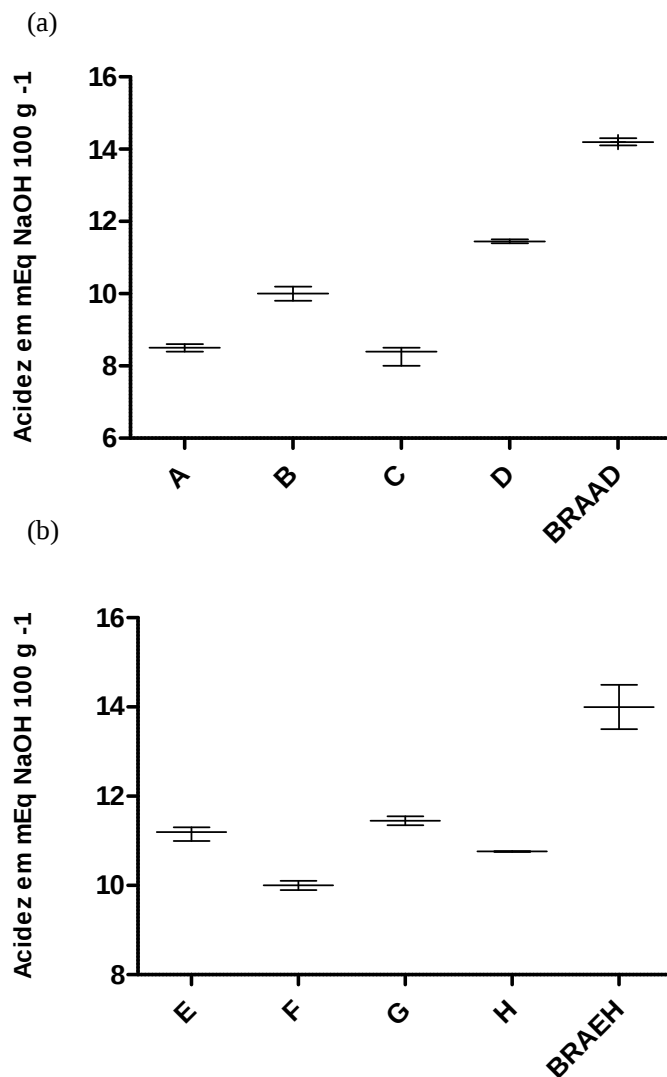
Não houve diferença estatística significativa ($p<0.05$) entre as fermentações e os controles em nenhum dos dois períodos.

Tabela 2 pH das amêndoas secas fermentadas com e sem inóculos em setembro e dezembro.

(a)	BraAD	A	B	C	D
	5,9 ^a	5,6 ^b	5,7 ^c	5,8 ^a	5,8 ^a
(b)	BraEH	E	F	G	H
	5,8 ^a	5,7 ^a	5,8 ^a	6,0 ^b	5,8 ^a

Os valores seguidos pela mesma letra dentro da mesma linha tem diferença estatística Significativa em relação ao branco do período ($P<0.05$).

Figura 3 Acidez em mEq NaOH 100 g⁻¹ de amêndoas fermentadas com e sem inóculo em setembro (a) e dezembro (b).



Houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre A, B, C, D e o controle BraAD, assim como entre E, F, G, H e o controle BraEH.

Tabela 3 Análise de açúcares redutores livres em fermentações com e sem inóculo em diferentes períodos. Resultados expressos em g kg⁻¹

BraAD	A	B	C	D
8,9a	11,8a	14,3b	15,3c	9,8a
BraEH	E	F	G	H
16,8a	15,6a	11,2b	11,0c	10,3d

Os valores da mesma linha seguidos por letras diferentes tem diferença estatística significativa em relação ao branco do período (P<0.05).

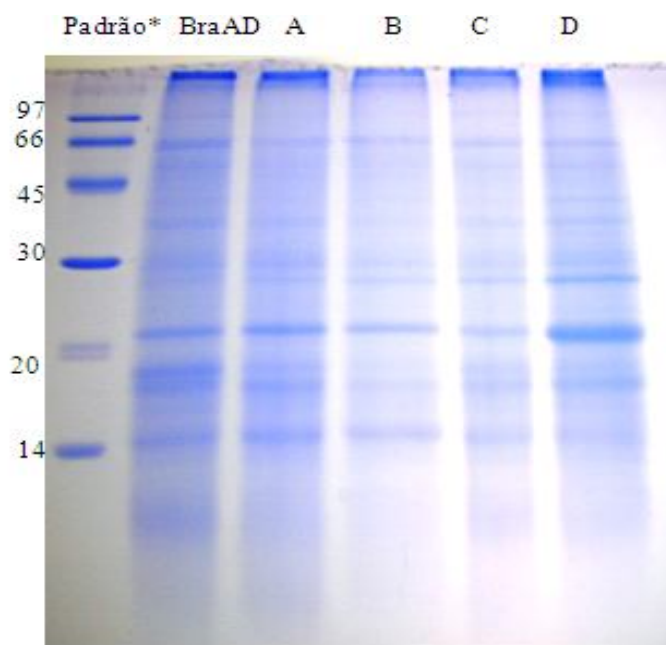
Tabela 4 Aminoácidos livres em amêndoas de cacau fermentadas com e sem inóculo *start* em dois diferentes períodos.

AMINOÁCIDOS	A	B	C	D	BraAD	E	F	G	H	BraEH
Ácidos (%)	12,48	14,62	14,86	18,05	15,23	15,71	15,98	16,82	17,32	15,96
(abs.)¹	1,09	1,43	1,42	1,63	1,32	1,86	1,69	1,62	1,65	1,86
Asp	0,32	0,33	0,34	0,36	0,31	0,41	0,34	0,32	0,33	0,42
Glu	0,36	0,70	0,68	0,85	0,65	0,96	0,91	0,89	0,93	0,98
Ser	0,26	0,25	0,24	0,30	0,23	0,34	0,30	0,29	0,28	0,32
His	0,14	0,15	0,15	0,12	0,12	0,15	0,13	0,11	0,12	0,14
Hidrofóbicos (%)	52,07	50,82	49,53	55,70	48,93	50,79	50,58	50,02	49,52	49,94
(abs.)¹	4,53	4,97	4,73	5,04	4,23	6,00	5,33	4,81	4,72	5,82
Ala	0,68	0,70	0,70	0,91	0,64	1,04	0,92	0,92	0,94	1,10
Tyr	0,56	0,64	0,60	0,63	0,51	0,72	0,66	0,57	0,55	0,69
Val	0,46	0,51	0,48	0,56	0,42	0,66	0,59	0,54	0,53	0,60
Ile	0,33	0,36	0,33	0,36	0,29	0,42	0,38	0,33	0,34	0,38
Leu	1,44	1,60	1,51	1,55	1,39	1,84	1,57	1,46	1,40	1,80
Phe	1,05	1,16	1,11	1,04	0,98	1,32	1,21	0,99	0,96	1,24
Outros (%)	35,46	34,56	35,61	26,25	35,83	33,51	33,44	33,15	33,16	34,11
(abs.)¹	3,08	3,38	3,40	2,38	3,10	3,96	3,53	3,19	3,16	3,97
Gly	0,15	0,14	0,13	0,14	0,12	0,16	0,12	0,12	0,12	0,15
Arg	0,72	0,80	0,83	0,76	0,82	0,91	0,77	0,69	0,66	0,87
Thre	0,23	0,25	0,23	0,29	0,22	0,32	0,28	0,26	0,26	0,30
Pro	0,81	0,92	0,85	0,00	0,82	1,15	1,20	0,97	1,03	1,18
Met	0,27	0,29	0,28	0,25	0,23	0,29	0,23	0,22	0,22	0,29
Cys	0,37	0,38	0,49	0,31	0,38	0,50	0,40	0,40	0,37	0,54
Lys	0,53	0,61	0,60	0,62	0,51	0,64	0,52	0,52	0,51	0,64
Total	8,70a	9,79b	9,55c	9,05d	8,65e	11,82f	10,55g	9,62h	9,53i	11,65j

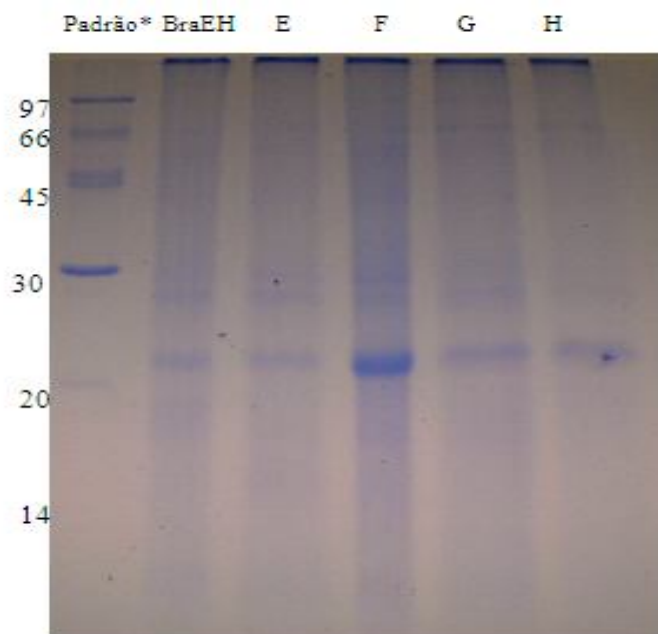
Os resultados estão expressos em g Kg⁻¹. Os valores seguidos por letras diferentes na linha de soma dos aminoácidos apresentam diferença significativa (P<0.05) com o branco respectivo do período. ¹Valores absolutos.

Figura 4 Perfil de degradação de proteínas extraídas das amêndoas de cacau fermentadas com e sem inóculo em setembro.

(a)



(b)



O padrão é um marcador de peso molecular cuja unidade está em kDa.

O presente trabalho demonstra o potencial da utilização de leveduras na fermentação do cacau, visando o melhoramento do flavor. Esse conhecimento permitirá desenvolver tecnologias de padronização desta fermentação natural, convertendo-lhe em um processo bem estabelecido e passível de industrialização. Assim, a fabricação de amêndoas com qualidade superior e de maneira reprodutível tornar-se-á uma prática comum, agregando muito valor ao produto do cacau baiano.

1. Abranches, J., Morais, P.B., Rosa, C.A., Mendonça-hagler L.C. e Hagler, A.N. (1997) The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Can J Microbiol* **43**(4), 328–336.
2. Amin, I. Jinap, S. e Jamilah, B. (1997) Vicilin-class globulins and their degradation during cocoa fermentation *Food Chemistry* **59**(1), 1-5.
3. Amin, I. Jinap, S. e Jamilah, B. (1998) Proteolytic activity (aspartic endoproteinase and carboxypeptidase) of cocoa bean during fermentation *J Sci Food Agric* **76**, 123-128.
4. Ardhana, M.M. e Fleet, G.H. (2003) The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol* **86** (1-2), 87-99.
5. Brito, E.S. Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor. Campinas, 2000. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.
6. Brito, E.S., García, N.H.P. e Amancio, A.C. (2004) Use of a proteolytic enzyme in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Braz arch Biol Technol* **47**, 553-558.
7. Brizzio, S., Turchetti, B., García, V., LibKind, D., Buzzini, P. e Van Broock, M. (2007) Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeast isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Can J Microbiol* **53**, 519 - 525.
8. Brunetto, M. D. R., Cayama, Y. D., Gutiérrez, L. Roa, S. C., Méndez, Y. C., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, A. e Ramos, G. (2009) Headspace gas chromatography–mass spectrometry determination of alkylpyrazines in cocoa liquor samples *Food Chemistry* **112**, 253–257.
9. Bull, A.T., Goodfellow, M. e Slater, J.H. (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu Rev Microbiol* **46**, 219-252.

10. Buyukpamukcu, E., Goodall, D. M., Hansen, C. E., Keely, B. J., Kocchar, S. e Wille, H. (2001) Characterization of peptides formed during fermentation of cocoa bean. *Journal of food chemistry*. **49**, 5822-5827.
11. Buzzini, P. e Martini, A. (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J Appl Microbiol* **93**, 1020–1025.
12. Caligiani, A., Cirlini, M., Palla, G., Ravaglia, R. e Arlorio, M. (2007) GC-MS detection of chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. *Chirality*. **19**, 329-334.
13. Camu, N., González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme P., Takrama, J. S., Addo, S. K. e De Vuyst, L. (2008) Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana *Appl Environ Microbiol* **74**(1), 86-98.
14. Carlin, J. T., Lee, K. N., Hsieh, O. A. L., Hwang, L. S., Ho, C. T. e Chang, S. S. (1986) Comparison of acid and basic volatile compounds of cocoa butters from roasted and unroasted cocoa beans. *Jaocs* **63**(8), 1031-1036.
15. Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A. e Todd, B.E.N. (1997) Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust J Grape Wine Res* **3**, 2–8.
16. Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D. e Collin, S. (2004) Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins *J Agric Food Chem* **52**, 6243-6249.
17. Czárán, T.L. e Hoekstra, R.F., (2003) Killer-sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms. *Proc Biol sci* **270**, 1373–1378.
18. De Camargo, R., Leme, J. e Martinelli, A. (1963) General observations on the microflora of fermenting cocoa beans (*Theobroma cacao*) in Bahia (Brazil). *Food Technol.* **17**, 116–118.
19. Effrain, P. (2004) Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate Campinas, 2000. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
20. Food And Agriculture Organization Of The United Nations - FAO (2008). Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. <acessado em 01 de novembro de 2009 às 10:51 a.m.>
21. Frauendorfer, F. e Schieberle, P. (2006) Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **54**, 5521-5529

22. Gálvez, S. L., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M. e Guiraud, J.P. (2007) Study of biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International journal of microbiology* **114**, 124-130.
23. Ganga, M.A. e Martinez, C. (2004) Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J Appl Microbiol* **96**, 76–83.
24. Gonçalves, F. A. G. (2007) Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. Belo Horizonte, 2007. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
25. Gopinath, S.C.B., Anbu, P. e Hilda, A. (2005) Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments *Mycoscience* **46**, 119–126.
26. Hansen, C.E., Olmo, M.D. e Burri, C. (1998) Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J Sci Food Agric*. **77**, 273-281.
27. Hashim, P., H., Jinap, S., Sharifah K. S. M. e Asbi A. (1998) Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *J Sci Food Agric* **78**, 535-542. (a)
28. Hashim, P., H., Jinap, S., Sharifah K. S. M. e Asbi A. (1998) Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *J Sci Food Agric* **78**, 543-550. (b)
29. Henderson, J.S., Joyce, R. A., Hall, G. R., Hurst, W. J e McGovern, P.E. (2007) Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *PNAS* **104**(48), 18939-18940.
30. Hoskin, J. C. (1994) Sensory properties of chocolate and their development *Am J Clin Nutr* **60**, 1068-1070.
31. Hoskin, J. C., e Dimick, P. S. (1981) Chemico-physical aspects of chocolate processing- a review. *Can inst food sci technol*. **14**, 269-282.
32. Jespersen, L., Nielsen, D.S., Honholt, S. e Jakobsen, M. (2005) Occurrence and diversity of yeast involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast res*. **5**, 441-453.
33. Jinap S., Siti, M. H. e Norsiaty M. G. (1994) Formation of methyl pyrazine during cocoa bean fermentation *Pertanika J. Trap. Agric. Sci.* **17**(1), 27-32.
34. Jinap, S. Ykrawan, Y., Bakar, J., Saari, N. e Lioe, H. N. (2008) Aroma precursors and methylpyrazines in underfermented cocoa beans induced by endogenous carboxipeptidase. *J Food Sci* **73**(7), 141-146.

35. Jinap, S., Dimick, P. S. e Hollender, R. (1995) Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control*, **6**(2), 105-110.
36. Joseph, B., Ramteke, P.W. e Thomas, G. (2008) Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv* **26**, 457-470.
37. Kattemberg, H. R. e Kemmink, A. (1993) The flavor of cocoa in relation to the origin and processing of the cocoa beans. *Develop Food Sci* **32**, 1-22.
38. Keeney, P. G. (1972) Various interactions in chocolate flavor. *J Am oil chemist soc* **49**, 567-572.
39. Kirk, O., Borchert, T.V. e Fuglsang, C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol.* **13**, 345-351.
40. Kostinek, M., Ban-Koffi, L., Ottah-Atikpo, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzapfel, W. H. e Franz, C. M. A. P. (2008) Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. *Curr microbial* **56**, 306-314.
41. Kosuge T e Kamiya H. (1962) Discovery of pyrazines in a natural product. *Nature* **193**, 776-9.
42. Leal, G.A., Gomes, L.H., Efraim, P., Tavares, F.C.A. and Figueira A. (2008) Fermentation of cocoa (*Theobroma cocoa L.*) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Res* **8**, 788-798.
43. Lehrian, D. W. e Patterson, G. R. (1983) Cocoa fermentation. In: Reed, G. (ed) *Biotechnology, a comprehensive treatise*. Vol. 5. Verlag Chemie, Basel, Switzerland, 529-575.
44. Leiter, J. e Harding S. (2004) Trinidad, Brazil and Ghana: three melting moments in the history of cocoa. *Journal of rural studies* **20**, 113-130.
45. Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M., Querol, A. e Caballero, A.C. (2007) Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**(8), 539-46.
46. Lopez, A.S. e Dimick, P.S. (1995) Cocoa Fermentation. In Reed, G. and Nagodawithana, T. W, eds. *Enzymes, biomass, food and feed*, 2nd ed. *Biotechnol.* **9**, 561-577.
47. Luna, F., Ccrouzillat, D. Cirou, L. C. e Bucheli, P. (2002) Chemical composition and flavor of ecuadorian cocoa liquor *J Agric Food Chem* **50**, 3527-3532.
48. Madigan, M. T., Martinko, J. M. e Parker, J. (2004) *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall. 10ed. 608p.
49. McShea, A., Ramiro-Puig, E., Munro, S.B., Casadesus, G., Castell, M. e Smith, M. A. (2008) Clinical benefit and preservation of flavonols in dark chocolate manufacturing *Nutr rev* **66**(11), 630-641.

50. Meneses, J. A. S. e Carmo-Neto, D. (1993) A modernização do *agribusiness* cacau. São Paulo-SP: Fundação Cargill. 233p.
51. Misnawi, Jinap, S., Nazamid, S. e Jamilah, B. (2002) Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursors formation. *Food Chem* **78**, 407-417.
52. Nielsen D. S., Snitkjaer, P. e Van den Berg, F. (2008) Investigating the fermentation of cocoa by correlating denaturing gradient gel electrophoresis profiles and near infrared spectra *Int J Food Microbiol* **125**, 133-40.
53. Nielsen, D. S., Honholt, S., Tano-Debrah, K. e Jespersen, L. (2005) Yeast populations associated with ghanaiian cocoa fermentations analyzed using denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE). *Yeast*. **22**, 271-284.
54. Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. and Holzapfel, W.H. (2007) The microbiology of Ghanaian cocoa fermentation analysed using culture-dependente and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* **114**, 168–186.
55. Noor-Soffalina, S. S., Jinap, S, Nazamid, S. e Nazimah, S. A. H. (2009) Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavour precursors in a lipidic model system. *Int J Food Sci Technol* **44**, 168-180.
56. Oliveira, A.N., Oliveira, L.A., Andrade, J.S. e Chagas Júnior, A.F. (2006) Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ciênc Tecnol Alimen Campinas* **1**, 204-210.
57. Passos, F.M., Lopez, A.S., Silva, D.O., (1984) Aeration and its influence on the microbial sequence in cacao fermentations in Bahia, with emphasis on lactic acid bacteria. *J Food Sci* **49**, 1470–1474.
58. Polonelli, L., Conti, S., Gerloni, M., Magliani, w., Castagnola, M. e Lucas, A. P. (1993) Acerola: suco da saúde conquista o mundo inteiro. *Manchete Rural* **5**(69), 10-13.
59. Reineccius, G., Keeney, P. e Weissberger, W. (1972) Factor affecting the concentration of pyrazines in cocoa beans. *J Agric Food Chem* **20**, 202-206.
60. Sanchez, J., Daguene, G., Guiraud, J.P., Vincent, J.C. e Galzy, P. (1985) A study of the yeast flora and the effect of pure culture seeding during the fermentation process of cocoa beans. *Lebensm.-wiss. Technol.* **18**, 69–76.
61. Schwan, R. F. (1998) Cocoa fermentations conduced with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl Environ Microbiol* **64**(4), 1477-1483.
62. Schwan, R.F. e Wheals, A. (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44** (17), 205-221.

63. Schwan, R.F., Rose, A.H. and Board, R.G. (1995) Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *J. Appl. Bact.* **79**, 96–107.
64. Schwan, R.F., Vanetti, M.C.D., Silva, D.O., Lopez, A., De Moraes, C.A. (1986) Characterization and distribution of aerobic, spore forming bacteria from cacao fermentations in Bahia. *J. Food Sci.* **51**, 1583–1584
65. Somers, J. M. e Bevan, E. A. (1969) The inheritance of killer character in yeast. *Genetic Researches* **13**, 71-73.
66. Steele, D.B. e Stowers, M.D. (1991) Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Annu Rev Microbiol* **45**, 89-106.
67. Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G. e Van Reensburg, P. (2001) Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J Appl Microbiol* **91**, 182–190.
68. Thompson S.S., Miller K.B. e Lopez A.S. (2001) Cocoa and coffee. Food Microbiology – Fundamentals and frontiers (Doyle MJ, Beuchat LR & Montville TJ, eds), pp. 721–733. ASM Press, Washington, DC.
69. Vadkertiová, R. and Slaviková, E. (2007) Killer activity of yeast isolated from natural environments against some medically important *candidas* species. *Pol J Microbiol* **56**, 39-43.
70. Van Beilen, J.B. and Li, Z. (2002) Enzyme technology: an overview. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 338-344.
71. Voigt, J., Heinrichs, H., Voigt, G. e Biehl, B. (1994) Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chem* **50**, 177-184.
72. Yap, N.A., Lopes, M.B., Langridge, P. e Henschke, P.A. (2000) The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. *J Appl Microbiol* **89**, 381-389.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)