

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



CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA POLIFÁSICA DA
DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À
FERMENTAÇÃO DE CACAU DO SUL DA BAHIA

Adriana Cristina Reis Ferreira

Ilhéus-Bahia-Brasil
Abril de 2007

ADRIANA CRISTINA REIS FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA POLIFÁSICA DA DIVERSIDADE DE
LEVEDURAS ASSOCIADAS À FERMENTAÇÃO DE CACAU DO SUL DA BAHIA**

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

Área de concentração: Bioprospecção e
biotecnologia

Ilhéus-Bahia-Brasil
Abril de 2007

ADRIANA CRISTINA REIS FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA POLIFÁSICA DA DIVERSIDADE DE
LEVEDURAS ASSOCIADAS À FERMENTAÇÃO DE CACAU DO SUL DA BAHIA

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

Área de concentração: Bioprospecção e
biotecnologia

APROVADA: 18 de abril de 2007,

Prof. Dr.^a Ana Paula T. Uetanabaro
(UEFS)

Prof. Dr. João Luciano Andriolli
(UESC)

Eduardo Grosss
(UESC)

Rachel Passos Rezende
(UESC-orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo apoio e amor incondicional dedicado. E a toda minha família e amigos que de forma direta ou indireta, participaram e estiveram sempre presentes, incentivando e colaborando nos momentos felizes e difíceis.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Fermentação de amêndoas de cacau.....	04
2.2. Leveduras associadas à fermentação de cacau.....	08
2.3. Provas moleculares.....	12
2.4. DGGE.....	17
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODO.....	24
4.1. Coleta das amêndoas de cacau e isolamento das colônias em cultura pura...24	
4.2. Determinação da temperatura e pH durante a fermentação do cacau.....25	
4.3. Identificação dos isolados.....25	
4.4. Extração de DNA total da polpa de cacau congelada.....26	
4.5. PCR.....27	
4.6. Extração de DNA dos isolados de leveduras da fermentação de cacau.....27	
4.7. DGGE.....27	
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

RESUMO

A amêndoa de cacau é a principal matéria prima para a produção do chocolate, esta é recoberta por uma doce polpa, rica em carboidratos que será removida pelo processo de fermentação do cacau. Muitos microrganismos como leveduras, bactérias ácido lácticas e acéticas, entre outros crescem nesta polpa. As leveduras são os principais agentes da fermentação e estão relacionadas com a formação dos precursores do “*flavor*” (aroma e sabor) da amêndoa de cacau. O termo fermentação de cacau implica em um processo microbiológico, de ação enzimática e melhoramento do *flavor*. No Sul da Bahia, a fermentação ocorre nos cochos, durante 5-7 dias, nos quais as amêndoas são revolvidas de uma caixa para outra diariamente. A diversidade de leveduras associadas à fermentação do cacau no Sul da Bahia foi investigada neste trabalho utilizando duas técnicas diferentes. O teste microbiológico tradicional, baseado na análise morfológica e bioquímica das linhagens isoladas durante o processo de fermentação. E o gel de eletroforese em gradiente de desnaturação (DGGE) associado a reação em cadeia da polimerase (PCR). Amostras de polpa de cacau foram coletadas de fazendas da região, nos municípios de Ilhéus e Una nos cochos de fermentação, em intervalos de 12 h, durante todos os dias do processo. As espécies de leveduras encontradas na polpa foram isoladas em cultura pura e identificadas pelo teste microbiológico padrão. Esta também foi utilizada para caracterização molecular das espécies pela extração do DNA da comunidade microbiana total presente na polpa de cacau seguida pela amplificação dos fragmentos do gene 26S do rDNA. Estes produtos de PCR foram utilizados para realização do DGGE. Nas duas coletas realizadas foram isoladas 206 linhagens de leveduras que foram agrupadas em 23 espécies relacionadas (19 grupos na coleta 1 e 14 grupos na coleta 2). As espécies de *Pichia membranifaciens*, *Candida krusei* e *Kloeckera apis* foram as leveduras dominantes nas duas coletas da fermentação realizadas, sendo a *P. membranifaciens* predominante durante todas as etapas da fermentação. Os “*fingerprint*” de DGGE da população de leveduras presentes na fermentação da coleta 1 foram desenvolvidos com sucesso, apresentando 13 bandas no perfil do DGGE. A coleta 2 não pode ser analisada por DGGE, devido a baixa pureza dos produtos de PCR. A identificação molecular das espécies não foi conclusiva. E a tentativa de construir um marcador molecular (*ladder*) com as espécies isoladas neste estudo, para comparação entre bandas, também não apresentou resultados satisfatórios. A técnica de DGGE demonstrou ser uma poderosa ferramenta para estudos de diversidade e dinâmica de populações de leveduras associadas a fermentação de cacau e os resultados obtidos neste trabalho quando comparados com trabalhos anteriores na região sugerem uma mudança significativa na diversidade de leveduras presentes na fermentação do cacau do Sul da Bahia.

ABSTRACT

Cocoa bean is the main raw material for chocolate manufacture. The beans are embedded in a sweet pulp, rich in carbohydrates which are removed in the cocoa fermentation process. Many microorganisms like yeast, lactic acid bacteria and others, grow in this pulp. The yeasts are the main fermentations agents and are related with the formation of the flavour precursors (aroma and color) of the cocoa bean. The term cocoa fermentation implies in a microbiological process of enzymatic action and flavor improvement. In South Bahia the fermentation occurs in a box, during 5-7 days in which the beans are revolved daily from one box to another. This study investigated the yeast diversity associated to cocoa fermentation in South Bahia, using two different techniques. The first was a traditional microbiological test based on morphological and biochemical analysis of strains isolated during the fermentation process. The second was the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) associated with polimerase chain reaction (PCR). Cocoa pulp samples were collected in fermentation boxes of farms in the municipality of Ilhéus and Una. The sampling was realized in intervals of 12 h, in all days. The yeast species found in the cocoa pulp were isolated in a pure culture and identified by the traditional microbiology method. The pulp was also used for the molecular analysis of the species by the DNA extraction of the total microbiological community followed by an amplification of the fragments of the 26S rDNA gene. These products of the PCR were used on the elaboration of the DGGE. In the two fermentation samplings, 206 yeast strains were isolated and grouped in 23 related species (19 groups in the sampling 1 and 14 groups in the sampling 2). *Pichia membranifaciens*, *Candida krusei* e *Kloeckera apis* were the dominant yeast species in both fermentation samplings, with the *P. membranifaciens* being the predominant species in the all fermentative stages. The fingerprint of the DGGE of the yeast population present in the cocoa fermentation of sampling 1 was developed with success, showing 13 bands on DGGE. The sampling 2 could not be analyzed due to the low pure products of PCR. The molecular identification of species was not conclusive. The effort on construction a ladder using the isolated species of this study for the comparison between bands also showed no satisfactory results. This study showed that the DGGE technique can be used as a powerful tool in studies of dynamic and diversity of yeast population associated with cocoa fermentation. When compared to others studies in the region, this results suggest a significant change in the yeast diversity present on the cocoa fermentation of South Bahia.

1. INTRODUÇÃO

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie supostamente originária da América Tropical. Sua domesticação foi realizada pelos Maias e pelos Astecas aproximadamente a 2 mil anos, na cidade do México, onde estes povos utilizavam suas amêndoas como moeda e para o preparo de uma bebida muito apreciada na época, o chocolate. Para estes povos o cacau teve origem divina e era considerado sagrado, seu cultivo era acompanhado por solenes cerimônias religiosas e esse significado provavelmente influenciou o botânico sueco Carolus Linneu (1707 – 1778) a denominar a planta de *T. cacao*, chamando-a assim de “manjar dos deuses”. O chocolate tal como é conhecido hoje é uma invenção atribuída aos conquistadores espanhóis que levaram a bebida para a Europa modificando sua receita original.

À medida que o cacau foi ganhando importância econômica com a expansão do consumo do chocolate, várias tentativas foram feitas visando à implantação da lavoura cacauera em outras regiões com condições de clima e solo semelhantes as do seu habitat natural. Em consequência, em meados do século XVIII o cacau já tinha atingido o Sul da Bahia e na segunda metade do século XIX foi levado para a África. A produção brasileira de cacau nos anos 1979/80 ultrapassou as 310 mil toneladas e o cacau adaptou-se muito bem ao clima e solo da região Sul da Bahia, região que produz atualmente 70-75% do cacau brasileiro, sendo hoje o quinto produtor de cacau do mundo, ao lado da Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Camarões.

Os produtores de cacau da Bahia nunca se preocuparam em desenvolver um cacau de qualidade, dito especial e fino, ou medidas de controle de qualidade para a melhoria do produto final. Uma vez que as indústrias moageiras, principais responsáveis pela compra dessa matéria-prima, nunca se dispuseram em pagar um preço justo para este tipo de cacau. Hoje, com a globalização e a abertura dos mercados iniciam-se novos conceitos para produção de massa de cacau e chocolates especiais, que são dependentes diretamente do beneficiamento primário do cacau. A possibilidade de se obter um cacau especial com características superiores de sabor, aroma, reduzida acidez e condições de manejos especiais, através da escolha adequada da variedade do fruto, da colheita no grau certo de maturação, de uma fermentação controlada e secagem eficiente, que são fatores indispensáveis para atender esse novo nicho de mercado (de chocolate fino e especial) em ascensão.

A fermentação das amêndoas de cacau é uma atividade indispensável para o desenvolvimento dos precursores do aroma e sabor de chocolate (*flavor*) e representa uma etapa fundamental do beneficiamento e produção de cacau especial. Durante este processo ocorre alta atividade microbiana na polpa mucilaginosa, onde são produzidos álcoois e ácidos em complexas reações bioquímicas que difundem dos microrganismos para os cotilédones. Uma sucessão microbiana complexa está associada ao processo, e dentro desta as leveduras são os principais agentes, contribuindo direta ou indiretamente para a redução da acidez, amargor e adstringência das amêndoas de cacau, sendo essenciais para a produção da alta qualidade do produto final. As espécies de leveduras associadas a fermentações de cacau do mundo têm sido determinadas pelos diversos países produtores, demonstrando que esta população é bastante heterogênea, variando não apenas nos locais e métodos de produção utilizados, ou país, estação do ano de colheita e tempo de duração da fermentação.

A região Sul da Bahia, com sua grande biodiversidade, tem um potencial fundamental na lavoura cacaeira do Brasil, e como o chocolate tem aceitação mundial indiscutível, começa a existir hoje na região “uma idéia” de qualidade, gerada por uma melhoria nas etapas do beneficiamento. Como atualmente, diversas estratégias moleculares têm sido aplicadas para estudo de comunidades

microbianas, como clonagem de genes de RNAr, hibridização por *slot blot*, e *fingerprints* de DNA como o ARDRA (*Amplified ribosomal DNA restriction analysis*), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*); FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*); TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) e o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), progressivamente adotadas e improvisadas por microbiologistas ávidos a evitar erros associados com métodos clássicos. Estas são hoje a grande chave para estudo de populações complexas, permitindo identificar microrganismos pela análise de seus genes, possibilitando informações sobre composição e função destas comunidades.

A população de leveduras associadas à fermentação de cacau do Sul da Bahia começa a ser pela primeira vez investigada, utilizando técnicas de biologia molecular para estudo de diversidade, o DGGE, associado à reação em cadeia da polimerase (PCR). Sendo o princípio desta e seu uso para estudo de comunidades microbianas, discutido neste trabalho, comparando-o ao teste de replica em meio sólido, um teste microbiológico tradicional bastante utilizado para estudo taxonômico de leveduras. Este trabalho teve como objetivo investigar a diversidade da comunidade de leveduras presentes na fermentação de cacau de fazendas da região Sul da Bahia, visando a melhoraria na qualidade final das amêndoas secas de cacau, produzidas na região. Na tentativa de se obter massa de cacau com aroma e sabor superiores, com reduzida acidez, o que pode estimular a verticalização da produção e conseqüente agregação de renda para os produtores da região.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fermentação de amêndoas de cacau

A cacauicultura é uma atividade agrícola de grande importância econômica, social e ecológica para as regiões de clima tropical úmido. No Brasil, a maior área cultivada encontra-se na região Sul da Bahia, com cerca de 600 mil hectares, que na sua maior parte se mantém sombreada com espécies da Mata Atlântica, em sistemas de cabruca, preservando parte da biodiversidade local. O fruto de cacau é composto por cerca de 30-40 amêndoas que são a principal matéria prima para a produção do chocolate. Cada uma destas é recoberta por uma doce polpa branca de mucilagem, rica em carboidratos (10-15%) como glicose, frutose, e sacarose, além de apresentar ainda uma alta concentração de ácido cítrico, e uma pequena quantidade de ácidos orgânicos, ácido láctico e ácido acético, apresentando um pH relativamente baixo, de 3,3 – 4,0 devido à alta concentração de ácido cítrico (SCHWAN, 1998; NIELSEN *et al.*, 2005; ARDHANA e FLEET, 2003). Os frutos após a colheita são abertos e levados para os locais de fermentação que variam de acordo com o tipo da região produtora (LEHRIAN e PETERSON, 1983). No sul da Bahia, a fermentação ocorre em caixas de madeira (cochos de fermentação), durante 5-7 dias, onde o cacau é revolvido de 12 em 12 horas a partir do segundo dia de fermentação.

O cacau cultivado pode ser dividido em dois grandes grupos raciais, que se inter cruzam, o grupo Crioulo da América Central e do Sul e o grupo Forasteiro da América do Sul. Taxonomicamente, cada um destes dois grupos constitui uma

subespécie, o *T. cacao cacao* compreendendo o grupo racial Crioulo e *T. cacao sphaerocarpum* correspondendo ao grupo Forasteiro. Neste último grupo estão inseridos ainda os Trinitários, grupo altamente heterozigoto, formado a partir da hibridação espontânea entre Crioulos e Forasteiro Amazônico. Tais grupos raciais não contribuem de modo igual para a qualidade final do chocolate, assim os Crioulos e os Trinitários constituem os cacauzeiros cujas amêndoas produzem os chocolates finos. Por sua vez, os Forasteiros produzem um chocolate de baixa qualidade, amargo e adstringência conhecido como cacau “ordinário”. Aproximadamente, 90% do consumo mundial de cacau para produção de chocolate provêm desse cacau ordinário, cujo sabor e aroma são gerados a partir de uma mistura com o cacau fino (DIAS, 1992).

A fermentação é a etapa mais importante do processamento do cacau, onde são gerados os compostos precursores do aroma, sabor (*flavor*) e cor de uma semente de boa qualidade (CASCANTE *et al.*, 1993). A fermentação é uma mistura de processos microbiológicos externos, caracterizados principalmente pela produção de etanol e ácido acético a partir de carboidratos, e de processos internos autolíticos envolvendo as enzimas da amêndoa. O termo fermentação de cacau implica em um processo microbiológico, de ação enzimática e de melhoramento do *flavor* (LEHRMAN e PATTERSON, 1983). É nesta fase que o embrião perde sua viabilidade e várias mudanças na cor e nos constituintes químicos das amêndoas serão operadas. A importância da fermentação na contribuição de um chocolate de qualidade tem sido reconhecida há mais de 90 anos, e diversos estudos e pesquisas têm sido conduzidos em diferentes países a fim de determinar as espécies de microrganismos associadas a este processo (LEHRMAN e PATTERSON, 1983; SCHWAN *et al.*, 1995; ARDHANA e FLEET, 2003; JESPERSEN *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2005). Esta é uma etapa fundamental do beneficiamento primário do cacau e, juntamente com o processo de secagem define o padrão do cacau comercial, estando as duas etapas comprometidas com a qualidade do produto final.

Estudos microbiológicos da fermentação do cacau certificam desde o século passado a presença de várias espécies de microrganismos associados ao processo, como leveduras, bactérias ácidas lácticas e acéticas, várias espécies de *Bacillus*, além de outros fungos e aeróbios formadores de esporos (NIELSEN *et al.*, 2005;

JESPERSEN *et al.*, 2004; ARDHANA e FLEET, 2003; LEHRIAN e PATTERSON, 1983; SAMAH *et al.*, 1993; ROHAN, 1958; LOPEZ, 1983). Esta diversidade de microrganismos presentes nas amêndoas de cacau provém do ar, do contato direto destas com as mãos e ferramentas dos operários, do contato com outras amêndoas de cacau, do próprio cocho de fermentação, etc. Além disto, Gilbert (1980) apontou que a *Drosophila* e as formigas são importantes para transferência de leveduras e bactérias de um substrato a outro, sendo os microrganismos importantes fontes de alimento para estes insetos. Maravalhas (1966) afirma que no Brasil a *Drosophila* sp. é uma das principais transportadoras de *Candida krusei*, uma das espécies de leveduras predominantes na fermentação de cacau do Sul da Bahia e de outras regiões do mundo.

A ação microbiana durante o processo fermentativo solubiliza o material da polpa que envolve as amêndoas e produz uma cadeia de metabólitos finais, tais como álcoois e ácidos orgânicos, os quais difundem para dentro das amêndoas causando sua morte. Estas mudanças induzem uma variedade de reações bioquímicas nas amêndoas o que gera os precursores do *flavor* do chocolate (LEHRIAN e PATTERSON, 1983; JONES e JONES, 1984; HANSEN *et al.*, 1998; THOMPSON *et al.*, 2001). A sucessão microbiana começa quando em altas concentrações de açúcares, baixo pH e tensão de oxigênio favorecem o crescimento de leveduras que convertem os carboidratos da polpa em etanol, dominando o processo durante 48 horas (ARDHANA e FLEET, 2003). As bactérias lácticas também fermentam os açúcares e utilizam o ácido cítrico da polpa, seu crescimento é favorecido pela escassez de oxigênio e ligeiras elevações do pH e da temperatura, estas bactérias pertencem a dois grupos, homo e heterofermentativas, apresentando crescimento máximo em torno das 16-48h, a partir do início da fermentação (ROELOFSEN, 1958; ARDHANA e FLEET, 2003).

Com a desintegração da polpa que envolve as amêndoas e o revolvimento do cocho, a aeração da massa se torna maior e juntamente com os valores do pH, que devido à ação das leveduras reduz o ácido cítrico presente na polpa, favorece o crescimento das bactérias acéticas. Tais bactérias promovem a oxidação do etanol, produzidos inicialmente pelas leveduras a ácido acético, em uma reação

extremamente exotérmica, elevando a temperatura da massa fermentativa para patamares de 45 a 50°C. A alta temperatura é importante pelo seu efeito nas reações enzimáticas, necessárias para o desenvolvimento do aroma e sabor de chocolate. O ácido acético ao penetrar nos tecidos cotiledôneos promove a morte do embrião das amêndoas (48-72h), e juntamente com o etanol atuam sinergisticamente, causando a difusão de polifenóis nos tecidos cotiledonares, o que gera amêndoas de cacau bem fermentadas (QUESNEL, 1965; LEHRIAN e PATTERSON, 1983; DIAS, 1992; SCHWAN *et al.*, 1995; SCHWAN, 1998; ARDHANA e FLEET, 2003; NIELSEN *et al.*, 2005). Outras espécies de microrganismos como *Bacillus* e fungos filamentosos desenvolvem-se nos estágios finais da fermentação, mas segundo Ardhana e Fleet (2003) o seu papel ainda não está completamente elucidado.

Os efeitos favoráveis da fermentação do cacau são a produção de sabor e aromas típicos de cacau e chocolate, oxidação e condensação de polifenóis adstringentes em compostos solúveis, menos desagradáveis ao paladar, redução na concentração de proteínas que poderiam conferir sabor desagradável na torrefação das amêndoas, e pela redução na concentração de purinas que são muito amargas (DIAS, 1992). Segundo Humphries (1944), as vantagens da fermentação são a conversão do tanino em substâncias escuras, com melhoria do sabor e aroma; redução na percentagem de theobromina e o enriquecimento da amêndoa com vitamina D. Como desvantagens são enumerados a perda de matéria seca; perda de gordura; e a perda de proteínas e açúcares solúveis e sais minerais. O ritmo do desenvolvimento do sabor e do aroma característicos do cacau e chocolate é função do tempo que o embrião demanda para morrer e que os polifenóis são liberados de seus compartimentos celulares (ROHAN, 1958) sabe-se que este sabor típico surge após 44-46 horas do início da fermentação (DIAS, 1992).

O cacau brasileiro tem apresentado uma acidez elevada atribuída por Lopez e McDonald (1982), à insuficiência de aeração. Schwan *et al.*, (1995) investigaram o efeito da frequência, do número de revolvimentos sobre a fermentação e a qualidade do produto final brasileiro e confirmaram os estudos de Lopez e McDonald (1982), sugerindo revolvimentos freqüentes da massa fermentativa duas vezes ao dia, a cada 12 horas durante os sete dias do processo, gerando uma fermentação mais rápida

(120 horas) das amêndoas com melhores características organolépticas e de acidez aceitável.

Embora o crescimento dos microrganismos seja similar nos diversos países produtores de cacau do mundo, acredita-se que cada fermentação tem a sua característica própria (SAMAH *et al.*, 1993; COCOLIN *et al.*, 2000), e a qualidade do produto final das amêndoas de cacau fermentadas e secas variam de país a país, de fazenda a fazenda e de colheita a colheita (LOPEZ e DIMICK, 1995; NIELSEN *et al.*, 2005). Um maior entendimento da dinâmica microbiana de todo processo de fermentação de cacau, no Sul da Bahia é um passo essencial para o desenvolvimento de medidas que assegurem ao cacau uma maior qualidade e por conseqüência, aos chocolates desenvolvidos a partir deste.

2.2. Leveduras associadas à fermentação de cacau

As leveduras estão largamente distribuídas na natureza e tem capacidades metabólicas extremamente diversas. Estas podem utilizar uma larga cadeia de nutrientes sob variáveis condições ambientais (TORNAI-LEHOCZKI *et al.*, 2003) e tem sido descritas como importantes organismos contaminantes, especialmente em alimentos com baixo pH, alta concentração de açúcar ou de sal, em alimentos contendo sorbato e benzoato como conservantes, bem como na presença de álcool onde muitas espécies de bactérias são inibidas (EVANS *et al.*, 2004; PARAPHAILONG e FLEET, 1997; SENSES-ERGUL e OZBAS, 2006). Muitos fatores ambientais afetam o seu crescimento, mas a resposta a algumas condições particulares varia com a espécie (BETTS *et al.*, 1999; SENSES-ERGUL e OZBAS, 2006). Também tem sido relatado, que a contaminação de vários produtos com alto conteúdo de açúcar, tais como mel, frutas, concentrados de sucos de frutas, caldo de cana, frutas secas, geléias entre outros são causados pela atividade das leveduras (TOKOUKA, 1993; SENSES-ERGUL e OZBAS, 2006).

A larga variedade de condições presentes na fermentação de cacau em respeito à aeração, pH, concentração de etanol e substrato fornece nichos para muitas espécies de leveduras em cada processo fermentativo. Segundo ROMBOUTS (1953) as

leveduras correspondem a mais de 90% da microbiota total da fase alcoólica, destacando-se as espécies do gênero *Saccharomyces* (*S. theobromae*, *S. cerevisiae*, *S. anomalus*, *S. apiculatus*, *S. ellipoides*), considerando possível a existência de 16 espécies de leveduras atuando na fermentação, com as espécies de *Candida zeylanoids*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis castelli* e *Torulopsis holmii* associadas, e este número podendo variar. Roelofsen (1958) identificou 24 espécies agindo no cacau em fermentação do Oeste africano e Java entre estas estão os gêneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Trichosporon* e *Schizosaccharomyces*. Em estudos da diversidade de leveduras da fermentação de cacau da Costa do Marfim, Gauthier *et al.*, (1977) identificaram *Pichia membranefaciens* e *Saccharomyces cerevisiae*. Na Bahia, Schwan (1995) encontrou 12 espécies diferentes de leveduras comumente encontradas, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a espécie mais abundante. Estudos na Indonésia realizados por Ardhana e Fleet (2003) revelaram as espécies de *Kloeckera apis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, como as principais espécies da fermentação de cacau. E em trabalhos recentes feitos por Nielsen *et al.* (2005) foi demonstrado a presença das espécies *Hanseniaspora guilliermondii*, *C. krusei* e *P. membranifaciens* como as mais predominantes nas fermentações de cacau, de Gana.

As evidências disponíveis sugerem que as diferenças na população de leveduras pode ser tanto geográfica ou em função de práticas fermentativas. Sem dúvida pode-se especular que esta população, variável regionalmente, pode ser um dos fatores responsáveis pelas pequenas diferenças em sabor e aroma observadas em cacau de diferentes regiões. Esta especulação, no entanto, não foi confirmada por estudos realizados, em laboratórios (HOYNAK *et al.*, 1941) pois para os autores, a qualidade final do cacau depende muito mais do tipo de amêndoas e do ambiente físico da fermentação, do que do número e das espécies presentes.

As leveduras não estão presentes de uma só vez durante todo processo fermentativo, mas sim participam de uma sucessão. A sucessão pode ser mascarada pelo revolvimento das amêndoas, e pelo fato da massa fermentativa não ser homogênea em tempo ou espaço. Assim, alguns grupos de leveduras tais como *Saccharomyces* sp. dominam o processo em altas concentrações de açúcar e baixa

concentração de oxigênio. Em contraste, *Candida krusei* cresce sob condições mais aeróbicas e acredita-se também que as leveduras termófilas sejam dominantes durante as máximas temperaturas de calor, especialmente na superfície da massa fermentativa, enquanto às leveduras mesófilas dominariam o processo durante a fase inicial da fermentação e serão encontradas no centro da massa mais tarde do que na periferia. Muitas leveduras oxidam o oxigênio se o mesmo estiver disponível, são anaeróbicas facultativas e muitas espécies são variáveis (linhagens específicas) para assimilação de diversas fontes de carbono, de temperaturas de crescimento, e de outros importantes parâmetros fisiológicos (LEHRMAN e PATTERSON, 1983).

O papel dos microrganismos na fermentação do cacau ainda não foi completamente estabelecido, mas é possível atribuir claramente as mudanças químicas que ocorrem na polpa às leveduras, bactérias lácticas e acéticas. Sabe-se que mais do que 42 espécies de microrganismos têm sido identificados, e envolvidos com a fermentação de cacau, porém nem todos são verdadeiramente essenciais para o processo. O fato de as leveduras serem os agentes principais da fermentação do cacau é explicado por estas serem responsáveis pela quebra do ácido cítrico da polpa o que leva a um aumento no pH de 3,5 a 4,2, possibilitando o crescimento de bactérias; pela produção de etanol sob condições de baixo oxigênio e altas concentrações de açúcares, os quais são consumidos oxidativamente; pela produção de ácidos orgânicos (oxálico, fosfórico, succínico, málico e ácido acético) os quais permeabilizam e matam os cotilédones das amêndoas; pela produção de alguns compostos orgânicos voláteis que contribuem tanto para o *flavor* do chocolate, quanto para os precursores do *flavor* do chocolate; e por fim, pela secreção de pectinases, que reduzem a viscosidade da polpa, levando a uma maior aeração da massa fermentativa (SCHWAN, 1998).

Como citado acima, as leveduras utilizam diversos carboidratos como fonte de carbono, e logo suas características fisiológicas e bioquímicas podem ser avaliadas de acordo com testes de assimilação de açúcares e fermentação (KURTZMAN e FELL, 1998). Devido à sua ampla distribuição, em diversos ambientes, várias metodologias seletivas têm sido desenvolvidas para sua identificação, empregando

meios de cultura que permitem seu crescimento e que, porém inibem o crescimento de outros fungos e bactérias.

As técnicas morfológicas e bioquímicas de identificação de populações de leveduras foram amplamente desenvolvidas e utilizadas, para que desta forma possam ser avaliadas as estruturas físicas, as características celulares, a formação de esporos, as formas de reprodução e apresentação das colônias em meios de cultura dos organismos testados (YARROW, 1984). Uma técnica bastante utilizada é a réplica em meio sólido (SHIFRINE *et al.*,1954), desenvolvida por Lederberg e Lederberg (1952), e adaptada até os dias de hoje. Estes autores desenvolveram um método de “carimbo de réplica” que permitem a transferência de um teste padrão de crescimento microbiano, de uma placa de agar inicial a uma série de outras. Esta técnica utiliza compostos de carbono associados às outras avaliações bioquímicas, que fornecem assim o perfil bioquímico e fisiológico das amostras avaliadas que serão posteriormente comparadas e colocadas em chaves de identificação, onde as espécies podem ser então identificadas (YARROW, 1984). Os Lederbergs recomendaram seu método no geral para toda a rotina de testes que envolvem a inoculação repetitiva de muitos isolados em meios diferentes, devido a rapidez e simplicidade do procedimento, sendo útil para o estudo de assimilação de carbono nas leveduras, principalmente quando estudos de diversidade de população são realizados, envolvendo a manipulação e a identificação de um grande número de linhagens. Permitindo assim ganhar tempo, especialmente por utilizar uma grande quantidade de compostos de carbono.

O procedimento da replica permite um teste rápido de compostos novos para determinar sua susceptibilidade em diferentes finalidades, onde dois pré-requisitos são requeridos para cada um dos compostos utilizados no procedimento, primeiramente a pureza da amostra que deve ser suficiente, para que nenhum resultado falso positivo seja obtido à custa de contaminar compostos, e ainda deve-se assegurar que nenhuma interação ocorra devido a acúmulo e secreção de intermediários no metabolismo de um composto (SHIFRINE *et al.*,1954).

2.3. Provas moleculares

A ecologia microbiana é o estudo das interações entre microrganismos, e entre estes e o meio em que vivem caracterizando assim sua dinâmica (AMANN e LUDWIG, 2000). Atualmente é reconhecido que somente uma pequena parcela dos microrganismos podem ser isolados e caracterizados, sugerindo um vasto campo de pesquisa a ser explorado e compreendido, levando a um melhor entendimento da diversidade microbiológica na manutenção dos ecossistemas. (HAHN, 2001; FERRIS *et al.*, 1996; McCracken *et al.*, 2000). Os ecossistemas microbianos têm sido estudados por longos períodos, objetivando assim explorar a diversidade e analisar a estrutura destas comunidades. O estudo destas levanta questões sobre a composição, estrutura e estabilidade, assim como a atividade e função de seus habitantes.

A maioria dos microrganismos em amostras ambientais não é detectado através da microscopia convencional, pois estes aderem às partículas de solos e sedimentos tornando-se “invisíveis”. O uso de corantes fluorescentes, como DAPI e “*acridine orange*” tem produzido bons resultados, porém não fornecem nenhuma informação sobre quais espécies estão presentes. Os meios de cultivo seletivos também são utilizados, porém não são capazes de mimetizar as condições que microrganismos particulares requerem para sua proliferação em seu habitat natural (GIOVANNONI *et al.*, 1990; TORSVIK *et al.*, 1990). Assim, técnicas de microbiologia tradicionais são hoje, meios insuficientes para análises, por subestimarem a grande diversidade microbiana presente em amostras ambientais e não traduzirem o real comportamento microbiano que ocorre no meio ambiente (ROOSE-AMSALEG *et al.*, 2001). Sendo assim, estudos de ecologia microbiana, através de técnicas de biologia molecular, sugerem a enorme riqueza destas populações, e as grandes limitações das técnicas tradicionais de cultivo para explorar e analisar estas comunidades (TORVISK *et al.*, 1990). As técnicas moleculares para estudo da diversidade são hoje a grande chave para o estudo de microrganismos não cultiváveis e ainda desconhecidos que representam, às vezes, cerca de 80% ou mais, das populações em amostras ambientais complexas.

Estas técnicas permitem identificar e quantificar microrganismos pela análise de seus genes, possibilitando informações sobre a composição e função de comunidades. E o uso destas confere a versatilidade destas análises, seguida do estudo de microrganismos pelo o uso de ácidos nucléicos extraídos diretamente de amostras ambientais (OLIVEIRA, 2000; STAHAL e AMANN, 1991). Os ácidos nucléicos constituem o material biológico através do qual são realizadas análises filogenéticas (taxonômicas), tipagens de espécies e linhagens, e análises da diversidade de organismos em amostras complexas. A análise do DNA fornece informação sobre a composição genética de espécies, ou estrutura de comunidades microbianas, ao passo que a análise do RNA pode revelar a atividade metabólica inferindo a função de populações microbianas particulares (OLIVEIRA, 2000).

Para que estas análises sejam realizadas, os ácidos nucléicos precisam ser co-extraídos e isolados de outros constituintes celulares que se apresentam juntamente com a amostra. Muitas vezes, as suspensões destes ácidos necessitam passar ainda, por passos adicionais de purificação para eliminação de contaminantes como matéria orgânica, proteínas e polissacarídeos da solução. Essa descontaminação se faz necessária quando os contaminantes interferem em reações posteriores, como ampliações, hibridizações, digestões com enzimas de restrição entre outras (PIZA, 2002). Vários métodos de extração de amostras ambientais são avaliados na literatura, cada qual adaptado a diferentes categorias de amostras, tais como água (SOMERVILLE *et al.*, 1989), fezes de animais (MONNIER, *et al.*, 1996; HOLLAND *et al.*, 2000; CHAMBERS *et al.*, 2001; McCRAKEN *et al.*, 2001), solos e sedimentos (TSAI e OLSON, 1992; BERTHELET *et al.*, 1996; KRSEK e WELLINGTON, 1999), polpa de frutas (NIELSEN *et al.*, 2005) além de outras. Estes protocolos são compostos por alguns procedimentos básicos, necessários à desintegração e homogeneização de tecidos e células, à solubilização dos ácidos nucléicos, à separação destes ácidos de outros constituintes celulares e à sua precipitação. São protocolos que apresentam pequenas variações e podem ser mais ou menos convenientes a depender do propósito em função do tempo gasto, da quantidade e pureza dos ácidos nucléicos obtidos, do nível de degradação destes e da eficiência de lise das células-alvo (PIZA, 2002). A extração de DNA de amostras de

água, por exemplo, geralmente requer a concentração da biomassa microbiana por meio da filtração ou centrifugação de largos volumes de material (SOMERVILLE *et al.*, 1989). No caso de solos e sedimentos, pode ser adotada tanto a extração celular como a lise direta de células (McCRACKEN *et al.*, 2000).

As provas moleculares segundo Stahal e Amann (1991) apresentam vantagens por serem altamente específicas e utilizadas em condições adversas para detectar um gene ou seqüências de ácidos nucléicos de um organismo particular ou de um grupo de organismos; serem usadas para detectar e identificar organismos sem a necessidade de cultivo e isolamento em cultura pura; e por serem designadas e usadas para detectar organismos específicos ou grupos taxonômicos amplificados, como é o caso de provas de regiões alvo da molécula de RNA ribossomal (RNAr) com diferentes níveis de variabilidade. Estes métodos tiveram um impacto muito grande na identificação e caracterização de leveduras comparadas com os métodos tradicionais baseados nas características fenotípicas.

Embora a princípio, qualquer gene possa ser utilizado para estas análises moleculares de estudo de diversidade, a molécula de DNA que codifica os genes ribossomais 5S, 5.8S, 18S e 26S e as regiões não codificadoras IGS (*Internal intergenic spacer*) e ITS (*Internal transcribed spacer*) (apresentados na figura 1) são excelentes moléculas marcadoras para este propósito. Pois estão presentes na maior parte dos organismos eucariotos, apresentando regiões conservadas assim como regiões altamente variáveis, tornando possível o desenho de *primers* e sondas com diferentes níveis de especificidade (BALEIRAS-COUTO *et al.*, 1996; FERNANDEZ-ESPINAR *et al.*, 2000). Além disto, estas moléculas possuem informações de seqüências suficientes para inferência filogenética e estão presentes em grande número nas células, o que facilita sua detecção e cerca de 10.000 seqüências estão disponíveis nos bancos de dados de livre acesso, como *Genebank*.

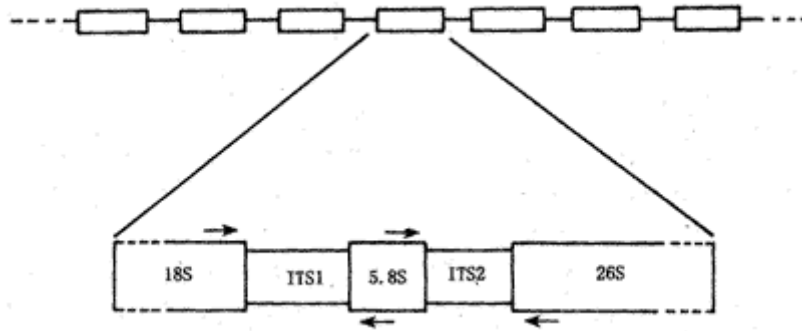


Figura 1- Esquema da localização dos trechos 18S, 5.8S e 26S ao longo do DNA ribossomal.

Estas seqüências de genes evoluíram, mostrando um baixo polimorfismo intraespecífico e alta variabilidade interespecífica, possibilitando assim a construção de árvores filogenéticas para estudo de evolução, com identificação de microrganismos conhecidos e ainda não conhecidos (COUTINHO *et al.*, 1999). Para estes estudos, de diversidade das populações de leveduras, a molécula de RNAr 26S (figura 2) vem sendo bastante utilizada, em estudos de monitoramento de fermentações espontâneas, como a do vinho (COCOLIN *et al.*, 2000; MILLS *et al.*, 2002) e da própria fermentação do cacau (NIELSEN *et al.*, 2005), além da análise deste gene também validar a identificação de leveduras em amostras de leite cru (COCOLIN *et al.*, 2002), de salsichas (GATTO e TORRIANI, 2004) e do café (MASOUD *et al.*, 2004).

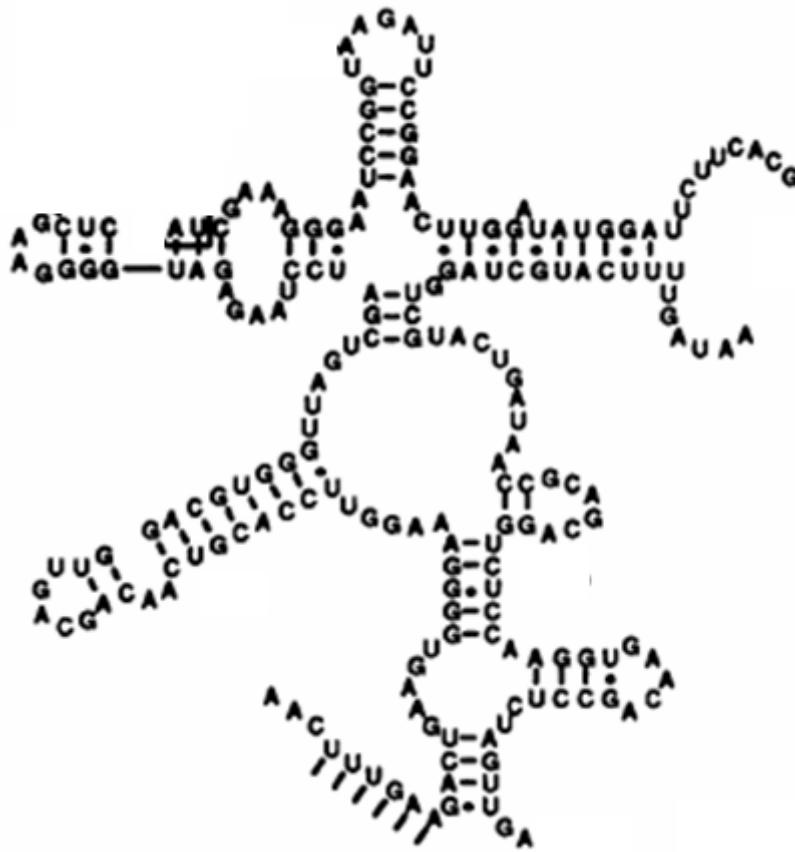


Figura 2- Estrutura do domínio D-1 da molécula de RNAr 26S da espécie *S. Cerevisiae*, um fragmento muito importante para estudo de populações de leveduras.

Várias técnicas são utilizadas para avaliar a diversidade microbiana pelo uso de seqüências do gene que codifica o RNAr a partir de amostras ambientais, porém o uso destas só se fez presente com a “reação em cadeia da polimerase” (PCR), que revolucionou a genética molecular por permitir a rápida clonagem e a análise do DNA (TSAI e OLSON, 1992; LI *et al.*, 1998). Desde os primeiros relatos descrevendo esta tecnologia, em meados de 1980, a PCR tem tido numerosas aplicações tanto nas pesquisas básicas como na clínica, e vem sendo aplicada em amostras de água, sedimento, e alimentos (TSAI e OLSON, 1991). A PCR é um método *in vitro* rápido e versátil para a amplificação de seqüências-alvo de DNA. Geralmente, esta é programada para permitir a amplificação seletiva de uma seqüência-alvo de DNA específica a partir de uma coleção heterogênea de DNA (por exemplo, DNA genômico total ou uma população complexa de cDNA). As principais vantagens desta são: a velocidade e facilidade de utilização; a sua sensibilidade, pois

é capaz de amplificar seqüências a partir de quantidades ínfimas do DNA-alvo e até mesmo do DNA de uma única célula (LI *et al.*, 1998); e por sua robustez, ou seja, por permitir a amplificação de seqüências específicas a partir de material no qual está gravemente degradado ou imerso em um meio onde o isolamento de DNA é problemático. Como desvantagens desta, nota-se a necessidade de informação sobre as seqüências-alvo de DNA e a infidelidade na replicação do DNA pela enzima Taq polimerase (STRACHAN e READ, 2002).

2.4. DGGE

As técnicas de *fingerprint* conseguem fornecer um perfil representativo da diversidade genética de comunidades microbianas de um ambiente específico, com base na separação física de fragmentos de ácidos nucléicos, através de uma matriz sólida que pode ser um polímero de agarose ou acrilamida (ERCOLINI, 2004). O uso destas vem sendo amplamente disseminada nos últimos anos, pois são metodologias rápidas e fáceis de se realizar e que permitem a análise simultânea de múltiplas amostras ambientais. Dentre estas técnicas destaca-se o DGGE, que é baseado na eletroforese de fragmentos de DNAr, amplificados por PCR, em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes de DNA (uréia e formamida) (MUYZER e SMALLA, 1998). Esta é uma metodologia que permite a separação de fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com seqüências de nucleotídeos diferentes (OLIVEIRA, 2000). Esta estratégia é um método que permite observar a estrutura de comunidades microbianas em amostras ambientais (COUTINHO *et al.*, 1999; SIGLER *et al.*, 2002), e talvez seja a técnica *fingerprint* de cultivo independente mais comumente utilizada para a caracterização e monitoramento de microrganismos em ecossistemas naturais (ERCOLINI, 2004).

O DGGE funciona a medida que fragmentos de DNA se movem através de géis de poliacrilamida contendo um gradiente crescente de desnaturantes, onde pequenas regiões denominadas domínios de desnaturação sofrem dissociação das fitas que compõem a dupla hélice do DNA, gerando moléculas parcialmente desnaturadas com mobilidade eletroforética retardada. Estas moléculas de DNA

continuam a se mover vagarosamente através das concentrações mais altas de desnaturantes e, desse modo, domínios de desnaturação adicionais sofrem dissociação das fitas. Variações na composição de bases dentro destes domínios alteram o seu comportamento de desnaturação, levando a diferenças no padrão de eletroforese no gel de gradiente desnaturante. Entretanto, quando o último domínio, ou o mais estável sofre desnaturação, o fragmento tem suas fitas completamente dissociadas e o poder de resolução do gel é perdido. Portanto, substituições de base no domínio da molécula de DNA com comportamento de desnaturação mais alto não podem ser detectadas por DGGE. Para contornar este problema, uma seqüência de DNA rica em GC (cerca de 40-45 bases) é acoplada a extremidade 5' do *forward primer*, no caso de fragmento amplificado por PCR. Desta maneira, o fragmento inteiro desnatura como um domínio único e para de migrar quando encontra seu T_m (*melting temperature*) no gel, enquanto a seqüência rica em GC permanece na configuração duplex, impedindo a completa separação da dupla fita da molécula (MYERS *et al.*, 1985; OLIVEIRA, 2000; ERCOLINI, 2004).

O DGGE foi originalmente desenvolvido e aplicado na pesquisa médica a fim de detectar, identificar e localizar mutações de ponto, naturais ou induzidas (FISHER e LERMAN, 1983; MYERS *et al.*, 1985). Recentemente é estabelecida como uma boa ferramenta e utilizada em muitos laboratórios que estudam ecologia microbiana. Esta técnica é de fato bastante versátil e tem sido utilizada para estudar estrutura e evolução de comunidades microbianas em solo, mar, rios e águas de lagos (ERCOLINI, 2004); comunidades complexas como biofilme bacteriano; para avaliar a distribuição sazonal e de populações, ao longo de um gradiente (van BEEK e PRIEST, 2002); para examinar diferenças entre bactérias habitadas no trato gastrintestinal de grandes variedades de animais, como ratos, coelhos, galinhas, porcos e humanos (SIMPSON *et al.*, 2000); e mais recentemente, na microbiologia dos alimentos (ERCOLINI, 2004). Esta ainda é ótima ferramenta para monitorar o enriquecimento e isolamento de bactérias, e para detecção de microheterogeneidade em códons de genes de RNAr. Por fim, o DGGE também é útil para comparar a eficácia e a reprodutibilidade de diferentes protocolos de extração de DNA (KRSEK e WELLINGTON, 1999).

Como muitos métodos moleculares, os passos envolvidos nas análises do DGGE são mais ou menos consistentes entre diferentes laboratórios, mas não padronizados. Em geral, os tamanhos de produtos de PCR analisados estão entre 200 e 600 pares de bases (pb) e a porcentagem de acrilamida do gel está entre 6% ou 8% e muitas corridas são realizadas na temperatura de 60° C, através de concentrações desnaturantes tão baixas quanto 20% a tão altas quanto 70%, ou mais (uma solução de 100% de desnaturantes é definida como 40% [vol/vol] de formamida e 7M de uréia) (SIGLER *et al.*, 2002). Segundo o mesmo autor, existe inconsistência na escolha da voltagem aplicada e no tempo de corrida utilizado para a elaboração do DGGE, descritas na literatura, em escalas mínimas de 455 V.h (130 V por 3.5h; COCOLIN *et al.*, 2001) a 2100 V.h (100 V por 21h; GEJMAN *et al.*, 1998).

Como já citado, para que o DGGE aconteça é extremamente necessário que o DNA seja extraído de uma mistura, contendo DNA de várias espécies numa dada amostra. Sucessivamente a mistura de DNA é usada como produto para ampliações por PCR de regiões variáveis de DNA de interesse taxonômico (como a região 26S, por exemplo), obtendo um produto que é uma mistura de amplificados das espécies presentes, todos estes de mesmo tamanho, mas com seqüências diferentes e que podem ser separados pelo DGGE. O resultado final é um *fingerprint* que é específico da amostra analisada e que contém uma série de bandas relativas às espécies microbianas presentes na amostra. A identificação destas espécies pode ser encontrada pela purificação e sequenciamento das bandas do perfil gerado pelo DGGE ou, ainda como uma alternativa ao sequenciamento pode ser construído um marcador molecular (*ladder*), usando os amplificados dos genes marcadores das espécies isoladas, representativamente. Esta identificação é realizada pela comparação da distância de migração dos amplificados no gel de DGGE com aquelas linhagens presentes na identificação *ladder* (Figura 3) (van BEEK e PRIEST, 2002; MEROTH *et al.*, 2003; ERCOLINI, 2004).

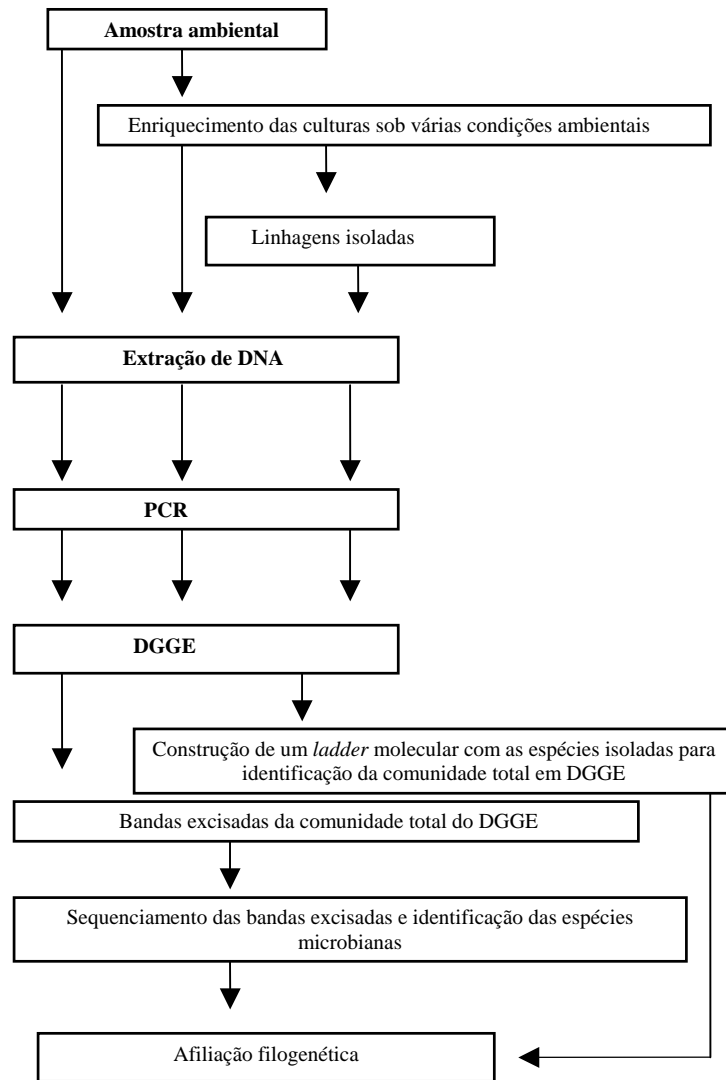


Figura 3. Fluxograma para aplicação do *fingerprint* de DGGE.

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm sido realizados nos países produtores de cacau, na tentativa de selecionar culturas iniciadoras, pré-selecionadas, apropriadas para conduzir uma fermentação de cacau de melhor qualidade, em um tempo relativamente mais curto. Schwan (1998) relatou que foi possível produzir produtos de cacau de aceitável qualidade, utilizando um coquetel microbiológico pré-definido, em cochos de cacau da CEPLAC, no Sul da Bahia, com resultados satisfatórios do teste de corte das amêndoas fermentadas. O pré-requisito para o desenvolvimento e aplicação desta tecnologia, implica em um profundo conhecimento, de quais microrganismos são os principais responsáveis pela fermentação do cacau da região e de como eles se comportam dentro de seu habitat.

Dentro deste propósito, a técnica molecular DGGE-PCR, oferece uma alternativa eficaz e relativamente barata, para examinar a composição microbiana de fermentações espontâneas de cacau, oferecendo a possibilidade de examinar um grande número de amostras de uma só vez, em um tempo relativamente curto, aumentando a compreensão da dinâmica microbiana durante todo o processo. Podendo ainda revelar a grande complexidade microbiana que envolve a fermentação de amêndoas de cacau, dando um importante passo para o desenvolvimento de medidas de controle de qualidade para a produção de cacau fino, de alta qualidade (ARDHANA e FLEET, 2003; NIELSEN *et al.*, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Aplicar o teste microbiológico tradicional e o DGGE-PCR para estudar a diversidade e a sucessão das espécies de leveduras encontradas na fermentação de cacau de fazendas da região Sul da Bahia, visando avaliar a dinâmica desta população durante todo o processo.

3.2. Objetivos específicos:

- Isolar e identificar leveduras presentes na fermentação de cacau de duas fazendas da região Sul da Bahia, através do teste de replica convencional;
- padronizar a extração do DNA total de cacau, de cada amostragem e de cada espécie isolada e identificada.
- padronizar a PCR para amplificação dos fragmentos do gene de DNAr 26S, das amostras coletadas;
- padronizar o DGGE-PCR;
- estudar a diversidade microbiana de leveduras, presente na fermentação de cacau da região, através do *fingerprint* de DGGE;
- identificar as bandas encontradas no perfil do gel de DGGE através da construção de um marcador molecular (*ladder*).

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Coleta das amêndoas de cacau, isolamento e purificação das colônias em cultura pura

As amostras de amêndoas de cacau (200-250g de cacau) foram coletadas de duas fazendas da região sul da Bahia, nos municípios de Ilhéus (fazenda São Jorge - coleta 1, cacau cultivado de maneira tradicional) e no município de Una (fazenda Ararauna – coleta 2, cacau orgânico). Nos cochos de fermentação, com capacidade para 800 kg, em intervalos de 12 h, durante os 6-7 dias do processamento da amêndoa de cacau, durante a fermentação. Estas coletas foram realizadas no início de outubro de 2004 (coleta 1) e no início de julho de 2005 (coleta 2). As amostras de polpa foram coletadas da porção central da massa fermentativa, a aproximadamente 40 cm da parede do cocho e 60 cm da superfície superior, e foram transferidas para sacos plásticos estéreis. As amêndoas foram despulpadas, misturadas em solução tampão (0,1 % de peptona, 0,1% de *Tween* 80%) através de um liquidificador e congeladas em freezer a -20° C, em triplicata. Foram retiradas alíquotas de 1 ml, de cada amostra coletada para a realização de diluições seriadas e posterior isolamento das linhagens. Diluições seriadas de 10^{-4} a 10^{-6} em solução salina foram plaqueadas em ágar Sabouraud 20% acrescido de cloranfenicol (100 mg/l) e as placas incubadas a 25° C, por 72 h. As colônias foram repicadas para obtenção de culturas puras, para serem posteriormente identificadas. E em seguida, estocadas em GYMP (2% de

glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1% de extrato de malte, 0,2 % de NaH_2PO_4 , 2% de ágar-ágar) em geladeira a 4°C, sob uma camada de óleo mineral estéril.

4.2. Determinação da temperatura e pH durante a fermentação do cacau

A temperatura foi determinada pela inserção de um termômetro calibrado, na parte central da massa fermentativa, a aproximadamente 40 cm da parede e 60 cm da superfície superior do cocho de fermentação. O pH foi aferido diretamente na polpa de cacau, após o despulpamento da amêndoa, por um eletrodo de um potenciômetro previamente calibrado, com tampão padrão pH 4,0 e 7,0.

4.3. Identificação dos isolados

A identificação dos isolados foi realizada pelo teste de replica (KURTZMAN e FELL, 1998), no Laboratório de Biotecnologia de Leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Onde cada linhagem pura isolada foi numerada e repicada em GYMP para identificação. Foi realizado para cada linhagem testes de assimilação de aproximadamente 38 compostos de carbono (glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melizitose, inulina, amido solúvel, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, etanol, glicerol, eritritol, galactitol, D-manitol, sorbitol, salicina, DL-lactato, succinato, citrato de sódio, M-inositol, metanol, hexadecano, glucosamina, xilitol, acetona, etilacetato, isopropanol, glucanato, N-acetilglucosamina). Além dos testes de morfologia, de assimilação de nitrogênio (nitrato/nitrito), a formação de compostos amilóides (iodo), o crescimento em meio com alta concentração de glicose (50%), a formação de ácidos, a assimilação de ácido acético, temperatura de crescimento (37° C ou 40° C), e a sensibilidade ou resistência a ciclohexamida.

4.4. Extração de DNA total a partir da polpa de cacau congelada

A extração de DNA da comunidade total microbiana foi realizada através de um protocolo desenvolvido no Laboratório de Monitoramento Ambiental, da UESC. As amostras de polpa congeladas, coletadas da fermentação em intervalos de 12 h, foram descongeladas, e 14 mL destas amostras foram transferidas para tubos de 15 mL (Falcon) e utilizadas para a extração do material genético. As amostras foram primeiramente centrifugadas a 5.000 rotações por minuto (rpm), em tampão TE (50mM Tris-HCl e 50mM EDTA, em pH 8,4), sendo o sobrenadante descartado. Em seguida foram realizadas lavagens com solução salina de tampão fosfato (PBS 1X) e ressuspensas em 1 mL de tampão TESC (100 mM Tris-HCl, pH 8,3). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e acrescidas de 10 µl de DMSO (dimetil sulfóxido) e homogeneizadas em vortex. Foram acrescentados 12 µL de proteinase K (20mg/ml) e 12 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 25%, com incubação de 60 min, a 37°C. Em seguida, foram realizados 3 ciclos de choque térmico em nitrogênio líquido e em água quente (80° C), alternadamente, e as amostras então, centrifugadas a 5.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado a amostra, igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) para em seguida, esta ser centrifugada a 4°C, 5.000 rpm por 10 minutos, com o sobrenadante coletado e transferido para tubos de 2 ml. Para precipitação do DNA adicionou-se isopropanol gelado e acetato de sódio e a solução foi deixada *over night* a - 20°C, precipitando. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C, 5.000 rpm por 10 minutos, o precipitado lavado com etanol 70% (a - 20°C), e centrifugado novamente, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi colocado em estufa (37° C), para secar, por aproximadamente 40 minutos, e então foi ressuspensado em 100 µL de tampão TE clássico (Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 1 mM, em pH 7,4). A purificação foi realizada por cromatografia de filtração em gel, com resina de Sephadex G-200 (*Amersham Biosciences*).

4.5. PCR

Um fragmento da região D-1 do gene 26S rRNA foi amplificado usando *primers* universais para eucariotos NL1GC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'; grampo GC sublinhado) e LS2 (5'- ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3') (COCOLIN *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2005). Todas as reações de PCR realizadas durante o trabalho foram realizadas em um *mix* de 1,25 U de *Taq* polimerase, 5 µL 10x de tampão de reação, 200 µL desoxinucleotídeo, 3,0 mM de MgCl₂, 1 µL DNA e água Milli-Q estéril, em um volume final de 50 µL, Por 5 min de desnaturação a 95 °C; 35 ciclos de 95 °C por 60 s, 52 °C por 45 s, 72 °C por 60 s; seguido por um passo de extensão final de 72 °C por 7 min. O tamanho e a quantidade do produto de PCR foram analisados a partir de 5 µL da amostra, através de eletroforese em gel de agarose 1%, corrida por 30 minutos a 100 V, e o gel corado por brometo de etídio.

4.6. Extração de DNA dos isolados de leveduras da fermentação de cacau

As culturas puras de cada espécie de levedura identificadas pelo teste microbiológico tradicional foram crescidas em caldo Sabouraud por 48 h. Em seguida, retirou-se 20 ml de amostra do caldo, centrifugando-a a 5.000 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante. As extrações de DNA dos isolados foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito (no item 4.5), para a extração do DNA total das amostras congeladas de polpa de cacau.

4.7. DGGE

A análise por DGGE foi realizada como descrito por Muyzer *et al.* (1993). O gel de poliacrilamida (6%), acrilamida: bisacrilamida (37,5: 1), em tampão TAE 1X (Tris Base 0,04 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 mM, em pH 8) foi preparado usando um gradiente de desnaturação de 35-65% (100% desnaturante correspondendo a 7M de uréia e 40% [vol/vol] de formamida). Este gel foi corrido

em TAE 1X, a 60 °C constante, por 15 min a 60V iniciais, e em seguida a 4 h por 200V. O gel foi visualizado após 30 min de coloração em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) e fotografado em transluminador UV. A elaboração de um marcador molecular (*ladder*) para o DGGE, utilizando as espécies isoladas da coleta 1 e 2, previamente identificadas pelos métodos clássicos microbiológicos foi realizado, em substituição ao sequenciamento das bandas excisadas do gel de DGGE (metodologia bastante utilizada para identificação molecular). Para isto, os DNAs dos isolados de cada espécie de levedura, foi extraído e estes amplificados por PCR, com os *primers* NL1 e LS2, para posterior análise em DGGE. De cada amplificado foi retirado 3 µl do produto final de PCR e estes misturados para ser então, corrido no DGGE, juntamente com as amostras de cada dia de coleta da fermentação de cacau, das coletas analisadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fermentação é caracterizada pelo metabolismo microbiano dos açúcares da polpa e pela produção significativa de etanol, ácido lático e ácido acético. A concentração de etanol tem seu pico no primeiro e segundo dia de fermentação, declinando quando este é metabolizado oxidativamente, a ácido acético. Nos cochos, a polpa das amêndoas se encontra extremamente ácida com o pH entre 3,7- 3,9, devido a presença de cerca de 2- 2,5% de ácido cítrico que é degradado, elevando os valores para 5,0 pH, no final do processo(LEHRIAN e PATTERSON, 1983). No nosso trabalho observou-se que o pH sofreu um sutil declínio nas primeiras 36h de fermentação da coleta 1 e, logo em seguida, um progressivo aumento, variando de 4,01 nas primeiras horas da fermentação a 3,7 e na safra temporã de 3,4 – 4,94 (Figura 4). Não foi verificada diferenças significativas entre os níveis de pH de uma coleta para outra, entre cacaus cultivados de maneiras diferentes. Em trabalhos recentes de Jespersen *et al.* (2004), uma diminuição do pH também foi relatado no primeiro dia da fermentação (24 h), seguido por um rápido aumento 72 h depois. O baixo pH é um dos fatores que favorecem a proliferação dos microrganismos na polpa de cacau, e assim como observado por outros autores, que estudaram a fermentação de cacau, resultados semelhantes aos nossos foram encontrados (LEHRIAN e PATTERSON 1983; SAMAH *et al.*, 1993; SCHWAN 1998; ARDHANA e FLEET, 2003).

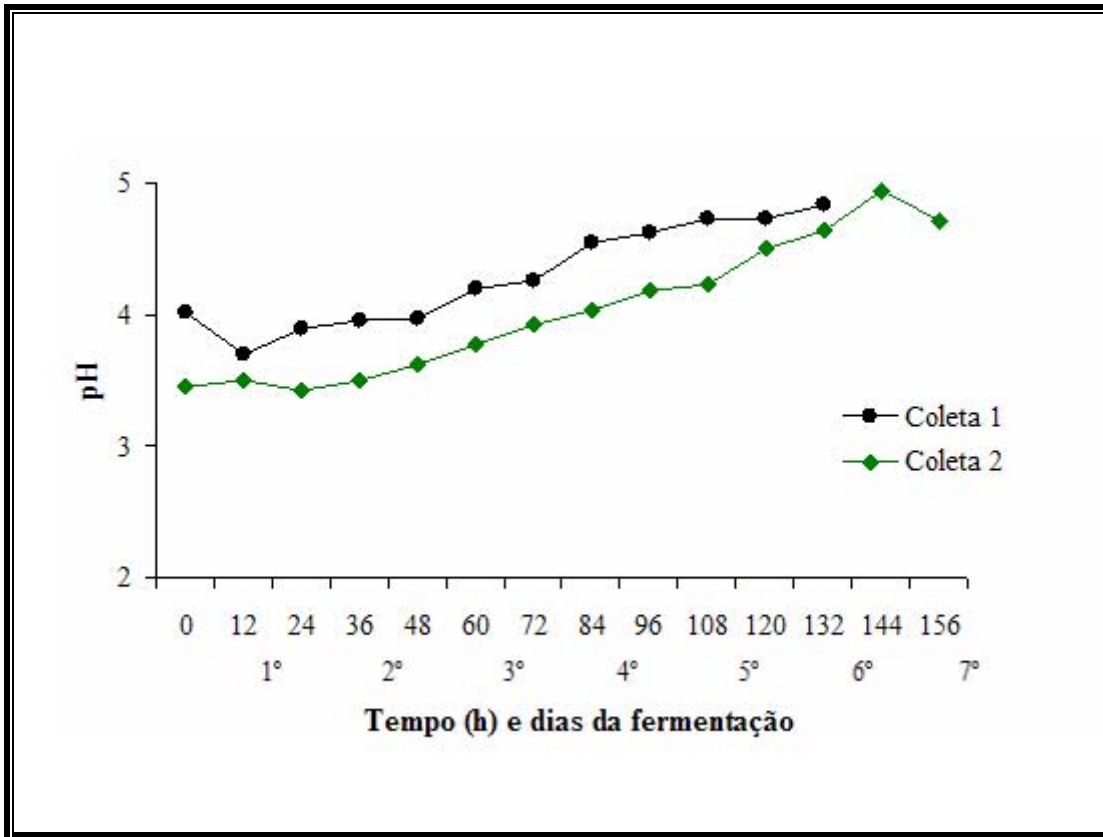


Figura 4. Variação do pH das amêndoas de cacau, no cocho de fermentação, ao longo dos dias do processo fermentativo. As coletas foram realizadas em intervalos de 12 h. Coleta 1- fazenda São Jorge (município de Ilhéus) e coleta 2- fazenda Ararauna (município de Una).

A temperatura no cocho de fermentação eleva-se lentamente no início do processo, aumentando rapidamente após as primeiras 48 h, quando atinge os valores de 40-45°C. Com o revolvimento da massa esta pode chegar a valores ainda mais altos, 50°C após 72 h de fermentação (LEHRIAN e PATTERSON 1983; SCHWAN 1995; ARDHANA e FLEET, 2003). Os resultados obtidos por este trabalho na coleta 1, de amêndoas fermentadas de forma tradicional, com cacau misturado e no verão apresentaram uma variação de temperatura de 32°C, nos estágios iniciais, até a máxima de 52°C encontradas no quinto e último dia da coleta (Figura 5). Já as coletas realizadas na fazenda Ararauna (coleta 2), cacau orgânico, as variações de temperatura foram de 25°C nas primeiras horas, até a máxima de 48°C no último dia do processo. A alta atividade metabólica dos microrganismos na polpa pode elevar a temperatura dentro do cocho para valores de 50°C, ou mais, até o final do processo

fermentativo (LEHRIAN e PETTERSON, 1983; LOPEZ e DIMICK, 1995). É importante ressaltar que a alta temperatura é fundamental pelo seu efeito nas reações enzimáticas, necessárias para o desenvolvimento do aroma e sabor aceitáveis de chocolate (QUESNEL, 1965).

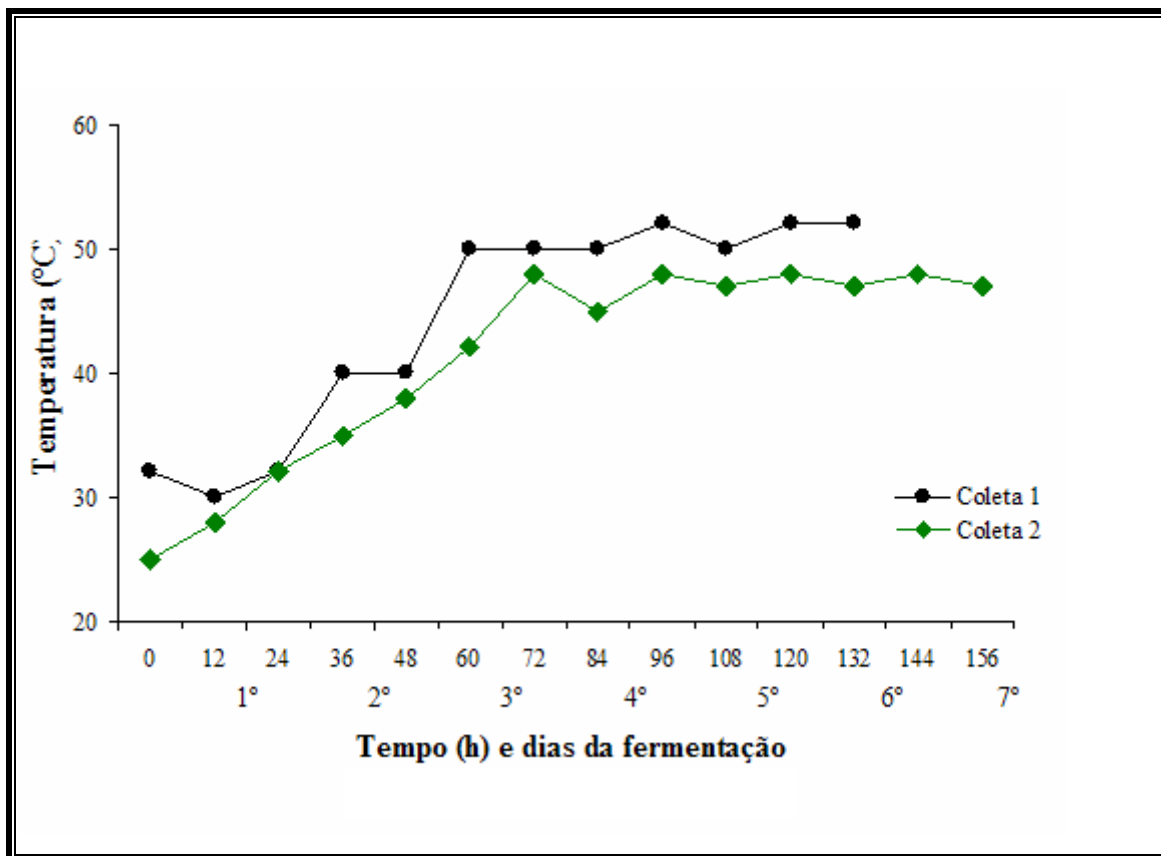


Figura 5. Variação da temperatura das amêndoas de cacau, no cocho de fermentação, ao longo dos dias do processo fermentativo. As coletas foram realizadas em intervalos de 12 h. Coleta 1- fazenda São Jorge (município de Ilhéus) e coleta 2- fazenda Ararauna (município de Una).

Conforme observado na figura 5, os valores máximos da temperatura, durante a 1ª coleta (verão) atingiram 52°C, enquanto na segunda coleta (inverno) 48°C, estes resultados sugerem que durante o verão há uma maior elevação da temperatura no cocho, podendo ser justificado por um maior crescimento microbiano e uma maior atividade metabólica destes microrganismos na polpa. Foi verificado também que, a partir do quarto dia de fermentação ocorreu uma pequena queda na temperatura da massa de cacau, sugerindo uma pequena baixa na atividade metabólica microbiana,

com uma marcante presença de fungos filamentosos correlacionados a este período (dados não mostrados). Alguns destes organismos podem não sobrevivem em temperaturas acima de 40°C e em altas concentrações de etanol, logo para alguns autores, a sua contribuição é restrita apenas, as primeiras 36h da fermentação (ROELOFSEN, 1958; LEHRIAN e PETTERSON, 1983; ARDHANA e FLEET, 2003). Outros trabalhos sugerem que os fungos filamentosos encontrados no final do processo são também responsáveis pelas transformações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação do cacau, com alta atividade pectinolítica associada, porém as exatidões destas funções e de como estes agem durante o processo, ainda hoje permanece desconhecida, sugerindo um campo a ser mais explorado e compreendido dentro da fermentação do cacau. Principalmente com o avanço e auxílio das ferramentas moleculares para estudos taxonômicos (SAMAH *et al*, 1993; SCHWAN *et al*, 1995; JESPERSEN *et al.*, 2004). Sabe-se que os fungos filamentosos são fontes potenciais de micotoxinas e representam uma ameaça à saúde do consumidor. Em cacau e derivados, a maior preocupação se concentra na presença da ocratoxina A, com relatos de sua ocorrência em diversos países. A presença de ocratoxina indica que em algum ponto do processo de produção, está havendo condições que favorecem o aparecimento destes fungos.

O controle de crescimento de fungos em frutas, já é largamente utilizado na rotina com aplicação de fungicidas, como uma nova alternativa. Hoje, por exemplo, na indústria do vinho encontra-se a utilização de espécies de leveduras como agentes de biocontrole naturais, e estas espécies normalmente estão associadas a superfícies de frutas, como uvas e o próprio cacau, apresentando forte atividade antifúngica (SUZZI *et al.*, 1995; FLEET, 2003). Leveduras como *Metschnikowia pulcherrima*, algumas espécies de *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, e algumas de *Saccharomyces* e *Zygosaccharomices*, a espécie *Candida oleophila*, por exemplo, já é registrada para uso comercial (DROBY *et al.*, 1998; FLEET, 2003).

Durante todos os dias de coleta (Tabela 1), realizadas durante as fermentações de cacau das fazendas da região foi isolado um total de 205 linhagens de leveduras. Através de avaliações macro e microscópicas, os perfis de identificação foram avaliados seguindo as chaves de identificação das espécies de KURTZMAN e FELL

(1998). As amostras foram agrupadas em 26 grupos de acordo com os perfis de assimilação de carboidratos e demais reações bioquímicas. As espécies identificadas foram divididas de acordo com as duas coletas realizadas, sendo apresentadas nas tabelas 2 e 4.

Tabela 1. Datas das coletas realizadas nas fazendas de cacau (2004 e 2005).

Coleta 1 (São Jorge)	Coleta 2 (Ararauna)
09/10/04 0 h (amostra nº. 1) 12 h (amostra nº. 2)	09/07/05 0 h (amostra nº. 12) 12 h (amostra nº. 13)
10/10/04 24 h (amostra nº. 3) 36 h (amostra nº. 4)	10/07/05 24 h (amostra nº. 14) 36 h (amostra nº. 15)
11/10/04 48 h (amostra nº. 4) 60 h (amostra nº. 5)	11/07/05 48 h (amostra nº. 16) 60 h (amostra nº. 17)
12/10/04 72 h (amostra nº. 6) 84 h (amostra nº. 7)	12/07/05 72 h (amostra nº. 18) 84 h (amostra nº. 19)
13/10/04 96 h (amostra nº. 8) 108 h (amostra nº. 9)	13/07/05 96 h (amostra nº. 20) 108 h (amostra nº. 21)
14/10/04 120 h (amostra nº. 10) 132 h não houve*	14/07/05 120 h (amostra nº. 22) 132 h (amostra nº. 23)
Não houve *	15/07/05 144 h (amostra nº. 24) 156 h (amostra nº. 25)

*cacau já fermentado.

Dos isolados durante a fermentação da fazenda São Jorge (coleta 1), 101 linhagens de leveduras foram agrupadas, em 19 grupos, separados por espécie (Tabela 2). Destas, as espécies predominantes durante os cinco dias de fermentação foram *P. membranifaciens* (22%) e *C. krusei* (20%), sendo estas isoladas em praticamente todos os tempos de coleta (0h – 108 h), como apresentadas na tabela 3. As espécies de *K. marxianus*, *K. apis* e a maioria das espécies de *Candida* foram isoladas nos estágios iniciais (0-24 h) da fermentação, ao passo que *C. krusei* e *Candida* sp. 3 que foram encontradas nos estágios finais do processo (Tabela 3). No

segundo dia de fermentação houve um rápido aumento no número dos isolados de *P. membranifaciens*, seguido pelo declínio desta mesma espécie e da comunidade total de leveduras presentes na massa do cacau, até o quarto dia da fermentação. Onde somente *P. membranifaciens* foi isolada, logo após houve uma retomada no crescimento dos isolados de *P. membranifaciens*, *C. krusei*, *R. mucilaginosa* e *Starmerella* sp. Os isolados de *S. cerevisiae* foram encontrados apenas na fase alcoólica, de 12-36 h, da fermentação e *M. reukaufii* isolada apenas uma vez, no segundo dia do processamento do cacau.

Tabela 2. Grupos e identificação de leveduras isoladas durante a fermentação do cacau da fazenda São Jorge, em outubro de 2004, no município de Ilhéus – BA (coleta 1).

Grupos Coleta 1	Número de isolados (n=101)	Identificação
I	3	<i>Candida</i> sp. 3
II	2	<i>Candida</i> sp. 4
III	1	<i>Candida</i> sp. 6
IV	1	<i>Candida</i> sp. 7
V	1	<i>Candida bombicola</i>
VI	1	<i>Candida parapsilosis</i>
VII	8	<i>Candida gropengiesseri similar</i>
VIII	20	<i>Candida krusei</i>
IX	1	<i>Cryptococcus</i> sp.
X	1	<i>Cryptococcus bhutanensis</i>
XI	3	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
XII	1	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
XIII	6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
XIV	22	<i>Pichia membranifaciens</i>
XV	8	<i>Pichia kluyveri</i>
XVI	4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
XVII	4	<i>Starmerella</i> sp.1
XVIII	5	<i>Starmerella</i> sp. 2
XIX	9	<i>Kloeckera apis</i>

Tabela 3. Sucessão de leveduras durante a fermentação de cacau da coleta 1.

Espécies	Número dos isolados em cada tempo de coleta:									
	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	96h	108h
Candida sp. 3	1									2
Candida sp. 4			2							
Candida sp. 6		1								
Candida sp.7		1								
<i>C. bombicola</i>	1									
<i>C. parapsilosis</i>	1									
<i>C. gropengiesseri</i>		4	4							
<i>C. krusei</i>		6	3	1	2			3	1	4
Cryptococcus sp.									1	
<i>C. bhutanensis</i>	1									
<i>K. marxianus</i>	1	1	1							
<i>M. reukaufii</i>					1					
<i>S. cerevisiae</i>		2		1	3					
<i>P. membranifaciens</i>		1	1	9	2	1	1	2	3	2
<i>P. kluyveri</i>		3	1	2	1					1
<i>R. mucilaginosa</i>					1			1	2	
Starmerella sp. 2	1	1	1							2
Starmerella sp.				3		1				
<i>K. apis</i>	2	4	2		1					

Na coleta 2 foram isoladas 104 linhagens de leveduras, agrupadas em 14 espécies (Tabela 4), com uma menor diversidade relatada, em relação a coleta 1 (Tabela 2). As espécies predominantemente identificadas nesta coleta foram as mesmas que as obtidas na coleta anterior, respectivamente *P. membranifaciens* (46,1%), *C. krusei* (26%) e *K. apis* (7,6%) presentes durante todo o processo. Porém, a dominância de *P. membranifaciens*, na coleta 2 foi muito maior em relação à anterior, nesta coleta na faz. Ararauna esta espécie dominou praticamente sozinha a fermentação, do 2º ao 4º dia, juntamente com pequenos números de isolados de *C. krusei* (Tabela 5). *K. apis* foi praticamente isolada nas primeiras horas do processo (12 h), e duas espécies de *S. exiguus* similar foram detectadas apenas no primeiro dia da coleta 2. A espécie *S. cerevisiae* principal responsável pela fermentação alcoólica de diversas fermentações espontâneas, como a do vinho e do próprio cacau, não foi encontrada nesta coleta, assim como outras espécies, *C. gropengiesseri*, *K. marxianus*, *C. bombicola*, *C. buthanensis* e *R. mucilaginosa* encontradas somente na

Sabendo que o *flavor* do chocolate depende de três fatores diretos: da genética da qualidade do cacau, do ambiente e do beneficiamento primário do cacau (DIAS, 1992). Conseqüentemente, as leveduras da fermentação contribuem diretamente para o completo aroma de cacau, na amêndoa seca de cacau (produto final). E logo, o predomínio de certas espécies durante a fermentação deve-se as diferentes condições em que estas são fermentadas, nas diferentes partes do mundo. O que torna necessário, investigações sobre a microbiota da fermentação e suas variações nos diferentes locais produtores de cacau, uma vez que, as leveduras são de fundamental importância para a qualidade do produto final de cacau (ROMBOUTS, 1953, DIAS, 1992).

A diversidade da comunidade de leveduras presentes nas fermentações de cacau é estudada, desde 1899 e tem sido revisada por diversos autores, como Knapp (1937), Rombouts (1952), Schwan *et al.* (1995), Ardhana e Fleet (2003), Jespersen *et al.* (2005) e Nielsen *et al.* (2005), nos diferentes países produtores do mundo. A diversidade das espécies isoladas no nosso estudo quando comparada as encontradas em trabalhos anteriores em Itabuna e Ilhéus foi muito mais elevada. De Camargo *et al.* (1963), encontraram como as espécies de leveduras mais abundantes durante a fermentação de cacau da Bahia, *C. krusei*, *Geotrichum candidum* e *C. vivi*, Schwan (1995), em trabalho posterior encontrou uma diversidade de 12 espécies diferentes relacionadas, com a predominância de duas linhagens de *S. cerevisiae* durante todo o processo, principalmente durante a fase alcoólica, seguida pelas espécies de *K. apiculata*, *K. marxianus* e *C. rugosa*, com *K. apiculata*, crescendo durante as fases iniciais, porém declinando rapidamente a partir do segundo dia em diante. As espécies de *K. marxianus* cresceram vagarosamente no começo da fermentação, e também declinaram gradualmente no final do processo, este declínio refletido pela intolerância de etanol em concentrações acima de 4% (vol/vol), destas linhagens (Schwan, 1995). Ainda em trabalhos na Bahia, pequenos números de *P. fermentans* e *Lodderomyces elongisporus* foram isoladas somente nas fases iniciais do processo, com as espécies de *Candida* sp., aumentando em número após 24 h, com *C. rugosa* presente em temperaturas de até 50°C, juntamente com as espécies de *Torulospora*

pretoriensis e *Kluyveromices thermotolerans* que também foram isoladas nesta temperatura.

O teste microbiológico tradicional utilizado por este trabalho para estudo de diversidade demonstrou que a comunidade e a sucessão microbiana de leveduras associadas à fermentação de cacau de das fazendas do Sul da Bahia (Tabelas 3 e 5) apresentaram mudanças significantes na última década. Com *P. membranifaciens*, sendo a espécie predominantemente encontrada nas duas coletas realizadas, demonstrando ser esta, a principal espécie responsável pelas fermentações de cacau das fazendas estudadas, ao contrário de *S. cerevisiae* encontrada em estudos anteriores na região (citados acima).

As espécies *C. bombicola* (também conhecida como *Starmerella bombicola*), *C. parapsilosis*, *C. gropengiesseri*, *C. floridula*, *M. reukaufii*, *P. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *R. mucilaginosa* (também conhecida como *R. rubra*), *K. apis* (também conhecida como *Hanseniaspora guillermondii*), *P. antarctica*, *S. exiguus*, *C. bhutanensis*, *C. flavus*, identificadas por este trabalho, não foram isoladas em outros trabalhos anteriores realizados na Bahia.

Em estudos de dinâmica de população associadas a fermentação de cacau, conduzidos em outros países do mundo foram encontradas espécies correlacionadas ao nosso estudo. Porém com diversidade menor relatada, provavelmente devido às diferenças da espécie do cacau e dos métodos de processamento utilizados na região específica. Na Indonésia, por exemplo, foi relatada a ocorrência das espécies de *Pichia*, *Schizosaccharomices*, *Candida* e *Kloeckera*, com a dominância de *S. cerevisiae* (ROELOFSEN, 1958). Em trabalhos mais recentes de Ardhana e Fleet (2003), *K. apis* foi a espécie dominante durante as primeiras 36 horas da fermentação, constituindo 70-90% da população de leveduras nesta fase. Seguida pelas espécies de *S. cerevisiae* e *C. tropicalis* que após *K. apis* foram as leveduras mais significativas da fermentação de cacau da Indonésia, dominando os estágios finais do processo. Outras espécies de *Kloeckera* também foram relatadas, como *K. javanica* e *K. africana*, além da presença de outras *Candida* de menor contribuição para o processo, como *C. pelliculosa* e *C. humicola*, e de espécies de *Rhodotorula rubra* (também isolada por este trabalho na Bahia) e *R. glutins*.

No Oeste Africano, em trabalhos realizados com diferentes métodos de fermentação de cacau da região, fermentação em pilha (*heap*) e a fermentação em bandejas (*trays*), um total de 496 isolados de leveduras foi identificado, baseado em identificações por teste convencional microbiológico e por ampliações da região ITS1-5,8S rDNA-ITS2, confirmadas por sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade 26S do rDNA. Neste estudo foi encontrado em fermentações *heap*, a predominância das espécies de *C. krusei*, seguida por *P. membranefaciens*, *P. kluyveri*, *H. guilliermondii* e *Trichosporon asahii*. Uma vez que em fermentações *tray* as espécies de *S. cerevisiae* e *P. membranefaciens* foram as espécies predominante durante o processo, seguidas em menor numero pelas espécies de *C. krusei*, *P. kluyveri* e *H. guilliermondii*, com outras espécies de menor importância relacionadas, como *C. stellimalicola*, *C. quercitrusa* e *Rhodotorula glutinis* (JESPERSEN *et al.*, 2004). Segundo o autor, os resultados obtidos pelo referido estudo, prova que a fermentação de amêndoas de cacau do Oeste Africano é bastante heterogênea e depende de variações sazonais, tamanho da pilha ou monte de amêndoas, métodos de produção, etc. E estas variações refletem na contagem máxima de células de leveduras, na sucessão destas e na identificação das espécies predominantes, influenciando na qualidade das amêndoas.

As mudanças na população de leveduras, durante a sucessão microbiana, no estudo da fermentação de cacau de fazendas da região Sul da Bahia, caracterizada por este trabalho, pode estar relacionada com mudanças no microambiente nas últimas décadas na região, além ainda da disponibilidade de nutrientes, de pH, da temperatura, presença e concentração de ácidos orgânicos, bem como, pela concentração de oxigênio presente na massa fermentativa. A presença e relativa dominância de *P. membranefaciens* durante as fermentações de cacau pode estar associada à tolerância da espécie, a um baixo pH, e a altas concentrações de ácidos orgânicos, como o ácido acético (HOCKING, 1996; VEIGA e MADEIRA-LOPES, 2000). Esta justificativa é bastante plausível, uma vez que, o produto final de cacau na Bahia é caracterizado há algumas décadas, como ácido. A levedura *P. membranefaciens*, também está relacionada com a inibição do crescimento de *Hanseniaspora* spp. em frutas, provavelmente, devido a competição por substrato ou

produção de substâncias inibidoras, logo que as espécies de *Hanseniaspora* são sensíveis a etanol e outros metabólitos secundários (ABRANCHES *et al.*, 2001). As linhagens de *P. membranifaciens* e *P. kluyveri* também têm sido relatadas como produtoras de micocinas que inibem outras leveduras, como *S. cerevisiae* e *Candida* spp. e certas linhagens de *C. krusei* têm se apresentado ser muito mais tolerantes a presença de ácidos orgânicos do que *S. cerevisiae* (JESPERSEN *et al.*, 2004).

Algumas linhagens de *Candida*, *Cryptococcus* e *Starmerella* foram identificadas até gênero pelo teste microbiológico padrão utilizado por este trabalho, tornando necessário o sequenciamento destas para a identificação completa em espécie. *P. kluyveri* e *C. krusei*, devido a grande similaridade nos seus perfis de assimilação de carbono, metabolizaram etanol e glicerol, assim como D-manitol e D-glucitol, e a diferenciação só pôde ser realizada com base em suas características microscópicas, pela detecção de presença ou ausência de pseudo-hifas celulares. Os perfis de assimilação de carbono das espécies predominantes identificadas pelo teste tradicional de replica, nas duas coletas realizadas são apresentados a seguir, nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Perfil de assimilação de compostos de carbono das espécies de leveduras dominantes, durante a fermentação do cacau da faz. São Jorge-2004 (coleta 1).

Compostos de Carbono	Assimilação (razão entre os isolados positivos) ^a					
	<i>C. krusei</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>K. apis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. gropengiesseri</i>	<i>P. Kluyveri</i>
Glicose	20/20	22/22	9/9	6/6	8/8	8/8
Galactose	–	–	–	5/6	–	–
L-Sorbose	–	–	–	–	8/8	–
Maltose	–	–	–	4/6	–	–
Sacarose	–	–	2/9	6/6	8/8	–
Celobiose	–	–	9/9	–	–	–
Trealose	–	–	–	6/6	7/8	–
Lactose	–	–	–	–	–	–
Melibiose	–	–	–	–	–	–
Rafinose	–	–	–	6/6	8/8	–
Melizitose	–	–	–	–	–	–
Inulina	–	–	–	–	8/8	–
Amido solúvel	–	–	–	–	–	–
D- Xilose	–	–	–	–	–	2/8
L-Arabinose	–	–	–	–	–	–
D-Ribose	–	–	–	–	–	–
L-Ramnose	–	–	–	–	–	–
Etanol	20/20	22/22	–	2/6	–	8/8
Glicerol	20/20	–	–	–	1/8	8/8
Eritritol	–	–	–	–	–	1/8
Galactiol	–	–	–	–	–	–
D-Manitol	7/20	4/22	–	–	8/8	2/8
D-Glucitol	1/20	–	–	1/6	8/8	2/8
Salicina	–	–	9/9	–	1/8	–
DL-Lactato	20/20	19/22	1/9	3/6	4/8	7/8
Succinato	20/20	11/22	–	–	–	7/8
Citrato	–	–	–	–	–	–
M-Inositol	–	–	–	–	–	–
Metanol	–	–	–	–	–	–
Hexadecano	–	–	–	–	–	–
Glucosamina	–	–	–	–	–	6/8
Xilitol	–	–	–	–	7/8	1/8
Acetona	–	–	–	–	–	–
Etilacetato	20/20	22/22	–	–	–	7/8
Isopropanol	–	–	–	–	–	–
Gluconato	–	–	7/9	–	1/8	–
N-acetilglucosamina	20/20	–	–	–	–	3/8

^a Número de isolados positivos/número total de isolados

Tabela 7. Perfil de assimilação de compostos de carbono das espécies de leveduras dominantes, durante a fermentação do cacau da faz. Ararauna -2005 (coleta 2).

Compostos de Carbono	Assimilação (razão entre os isolados positivos) ^a			
	<i>C. krusei</i>	<i>P. membranefaciens</i>	<i>K. apis</i>	<i>P. Kluyveri</i>
Glicose	27/27	48/48	8/8	6/6
Galactose	—	—	—	—
L-Sorbose	6/27	—	—	4/6
Maltose	—	—	—	—
Sacarose	—	—	—	—
Celbiose	—	—	8/8	—
Trealose	—	—	—	—
Lactose	—	—	—	—
Melibiose	—	—	—	—
Rafinose	—	—	—	—
Melizitose	—	—	—	—
Inulina	—	—	—	—
Amido solúvel	—	—	—	—
D- Xilose	2/27	—	—	1/6
L-Arabinose	—	—	—	—
D-Ribose	—	—	—	—
L-Ramnose	—	—	—	—
Etanol	27/27	48/48	—	6/6
Glicerol	27/27	6/48	—	6/6
Eritritol	—	—	—	—
Galactiol	—	—	—	—
D-Manitol	—	—	—	—
D-Glucitol	—	—	—	—
Salicina	—	—	8/8	—
DL-Lactato	21/27	20/48	—	6/6
Succinato	27/27	19/48	—	6/6
Citrato	1/27	2/48	—	—
M-Inositol	—	—	—	—
Metanol	—	—	—	—
Hexadecano	—	—	—	—
Glucosamina	8/27	2/48	—	1/6
Xilitol	3/27	—	—	1/6
Acetona	—	—	—	—
Etilacetato	26/27	46/48	—	6/6
Isopropanol	4/27	—	—	—
Gluconato	2/27	—	8/8	—
N-Acetilglucosamina	17/27	9/48	—	2/6

^a Número de isolados positivos/número total de isolados

Com o objetivo principal de aplicar o DGGE-PCR, para caracterizar a diversidade da população de leveduras presentes durante a fermentação de cacau, da região Sul da Bahia, este trabalhou buscando a otimização de um protocolo de extração de DNA, eficiente, para amostras de polpa de cacau congeladas, coletadas nos diferentes intervalos (a cada 12h), durante as coletas 1 e 2 (Tabela 1). Para isto foi proposto um simples e rápido método de extração de DNA, baseado no conhecimento prévio da estrutura celular das leveduras e dos procedimentos básicos necessários a desintegração, homogeneização de tecidos, células e solubilização dos ácidos nucléicos (FERREIRA, 2004; NIELSEN *et al.*, 2005). Segundo o mesmo autor, a liofilização da polpa de cacau é a melhor alternativa para preservação das amostras, antes destas serem utilizadas em posteriores análises moleculares. Esta metodologia não pôde ser empregada em nossos experimentos, e as polpas de cacau foram então congeladas.

O primeiro passo na execução do protocolo de isolamento de DNA total da polpa, desenvolvido para este estudo foi descongelar as amostras e centrifugá-las com PBS 1X, em sucessivas lavagens, a fim de retirar toda a água e matéria orgânica agregada. Para iniciar e facilitar o rompimento das células microbianas (para que os DNAs sejam liberados em solução) foi utilizado métodos eficientes de rompimento de parede e membrana celular. Para a lise física, foi utilizado a maceração em nitrogênio líquido e o choque térmico em nitrogênio e água quente a 80° C. Para lise enzimática, foi realizado tratamento com proteinase K e, a lise química por adição de SDS. Estes passos tornaram-se necessários, uma vez que, células de leveduras apresentam parede celular bastante rígida e de difícil desintegração, devido à presença de cerca de 30% de mananas, 30% de glicanas e 12,5% de proteínas (como quitina) (FLEURI e SATO, 2005). A solubilização do DNA foi procedida separando-os dos outros constituintes celulares, como proteínas, lipídios, polissacarídeos e restos de membranas por centrifugação, simultaneamente à desintegração das células, pelo uso do detergente SDS. Esta molécula é anfipática, e capaz de dissolver lipídios de membrana, solubilizar proteínas de membrana, dissociar proteínas dos ácidos nucléicos e solubilizar proteínas que recobrem o DNA, além de, ainda inibir a ação de nucleases. Esta última função, também encontrada no reagente EDTA,

comumente utilizado no preparo de tampão de extração (TE), necessário para que não ocorra degradação do DNA durante e após a realização do isolamento deste (PIZA, 2002). Em recentes estudos moleculares de fermentação de cacau, o reagente CTAB foi utilizado durante a extração, substituindo o SDS, seguido pela adição de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), para remoção de impurezas do DNA (NIELSEN *et al.*, 2005).

O fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), também foi utilizado neste protocolo, permitindo a interação deste com as proteínas do DNA, desnaturando-as, e permitindo assim o seu isolamento, a partir de uma mistura complexa, presente nas amostras da polpa. Para o passo de precipitação, que promove a agregação entre as moléculas deste ácido nucléico foi adicionado, solução de acetato de sódio (3M) concentrada e isopropanol, à solução para que estes neutralizem as cargas negativas (fosfatos) destes ácidos, promovendo sua compactação. A dessalinização da amostra foi realizada após 16h de precipitação, através de lavagens com etanol 70%, seguida por centrifugações da amostra, para que enfim, o DNA fosse ressuspendido em volumes adequados de TE (150 µl).

Como certificado por alguns autores que estudaram comunidades microbianas complexas, utilizando métodos de cultivo independentes, o isolamento de DNA diretamente da amostra ambiental deve ser seguido por um ou mais, passos extras de purificação, para remoção de substâncias contaminantes da amostra, que possam interferir em posteriores reações, como a PCR (BERTHELET *et al.*, 1996; MONNIER *et al.*, 1996; KRSEK e WELLINGTON, 1999; MCCRACKEN *et al.*, 2000). A eliminação dos contaminantes presentes na polpa de cacau (como as enzimas proteolíticas, as longas cadeias de carboidratos, mucilagem, entre outros) foi realizada neste trabalho, por cromatografia de filtração em gel. Esta promove a purificação da amostra, separando os componentes de uma mistura através de cromatografia e esta separação se baseia na migração diferencial dos componentes arrastadas pelo fluxo de uma fase móvel (líquida ou gasosa) em uma fase fixa (papel ou resina). Os resultados obtidos, através dos extratos de DNA não purificados com *Sephadex*, analisados neste trabalho (Figura 5), em gel de agarose ajudaram a confirmar, a necessidade de um passo adicional de purificação para obtenção de

produtos de DNA puro e pouco degradado. Todas as amostras, submetidas à purificação com *Sephadex*, apresentaram bons resultados nos géis de agarose quanto a pureza e degradação, podendo ser utilizadas para amplificar regiões específicas de identificação de leveduras, e posterior análise por DGGE. A cromatografia utilizando resina de *Sephadex*, para purificar produtos de DNA são colunas, formadas por esferas porosas que podem ser de tamanhos variados, por onde partículas de diversos tamanhos moleculares penetram nos poros internos destas, em diferentes graus, percorrendo a coluna com velocidades diferentes: moléculas pequenas penetram nos poros e são retardadas na coluna, enquanto moléculas maiores não conseguem penetrar nestes, passando mais rapidamente pela coluna (PIZA, 2002).

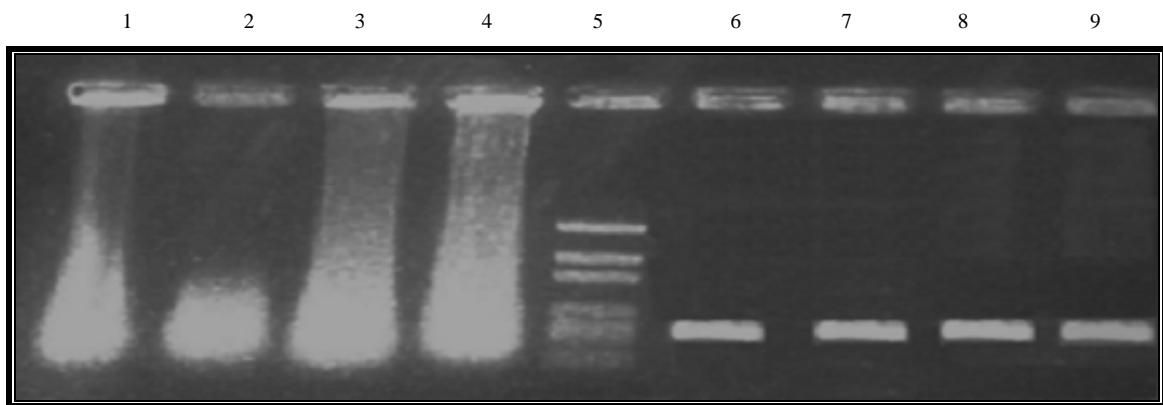


Figura 5: Gel de agarose 0,8%, para análise de DNA extraído, através de protocolo desenvolvido neste estudo da população de leveduras presentes na polpa de cacau congelada, nos diferentes intervalos de coleta. As canaletas 1-4 apresentam amostras extraídas sem o passo de purificação com *Sephadex*, a canaleta 5 padrão de peso molecular pGEM (cortado com a enzima *EcoR V*), e de 6-9, as mesmas amostras das canaletas 1-4, porém purificadas com *Sephadex*.

O protocolo de extração de DNA de polpa de cacau, padronizado acima foi de simples e rápida execução, além de bastante viável economicamente para analisar um determinado número de amostras, em substituição aos kits de extração de DNA, que são muito mais caros e, às vezes, não se adequam as necessidades impostas pela amostra. Com este protocolo foi possível extrair 11 amostras de DNA da coleta 1, durante os 5 dias de coleta (de 12 em 12h), e 14 na segunda, durante os 7 dias de coleta (de 12 em 12h). Estas amostras foram numeradas de 1-25, e de cada uma

destas foram amplificados os fragmentos da região D-1 do gene 26S de RNAr, pela reação de PCR. *Primers* universais para eucarioto NL1GC e LS2 amplificaram um fragmento de aproximadamente 250 pb, visualizados em gel de agarose 1%, com as 11 amostras (extratos de DNA) da coleta 1 amplificadas, apresentando bandas consistentes, definidas e fortes (Figura 6), para serem utilizadas em DGGE.

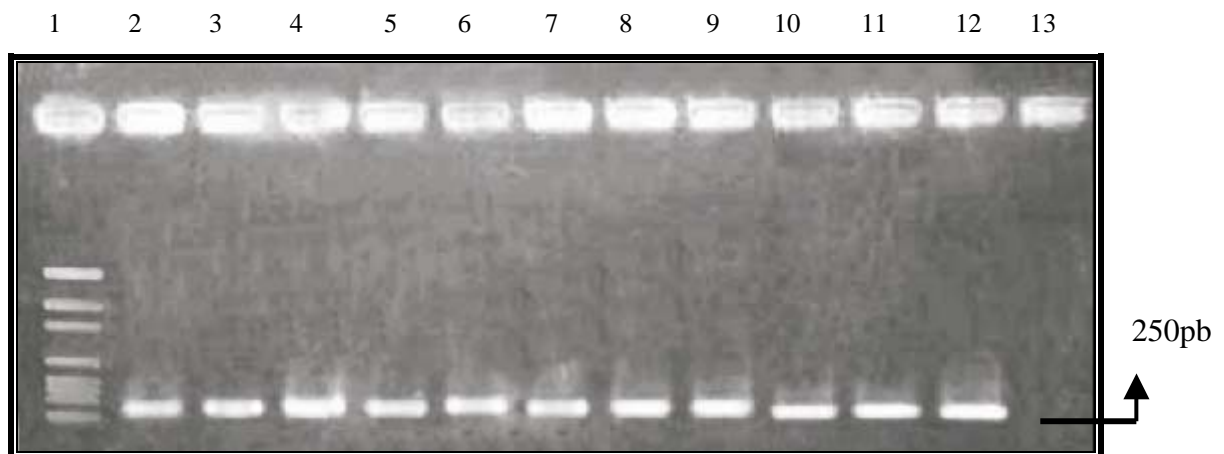


Figura 6: Gel de agarose 1% dos produtos de PCR da **coleta 1**. Canaleta 1: marcador molecular pGEM; canaleta 2- amostra n.º 1 (0h); canaleta 3- amostra, n.º 2 (12h); canaleta 4- amostra n.º 3, (24h); canaleta 5- amostra n.º 4 (36 h); canaleta 6- amostra n.º 5 (48 h); canaleta 7- amostra n.º 6, (60 h); canaleta 8- amostra n.º 7 (72 h); canaleta 9- amostra n.º 8 (84 h); canaleta 10- amostra n.º 9 (96 h); canaleta 11- amostra n.º 10 (108 h); canaleta 12- amostra n.º 11 (120 h); canaleta 13- controle negativo.

Os produtos de PCR dos extratos de DNA, obtidos na segunda coleta, por sua vez, não apresentaram o mesmo sucesso de amplificação, encontrada na coleta anterior, revelando em gel de agarose 1%, bandas fracas e sem definição (Figura 7). Para validação deste resultado as amostras de DNA da coleta 2 foram novamente purificadas com *Sephadex* e amplificadas por PCR (Figura 8). Estas amplificaram quatro (primeiras) bandas fortes e consistentes, visualizadas em gel de agarose 1%. Estes resultados sugeriram a repetição da extração de DNA das amostras de polpa de cacau da coleta 2, para possibilitar a amplificação destas amostras por PCR e posterior aplicação do DGGE, para estudo da diversidade populacional de leveduras presentes na fermentação de cacau da fazenda Ararauna.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

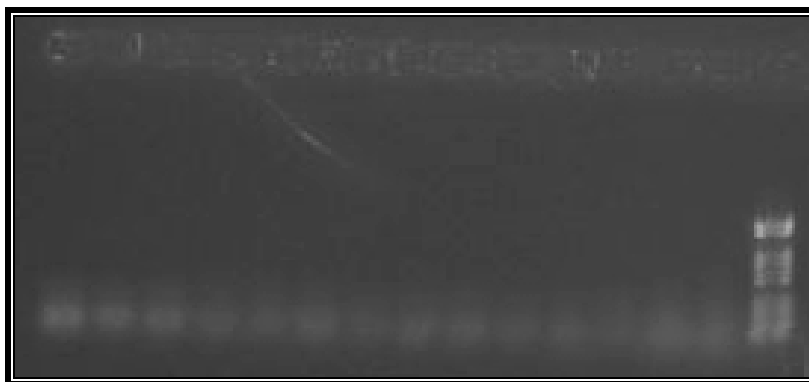


Figura 7: Gel de agarose 1% dos produtos de PCR da **coleta 2**. Canaleta 1- amostra nº. 12 (0 h); canaleta 2- amostra, nº. 13 (12 h); canaleta 3- amostra nº. 14 (24 h); canaleta 4- amostra nº. 15, (36 h); canaleta 5- amostra nº. 16 (48 h); canaleta 6- amostra nº. 17 (60 h); canaleta 7- amostra nº. 18 (72 h); canaleta 8- amostra nº. 19 (84 h); canaleta 9- amostra nº. 20 (96 h); canaleta 10- amostra nº. 21 (108 h); canaleta 11- amostra nº. 22 (120 h); canaleta 12- amostra nº. 23 (132 h); canaleta 13- amostra nº. 24 (144 h); canaleta 14- amostra nº. 25 (156 h); canaleta 13- marcador molecular pGEM.

pGEM 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

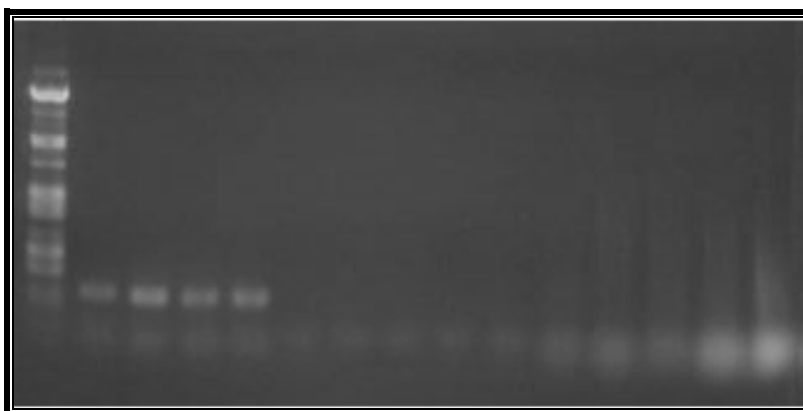


Figura 8: Gel de agarose 1%, dos extratos de DNA da **coleta 2**, reamplificados por PCR. Canaleta 1: marcador molecular pGEM; canaleta 2- amostra nº. 12 (0 h); canaleta 3- amostra, nº. 13 (12 h); canaleta 4- amostra nº. 14 (24 h); canaleta 5- amostra nº. 15 (36 h); canaleta 6- amostra nº. 16 (48 h); canaleta 7- amostra nº. 17 (60 h); canaleta 8- amostra nº. 18 (72 h); canaleta 9- amostra nº. 19 (84 h); canaleta 10- amostra nº. 20 (96 h); canaleta 11- amostra nº. 21 (108 h); canaleta 12- amostra nº. 22 (120 h); canaleta 13- amostra nº. 23 (132 h); canaleta 14- amostra nº. 24 (144 h); canaleta 15- amostra nº. 25 (156 h).

Como sugeriram TSAI e OLSON (1992) o maior obstáculo no uso da PCR em amostras ambientais é a presença de substâncias húmicas ou outros componentes (como uréia, ferro e outros). Estas substâncias podem inibir a atividade da enzima polimerase ou reter os iniciadores, reduzindo a sensibilidade da PCR. Embora alguns métodos de diluição possam atenuar os efeitos dos ácidos húmicos, estes também podem reduzir o limite de detecção. A interação entre os contaminantes e a PCR precisa ser cada vez mais investigada e compreendida, para que bons produtos, livre destas substâncias aumentem a sensibilidade desta técnica.

Neste trabalho, os perfis de DGGE, de produtos de PCR obtidos da coleta 1 revelaram aproximadamente, 8-13 bandas distintas, com intensidades variadas (forte, média e fraca), em gel de poliacrilamida a 6%, num gradiente de 35-65% de agentes desnaturantes (Figura 9). Este gradiente foi testado previamente, e padronizado para analisar os fragmentos amplificados do gene RNAr 26S, das espécies de leveduras presentes durante a fermentação de cacau da fazenda São Jorge, demonstrando a diversidade desta população, uma vez que, o número de bandas visualizadas no gel de DGGE é geralmente, diretamente proporcional ao número de espécies encontradas na amostra.

O tempo e a voltagem, também foram parâmetros previamente analisados para a elaboração desta metodologia. A corrida por 15 min. a 60 V, seguido de 4 h por 200 V geraram os melhores resultados de separação e resolução de bandas. Experimentos realizados com 60 V por 16 h não revelaram bandas no DGGE, sendo este resultado confirmado por uma repetição do experimento. Deste modo é possível inferir que a seleção da proporção da voltagem-tempo tem um impacto significativo no perfil das bandas geradas durante as análises de DGGE, bem como na subsequente avaliação da estrutura da comunidade (SIGLER *et al.*, 2004). Segundo Sigler *et al.* (2004), sob um constante regime de V-H, com tempos de eletroforeses mais curtos é possível minimizar a instabilidade do gradiente de desnaturação, e resultar em uma completa separação de bandas, maior do que encontrado em corridas mais longas. As comparações gel a gel, somente podem ser realizadas se todos os géis tiverem sido sujeitos a parâmetros similares de eletroforese.

O perfil revelado no gel de DGGE das espécies associadas a coleta 1 (Figura 9 e 10) apresentaram uma menor diversidade de leveduras, durante o processo de fermentação, quando comparadas com os resultados de isolamento e identificação. A identificação por métodos microbiológicos convencionais detectou 19 espécies de leveduras (Tabela 2) presentes ao longo do processo, enquanto que na caracterização molecular, o perfil gerado pelo DGGE detectou aproximadamente, 8-13 espécies (bandas). Estes resultados moleculares não estão completamente validados, sendo importante o monitoramento de várias fermentações de cacau para determinar quem são realmente as principais espécies presentes neste processo e como elas interagem.

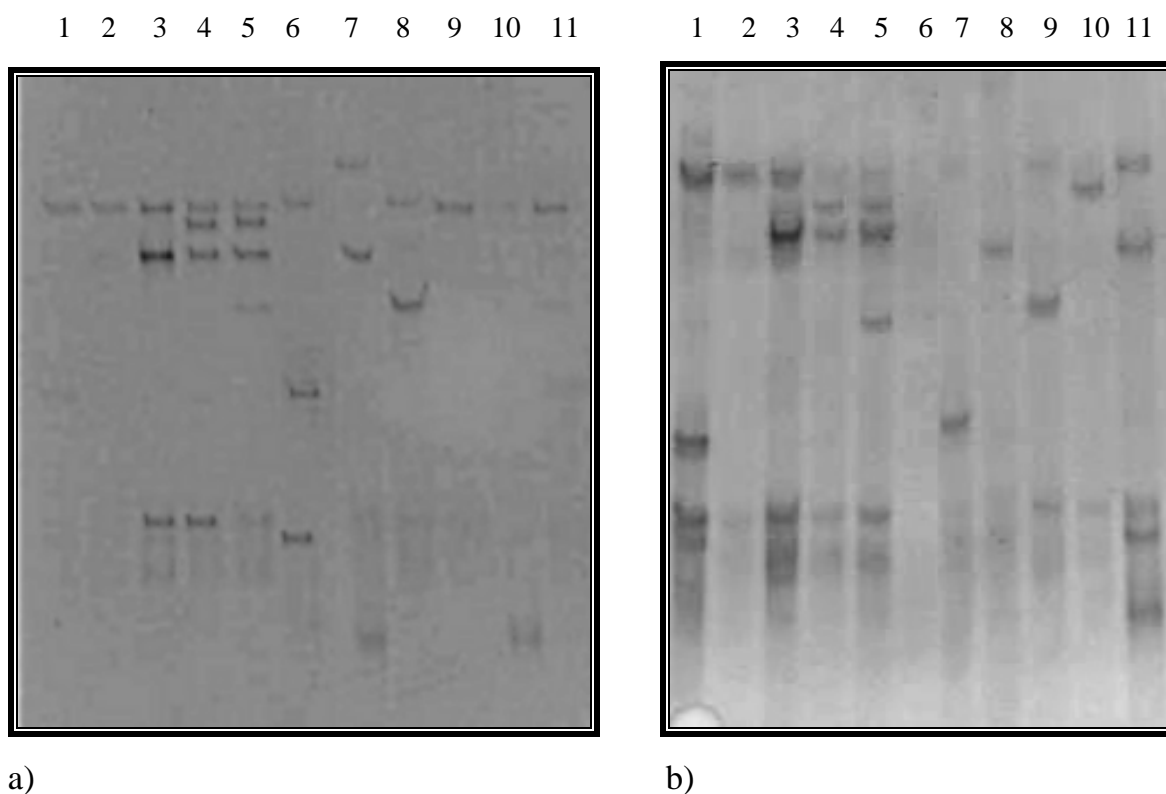


Figura 9: a e b representam géis de DGGE (da comunidade de leveduras presentes na fermentação da coleta 1) corridos em dias diferentes, porém elaborados com a mesma metodologia. Canaletas 1- amostra n.º. 1 (0 h); canaletas 2- amostra n.º. 2 (12 h); canaletas 3- amostra n.º. 3 (24 h); canaletas 4- amostra n.º. 4 (36 h); canaletas 5- amostra n.º. 5 (48 h); canaletas 6- amostra n.º. 6 (60 h); canaletas 7- amostra n.º. 7 (72 h); canaletas 8- amostra n.º. 8 (84 h); canaletas 9- amostra n.º. 9 (96 h); canaletas 10- amostra 10 (108 h); canaletas 11- amostra n.º. 11 (120 h).

Muyzer *et al.* (1993), sugeriram que análises de DGGE de fragmentos do DNAr amplificados por PCR geram *fingerprints* dos constituintes mais dominantes de populações microbianas mistas, quando *primers* que se anelam a regiões conservadas deste gene (RNAr) são usados. Para comunidades microbianas complexas, padrões de bandas complexos podem ser observados, e algumas bandas podem ser visualizadas quando diluições são realizadas a partir do DNA molde. Estas bandas, não visíveis antes podem indicar que seqüências menos eficientemente são amplificadas, quando em concentrações mais altas de DNA competidor. Entretanto quando apenas algumas espécies dominam em número, os padrões de bandas se tornam menos complexos (OLIVEIRA, 2000).

O DGGE realizado com os amplificados da coleta 2 não revelou perfil de desnaturação das espécies relacionadas, uma vez que, nenhuma banda foi visualizada no gel. Isto pode ter sido, devido à má qualidade dos produtos de PCR amplificados na coleta 2 (Figuras 7 e 8). Sabendo que a riqueza das seqüências amplificadas interfere no número representativo da amostragem, e que isto pode mudar de amostra a amostra, por influências das variações metodológicas envolvidas neste processo, como a eficiência de protocolos de extração e o grau de especificidade dos *primers*. É fortemente sugerido, neste trabalho, a repetições de todos os passos experimentais que antecedem o DGGE da coleta 2.

Em estudo moleculares, através de DGGE-PCR, da diversidade de leveduras presentes na fermentação de cacau de Gana, Nielsen *et al.* (2005) encontraram cerca de 16 bandas no perfil de DGGE, das coletas realizadas durante as fermentações *trays* e *heaps*. Os melhores resultados obtidos foram em gel de poliacrilamida a 8%, com gradiente de 35- 65% de desnaturação, corrido por 16 h a 70 V. As espécies encontradas no DGGE, quando comparados a identificação das espécies por microbiologia convencional apresentaram resultados ligeiramente diferentes. Com o DGGE, revelando espécies de microrganismos não cultiváveis como *C. zemplinina*, tipicamente relatada durante as fermentações de vinho. Estes autores sequenciaram os fragmentos selecionados do gel de DGGE, revelando a detecção de *H. guilliermondii*, *C. krusei* e *P. membranifaciens* em muitas fermentações analisadas, indicando o papel importante destas nas fermentações de cacau de Gana. As espécies

S. cerevisiae e *C. zemplinina*, foram quase exclusivamente detectadas, durante as fermentações *tray*. A habilidade de detectar organismos não cultiváveis é uma das muitas vantagens oferecidas pela técnica de DGGE (MILLS *et al.*, 2002; MUYZER e SMALLA, 1998).

O DGGE-PCR também foi utilizado para o monitoramento de populações de leveduras, presentes em fermentações comerciais de vinho, o perfil desta população revelada por DGGE caracterizou a presença dos gêneros *Metschnikowia*, *Candida* e *Pichia*, ao longo da fermentação, onde *S. cerevisiae* foi o membro dominante do processo (COCOLIN *et al.*, 2001).

Estudos de ecologia microbiana requerem amostragem de diferentes pontos de tempo, por um longo período. Sabendo que pelo uso do DGGE muitas amostras em diferentes intervalos de tempo podem ser analisadas simultaneamente, isto faz desta técnica uma poderosa ferramenta para o monitoramento do comportamento de comunidades complexas, após mudanças ambientais. Esta metodologia é menos laboriosa, do que a clonagem de genes de RNAr, bastante usada para estudo de diversidade, porém esta, não oferece um método suscetível para analisar múltiplas amostras diferentes, em um tempo relativamente curto (MUYZER e SMALLA, 1998). Outras aplicações do DGGE-PCR, na ecologia microbiana têm sido previamente descritas e bem revisadas por MUYZER *et al.* (1998), MUYZER e SMALLA (1998), MUYZER (1993). E a aplicação desta tem sido somente, recentemente introduzida na microbiologia dos alimentos, revelando todo o seu potencial para análise de amostras em seu habitat natural, em fermentações microbianas de alimentos e ecossistemas relacionados a alimentos. Ercolini (2004) discutiu vastamente os aspectos teóricos e a aplicação do DGGE para analisar comunidades, avaliando suas vantagens e desvantagens, quando associada a microbiologia dos alimentos.

É importante relatar que análises por DGGE de produtos de PCR amplificados com *primers* para regiões conservadas, como do gene 26S do RNAr são realizadas, para detectar alterações da diversidade estrutural de uma comunidade, e estas mudanças só são detectadas quando as populações predominantes são afetadas. Se, por exemplo, o número ou a composição de uma população sofre alteração, então

esta pode ser detectada, uma vez que a proporção desta população é geralmente menor que 0,01% da população total presente na amostra. Por outro lado, padrões de bandas muito complexos podem ser difíceis de avaliar e, portanto técnicas para reduzir a complexidade devem ser aplicadas (OLIVEIRA, 2000). Como qualquer técnica utilizada para estudar comunidades microbianas no seu habitat natural, o DGGE também apresenta limitações que precisam ser esclarecidas para permitir a máxima exploração do seu potencial, gerando dados confiáveis. Como já citado, uma banda observada no gel corresponde a uma linhagem analisada, entretanto para algumas linhagens duas ou mais bandas podem ser detectadas. Devido a heterogeneidade de seqüências dos operons RNAr, por outro lado existem exemplos onde mobilidade eletroforéticas similares foram observadas entre linhagens filogeneticamente não relacionadas (COUTINHO, *et al.*, 1999). Segundo Oliveira (2000), este fato deve ser levado em consideração quando o número de bandas é utilizado como uma medida da diversidade. Outra limitação desta técnica é não poder analisar produtos de PCR acima de 500 pb, uma vez que a separação destes é reduzida.

Para que as bandas do DGGE sejam visualizadas em gel de poliacrilamida, é utilizado Brometo de etídio, SYBER Green I ou SYBER Safe. Porém, o corante que apresenta maior sensibilidade, para corar os produtos de PCR analisados no DGGE é a prata, sendo esta bastante utilizada em trabalhos com esta técnica, mas esta apresenta algumas limitações, uma vez que, géis corados por prata não podem ser utilizados em experimentos de hibridização e fragmentos de DNA de fita-simples podem ser detectados (FELSKE *et al.*, 1996; ERCOLINI, 2004). Com o objetivo de identificar as espécies encontradas no gel de DGGE da coleta 1 (Figura 9), as bandas reveladas pelo DGGE foram excisadas de sua matriz, por um bisturi e colocadas em tubos de 0,2 ml, acrescidos de 100 µl de água Milli-Q estéril, foi deixado O/N a -20°C, para a eluição do DNA das bandas excisadas para a solução de água. Estas então foram amplificadas e reamplificadas por PCR (Figura 10), para que o DNA das espécies de leveduras encontradas no gel de DGGE fossem então, seqüenciadas e identificação molecularmente. O sequenciamento apresenta vantagens em relação a outros métodos tradicionais de identificação de espécies, como os perfis de

assimilação e fermentação de açúcares, que podem ser às vezes incertas, laboriosas e demoradas (ERCOLINI, 2004).

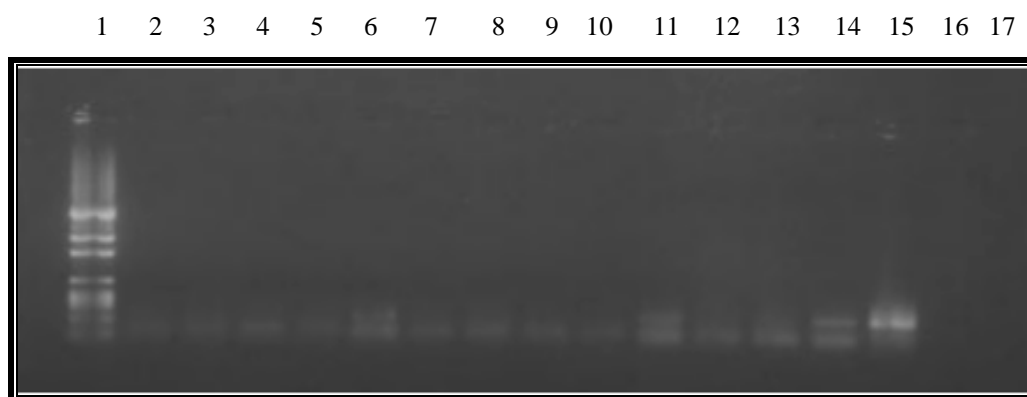


Figura 10: Gel de agarose 1%, dos produtos de DNAs eluídos do gel de DGGE, e reamplificados por PCR, coleta 1 (Figura 9). Canaleta 1: marcador molecular (pGEM); canaleta 2- banda 1A; canaleta 3- banda 1B; canaleta 4- banda 1C; canaleta 5- banda 1D; canaleta 6- banda 3A; canaleta 7- banda 3B; canaleta 8- banda 3C; canaleta 9- banda 3D; canaleta 10- banda 6A; canaleta 11- banda 8B; canaleta 12- banda 9A; canaleta 13- banda 10A; canaleta 14- banda 10B; canaleta 15- 10C; canaleta 16- banda 10D; canaleta 17- banda 10E.

Os DNAs eluídos das bandas excisadas do gel de DGGE da coleta 1 e reamplificados por PCR demonstraram (em gel de agarose 1%) bandas sem definição, com intensidades fracas. Apenas as bandas 10B e 10C apresentaram uma melhor definição de intensidade no gel (canaletas 14 e 15 da figura 10). Os produtos de PCR utilizados para a realização do sequenciamento exigem extratos de DNA de alta qualidade, em pureza e uma boa definição quando visualizadas em eletroforese. Os resultados obtidos na reamplificação dos produtos de PCR das bandas excisadas, para identificação molecular das espécies apresentaram produtos de PCR de baixa qualidade, que não conseguiram ser sequenciados. Com isto, a repetição de todos os passos que antecedem a elaboração do DGGE é sugerido para elucidar este problema.

Dentro deste propósito, como uma alternativa rápida ao sequenciamento das bandas excisadas do DGGE para identificar as espécies de leveduras encontradas no perfil da coleta 1 foi construído um marcador molecular (*ladder*), utilizando produtos

amplificados do gene de DNAr 26S, das espécies isoladas durante toda a fermentação da polpa de cacau da coleta 1 (Tabela 2), identificadas pelo teste microbiológico convencional. As espécies de *Candida* sp. 3, *Candida* sp. 4, *Candida* sp.6, *Candida* sp. 7, *C. bombicola*, *C. parapsilosis*, *C. gropengiesseri similar*, *C. krusei*, *Cryptococcus* sp., *C. bhutanensis*, *K. marxianus*, *M. reukaufii*, *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *R. mucilaginosa*, *Starmerella* sp. 2, *Starmerella* sp., *K. apis* foram reativadas em caldo para crescimento de leveduras (caldo Sabouraud) e cada uma destas culturas foram utilizadas para a extração do conteúdo genético (DNA) e posterior amplificação por PCR (Figura 11) destas espécies.

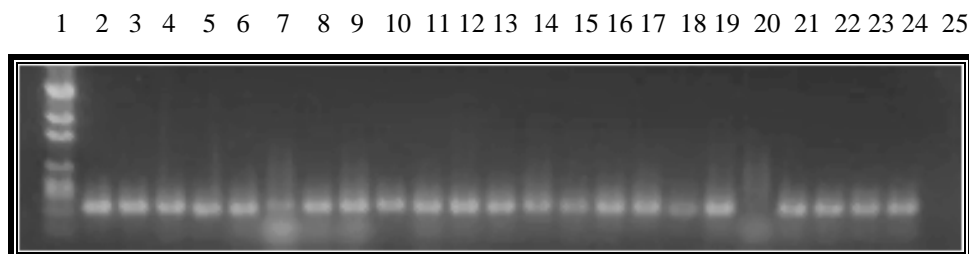


Figura 11: PCR dos DNAs extraídos de cada espécie isolada e identificadas pelo teste microbiológico tradicional, nas duas coletas realizadas. Canaleta 1: marcador molecular (pGEM); canaleta 2- *K. Marxianus*; canaleta 3- *C. bhutanensis*; canaleta 4- *C. parapsilosis*; canaleta 5- *C. bombicola*; canaleta 6- *Starmerella* sp. 2; canaleta 7- *Candida* sp. 7; canaleta 8- *C. Krusei* ; canaleta 9- *C. gropengiesseri similar* ; canaleta 10- *R. mucilaginosa*; canaleta 11- *Candida* sp. 5; canaleta 12- *Candida* sp. 4; canaleta 13- *K. apis*; canaleta 14- *Candida* sp. 8; canaleta 15- *C. floridula*; canaleta 16- *S. exigus*; canaleta 17- *P. antarctica*; canaleta 18- *P. kluyveri*; canaleta 19- *Candida* sp. 3; canaleta 20- *Cryptococcus* sp.; canaleta 21- *P. membranefaciens*; canaleta 22- *S. cerevisiae*; canaleta 23- *M. reukaufii*; canaleta 24- *Starmerella* sp.; canaleta 25- controle negativo.

Os resultados obtidos das amplificações dos extratos de DNA dos isolados apresentados na figura 11 demonstram a qualidade destes produtos, em gel de agarose 1%, apresentando bandas puras, bem definidas e fortes no gel. A amostra de *Cryptococcus* sp. foi a única espécie que não amplificou os *primers* utilizados neste trabalho para estudo de diversidade. Devido, talvez a qualidade e pureza do seu extrato de DNA. O DGGE dos isolados da fermentação de cacau da fazenda São Jorge foi realizado, seguindo os mesmos parâmetros utilizados para elaboração do

gel de DGGE da população total de leveduras da coleta 1. A identificação das espécies realizada pela comparação das distâncias de migração dos produtos de PCR no gel de DGGE com aquelas presentes linhagens referidas na identificação pelo marcador.

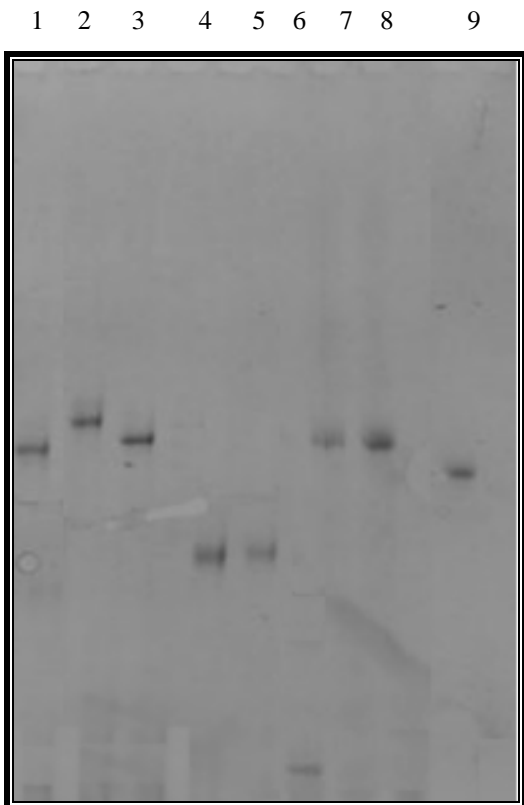


Figura 12: Gel de DGGE dos isolados da coleta 1. Canaleta 1- amostra *K. Marxianus*; canaleta 2- *C. bhutanensis*; canaleta 3- amostra *C. parapsilosis*; canaleta 4- *C. bombicola*; canaleta 5- *Starmerella* sp. 2; canaleta 6- *C. Krusei*; canaleta 7- *Candida* sp. 7; canaleta 8- *C. gropengiesseri*; canaleta 9- *R. mucilaginosa*.

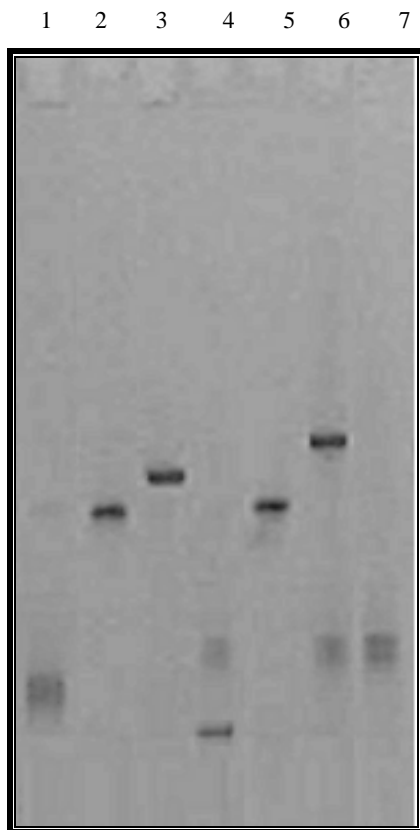


Figura 13: Gel de DGGE dos isolados da coleta 1. Canaleta 1- *K. apis*; canaleta 2- *Starmerella* sp.; canaleta 3- *M. reukaufii*; canaleta 4- *P. membranefaciens*; canaleta 5- *S. cerevisiae*; canaleta 6- *Cryptococcus* sp.; canaleta 7- *P. kluyveri*.

O DGGE das espécies de leveduras isoladas e identificadas, na coleta 1, para a construção do marcador molecular apresentou perfil de bandas bem definidas com intensidade forte, estes resultados são apresentados nas figuras 12 e 13. A partir destes, foi testado a utilização do marcador em um gel de DGGE da comunidade total de leveduras, encontradas durante os respectivos intervalos de coleta realizados na fermentação de cacau. Para isto este marcador foi corrido nas primeiras e últimas canaletas do DGGE que foi elaborado, seguindo os mesmos parâmetros dos outros DGGE realizados neste estudo, para comparação de bandas. O DGGE dos isolados de leveduras da coleta 1 caracterizou os perfis das espécies de *K. marxianus*, *C. bhutanensis*, *C. parapsilosis*, *C. bombicola*, *Starmerella* sp. 2, *C. krusei*, *Candida* sp. 7, *C. gropengiesseri*, *R. mucilaginosa* (Figura 12) e de *Starmerella* sp., *M. reukaufii*, *P. membranefaciens*, *S. cerevisiae*, e *Cryptococcus* sp. (Figura 13). As espécies *K. apis* e *P. kluyveri* não puderam ser utilizadas no marcador, uma vez que, não geraram bandas no DGGE. A alta definição e intensidade das bandas no gel de DGGE dos

isolados confirmaram a qualidade dos extratos de DNA testados, validando o protocolo de extração desenvolvido neste trabalho, para isolamento do material genético das isoladas em cultura pura. Sugerindo para as espécies que não foram caracterizadas no DGGE, a repetição dos experimentos de extração de DNA e amplificação destes produtos, a fim de gerar perfil no DGGE. Uma vez que estas espécies foram bem caracterizadas durante as fermentações de cacau da Bahia, quando investigadas pelo teste microbiológico padrão.

Os resultados obtidos na construção do marcador molecular não foram satisfatórios para confirmar e identificar todas as espécies de leveduras presentes na fermentação de cacau da coleta 1 (faz. São Jorge). Estes serviram apenas para inferir as espécies mais importantes do processo ou aquelas que apresentaram maior sensibilidade a técnica. O marcador não foi padronizado e novas tentativas devem ser conduzidas até o aperfeiçoamento deste, para caracterização molecular. A realização da identificação molecular pela construção de um marcador com as espécies isoladas é um processo muito mais fácil do que o sequenciamento das bandas do DGGE. Porém esta metodologia não oferece garantia absoluta de identificação verdadeira, pois algumas desvantagens são apresentadas. Autores relatam casos de comigração de bandas, referentes a espécies diferentes no gel de DGGE. Estes trabalhos foram conduzidos com bactérias, e muitas espécies analisadas pelos seus fragmentos de 16S rDNA não apresentaram diferenças significativas durante a separação por DGGE (van BEEK e PRIEST, 2002; MEROTH *et al.*, 2003; ERCOLINI, 2004). Uma outra desvantagem, encontrada neste tipo de marcador é a possibilidade de gerar múltiplas cópias dos genes que amplificam rRNA e, assim múltiplas bandas indicarem somente uma espécie, tornando a identificação ainda mais difícil. Além disto, algumas vezes as diferenças nas distâncias de migração das bandas no DGGE não são tão grandes, tornando a identificação complicada e não confiável, nestes casos a melhor solução é recorrer para o sequenciamento das bandas do DGGE (ERCOLINI, 2004). O sequenciamento, apesar de apresentar uma metodologia mais complicada, como citado acima, ainda é a melhor opção para identificar espécies dentro de uma população tão complexa e heterogênea, como a da fermentação do cacau, oferecendo um método eficiente e confiável para caracterização da população de leveduras do cacau.

A figura 14 foi construída para demonstrar como o marcador molecular é utilizado para identificar molecularmente as espécies encontradas no perfil da coleta 1. Esta, também ilustra as limitações desta metodologia, uma vez que algumas espécies apresentaram comigração de bandas e outras diferenças muito pequenas nas distâncias de migração. Com estes resultados torna-se difícil inferir com confiança as espécies encontradas no perfil do DGGE da população total de leveduras, havendo a necessidade de melhorar os extratos de DNA, gerando produtos mais puros e, logo bandas consistentes e definidas no gel de DGGE. Pela figura 14 podemos inferir a ocorrência das espécies de *P. membranefaciens*, *C. krusei*, *M. reukaufii*, *S. cerevisiae* e *K. Marxianus*, porém a confirmação destes resultados só poderão ser revelados por sequenciamento das bandas. Segundo Temmerman *et al.* (2003), cada posição das bandas encontradas no DGGE pode ser registrada em databases e esta normalização permite a comparação de diferentes géis de DGGE. Contudo que este gel seja de gradiente desnaturante. Isto é muito importante, especialmente quando longas análises são realizadas, envolvendo um grande número de amostras.

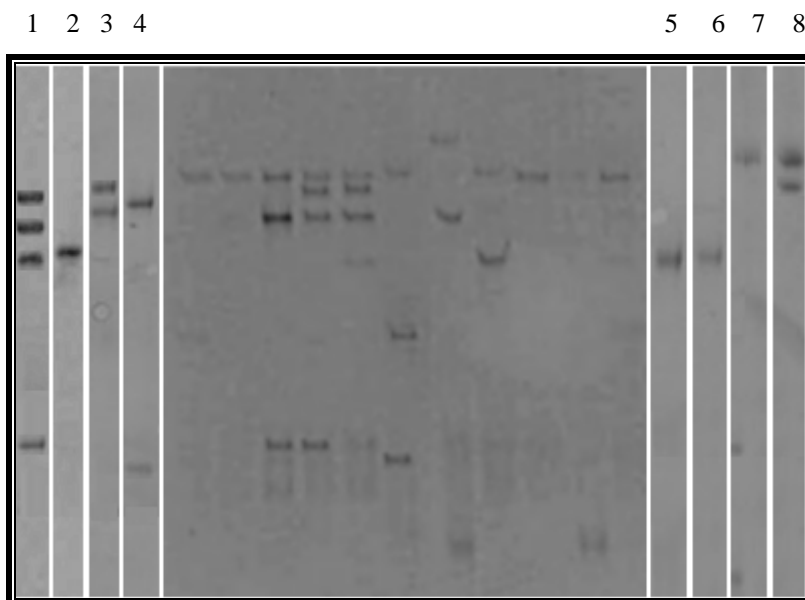


Figura 14: Perfil do DGGE da comunidade total de leveduras presentes na fermentação do cacau da coleta 1, comparadas com espécies isoladas e identificadas pelo teste microbiológico padrão, na tentativa de elaboração de um marcador molecular. Canaleta 1: *Cryptococcus* sp., *M. reukaufii*, *Starmerella* sp., *P. membranefaciens* respectivamente; canaleta 2: *S. cerevisiae*; canaleta 3: *C. bhutanensis*, *K. Marxianus*; canaleta 4: *C. parapsilosis*, *C. krusei*; canaleta 5: *C. bombicola*; canaleta 6: *Starmerella* sp. 2; canaleta 7: *Candida* sp. 7; canaleta 8: *C. gropengiesseri*, *R. mucilaginosa*.

Durante os últimos anos, diversas tentativas têm sido realizadas para formular a susceptibilidade de culturas iniciadoras para a utilização em fermentações de amêndoas de cacau, com sucessos variados (SCHWAN, 1998). Para este propósito um profundo conhecimento da composição microbiana e sua dinâmica no processo fermentativo são requeridos. O DGGE oferece a possibilidade de examinar múltiplas amostras em curto tempo, caracterizando assim, as populações microbianas e identificando as espécies mais importantes e predominantes da fermentação. A disseminação deste na análise direta das amostras ambientais se deve, principalmente, a tentativa de superar as limitações impostas pelas técnicas tradicionais de isolamento e cultivo de microrganismos. Uma vez que alguns estudos já demonstraram que os microrganismos isolados por meios tradicionais podem não representar aqueles mais dominantes e significativos nas respectivas amostras ambientais (GIOVANNONI *et al.*, 1990; WARD *et al.*, 1990). É importante ressaltar que o DGGE é uma técnica que oferece alta sensibilidade e reprodutibilidade, sendo eficiente para detectar variações entre seqüências cerca de 100%. Atualmente o *fingerprint* por DGGE é uma das técnicas mais promissoras para o estudo da diversidade estrutural de comunidades microbianas. Após a solução dos problemas técnicos iniciais na padronização do sistema este torna-se uma ferramenta poderosa na ecologia microbiana, com potenciais versáteis de aplicação.

6. CONCLUSÕES

- O isolamento e a identificação clássica das principais linhagens de leveduras presentes na fermentação de cacau de duas fazendas da região Sul da Bahia foi realizado com sucesso, através da caracterização bioquímica e morfológica. As espécies de *P. membranifaciens*, *C. krusei* e *K. apis* foram encontradas como as espécies predominantes da fermentação, confirmando seu papel nas fermentações de cacau;

- a padronização de um protocolo de extração de DNA total, de polpa de cacau eficiente foi realizada neste trabalho. Porém o aprimoramento dos passos de purificação e lise celular torna-se necessárias para minimizar os problemas de inibição da PCR e das análises moleculares posteriores (DGGE e sequenciamento);

- as amplificações dos fragmentos do gene de DNAr 26S, das amostras de DNA de cada amostra coletada durante a coleta 1, com os *primers* específicos de leveduras foi realizado com êxito, com produtos de qualidade gerados. As amplificações das amostras coletadas durante a coleta 2 devem ser novamente extraídas, purificadas e amplificadas para melhorar a pureza dos produtos de PCR que serão utilizados para gerar o perfil de DGGE da coleta 2.

- os isolados de *K. apis* e *P. kluyveri* devem ser novamente reativados e o isolamento do matéria genético (DNA) refeito;

- o estudo da diversidade microbiana total de leveduras, presente na fermentação de cacau da região, através do *fingerprint* de DGGE foi realizado nas coletas 1 e 2. Porém, somente a coleta 1 gerou perfil no gel de DGGE, a coleta 2

precisa ser aperfeiçoada, melhorando os produtos de DNA extraídos diretamente da polpa de cacau. Um melhor método de identificação molecular, como o sequenciamento das bandas do DGGE é requerido para o aprimoramento e padronização desta técnica. A fim de torná-la uma ferramenta útil e eficiente para o monitoramento do processo fermentativo de cacau da região, dando um grande passo para o desenvolvimento de medidas de controle de qualidade para produção de cacau de alta qualidade, com características finas e especiais de *flavor*;

- na última década as espécies de leveduras que conduzem a fermentação de cacau do Sul da Bahia (representados neste trabalho pelos municípios de Ilhéus e Una) apresentaram mudanças significativas de dominância e sucessão. Com as espécies *C. bombicola*, *C. parapsilosis*, *C. gropengiesseri*, *C. floridula*, *M. reukaufii*, *P. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *R. mucilaginosa*, *K. apis*, *P. antarctica*, *S. exiguus*, *C. bhutanensis*, *C. flavus*, identificadas pelo teste microbiológico tradicional, não foram antes determinadas e isoladas em trabalhos anteriores, realizados na região. Esta mudança, provavelmente deve-se a alterações no microambiente, na temperatura, no pH e na oxigenação das amêndoas durante as fermentações da região;

- por fim, sugere-se fortemente que para um melhor entendimento e compreensão da diversidade e sucessão da comunidade de leveduras presentes na fermentação de cacau, das coletas realizadas, alguns experimentos devem ser refeitos. Além de coletas de fermentações em outras fazendas, que apresentem práticas de processamento de cacau diferente das investigadas neste trabalho. Com a aplicação de análises moleculares, a fim de demonstrar a praticidade e eficiência da técnica de DGGE-PCR, no monitoramento temporal do processo fermentativo da região.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, J.; STARMER, W.T.; HAGLER, A.N. Yeast-yeast interactions in guava and tomato fruits. **Microbial Ecology**. v. 42, p. 186–192, 2001.

AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-target nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, p. 555-565, 2000.

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

BALEIRAS COUTO, M.M; EIJSMA, B.; HOFSTRA, H.; HUIS, J.H.J.; VOSSEN, J. M.B.M. Evaluation of molecular typing techniques assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied Environmental Microbiology**. v.62, p. 41-46, 1996.

BERTHELET, M.; WHITE, G.L.; GREER, W.C. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 17-22, 1996.

BETTS, G. D.; LINTON, P.; BETTERIDGE, R. J. Food spoilage yeast: effects of pH, NaCl and temperature on growth. **Food Control**. v. 10, p. 27-30, 1999.

CASCANTE, M.; ENRIQUEZ A. G.; GARCIA V. Flora microbiana durante el proceso de fermentación del cacao. **FUNDAGRO**. v. 219, p. 17-16, 1993.

CHAMBERS, A. Ph.; DUGGAN, S.P.; FORBES, M.J.; HERITAGE, J. A rapid, reliable method for the extraction from avian feces of total bacterial DNA to be used as a template for the detection of antibiotic resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 47, p. 239-246, 2001.

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

COCOLIN L, HEISEY A, MILLS D.A. Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. **American Journal Enology and Viticulture**. v. 52, 49–53. 2001.

COCOLIN, L.; AGGIO, D.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; COMI, G. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. **International Dairy Journal**. v. 12, p. 407-411, 2002.

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira**. v.3-II, n.71, p.491-503, 1999.

DE CAMARGO, R.; LEME, J.; MARTINELLI FILHO, A. General observations on the microflora of fermenting cocoa beans (*Theobroma cacao*) in Bahia (Brazil). **Food Technology**. v. 17, p. 116-118, 1963.

DIAS, L.A.S. O processo fermentativo em cacau. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-ESALQ. Tese de mestrado. Universidade de São Paulo. 1992.

DROBY, S.; COHEN, L.; DAVIS, A.; WEISS, B.; HORES, B.; CHALUTS, E.; KOTZ, H.; KERANTZUR, M.; SHACHNAI, A. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. **Biological Control**. v. 12, p. 97-101, 1998.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**. v. 56, p. 297-314. 2004.

EVANS, D. G.; EVERIS, L. K.; BETTS, G. D. Use of survival analysis and classification and regression trees to model the growth/no growth boundary of spoilage yeast as affected by alcohol, pH, sucrose, sorbate and temperature. **International Journal Food Microbiology**. v. 92, p. 55-67, 2004.

FELSKE, A.; ENGELEN, B., NUBEL, U.; BACKHAUS, H.; Direct ribosomal isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. **Applied Environmental Microbiology**. v. 62, p. 4162-4167, 1996.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; QUEROL, A.; BARRIO, E. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8 rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and differentiation of flora yeast. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 78, p. 87-97. 2000.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p. 340-346, 1996.

FISHER, S.G.; LERMAN L. S. DNA fragment differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. **Proceedings of the National Academy of Science**. v.80, p.1579-1583, 1983.

FLEET, G.H. Yeast in fruit and fruit products. Em: Boekhout, T., Robert, R. (Ed.), *Yeasts and Food. Beneficial and Detrimental Aspects*. Hamburg, p. 267-288, 2003.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Production, purification, cloning and application of lytic enzymes. **Química Nova**. v. 28, n. 5, 2005.

GATTO, V.; TORRIANI, S. Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. **Annual microbiology**. v. 54, p. 31-42, 2004.

- GAUTHIER, B.; GUIRAUD, J.; VINCENT, J.C.; PARVAIS, J.P.; GALZY, P. Remarques sur la flore de levures de la fermentation traditionnelles du cacao en Cote d'Ivoire. **Revue des Fermentation et des Industries Alimentaires**. v. 32, p. 160-163, 1977.
- GEJMAN, P.V.; CAO, Q.; GUEDJ, F.; SOMMER, S. The sensitivity of denaturing gradient gel electrophoresis: a blinded analysis. **Mutant Research Genomics**. v. 382, p. 109-114, 1998.
- GILBERT, D. G. Dispersal of yeast and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. **Oecologia**. v. 46, p. 135-137, 1980.
- GIOVANNONI, S. J.; BRITSCHGI, T. B.; MOYER, C. L.; FIELD, K. G. Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. **Nature**. v. 345, p. 1294-1302, 1990.
- HAHN, D. In situ analysis of microbial populations. **Journal New Jersey of Technology**. v.172, p.762-770, 2001.
- HANSEN, G. E.; OLMO, M. D.; BURNS, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal Science Food Agriculture**. v. 77, p. 273-281, 1998.
- HOCKING, A.D. Media for preservative resistant yeasts: a collaborative study. **International Journal Foods Microbiology**. v. 29, p. 167-175, 1996.
- HOLLAND, J.L.; LOUIE, L.; SIMOR, A.E.; LOUIE, M. PCR Detection of *Escherichia coli* O157: H7 directly from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, p. 4108-4113, 2000.
- HOYNAK, S.; POLANSKY, T. S.; STONE, R. W. Microbiological studies o cocoa fermentation. **Food Research**. v. 6, p. 417-419, 1941.
- HUMPHRIES, E.C. Some problems of cacao fermentation. **Tropical Agriculture**. v. 21, p. 166-169, 1944.

JESPERSEN, L.; NIELSEN, D. S.; HØNHOLT S.; JAKOBSEN, M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**. v. 5, p. 441-453, 2004.

JONES, K. L.; JONES, S. E. Fermentation involved in the production of cocoa, coffee and tea. **Progress in Industrial Microbiology**. v.19, p. 411-433, 1984.

KNAPP. A. W. **Cacao fermentation**. London. John Bale. Sons & Curnow. p. 171. 1937.

KRSEK, M.; WELLINGTON, H.M.E. comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. **Journal of Microbiological Methods**. v. 39, p. 1-16, 1999.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W. The Yeasts: a taxonomic study (Fourth Revised and Enlarged Edition), Eds., Amsterdam: Elsevier Science, 1998.

LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **Journal Bacteriology**. v. 63, p. 399-406, 1952.

LEHRIAN, D. W.; PATTERSON, G. R. Cocoa Fermentation. **Biotechnology**. v. 5, c. 12, 1983.

LI, H.; GYLLENSTEIN, V. B.; CUI, X.; SAIKI, R. K.; EHRLICH, H.; ARNHEIM, N. Amplification and Analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. **Nature** . v. 335, p. 414-417, 1988.

LOPEZ, A.S.F.; McDONALD, C.R. Preliminar test of a simple and inexpensive system for the mechanical aeration of box-type cacao fermentation. **Review Theobroma**. v. 12, p. 57-83, 1982.

LOPEZ, A.S.F. Factors associated with cacao acidity and the possibility of its reductions by improved fermentation. **Review Theobroma**. v.13, p. 233-248, 1983.

LOPEZ, A.S.; DIMICK, P.S. Cocoa fermentation. In: Reed, G., Nagodawithana, T.W. (Eds.), *Enzymes, Biomass, Food and Feed*, 2nd ed. **Biotechnology**. v. 9, p.561-577, 1995.

MASOUD, W.; CESAR, L.B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in the fermentation of *Coffea Arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**. v. 21, p. 549-577, 2004.

MARAVALHAS, N. Mycological deterioration of cocoa beans during fermentation and storage in Bahia. **Review international of Chocolate**. v. 21, p. 375-378, 1966.

MCCRACKEN, V.J.; SIMPSON, J.M.; MACKIE, R.I.; GASKISNS, H.R. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. **American Society for Nutritional Sciences**. v. 131, p. 1862-1870, 2000.

MEROTH, C.B.; WALTER, J.P.; HERTEL, C.; BRANDT, M.J.; HAMMES, W.P. monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation process by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, p. 475-482, 2003.

MILLS, D.A., JOHANNSEN, E.A., COCOLIN, L. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. **Applied Environmental Microbiology**. v. 68, p. 4884-4893. 2002.

MONNIER, P.H.; CLIQUET, F.; AUBERT, M.; BRETAGNE, S. Improvement of a polymerase chain reaction assay for the detection of *echinococcus multilocularis* dna in fecal samples of foxes. **Veterinary Parasitology**. v. 67, p. 185-195, 1996.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**. v. 2, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology kluwer. **Academic Publishers**. v.73, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G.; De WAAL, E.C.; UITTERLINDER, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polimerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**. v. 59, p. 695-700, 1993.

MYERS, R.M.; FISHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**. v. 13, p. 3131-3145, 1985.

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

OLIVEIRA, V. M. Métodos para a caracterização de comunidades microbianas. CPQBA/UNICAMP, 2000.

PARAPHAILONG, W.; FLEET, G. H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeast. **Food Microbiology**. v. 14, p. 459-468, 1997.

PIZA, F. F. Princípios de isolamento e purificação de ácidos nucléicos. CPQBA/UNICAMP. v. p., 2002.

QUESNEL, V. C. Agents inducing the death of cocoa seeds during fermentation. **Journal Science Agriculture**. v. 16, p. 441-447, 1965.

ROHAN, T.A. Processing of raw cocoa: II- uniformity in heap fermentation and development of methods for rapid fermentation of West Africa amelonado cocoa. **Journal of Food Agriculture**. v.9, p. 542-555, 1958.

ROELOFSEN, P. A. Fermentation, drying and storage of cocoa beans. **Advances in Food Research**. v. 8, p. 225-296, 1958.

ROOSE-AMSALEG, C.L.; GARNIER-SILLAM, E.; HARRY, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. **Applied Soil Ecology**. v. 18, p. 47-60, 2001.

ROMBOUST, J. E. Contribution to the knowledge of the yeast flora of fermenting cacao: A critical review of the yeast species previously describe from cacao. **Tropical Agriculture**. v. 30, p. 34-41, 1953.

SANCHEZ, J.; DAQUENET, G.; GUIRAUD, J. P.; VICENT, J. C.; GALZY, P. A Study of the yeast flora and the effect of pure culture seedling during the fermentation process of cocoa beans. **Lebensm-Wiss Technology**. v. 18, p. 69-75, 1985.

SAMAH, A.O.; IBRAHIM, A, H.; ALIMON, H.; KARIM A. Fermentation studies of stored cocoa beans. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 9, p. 603-604, 1993.

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

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

SENSES-ERGUL, S.; OBAS, Z. Y. Characterization of the yeast flora present in some Turkish high-sugar products. **Journal Genetic Applied Microbiology**. v. 52, p. 99-106, 2006.

SHIFRINE, M., H. J. PHAFF., DEMAIN, A. L., Determination of carbon assimilation patterns of yeasts by replica plating. , 1953.

SIGLER, W.V.; CRIVII, S.; ZEYER, J. Bacterial succession in glacial forefield soils characterization by community structure, activity and opportunistic growth dynamics. **Microbiology Ecology**. v. 44, p. 306-316, 2002.

SIMPSON, J. M.; McCRACKEN, V. J.; GASKINS, H. R.; MACKIE, R. I. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16s ribosomal DNA applications to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* Strain MM53. **Applied and Environmental Microbiology**. v. , p. 4705-4714, 2000.

SOMERVILLE, C. C.; KNIGHT, I. T.; STRAUBE, W. L.; COLWELL, R. R. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environment. **Applied Environmental Microbiology**. v. 55, p. 548-554, 1989.

STAHL, D. A.; AMANN, R. Development and applications of nucleic acid probes. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic**. Chichester, p. 205-248, 1991.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana**. 2ª edição. Artmed. Porto Alegre, v. , p. 119-122, 2002.

SUZZI, G.; ROMANO, P.; PONTI, I.; MONTUSCHI, C. Natural wine yeast as biocontrol agents. **Journal Applied Bacteriology**. v. 78, p. 304-308, 1995.

TORNAI-LEHCZKI, J.; PÉTER, G.. DLAUCHY, D. M. Agar Candida medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. **International Journal Food Microbiology**. v. 86, p. 189-200, 2003.

TEMMERMAN. R., SCHEIRLINCK, S. J., HUYS, G., SWINGS, J. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, p. 220-226, 2003.

TOKOUKA, K. Sugar and salt tolerant yeast. **Journal Applied Bacteriology**. v. 74, p. 101-110, 1993.

TORVISK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. Height diversity in DNA of soil bacterial. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, p. 782-787, 1990.

TSAI, Y. L.; OLSON, B. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polimerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**. v. , p. 754-757, 1991.

TSAY, Y. L.; OLSON, B. Rapid methods for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**. p.2292-2295, 1992.

Van BEEK, S.; PRIEST, F.G. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisk fermentation: a polyphasic study. **Applied Environmental Microbiology**. v. 68, p. 297-305, 2002.

VEIGA, A.; MADEIRA-LOPES, A. Effects of weak acid preservatives on the growth and thermal death of the yeast *Pichia membranifaciens* in a commercial apple juice. **International Journal Food Microbiology**. v. 56, p. 145–151, 2000.

WARD, D.M.; BATESON, M.M.; WELLER, R.; RUFF-ROBERTS, A.L. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. **Advances in Microbiology Ecology**. v. 12, p. 219-286. 1993.

YARROW D. **The Yeasts – a taxonomic study**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands. Part IV – Methods, chapter 11, p.75-100, 1984.

YARROW D. **The Yeasts – a taxonomic study**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands. Part IV – Methods, chapter 11, p.77-100, 1998.