



**IGOR MAGALHÃES DA VEIGA MOREIRA**

**SUCCESSÃO MICROBIANA E DINÂMICA DE  
SUBSTRATOS E METABÓLITOS DURANTE A  
FERMENTAÇÃO DE TRÊS HÍBRIDOS DE  
CACAU (*Theobroma cacao* L.) CULTIVADOS NO  
SUL NA BAHIA**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**IGOR MAGALHÃES DA VEIGA MOREIRA**

**SUCESSÃO MICROBIANA E DINÂMICA DE SUBSTRATOS E  
METABÓLITOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE TRÊS HÍBRIDOS  
DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) CULTIVADOS NO SUL NA BAHIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos  
da Biblioteca da UFLA**

Moreira, Igor Magalhães da Veiga.

Sucessão microbiana e dinâmica de substratos e metabólitos durante a fermentação de três híbridos de cacau (*Theobroma cacao* L.) cultivados no sul da Bahia / Igor Magalhães da Veiga Moreira. – Lavras : UFLA, 2013.

84 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Chocolate. 2. PCR-DGGE. 3. Leveduras. 4. Fermentação de cacau. 5. Clones. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.28449

**IGOR MAGALHÃES DA VEIGA MOREIRA**

**SUCESSÃO MICROBIANA E DINÂMICA DE SUBSTRATOS E  
METABÓLITOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE TRÊS HÍBRIDOS  
DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) CULTIVADOS NO SUL NA BAHIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2013.

Dra. Karina Teixeira Magalhães	UFLA
Dra. Priscilla Efraim	UNICAMP
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2013**

*Aos meus pais Maria e Paulo, pela criação e apoio*  
*Aos meus irmãos, Diogo e Caio, pela amizade*  
*A Mariana Dias, pelo amor e companheirismo*

***DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e por se fazer presente em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Biologia e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

Às Fazendas Reunidas Vale do Juliana pela hospedagem, permissão e ajuda na coleta das amostras, em especial Aline Malta.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da Bolsa de Estudos.

À Professora Rosane Freitas Schwan, pela orientação, ensinamentos e confiança.

Ao Professor Whasley Ferreira Duarte pelos conhecimentos transmitidos e ajuda nas análises cromatográficas.

Ao Professor Disney Ribeiro Dias, pelos valiosos ensinamentos concedidos.

À Mariana Dias, pelo carinho, paciência e incentivo.

Às estagiárias, Jessimara e Marcela, pela ajuda e acompanhamento durante todo o experimento.

À Gabi, pelas análises moleculares e parceria na redação do artigo.

A todos os meus amigos do Laboratório, pela colaboração, descontração e troca de conhecimentos.

A todos os funcionários envolvidos no nosso dia a dia de trabalho, em especial Ivani, Cidinha e Rose.

Aos amigos de Lavras, em especial a República Arapuça.

E a todas as pessoas que se fizeram presentes na minha vida durante essa conquista.

Muito Obrigado!

“A persistência é o caminho para o êxito”.

Charles Chaplin

## RESUMO

Durante a década de 1980, o Brasil se destacou no mercado mundial de cacau como um grande produtor, atingindo marcas históricas de, por exemplo, 400.000 toneladas de amêndoas secas e produtividade de 750 kg/ha, a maior no contexto mundial da época. A partir da década de 90, devido à disseminação da doença vassoura-de-bruxa (causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*) houve declínio na produtividade brasileira. Como consequência, o Brasil passou de exportador a importador de amêndoas fermentadas e secas. Entre as medidas para o controle da vassoura-de-bruxa no Brasil, as pesquisas sobre cultivares de cacau resistente e mais produtivo têm recebido atenção especial. No entanto, as pesquisas sobre o processo fermentativo dessas novas variedades não foram levadas em consideração. O objetivo deste trabalho foi estudar a sucessão microbiana e a caracterização físico-química durante a fermentação de três híbridos produzidos no sul da Bahia (PH 9, PH 15 e PH 16). A sucessão microbiana durante o processo de fermentação dos três híbridos foi semelhante, com as leveduras dominando as primeiras 24 horas e depois bactérias do ácido láctico (BAL) e bactérias do ácido acético (BAA) foram mais representativas até ao final da fermentação. Mas as médias de populações de BAL (3,91 Ufc/mL), BAA (4,49 Ufc/mL), leveduras (3,13 Ufc/mL) e aeróbios mesófilos (2,48 Ufc/mL) durante a fermentação do clone PH 9 foram mais elevadas do que as encontradas no processo de fermentação dos clones PH 15 e PH 16. *Lactobacillus fermentum*, *L. casei* e *L. rhammnosus* foram as espécies predominantes na fermentação de todos os híbridos de cacau. No entanto, o perfil da comunidade bacteriana detectada por PCR-DGGE durante a fermentação do clone PH 9 foi mais bem definido, com um maior número de bandas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi predominante em todas as fermentações, seguido por *Hanseniaspora uvarum* e o gênero *Pichia*. Um perfil semelhante de consumo de substrato (glicose, sacarose, frutose e ácido cítrico) e cinética de metabolitos principais (etanol, ácido acético e ácido láctico) foi também observado, mas o híbrido PH 16 apresentou as concentrações mais elevadas de açúcares, ácidos e alcoóis.

Palavras-chave: Fermentação do cacau. Chocolate. Híbridos. Substratos e metabolitos. PCR-DGGE.



## ABSTRACT

During the 1980's, Brazil was highlighted in the world cocoa market as a large producer, reaching historical marks of, 400,000 tons of dry almonds and a productivity of 750 kg/ha, for example, the largest in the global context at that time. From the 90's, there was a decrease in the Brazilian productivity due to the dissemination of the "witch's broom" disease (caused by the *Moniliophthora perniciosa* fungus). As a consequence, Brazil went from fermented and dry almond exporter to importer. Among the "witch's broom" control measures in Brazil, researches on resistant and more productive cacao cultivars have received special attention. However, researches on the fermentation process of these new varieties were not taken into consideration. The objective of this work was to study the microbial succession and the physical-chemical characteristics during the fermentation of three hybrids produced in Southern Bahia (PH 9, PH 15 and PH 16). The microbial succession during the fermentation process of the three hybrids were similar, with yeast dominating the first 24 hours, subsequently Lactic Acid Bacteria (LAB), and, finally, Acetic Acid Bacteria (AAB) were the most representative until the end of the fermentation. However, the measures of LAB (3.91 CFU/mL), AAB (4.49 CFU/mL), yeast (3.13 CFU/mL) and mesophilic aerobic (2.48 CFU/mL) populations, during the fermentation of the PH9 clone, were more elevated than those found in the fermentation process of clones PH 15 and PH 16. *Lactobacillus fermentum*, *L. Casei* and *L. rhammnosus* were the predominant species in the fermentation of all the cocoa hybrids. However, the profile of the bacterial community detected by PCR-DGGE during the fermentation of the PH 9 clone was a lot more defined, with a higher number of bands. The *Saccharomyces cerevidiae* yeast was predominant in all the fermentations, followed by *Hanseniaspora uvarum* and the *Pichia* genus. A similar profile of substrate (glucose, sucrose, fructose and citric acid) and main metabolite kinetics (ethanol, acetic acid and lactic acid) consumption was also observed, but hybrid PH 16 presented the most elevated sugar, acid and alcohol concentrations.

Keywords: Cocoa fermentation. Chocolate. Hybrids. Substrates and metabolites. PCR-DGGE.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Produção, área plantada e número de produtores.....	18
Figura 2	Produção Brasileira de cacau entre 1988 e 2009.....	20
Figura 3	Alguns exemplos de variedades de cacau encontradas em solo brasileiro .....	25
Figura 4	Mudanças visíveis na massa de cacau durante os dias de fermentação.....	29
Figura 5	Sucessão microbiana durante o período de fermentação .....	30
Figura 6	Metabólitos finais produzidos durante o processo fermentativo da amêndoa de cacau .....	32

### SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Figure 1	Fruit, pulp and beans of the three different hybrids cocoa – PH 9 (A), PH 15 (B) and PH 16 (C) .....	56
Figure 2	Microbial succession of LAB (MRS counts, ◆), yeasts (YEPG counts, ■), aerobic mesophilic bacteria (Nutrient Agar counts, ●) and AAB (GYC counts, ▲) during cocoa bean fermentation using three different hybrid PH 9 (A), PH 15 (B) and PH 16 (C)..	63
Figure 3	Changes in eukaryotes communities during cocoa beans fermentation using three different hybrid. The fingerprints were generated by PCR-DGGE of the D1/D2 region of the 26S rRNA gene for PH 9 (A), PH 15 (B) and PH 16 (C). The identities of the bands are presented in Table 1, bands indicated by numbers were excised and after reamplification they were subjected to sequencing .....	66

- Figure 4 Changes in prokaryotes communities during cocoa beans fermentation using three different hybrid. The fingerprints were generated by PCR-DGGE of the V3 region of the 16S rRNA gene for PH 9 (A), PH 15 (B) and PH 16 (C). The identities of the bands are presented in Table 1, bands indicated by numbers were excised and after reamplification they were subjected to sequencing ..... 66
- Figure 5 Carbohydrates, acids and alcohols produced in the pulp and inside the beans during fermentation of cocoa three different hybrid PH 9 (A and B), PH 15 (C and D) and PH 16 (E and F). Course of glucose (✕), sucrose (■), fructose (●) and citric acid (⊕) in the pulp cocoa (A, C and E), and course of ethanol (◆), lactic acid (●) and acetic acid (▲) in the pulp and inside the beans (open symbols) ..... 69

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> ..... 14
<b>2.1</b>	<b><i>Theobroma cacao</i> L.: origem e dispersão</b> ..... 14
<b>2.2</b>	<b>Cacaucultura: Produção mundial e nacional</b> ..... 16
<b>2.3</b>	<b>Vassoura-de-bruxa</b> ..... 20
<b>2.4</b>	<b>Desenvolvimento de novas variedades clonais do cacau</b> ..... 22
<b>2.5</b>	<b>Impacto do melhoramento genético na qualidade do cacau</b> ..... 25
<b>2.6</b>	<b>O processo fermentativo do cacau</b> ..... 28
<b>2.7</b>	<b>Identificação e função de leveduras associadas à fermentação de cacau</b> ..... 34
<b>2.8</b>	<b>Identificação e função de bactérias associadas à fermentação de cacau</b> ..... 36
<b>2.9</b>	<b>Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE)</b> ..... 38
	<b>REFERÊNCIAS</b> ..... 41
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> ..... 49
	<b>ARTIGO 1</b> Microbial succession and dynamics of substrates and metabolites during fermentation of three different cocoa ( <i>Theobroma cacao</i> L.) hybrids ..... 49
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> ..... 84

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é de grande importância econômica e social para regiões de clima tropical como o Brasil. Costa do Marfim, desde a década de 60, lidera a produção mundial de cacau em amêndoas secas, seguida, na ordem, por Gana, Indonésia, Nigéria, Camarões, Brasil e Equador. Este grupo de sete países concentra mais de 80% da oferta mundial (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION - ICCO, 2012). O Brasil, que até a década de 80 ocupava o segundo lugar desse ranking, caiu para o sexto lugar, em razão (a) da progressiva redução da área plantada e do padrão tecnológico adotado, como resposta à queda dos preços internacionais, e (b) do alastramento da doença conhecida como vassoura-de-bruxa nos cacauais da Bahia, o principal estado produtor (PIRES, 2003). Como consequência, o Brasil passou de exportador de cacau em amêndoas para importador do produto.

Com o intuito de recuperação da lavoura cacauieira, o Brasil incentiva a união entre fazendeiros e órgãos de pesquisas, como o Centro de Pesquisa do Cacau – CEPEC e a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. Essa união tem como objetivo desenvolver pesquisas sobre cultivares de cacau resistentes, produtivos e que originem matérias-primas de qualidade. Uma das formas mais eficientes encontradas para a recuperação da lavoura cacauieira (EFRAIM, 2009). A substituição das lavouras baianas por materiais resistentes à vassoura-de-bruxa iniciou-se em 1997, com a distribuição dos cinco primeiros genótipos resistentes à doença recomendados pela CEPLAC e que foram propagados por meio de técnicas de clonagem: CEPEC 42, EET 397, TSH 1188, TSH 565 e TSH 516, e posteriormente os materiais TSA 654, TSA 656,

TSAN 792 e TSH 774, além dos clones desenvolvidos pelos próprios produtores em suas fazendas (LUZ et al., 1997).

Com o desenvolvimento de diferentes clones do cacau resistente à doença vassoura de bruxa, surgiu a necessidade de informações sobre a qualidade das amêndoas fermentadas, devido às características físico-químicas diferenciadas da polpa (mucilagem) e sementes.

A fermentação das sementes de cacau é uma atividade indispensável para o desenvolvimento dos precursores do sabor de chocolate e representa uma etapa fundamental do beneficiamento e produção de cacau fino. Durante este processo ocorre alta atividade microbiana na polpa, onde são produzidos alcoóis e ácidos, em complexas reações bioquímicas, que se difundem para os cotilédones (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Visando contribuir para o conhecimento da sucessão microbiana, bem como a dinâmica de substratos e metabólitos durante a fermentação das novas variedades, torna-se relevante o estudo das características fermentativas e a caracterização físico-química das respectivas amêndoas de cacau fermentadas destinadas para produção de chocolate de qualidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Theobroma cacao* L.: origem e dispersão

O cacaueteiro pertence à ordem Malvales, família *Sterculiaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L., única utilizada comercialmente para a produção de chocolate (EFRAIM, 2009). O cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie supostamente originária da América Tropical. Sua domesticação foi realizada pelos Maias e pelos Astecas aproximadamente a dois 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 (HURST et al., 2002).

De acordo com Cheesman (1944), o cacaueteiro desenvolve-se espontaneamente em florestas tropicais desde o sul do México, até o extremo sul da Amazônia, sendo sua distribuição geográfica associada a uma divisão da espécie em dois grandes grupos: *Forastero* e *Criollo*. Estes termos foram aplicados, inicialmente, na Venezuela, para distinguir o material nativo (*Criollo*), de material introduzido (*Forastero*). Materiais semelhantes da América Central e México receberam, também, a denominação de *Criollo* e os *Forasteros* foram divididos em *Forastero* Amazônico (Alto e Baixo Amazônico) e *Trinitário* (BARTLEY, 2005).

Os dois grupos são bastante distintos, sendo que o *Criollo* produz, normalmente, frutos grandes, com casca rugosa ou lisa, delgada ou grossa e vermelha ou verde (TUCCI, 1997). Suas sementes são normalmente grandes, com os cotilédones brancos ou violeta-pálido. O grupo *Forastero* Amazônico é considerado o verdadeiro cacau brasileiro e caracteriza-se por produzir sementes intensamente pigmentadas, frutos verdes quando imaturos e amarelos quando maduros (BECKETT, 2011; PIRES, 2003). A partir da associação de caracteres

dos grupos anteriores surgiu um terceiro tipo – Trinitário, cuja designação foi utilizada inicialmente para materiais provenientes de Trindade, que apresenta cotilédones das sementes com coloração variando de branca a violeta-pálida (EFRAIM, 2009; PIRES, 2003).

Purseglove (1968) relata que a dispersão do cacau pelo mundo foi feita por Colombo, que levou sementes de cacau para a Europa, como curiosidade, não sendo estas apreciadas a princípio. No entanto, em pouco tempo os espanhóis desenvolveram um procedimento que as tornava mais saborosas, através da mistura de grãos torrados e moídos, açúcar e baunilha. Iniciou-se, assim, a exportação e as primeiras fábricas de chocolate foram montadas na Espanha. No início do século XVIII a bebida passou a ser popular na Itália e França e, logo em seguida, na Holanda, Alemanha e Inglaterra. Em 1828 foi desenvolvido, na Holanda, um procedimento para prensagem e separação da gordura da amêndoa, permitindo a fabricação de chocolate em barras, com posterior incorporação de leite condensado ou em pó, em 1876, na Suíça (PURSEGLOVE, 1968).

Pires (2003) destaca que a crescente demanda do produto induziu a expansão da cultura. A princípio, o México era o único exportador, e no século XVI o cacau já era cultivado para o comércio com a Europa, América Central, América do Sul, Trindade, Jamaica e Haiti. No século XVII foi introduzido na Venezuela, a partir do México, e, por volta de 1750, este país passa a ser o maior produtor mundial, sendo substituído pelo Equador no século seguinte, que cultivava a variedade local Nacional (DUBLIN, 1984). Em 1746 é introduzido na Bahia, a partir de sementes trazidas do Pará, e, entre 1822 e 1878, é levado à África por portugueses, se expandindo em Gana, Nigéria, Camarões e Costa do Marfim (PAULIN; ESKES, 1995). Atualmente, o continente Africano produz a maior parte do cacau comercializado no mundo (ICCO, 2012).



## **2.2 Cacaucultura: Produção mundial e nacional**

Segundo Amin (2003), entre os produtos de origem tropical, o cacau pode ser considerado como a *commodity* mais representativa de uma agricultura de subsistência para milhares de produtores e que assume, ao mesmo tempo, um caráter estratégico na elaboração e implementação de políticas de planejamento e desenvolvimento econômico. O crescimento da economia dos países produtores, sempre esteve ligado ao comportamento de uma simples variável: o preço internacional de cacau.

Costa do Marfim lidera, desde a década de 60, a produção mundial de cacau em amêndoas secas, seguida, na ordem, por Gana, Indonésia, Nigéria, Camarões, Brasil e Equador. Este grupo de sete países concentra mais de 80 % da oferta mundial (ICCO, 2012). Dados sobre a produção em mil toneladas de amêndoas de cacau estão apresentados na Tabela 1, safra de 2009/10 e estimativas para 2010/11 e 2011/12.

Tabela 1 Produção de amêndoas de cacau (mil toneladas)

	2009/10		2010/11*		2011/12*	
África	2486	68,4%	3225	74,8%	2891	71,4%
Camarões	209		229		210	
Costa do Marfim	1242		1511		1476	
Gana	632		1025		879	
Nigéria	235		240		220	
Outros	168		221		107	
América	516	14,2%	561	13%	630	15,5%
Brasil	161		200		220	
Equador	150		161		190	
Outros	205		201		220	
Ásia e Oceania	633	17,4%	527	12,2%	531	13,1%
Indonésia	550		440		450	
Papua Nova Guiné	39		48		45	
Outros	44		39		36	
Total	3636	100%	4313	100%	4052	100%

Fonte: ICCO (2012).

Nota: \*Estimativas

Os Estados Unidos é o país que mais importa amêndoas de cacau e seus derivados. No 1º trimestre de 2011 as importações norte-americanas de amêndoas de cacau somaram 156.732 t, as importações de manteiga de cacau alcançaram 17.942 t, 14,54% acima das 15.664 t do primeiro trimestre de 2010. Já as importações de pasta (*líquor*) caíram de 6.953 t em 2010 para apenas 80,4 t (BRASIL, 2011).

A produção nacional de cacau em amêndoas está concentrada no sul da Bahia, seguida, em escala bem inferior, pelo Pará e por Rondônia (BRASIL, 2011). A Figura 1 mostra a produção, área plantada e número de produtores dos estados brasileiros que cultivam cacau.

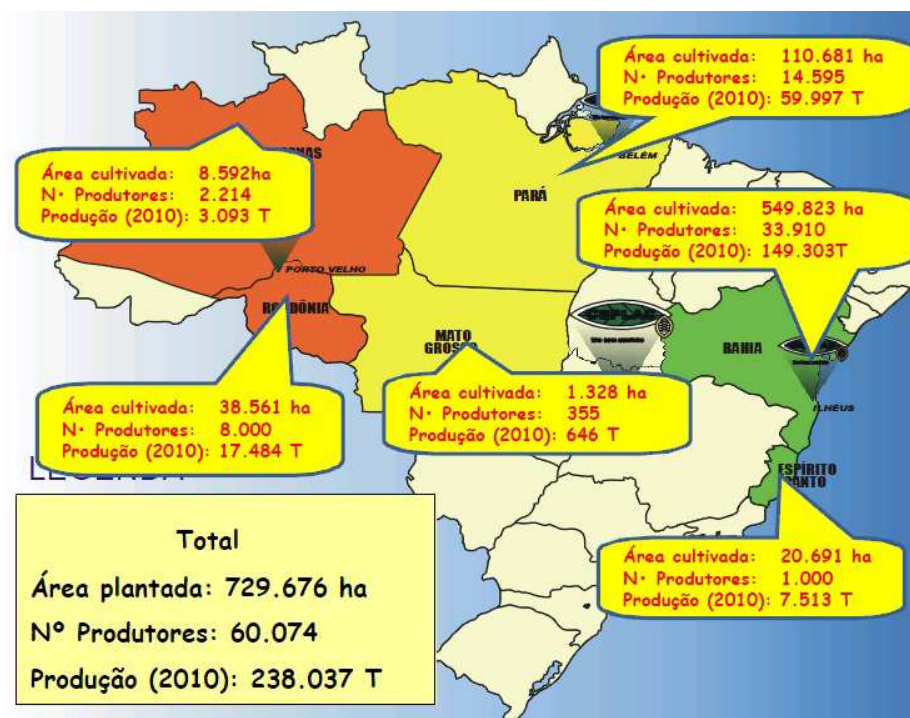


Figura 1 Produção, área plantada e número de produtores

Fonte: Brasil (2011).

De acordo com Brasil (2011), a safra brasileira de maio/2010 a abril/2011 fechou com recebimentos acumulados de 200.964 t, dos quais 153.393 t foram produzidos pelo estado da Bahia, e 47.571 t provenientes dos outros estados produtores. O que demonstra a importância da Bahia para a produção nacional de cacau.

Durante a década de 1980, o Brasil se destacou no mercado mundial de cacau como um grande produtor, atingindo marcas históricas de, por exemplo, 400.000 toneladas de amêndoas secas e produtividade de 750 kg/ha, a maior no contexto mundial da época. A partir da década de 90, devido à disseminação da doença vassoura-de-bruxa (causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*) houve

declínio na produtividade brasileira (EFRAIM, 2009). Desde o surgimento da doença em 1989, a produção brasileira de amêndoas secas de cacau, passou de 392 mil toneladas (1989) para apenas 170 mil (2003/04), representando uma expressiva queda da produção nacional (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2011). As exportações também sofreram acentuado declínio de 70%, como consequência, o Brasil passou de exportador a importador de amêndoas fermentadas e secas para suprir a demanda nacional (EFRAIM, 2009).

Nesse contexto, Efraim (2009) ressalta que a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) vem indicando o controle integrado da doença, com a utilização de variedades resistentes, práticas culturais, utilização de defensivos químicos e controle biológico, além de disponibilizar aos agricultores as informações ou materiais relativos a cada um desses métodos de controle. Com isso, a produção nacional de cacau vem se recuperando, e o Brasil, de um pico de baixa em 2003, de 170.000 toneladas, passou para 220.000 toneladas em 2011/2012, de acordo com as estimativas da International Cocoa Organization (ICCO, 2012).

Alves et al. (2006) ressaltam que a vassoura-de-bruxa é a doença mais importante da cultura do cacaueiro, nos países onde ela ocorre. Em 1989 foi constatada pela primeira vez a presença do patógeno (*Moniliophthora perniciosa*) na principal região produtora do Brasil, a Bahia. A falta de medidas de controle eficientes resultou, nos últimos anos, em menor produção, mudanças no uso da terra, venda de propriedades, diminuição do nível de emprego e danos ao meio ambiente. A Figura 2 representa a queda da produção brasileira desde o surgimento da praga.

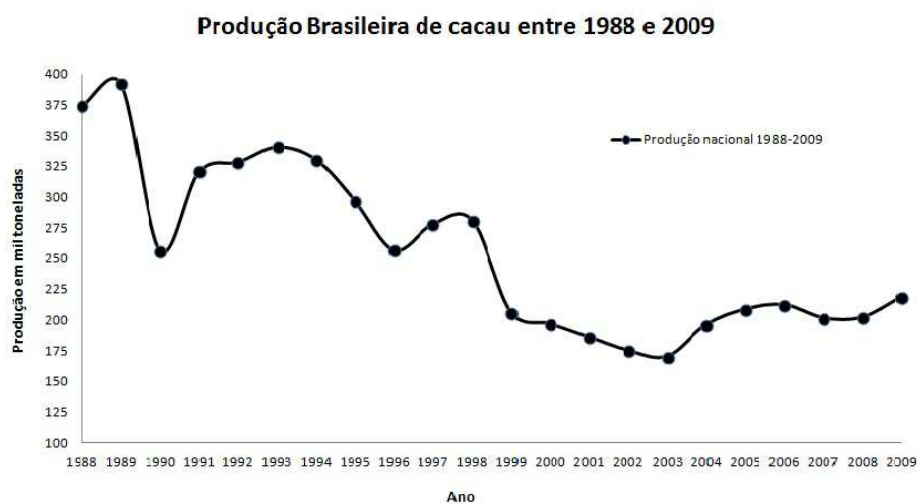


Figura 2 Produção Brasileira de cacau entre 1988 e 2009

Fonte: FAO (2011)

### 2.3 Vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa do cacau foi observada pela primeira vez no Suriname, em 1895 (HOLLIDAY, 1970). Essa enfermidade tem ampla distribuição geográfica nos países produtores de cacau da América do Sul e Central, como Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Venezuela, Panamá, nas Ilhas do Caribe, Trinidad & Tobago, Granada, Santa Lucia e São Vicente (BASTOS, 1990; SILVA et al., 2002). O primeiro registro da doença na Bahia ocorreu no município de Uruçuca, em 22 de maio de 1989 (PEREIRA et al., 1990). Em fevereiro de 2001, foi constatada em Linhares, estado do Espírito Santo (SILVA et al., 2002).

O patógeno (*Moniliophthora perniciosa*) é um parasita hemibiotrófico que possui duas fases fisiológicas e morfológicas distintas. Uma delas é parasítica, monocariótica, de crescimento intercelular, com ausência de grampos

de conexão, encontrada em tecidos vivos, enquanto que a outra é saprofítica, dicariótica, com crescimento intracelular e presença de grampos de conexão, encontrada somente em tecidos mortos (LUZ; SGRILLO; SANTOS FILHO, 2005).

A vassoura-de-bruxa provoca um superbrotamento das partes terminais do cacauzeiro, possuindo sintoma característico à formação dos brotos hipertrofiados de excessivo desenvolvimento, aparentando uma vassoura – caracterizando assim, o nome da doença. De início, o desenvolvimento da doença nos brotos é rápido, porém depois de 5 a 6 semanas o broto começa a secar, podendo cair ou ficar aderente à árvore (LOPES et al., 2011).

Sua disseminação é feita por basidiósporos, únicas unidades efetivas do patógeno, que são produzidos na superfície de lamelas situadas no himenóforo dos basidiomas, em células especializadas denominadas basídios, de onde são liberados ativamente. O principal mecanismo de disseminação da doença é pelo ar, embora chuvas não deixem de exercer também um importante papel (ANDEBRHAN, 1988; EVANS, 1981).

Os basidiósporos, cuja liberação ocorre, geralmente, entre as 18 h e 6 h da manhã, são levados pelas correntes aéreas (disseminação) e necessitam ser depositados rapidamente sobre os tecidos em crescimento (sítios de infecção) do hospedeiro. Nesses locais, os esporos germinam e penetram. Após uma hora de exposição ao ar livre, submetidos à radiação solar e ao dessecação, os basidiósporos perdem a viabilidade. A quantidade de basidiósporos no ar reduz sensivelmente em distâncias superiores a 300 m da fonte de inóculo, embora possa ocorrer alguma deposição de esporos e infecções em plantas situadas a alguns quilômetros da fonte de inóculo, quando as condições atmosféricas são favoráveis à disseminação (LUZ; SGRILLO; SANTOS FILHO, 2005).

Na Bahia, devido a ocorrência da doença, a produção brasileira reduziu severamente. Entretanto, avaliando-se os dados de estimativas da produção para

a safra 2011/2012, confirmou-se uma recuperação na produção brasileira de cacau, representando um aumento em torno de 30% entre 2003 e 2011/2012 (EFRAIM, 2009; FAO, 2011). Isso indica que as pesquisas em busca do controle do fungo causador da vassoura-de-bruxa ou de resistência de cacauzeiros à doença, seja por melhoramento genético, uso de fungicidas, manejo da lavoura, entre outros métodos, estão promovendo efeitos positivos (EFRAIM, 2009).

O controle adequado da vassoura-de-bruxa depende da remoção das partes infectadas (poda fitossanitária), aplicação de fungicidas químicos e seleção de variedades clonais resistentes (LOPES et al., 2011).

#### **2.4 Desenvolvimento de novas variedades clonais do cacauzeiro**

O uso de variedades resistentes é sem dúvida, a forma mais promissora e econômica para o controle da vassoura-de-bruxa. A primeira introdução de cacau na região baiana ocorreu em 1888. Até a década de 70 do século passado, haviam sido realizados apenas quatro períodos de introdução, com baixa variabilidade genética. No período de 1970 a 1979 ocorreu a implantação de núcleos de cacauzeiros e distribuição de sementes híbridas (SILVA; CARDOSO, 1980).

Recentemente, uma atenção por clones resurgiu, sendo dada atenção especial a este tipo de material na Malásia e em alguns países da América Latina, como a Colômbia, onde são distribuídos, principalmente, clones TSH e TSA, obtidos em Trinidad; e Equador, aonde o clone CCN 51, de alta produtividade, resistente à vassoura-de-bruxa e resultante de dois ciclos de seleção conduzidos por um agricultor, está sendo amplamente cultivado (neste país também são indicados clones TSH, TSA e EET) (PIRES, 2003).

Com o intuito de recuperação da lavoura cacauzeira, o Brasil incentiva a união entre fazendeiros e órgãos de pesquisas, como o Centro de Pesquisa do

Cacau – CEPEC e a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. Essa união tem como objetivo desenvolver pesquisas sobre cultivares de cacau resistentes, produtivos e que originem matérias-primas de qualidade. Uma das formas mais eficientes encontradas para a recuperação da lavoura cacaueira (EFRAIM, 2009).

De acordo com Dias (2001), os primeiros trabalhos dirigidos ao melhoramento da espécie, na Bahia, tiveram início na década de 1940, sob a condução do Instituto de Cacau da Bahia, na Estação Experimental de Uruçuca, com a seleção de plantas individuais dentro da população de cacaueiros comuns da Bahia. Esta seleção feita em fazendas, com base na avaliação da produção, deu origem as seleções da série SIC (Seleção Instituto do Cacau). Foram identificadas algumas plantas de semente branca e folhas tenras em cacaueiros da variedade Comum denominados Catongo, nome da fazenda onde foram identificados, na antiga localidade de Pirangi, hoje município de Itajuípe-BA.

Nas fazendas de cacau durante, aproximadamente, dois séculos foram cultivadas e multiplicadas as plantas pelos produtores locais, que ao longo desses anos selecionaram de forma massal suas variedades comuns, constituídas das conhecidas variedades Comum, Para, Parazinho e Maranhão. Na década de 1950, foi realizado nas Estações Experimentais de Jussari (Jussari, BA) e Goitacazes (Linhares, ES), seleções que deram origem as series SIAL (Estação Instituto Agronomico do Leste) e EEG (Estação Experimental de Goitacazes) (LUZ et al., 1997).

A CEPLAC usou variedades competitivas e agronomicamente superiores, introduzidas de outros países, principalmente de Trinidad e da Costa Rica, para serem utilizados diretamente como cultivares ou em cruzamentos, especialmente com as seleções locais, dando início ao programa de desenvolvimento de cultivares híbridas buscando variedades com boas características de qualidade, produção e resistência (PEREIRA, 2001).



Atualmente um amplo conjunto de novas fontes de resistência foi identificado incluindo: os clones das series Cruzeiro do Sul e RB, originarias do Acre; o clone Ma, do Amazonas; os clones CCN, do Equador. Pelas análises de distancias genéticas entre estas fontes, avaliadas em nível de DNA, vem sendo efetuados cruzamentos visando a associação de genes de resistência.

Hoje, para os agricultores baianos, por meio do Instituto Biofabrica de Cacau (Organização social vinculada ao Governo da Bahia), esta sendo disponibilizado material genético de cacau tolerante a vassoura-de-bruxa e de alta produtividade, tendo como finalidade básica o apoio complementar ao programa de Recuperação da Lavoura Cacaueira Baiana. Alguns destes materiais são: TSH 516, 565, 774, 1188; SJ 02; TSA 654, 656, 792; FA 13; PS 1030, 1319; CCN 51; IPIRANGA 01; BN 34; EET 397; CEPEC 2002, 2003, 2004; PH 9, 15, 16; LCTEEN 37 A (PEREIRA, 2001). A figura 3 apresenta algumas variedades de cacau cultivadas em solo brasileiro.

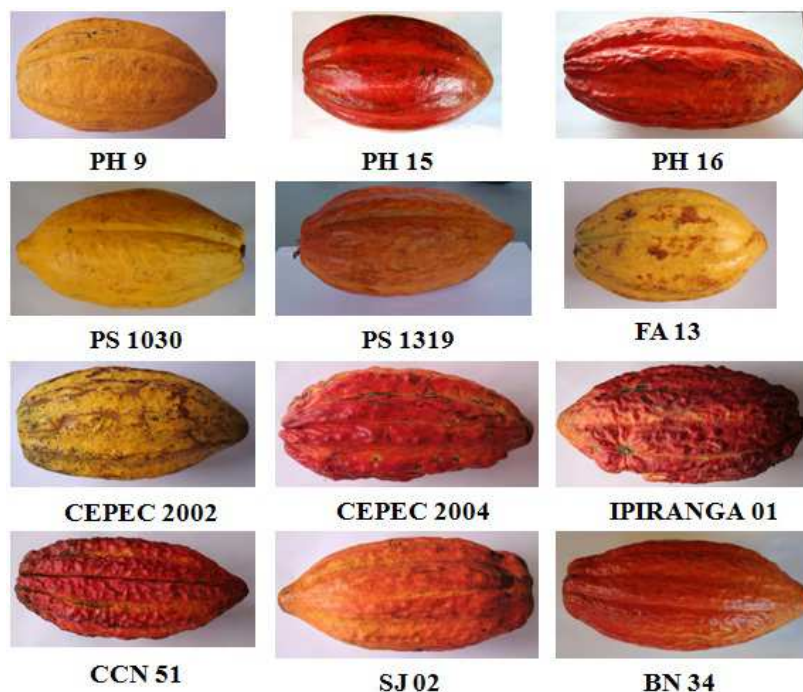


Figura 3 Alguns exemplos de variedades de cacau encontradas em solo brasileiro

### 2.5 Impacto do melhoramento genético na qualidade do cacau

A dificuldade em se avaliar comparativamente as diferenças entre variedades de cacau encontra-se na escassez de trabalhos que tenham utilizado diferentes variedades genéticas submetidas aos mesmos protocolos de fermentação, secagem e torração (CROSS, 1999). Mas, algumas pesquisas têm possibilitado um maior conhecimento sobre os fatores que influenciam no sabor de chocolate das novas variedades genéticas (EFRAIM, 2009).

Apesar da importância de processos pós-colheita, como a fermentação, secagem e torrefação, no desenvolvimento do sabor de chocolate, alguns estudos mostraram também um forte efeito da variedade de cacau no sabor. Clapperton

et al. (1994b) avaliaram sensorialmente mais de quatro mil amostras de *liquor* de cacau preparado a partir de 107 clones, na Malásia, e relataram um efeito claro no sabor dos diferentes clones avaliados. Clapperton et al. (1994c) avaliaram 64 clones e 12 atributos de sabor, e observaram uma grande diferença entre os clones, especialmente para o sabor do cacau e adstringência.

Efrain (2009) verificou atributos de sabor distintos para o chocolate produzido a partir de nove clones do programa de melhoramento do Brasil, os clones estudados foram: CEPEC 42, EET 397, TSA 654, TSA 656, TSAN 792, TSH 516, TSH 565, TSH 774 e TSH 1188. Efrain (2009) submeteu todas as amostras ao mesmo tipo de processamento, gerando três produtos: massa de cacau, manteiga e chocolate. Avaliando as características desses derivados, constatou-se que a manteiga de cacau obtida de oito das nove variedades mais resistentes à vassoura-de-bruxa apresentava maior dureza em comparação com a extraída do cacau comum cultivado na Bahia, além disso, testes sensoriais comprovaram uma maior preferência pelos produtos gerados a partir de variedades obtidas de misturas de dois grupos de cacauzeiros (*Forastero* e *Trinitário*), em comparação com outras variedades descendentes apenas do grupo *Forastero*.

Sukha et al. (2008) avaliaram o sabor do chocolate produzido a partir de sete clones de cacau fermentados e plantados em quatro regiões de Trinidad e Tobago, e observou que o efeito da variabilidade genética em atributos de sabor foi grande, até mesmo maior do que o efeito do meio ambiente.

O efeito de variabilidade genética na composição química do cotilédone também tem sido alvo de pesquisas. Os conteúdos de flavonoides, cafeína e teobromina em grãos de cacau demonstraram que podem afetar o amargor e adstringência do chocolate, e suas quantidades variam entre os clones de cacau (CAMU et al., 2008; CLAPPERTON et al., 1994a, 1994b; NOOR-SOFFALINA et al., 2009).

Visando contribuir para o aperfeiçoamento do melhoramento do cacauero no Brasil, Pires (2003) conduziu estudos sobre a coleção de germoplasma do CEPEC – Centro de Pesquisa do Cacau, em Ilhéus, na Bahia, que abordaram os caracteres de maior importância para a cultura: resistência à vassoura-de-bruxa e podridão parda, produtividade, características físicas de fruto e semente, teor e dureza da gordura e concentração de ácidos graxos e triglicéridos. Pires (2003) observou que as séries com maiores médias para o teor de gordura são na quase totalidade, originárias da região Amazônica e de material não domesticado, além disso, o genótipo do embrião é fator determinante para o conteúdo de manteiga da semente.

A fim de avaliar o efeito da fermentação sobre o teor de purinas no cacau *Criollo* e um híbrido originado ao Sul do Lago Maracaibo, foi realizado um teste conduzido por Portillo et al. (2001). O teor de teobromina e cafeína diminuiu durante a fermentação para os dois tipos de cacau. O conteúdo de teobromina foi menor no cacau *Criollo*. Também a relação de teobromina:cafeína foi menor para os tipos de cacau *Criollo*, indicando que estes são menos amargos.

Efraim (2009) ressalta, que nestes trabalhos, uma vez que as fermentações foram realizadas em pequenas quantidades (em alguns casos de 1 a 3 Kg) e que as sementes com polpa de grande parte dos genótipos avaliados foram colocadas em uma mesma caixa de fermentação com quantidades maiores de outras sementes com polpa, particularidades da etapa de fermentação de cada material não puderam ser avaliadas, bem como as possíveis variações na qualidade final de cada material decorrentes do processo fermentativo. Pode-se especular que esta variação pode resultar numa fermentação irregular levando a conclusões errôneas sobre a qualidade do novo clone. Assim, surge a necessidade do estabelecimento de uma fermentação em grande escala (40 a 60 Kg) para melhor caracterizar e qualificar os novos clones desenvolvidos.

## 2.6 O processo fermentativo do cacau

A partir das sementes do cacau é obtido um dos alimentos mais conhecidos e apreciados: o chocolate. Seu sabor é condicionado não apenas a atributos genéticos do cacaueiro (variedade), como também a modificações que ocorrem durante seu beneficiamento. Basicamente, após a colheita do cacau, são efetuadas as operações de abertura dos frutos, fermentação das sementes junto à polpa que as envolve, secagem e torração para obtenção da massa ou *liquor* de cacau, que será utilizado na obtenção de manteiga e pó de cacau, além de chocolates e produtos derivados (BECKETT, 2011).

Os frutos após a colheita são abertos e levados para os locais de fermentação que variam de acordo com o tipo da região produtora (LEHRMAN; PETERSON, 1983). No sul da Bahia, a fermentação ocorre em caixas de madeira (cochos de fermentação), durante 6-8 dias, onde o cacau é revolvido de 12 em 12 horas a partir do segundo dia de fermentação. A Figura 4 apresenta as mudanças visíveis que ocorrem na massa de cacau durante os dias de fermentação. No início, a polpa se faz muito presente, com o passar dos dias a atividade microbiana torna-se mais intensa, sendo essa polpa consumida. No final dos dias de fermentação apenas amêndoas prontas para o processo de secagem permanecem no cocho.



Figura 4 Mudanças visíveis na massa de cacau durante os dias de fermentação

O termo fermentação de cacau implica em um processo microbiológico, de ação enzimática e de produção dos precursores do aroma e sabor de chocolate. Ou seja, 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 (BIEHL et al., 1989; SCHWAN; WHEALS, 2004). 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 sobre a fermentação do cacau certificam desde o século passado a presença de várias espécies de microrganismos associados ao processo, como leveduras, bactérias do ácido láctico e acético, várias espécies de *Bacillus*, além de outros fungos e aeróbios formadores de esporos (GARCIA-ARMISEN et al., 2010; JESPERSEN et al., 2004; LIMA et al., 2011; NIELSEN et al., 2005; SCHWAN; WHEALS, 2004). A Figura 5 representa a sucessão microbiana que ocorre durante o processo fermentativo do cacau.

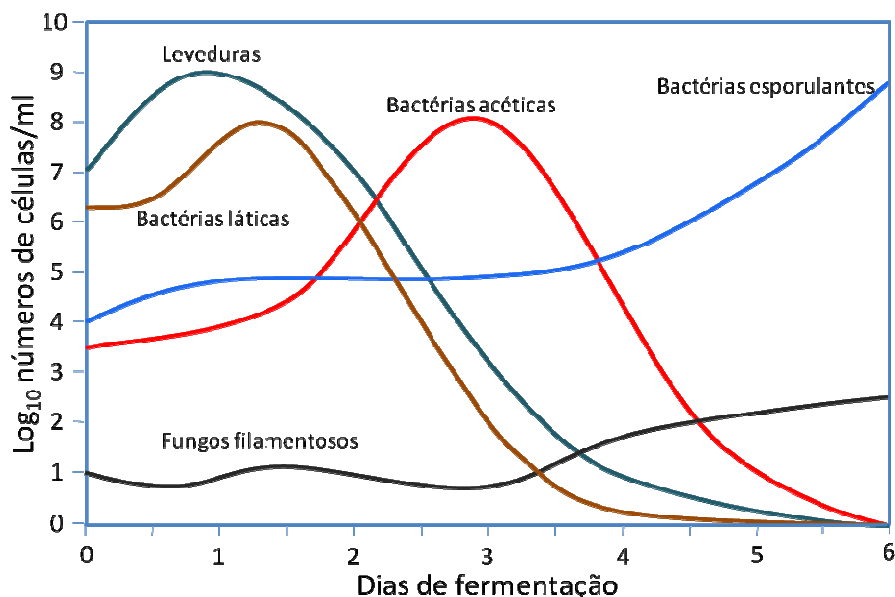


Figura 5 Sucessão microbiana durante o período de fermentação

Fonte: Schwan e Wheals (2004).

A sucessão microbiana começa quando 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 as primeiras 48 horas (NIELSEN et al., 2007). 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 (ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS, 2004).

Com a desintegração da polpa que envolve as amêndoas e o revolvimento da massa de cacau, a aeração 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, produzido 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 dos cotilédones promove a morte do embrião das sementes (48-72h), e juntamente com o etanol atuam sinergisticamente, causando a difusão de polifenóis, o que gera amêndoas de cacau bem fermentadas (ARDHANA; FLEET, 2003; BIEHL et al., 1989; CAMU et al., 2007; NIELSEN; SNITKJAER; BERG, 2008; SCHWAN, 1998; SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995). 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. A Figura 6 ilustra os metabólitos produzidos durante o processo fermentativo da amêndoa de cacau.



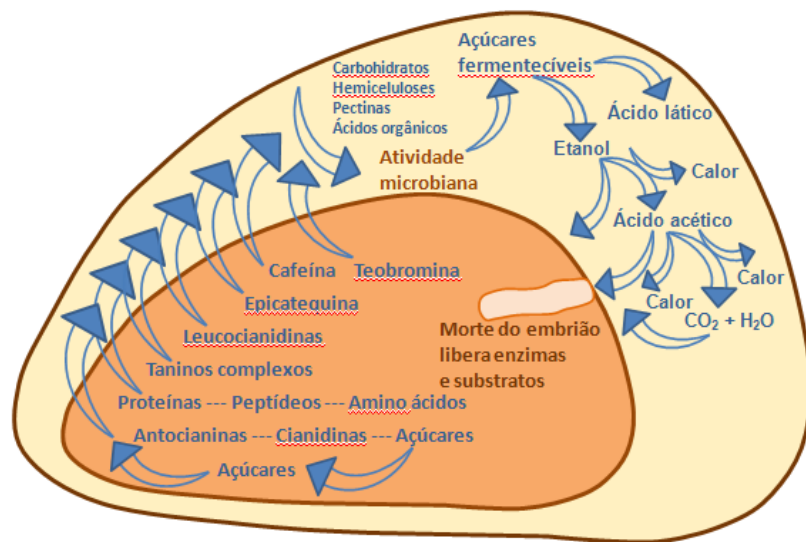


Figura 6 Metabólitos finais produzidos durante o processo fermentativo da amêndoa de cacau

Fonte: Lopez e Dimick (1995)

Os efeitos favoráveis da fermentação do cacau são a produção de sabor 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. 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. Sabe-se que este sabor típico surge após 44-46 horas do início da fermentação (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2007).

De acordo com Thompson, Miller e Lopez (2001), a técnica de fermentação é variável, dependendo do país, da região e do porte do produtor de cacau (grandes ou pequenas propriedades). Em regiões da América Central, a

fermentação, geralmente, é realizada em plataformas de secagem, nas quais as sementes com polpa são espalhadas durante o dia e reunidas em montes durante a noite como forma de manter o calor. Essa prática mostrava-se eficiente quando a maior parte do cacau produzido na região era do tipo *Criollo*. Porém, atualmente, grande parte do material é constituída por híbridos do grupo *Forastero*, sendo essa prática inadequada para esse tipo de cacau. Em alguns países africanos e esporadicamente na região amazônica brasileira, a fermentação é realizada em montes, sendo que as quantidades podem variar consideravelmente, de 25 a 1.000 Kg de sementes com polpa (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001). Em algumas regiões de Gana, na Nigéria e nas Filipinas, a fermentação é geralmente realizada em cestos. Em fazendas de grande porte, como na Bahia, a fermentação é realizada em caixas de madeira de aproximadamente 1 m<sup>3</sup>.

Contudo, a maior parte do cacau no mundo é cultivado em menor escala, em pequenas propriedades com condições precárias de mão-de-obra e mecanização. Nesse caso, a fermentação é realizada de diversas formas, como por exemplo, em montes de sementes com polpa cobertas com folhas de bananeira, os quais permanecem ao lado ou na própria área de cultivo do cacau, em caixas utilizadas no transporte de frutas, em sacos, em plataformas de secagem, entre outros (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001).

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 (COCOLIN; BISSON; MILLS, 2000; SAMAH et al., 1993), 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; 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.

## **2.7 Identificação e função de 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; PÉTER; DLAUCHY, 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; EVERIS; BETTS, 2004; SENSES-ERGUL; OZBAS, 2006).

As 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. Estudos realizados no Brasil identificaram diversas espécies de leveduras associadas à fermentação do cacau, entre elas: *Candida bombi*, *C. pelliculosa*, *C. rugopelliculosa*, *C. rugosa*, *C. humilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluveromyces marxianus*, *Kloechera apiculata*, *K. thermotolerans*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, e *Torulaspota pretoriensi* (PEREIRA et al., 2012, 2013; SCHWAN; WHEALS, 2004).

O fato das leveduras serem os agentes principais da fermentação do cacau é explicado pelas seguintes funções:

- a) 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;
- b) Produção de etanol sob condições de baixo oxigênio e altas concentrações de açúcares, os quais são consumidos oxidativamente;
- c) Produção de ácidos orgânicos (oxálico, fosfórico, succínico, málico e ácido acético), os quais penetram nas sementes e causam a morte do embrião;
- d) Produção de alguns compostos orgânicos voláteis que contribuem tanto para o sabor do chocolate, quanto para os precursores do sabor;
- e) E por fim, pela secreção de pectinases, que reduzem a viscosidade da polpa, levando a uma maior aeração da massa fermentativa (SCHWAN, 1998; SCHWAN; WHEALS, 2004).

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; FELL; BOEKHOUT, 2011). 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 (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Durante muitos anos as técnicas de identificação e classificação de leveduras mais empregadas foram aquelas baseadas em características morfológicas e fisiológicas, denominadas técnicas tradicionais. Entretanto, os

procedimentos taxonômicos convencionais para classificar microrganismos são ainda muito lentos, exigem muito trabalho e não são absolutamente conclusivos (BERNARDI et al., 2008).

Métodos moleculares vêm sendo cada vez mais usados como importante ferramenta de identificação de leveduras. O rDNA é muito empregado em estudos taxonômicos de leveduras devido a presença de regiões codificadoras e não codificadoras, que evoluem em diferentes taxas, e também pelo fato de estar presente em todos os organismos, a partir de uma origem evolutiva comum.

## **2.8 Identificação e função de bactérias associadas à fermentação de cacau**

Testes bioquímicos, nutricionais e fisiológicos são usados na taxonomia de bactérias desde a década de 20 (BUSSE; DENNER; LUBITZ, 1996). Esses métodos testam, entre outras coisas, a capacidade de utilização de diferentes fontes de carboidrato e a presença de determinadas enzimas. Até pouco tempo atrás a identificação bacteriana baseava-se somente nessas características. Isso gerava um problema, pois organismos não relacionados filogeneticamente podem apresentar características semelhantes se ocupassem o mesmo ambiente.

Kirchoff et al. (1997) admitiram que a identificação de novos isolados torna-se difícil se for baseada em critérios puramente fenotípicos e fisiológicos e, principalmente, se as características mostradas por um isolado em particular não são completamente idênticas às espécies já descritas. Por esse motivo tem se recomendado uma abordagem polifásica para a identificação de bactérias. Isso inclui informação fenotípica, genotípica e filogenética (VANDAMME et al., 1996).

O papel das bactérias 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 (SCHWAN, 1998).

Os dois grupos mais importantes de bactérias encontrados na fermentação do cacau constituem de bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético. Das bactérias isoladas da fermentação do cacau, *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus lactis* são as principais espécies encontradas nas primeiras 24 horas de fermentação (PEREIRA et al., 2013; SCHWAN; WHEALS, 2004). 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 (ARDHANA; FLEET, 2003; CAMU et al., 2007; SCHWAN; WHEALS, 2004). Em geral, *Lactobacillus sp.* estão presentes no início da fermentação enquanto que *Lactococcus sp.* aparecem nos estágios finais da fermentação (SCHWAN; WHEALS, 2004).

O aumento da aeração dentro da massa fermentativa estimula o desenvolvimento de bactérias do ácido acético. Estas bactérias são responsáveis pela oxidação do etanol a ácido acético e posteriormente pela oxidação do ácido acético em água e dióxido de carbono. Esta reação é 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 cotilédones promove a morte do embrião das sementes (48-72h), e juntamente com o etanol atuam sinergisticamente, causando a quebra das paredes celulares, o que possibilita a difusão de polifenóis, gerando assim amêndoas de cacau bem fermentadas (ARDHANA; FLEET, 2003; NIELSEN et

al., 2005; SCHWAN, 1998; SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995). Em geral, membros do gênero *Acetobacter* são mais frequentemente isolados do que *Gluconobacter* (PEREIRA et al., 2013). As espécies *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* são as mais frequentemente isoladas.

Outras espécies de bactérias como *Bacillus* desenvolvem-se nos estágios finais da fermentação, mas segundo Schwan e Wheals (2004) o seu papel ainda não está completamente elucidado.

## **2.9 Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE)**

Durante muito tempo foi bastante limitada a capacidade de se realizar estudos sobre a diversidade de microrganismos dos solos, já que uma pequena porcentagem (1% a 5%, aproximadamente), podia ser acessada pelos métodos convencionais, com base em cultivo. Uma nova perspectiva surgiu com o desenvolvimento de métodos moleculares e bioquímicos mais sensíveis, que tem permitido interpretar mais facilmente e de forma mais sensível a diversidade genética e funcional dos microrganismos em alimentos (ERCOLINI, 2004).

Com o advento da biologia molecular, tem sido possível avaliar mais facilmente e de forma mais sensível a estrutura das comunidades de microrganismos no solo. Técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA de microrganismos retiradas diretamente dos ambientes naturais, sem a necessidade de multiplicação prévia das células, têm contribuído para o avanço nos estudos de ecologia microbiana (CAMU et al., 2007; CHEN; WANG; CHEN, 2008; MAGALHÃES et al., 2010; NIELSEN et al., 2005; NIELSEN; SNITKJAER; BERG, 2008; RAMOS et al., 2010).

Muyzer, De Waal e Uitterlinden (1993) foram os primeiros a utilizar PCR-DGGE com o objetivo de avaliar a diversidade de amplicons do gene rRNA 16S de uma comunidade microbiana. Muito embora existam várias

limitações, a PCR-DGGE de fragmentos do gene rRNA 16S é uma metodologia adequada para análises comparativas de duas ou mais comunidades bacterianas.

A análise de DGGE depende da extração do DNA de uma mistura, que irá conter DNA de várias espécies em uma 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 (ERCOLINI, 2004; KIM; PARK; KIM, 2009).

O DGGE foi originalmente desenvolvido e aplicado na pesquisa médica a fim de detectar, identificar e localizar mutações de ponto, naturais ou induzidas (FISHER; LERMAN, 1983). 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 (BEEK; PRIEST, 2002); para examinar diferenças entre bactérias habitadas no trato gastrointestinal 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), como para estudar a sucessão das espécies microbianas envolvidas na fermentação de cacau (CAMU et al., 2007; NIELSEN et al., 2005, 2007; NIELSEN; SNITKJAER; BERG, 2008; PEREIRA et al., 2012, 2013).

Dentro deste propósito, a técnica molecular PCR-DGGE, 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 (ARDHANA; FLEET, 2003; NIELSEN et al., 2005).

## REFERÊNCIAS

ALVES, S. A. M. et al. Curvas de progresso e gradientes da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 483-491, out. 2006.

AMIN, M. M. A ação especulativa dos fundos *hedge* e de *commodities* nos mercados futuros de cacau. **Revista Informe GEPEC**, Cascavel, ano 7, n. 1, p. 7-30, 2003.

ANDEBRHAN, T. Rain water as a factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer within cacao tree. In: INTERNATIONAL COCOA CONFERENCE, 10., 1988, Santo Domingo. **Proceedings...** Santo Domingo: ICC, 1988. p. 367-369.

ARDHANA, M. M.; FLEET, H. G. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 87-99, Sept. 2003.

BARTLEY, B. G. D. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. Oxford: Oxford USA Professio, 2005. 341 p.

BASTOS, C. N. **Epifitiologia, hospedeiro e controle da vassoura-de-bruxa *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer**. Ilhéus: CEPLAC, 1990. 21 p. (Boletim Técnico, 168).

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. New York: J. Wiley, 2011. 720 p.

BEEK, S. van; PRIEST, F. G. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 1, p. 297-305, Jan. 2002.

BERNARDI, T. L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP).

**World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 2405-2412, Nov. 2008.

BIEHL, B. et al. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of cocoa pods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 48, n. 2, p. 189-208, 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cacau**: informações de mercado. Brasília, 2011. 43 p.

BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem: overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 3-38, June 1996.

CAMU, N. et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 6, p. 1809-1824, Mar. 2007.

CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationship of cocoa populations. **Tropical Agriculture**, Saint Augustine, v. 21, p. 144-159, 1944.

CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 492-501, May 2008.

CLAPPERTON, J. et al. Contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L) flavor. **Tropical Agriculture**, Surrey, v. 71, n. 4, p. 303-308, Oct. 1994a.

\_\_\_\_\_. Effects of planting materials on flavour. **Cocoa Growers' Bulletin**, Bournville, n. 48, p. 47-63, 1994b.

\_\_\_\_\_. Genetic variation in cocoa flavour. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 11., 1993, Yamoussoukro. **Proceedings...** Lagos: Cocoa Producers' Alliance, 1994c. p. 749-758.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, n. 1, p. 81-87, Aug. 2000.

CROSS, E. Cocoa flavor development. **The Manufacturing Confectioner**, Chicago, v. 79, n. 2, p. 70-77, 1999.

CUBBERO, E. M. et al. Efecto del genotipo sobre el proceso de fermentacion de cacao. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 11., 1993, Yamoussoukro-Côte D'Ivoire. **Proceedings...** Yamoussoukro-Côte D'Ivoire: ICR, 1993. p. 729-739.

DIAS, L. A. S. **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2001. 578 p.

DUBLIN, D. **Handbook of plant cell culture**. New York: McMillan, 1984. v. 3, 620 p.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. 208 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 297-314, Mar. 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 of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 55-67, Apr. 2004.

EVANS, H. C. Witches' broom disease: a case study. **Cocoa Growers' Bulletin**, Bournville, n. 32, p. 5-9, 1981.

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**, Washington, v. 80, p. 1579-1583, 1983.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site>>. Acesso em: 10 set. 2011.

GARCIA-ARMISEN, T. et al. Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 6, p. 2281-2292, Aug. 2010.

HOLLIDAY, P. *Crinipellis pernicioso*: CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1970. 233 p.

HURST, W. J. et al. Cacao usage by the earliest Maya civilization. **Nature**, London, v. 418, n. 6895, p. 289-290, July 2002.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **ICCO quarterly bulletin of cocoa statistics**. Disponível em: <[http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/30-related-documents/46-statistics-production.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html)>. Acesso em: 18 dez. 2012.

JESPERSEN, L. et al. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**, New York, v. 5, n. 4/5, p. 441-453, Feb. 2004.

KIM, N. K.; PARK, H. J.; KIM, Y. P. Chemical composition change in TSP due to dust storm at Gosan, Korea: do the concentration of anthropogenic species increase due to dust storm? **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 204, n. 1/4, p. 165-175, Nov. 2009.

KIRCHOFF, G. et al. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 5/6, p. 853-862, May 1997.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, J. **The yeasts, a taxonomic study**. 5<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier, 2011. 1873 p.

LEHRIAN, D. W.; PATTERSON, G. R. Cocoa fermentation. **Biotechnology**, New York, v. 5, p. 12-15, 1983.

LIMA, L. J. R. et al. *Theobroma cacao* L., “The Food of the Gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 51, n. 8, p. 731-761, Sept. 2011.

LOPES, U. V. et al. Cacao breeding in Bahia, Brazil: strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 11, n. S1, p. 73-81, June 2011.

LOPEZ, A. S.; DIMICK, P. S. Cocoa fermentation. In: REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. (Ed.). **Biotechnology: enzymes, biomass, food and feed**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley, 1995. p. 561-577.

LUZ, E. D. M. N. et al. Cacaú (*Theobroma cacao* L.): controle de doenças. In: VALLE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 1997. v. 2, p. 611-655.

LUZ, E. D. M. N.; SGRILLO, R. B.; SANTOS FILHO, L. P. Estimativas de danos e perdas causadas por doenças no cacau. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 67-79.

MAGALHÃES, K. T. et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1241-1250, July 2010.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar. 1993.

NIELSEN, D. S. et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture dependent and culture independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 168-186, Mar. 2007.

\_\_\_\_\_. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analyzed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast**, Davis, v. 22, n. 4, p. 271-284, Mar. 2005.

NIELSEN, D. S.; SNITKJAER, P.; BERG, F. van den. Investigating the fermentation of cocoa by correlating Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiles and Near Infrared spectra. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 133-140, July 2008.

NOOR-SOFFALINA, S. S. et al. Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavor precursors in a lipidic model system. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 168-180, Jan. 2009.

PAULIN, D.; ESKES, A. B. Le cacayer stratégies de sélection. **Plantations, Recherche, Développement**, Paris, v. 2, n. 6, p. 5-18, Mar. 1995.

PEREIRA, A. B. Melhoramento clonal. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa, MG: FUNAPE, 2001. p. 361-384.

PEREIRA, G. V. de M. et al. Bacterial strains to develop a defined fermentations and screening of yeast and characterization of small-scale cocoa microbiological. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 78, p. 5395-5405, Aug. 2012.

\_\_\_\_\_. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 121-133, Feb. 2013.

PEREIRA, J. L. et al. The first occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa growing region of Brazil. **Tropical Agriculture**, Surrey, v. 67, n. 2, p. 188-189, Apr. 1990.

PIRES, J. L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento de cacaueteiro com ênfase na produtividade, qualidade dos frutos e resistência à doenças**. 2003. 226 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

PORTILLO, E. et al. Effect of the fermentation on the content of purines in *Criollo* and hybrid cocoa (*Theobroma cocoa* L.) in the south of Maracaibo's lake. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v. 28, n. 1, p. 228-237, dic. 2011.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops: dicotyledons 2**. New York: J. Wiley, 1968. 719 p.

RAMOS, C. L. et al. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 240, n. 2/3, p. 225-231, June 2010.

SAMAH, A. O. et al. Fermentation studies of stored cocoa beans. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 603-604, Sept. 1993.

SCHWAN, R. F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 4, p. 1477-1483, Apr. 1998.

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**, Oxford, v. 79, p. 96-107, 1995. Supplement.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 44, n. 4, p. 1-17, May 2004.

SENSES-ERGUL, S.; OBAS, Z. Y. Characterization of the yeast flora present in some Turkish high-sugar products. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 99-106, Apr. 2006.



SILVA, P.; CARDOSO, A. de O. Histórico das introduções de cacauero (*Theobroma cacao* L.) no recôncavo da Bahia, Brasil. **Revista Theobroma**, Itabuna, v. 10, n. 3, p. 135-140, 1980.

SILVA, S. D. V. M. et al. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero. **Agrotropica**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 1-24, July 2002.

SIMPSON, J. M. et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in faecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 4705-4714, Nov. 2000.

SUKHA, D. A. et al. The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 226, n. 3, p. 405-413, Jan. 2008.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In: DOYLE, M. J.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 2001. p. 721-733.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2<sup>nd</sup> ed. Washington: ASM, 2007. p. 837-849.

TORNAL-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 of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1/2, p. 189-200, Sept. 2003.

TUCCI, M. L. S. **Seleção de genótipos para produção de manteiga de cacau no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil**. 1997. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1997.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 60, n. 2, p. 407-438, June 1996.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

**ARTIGO 1** **Microbial succession and dynamics of substrates and metabolites during fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids**

**Artigo nas normas da revista Food Research International**

### **Abstract**

The intensive efforts to control the “witches' broom” fungus in Brazil have included research on resistant and more productive cocoa cultivars, but the impact of these crosses on cocoa fermentation is not known. To understand the effects of breeding on cocoa fermentation, this work investigated the microbes and chemical compounds present during the fermentation of three highly productive hybrids (PH 9, PH 15 and PH 16). The microbial species present during the fermentation process were similar in all three hybrids, but the populations of lactic acid, acetic acid, and mesophilic aerobic bacteria and yeast in the PH 9 hybrid fermentations were greater than those in PH 15 and PH 16. *Lactobacillus fermentum*, *L. casei* and *L. rhammnosus* were the predominant species in all hybrid cocoa fermentations. However, the profile of the bacterial community detected by PCR-DGGE was more complex in the PH 9 fermentation. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was predominant in the all fermentations, followed by *Hanseniaspora uvarum* and the genus *Pichia*. A similar profiles of substrate consumption (glucose, sucrose, fructose and citric acid) and kinetics of major metabolites (ethanol, acetic acid and lactic acid) was also observed, but the PH 16 hybrid presented the highest concentrations of sugars, acids and alcohols.

**Keywords:** cocoa fermentation, chocolate, hybrids, substrates and metabolites, PCR-DGGE.

## Resumo

Entre as medidas para o controle da vassoura-de-bruxa no Brasil, as pesquisas sobre cultivares de cacau resistente e mais produtivo têm recebido atenção especial. Mas o impacto do melhoramento genético na fermentação do cacau não é conhecido. Para entender os efeitos do melhoramento na fermentação do cacau, este trabalho investigou a microbiota e compostos químicos presentes durante a fermentação de três híbridos altamente produtivos (PH 9, PH 15, e PH 16) cultivados no sul da Bahia. As espécies microbianas presentes durante o processo de fermentação foram semelhantes em todos os três híbridos, mas as populações de bactérias do ácido láctico (BAL), bactérias do ácido acético (BAA), aeróbios mesófilos, e leveduras na fermentação do híbrido PH 9 foram maiores do que em PH 15 e PH 16. *Lactobacillus fermentum*, *L. casei* e *L. rhammnosus* foram as espécies bacterianas predominantes em todas as fermentações dos híbridos de cacau. No entanto, o perfil da comunidade bacteriana detectada por PCR-DGGE foi mais complexo na fermentação do híbrido PH 9. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi predominante em todas as fermentações, seguido por *Hanseniaspora uvarum* e uma espécie do gênero *Pichia*. Um perfil semelhante de consumo de substrato (glicose, sacarose, frutose e ácido cítrico) e cinética de metabolitos principais (etanol, ácido acético e ácido láctico) foi também observado, mas o híbrido PH 16 apresentou as concentrações mais elevadas de açúcares, ácidos e álcoois.

Palavras-chave: Fermentação do cacau, chocolate, híbridos, substratos e metabólitos, PCR-DGGE

## 1. Introduction

*Theobroma cacao* L. belongs to the family *Sterculiaceae* and is economically important due to its valuable seeds. The seeds, commonly known as cocoa beans, are the principal raw material for chocolate production. Cocoa plants are cultivated on plantations in tropical regions throughout the world; Ivory Coast, Ghana, Nigeria, Cameroon, Indonesia and Brazil are the major producers. For many years, cocoa production and commercialization has been the basis of the economy in some Brazilian states and particularly in Bahia. Brazil is the world's sixth largest cocoa producer (FAOSTAT, 2010).

Three main genetic groups of cocoa - *Criollo*, *Forastero* and *Trinitario* - have been established based on their morphological traits and geographical origins (Cheesman, 1944). In the early 1990s, financial crises in the international cacao market and 'witches broom', a disease caused by the pernicious fungus *Moniliophthora perniciosa* (*Crinipellis perniciosa*), dramatically decreased the production and exports of cocoa beans (Freire et al., 1999; Schwan and Wheals, 2004). These events prompted the search for disease-resistant hybrids, and the Brazilian producers are currently recovering. The cocoa breeding aimed at increasing productivity and disease resistance, affects some characteristics of cocoa, such as size, color, quantity and weight of the seeds, pulp amount, flavor, chemical composition (Camu et al., 2008; Noor-Soffalina, Jinap, Nazamid, & Nazimah, 2009; Sukha, Butler, Umaharan, & Boulton, 2008; Clapperton, Lockwood, Yow, & Lim, 1994). Considering the large variability in pulp content and composition, as well

as in the cotyledon composition, it should not be a surprise that different hybrids have different fermentation dynamics and requirements. However, the effects of hybrid breeding on cocoa fermentation and chocolate quality are unknown.

The major constituents of the fresh pulp, glucose, fructose and citric acid, are fermented into ethanol and lactic acid by yeasts, lactic acid bacteria (LAB). Studies have identified several yeast and LAB species associated to cocoa fermentation, including: *Candida Bombi*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. ethanolica*, *C. humilis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluveromyces marxianus*, *K. thermotolerans*, *Kloeckera apiculata*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia fermentans*, *P. kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis*, and *Pediococcus acidilactici* (Schwan and Wheals, 2004; Garcia-Armesen et al., 2010; Pereira, Magalhães, Almeida, Coelho, & Schwan, 2013). Consequently, the microenvironment of the fermenting substrate changes, allowing obligate aerobic acetic acid bacteria (AAB) to replicate and to oxidize ethanol, produced by yeasts, into acetic acid (Schwan and Wheals, 2004). Regarding the isolated AAB during fermentation of cocoa stands out: *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. ghanensis*, *A. senegalensis*, *A. lovaniensis*, *A. fabarum*, *Gluconobacter oxydans*, and *G. xylinus* (Schwan and Wheals, 2004; Camu et al., 2007; Cleenwerck et al., 2008; Papalexandratou, Vranckena, De Bruyneb, Vandammeb, & De Vuys, 2011; Pereira, Magalhães, Almeida, Coelho, & Schwan, 2013).

The fermentation of raw cocoa beans occurs in two steps: the first stage involves microbial reactions that take place in the pulp and the outer part of the beans; the second phase involves several hydrolytic reactions that occur within the cotyledons (Biehl, Brunner, Passem, Quesnel, & Adomako, 1985; Schwan and Wheals, 2004). As a consequence of the fermentation process cocoa different volatile and non-volatile compounds are formed and these alcohols, aldehydes, ketones, esters, carboxylic acids, pyrazines and sugars (Rodriguez-Campos, Escalona-Buendía, Orozco-Avila, Lugo-Cervantes, & Jaramillo-Flores, 2011). The microbial activity in the cocoa pulp is a well-defined temporal succession that is dominated by yeast during the first few hours, and then by LAB, which decline after 48 h of fermentation, and AAB. Various species of *Bacillus* (e.g. *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, and *B. flexus*), other bacteria of the genus *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Tatumella*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, and filamentous fungi (e.g. *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus glaucus*, *Mucor sp.*, and *Penicillium sp.*) may also grow throughout fermentation and can affect bean quality and cocoa flavor (Schwan et al., 1995; Schwan and Wheals, 2004; Ardhana and Fleet, 2003).

During fermentation, ethanol and acetic acid diffuse into the beans and, combined with the increased temperature, kill the seed embryo; consequently, the internal structure of the cocoa bean breaks down, releasing compounds and pigments that interact biochemically with activated endogenous hydrolases to develop flavor and color precursors (Schwan and Wheals, 2004; Afoakwa et al., 2008). This study investigated the microbial communities and the physicochemical changes

inside and outside of cocoa beans during the spontaneous fermentation of the three cocoa hybrids cultivated in Brazil.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Fermentation experiments and Sampling*

The fermentation experiments were conducted at the Vale do Juliana cocoa farm in Igrapiúna, Bahia, Brazil. The ripe cocoa pods from three different hybrids [Hybrid Port 9 (pH 9), Port Hybrid 15 (PH 15) and Port Hybrid 16 (PH 16)] (Fig. 1) were collected during the main harvest of 2011 (April and May). The cocoa pods were harvested and immediately opened with a machete, and the beans were transferred to the house of fermentation. The fermentation was started five hours after the breaking of the fruit and was performed in 0.06 m<sup>3</sup> wooden boxes (Schawn and Wheals, 2004). The time of the fermentation was 6 days (144 h) and the amount used for each one of the hybrids was 60 Kg. The pH value and temperature were evaluated during fermentations.





Figure 1 Fruit, pulp and beans of the three different hybrids cocoa – PH 9 (A), PH 15 (B) and PH 16 (C)

Bean samples of approximately 100 g each were withdrawn every 12 h during the fermentation process. The samples were collected approximately 40 cm from the surface of the center of the fermenting cocoa mass, placed in sterile plastic pots and transferred to the laboratory. The samples for chemical and culture-independent analyses were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### *2.1.1. Physical-chemical analysis*

#### *2.1.1.1. Sugars, alcohols and organic acids analysis*

The carbohydrates, alcohols and organic acids were extracted as described by Rodriguez-Campos, Escalona-Buendía, Orozco-Avila, Lugo-Cervantes, & Jaramillo-Flores (2011) with minor modifications. Ten grams of fermented cocoa beans from each sample were extracted twice with 10 mL of Milli-Q water with vortexing for 5 min, and each 10 mL homogenate was transferred to another tube. The tubes containing 20 mL of solution were centrifuged (7000 rpm, 10 min, 4 ° C), and the supernatant was separated from the precipitate. The precipitate was resuspended in an additional 5 mL of Milli-Q water, and vortexed and centrifuged as described above. The final volume of 25 mL of diluted pulp was centrifuged, and 2 mL of supernatant was filtered through a 0.22 µm membrane (Millipore) for the HPLC analysis of sugars, alcohols and organic acids. After the extraction of compounds (sugars, alcohols and acids) from the cocoa pulp, the testa was separated from the cocoa beans. The cocoa beans were crushed with a pestle and mortar, and extractions were performed as described above.

#### *2.1.1.2. HPLC analyses*

The carbohydrate (glucose, sucrose and fructose), organic acid (acetic acid, lactic acid, malic acid, citric acid and succinic acid) and alcohol (ethanol, glycerol and methanol) analyses were carried out using a liquid chromatography system (Shimadzu, model LC-10Ai, Shimadzu Corp., Japan) equipped with a dual detection system consisting of a UV-Vis detector (SPD 10Ai) and a refractive index detector (RID-10Ai). A Shimadzu ion exclusion column (Shim-pack SCR-101H, 7.9 mm x 30

cm) was operated at 30 °C for carbohydrates and alcohols and 50 °C for acids. Perchloric acid (100 mM) was used as the eluent at a flow rate of 0.6 mL/min. The acids were detected via UV absorbance (210 nm), while the alcohols and carbohydrates were detected via RID (Miguel, Santos, Duarte, Almeida, & Schwan, 2012). All samples were analyzed in triplicate, and individual compounds were identified based on the retention time of standards injected using the same conditions. The sample concentrations were determined using an external calibration method. Calibration curves were constructed by injecting different concentrations of the standards under the same conditions for sample analysis and the areas obtained was plotted a linear curve whose equation was used to estimate the concentration of the compounds in the sample.

## *2.2. Isolation and microbial count*

Fifteen grams of cocoa beans were added to 135 ml of sterile peptone water [0.1% v/w bacteriological peptone (Himedia) pH 7.0 ± 0.2], homogenized for 10 min in a stomacher (Mayo Homogenius HG 400, São Paulo, Brazil) and serially diluted. The lactic acid bacteria (LAB) were enumerated by pour-plate inoculation in MRS agar (De Man Rogosa Sharpe, Merck, Darmstadt, Germany) containing 0.4% (v/v) nystatin (Merck) to inhibit yeast growth; the acetic acid bacteria (AAB) were enumerated by spread-plate inoculation on GYC agar [50 g/l glucose (Merck), 10 g/l yeast extract (Merck), 30 g/l calcium carbonate (Merck) and 20 g/l agar (Merck), pH 5.6] supplemented with 0.4% nystatin to inhibit yeast growth. The yeasts were enumerated by spread-

plate inoculation on YEPG agar [1% yeast extract, 2% peptone (Himedia), 2% glucose at pH 3.5] containing 100 mg/l chloramphenicol (Sigma) to inhibit bacterial growth. Nutrient agar (Merck) containing 0.4% nystatin was used as a general medium for enumerating viable mesophilic bacteria and *Bacillus* spp. The MRS and nutrient agar plates were incubated at 30 °C for 3-4 days; GYC and YEPG agar cultures were incubated at 28 °C for 3-4 days. After the incubation period, the number of colony-forming units (CFU) was recorded. All samples of microbial count were examined in triplicate and the calculation of standard deviation was performed using program Microsoft Office Excel 2007.

### *2.3. Culture-independent microbiological analysis*

#### *2.3.1. PCR analysis*

The total DNA was extracted from samples with a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions for DNA purification from tissues. The DNA was stored at -20 °C until further use.

The DNA from the bacterial community was amplified with the primers 338fgc (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') (the GC clamp is underlined) and 518r (5'-ATT ACC GCG GCTGCT GG-3'), which span the V3 region of the 16S rRNA gene (Ovreas, Forney, Daae, & Torsvik, 1997). A fragment of the D1/D2 region of the 26S rRNA gene was amplified with the eukaryotic universal primers NL1GC (5'-CGC

CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') (the GC clamp is underlined) and LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3'), which amplified a fragment of approximately 250 bp (Cocolin, Bisson, & Mills, 2000). All reactions were performed in 25  $\mu$ L containing 0.625 U Taq DNA polymerase (Promega, Madison, U.S.A), 2.5  $\mu$ L 10X buffer, 0.1 mM dNTP, 0.2 mM each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1  $\mu$ L of extracted DNA. The amplification was performed as in Ramos et al. (2010). The amplified products (2  $\mu$ L) were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels before DGGE analysis.

### 2.3.2. PCR-DGGE analysis

The PCR products were separated on polyacrylamide gels [8% (w/v) acrylamide:bisacrylamide (37.5:1)] in 1 $\times$  TAE buffer with a DCode system apparatus (BioRad Universal Dcode Mutation Detection System, Richmond, CA, USA). Solutions containing 35-70% denaturant [100% denaturant contains 7 M urea and 40% (v/v) formamide] were used for bacteria, and solutions containing 30-60% denaturant were used for yeast. The gels were run at 60 °C for 6 h at a constant voltage of 120 V. After electrophoresis, the gels were stained with SYBR-Green I solution (Molecular Probes, Eugene, UK) (1:10000 v/v) for 30 min, and the images were visualized and photographed with a transilluminator Lpix Image (LTB 20x20 HE, LPix<sup>®</sup>, Brazil).

The DGGE bands were excised from the acrylamide gels. The DNA fragments were purified with a QIAEX II gel extraction kit

(Qiagen, Chatsworth, CA, USA) and re-amplified with the primers 338fgc and 518r for bacteria and NL1 and LS2 for yeast. The PCR products were purified and sequenced with an ABI3730 XL automatic DNA sequencer (Macrogen Inc., Seoul, South Korea), and the sequences were compared with those available in the GenBank database with the BLAST algorithm (National Center for Biotechnology Information, Maryland, USA)

#### *2.4. Statistical analysis*

Randomized experimental design with a factorial 3 x 5 (three hybrids x five fermentation times) was analyzed statistically using the processes of analysis of variance according to software SISVAR<sup>®</sup> version 4.5 (Lavras, Brazil), and Scott-Knott test (5% probability) was used to compare averages.

### **3. Results**

#### *3.1. General aspects of cocoa fruit*

The cocoa fruits of different hybrids used in this study are shown in Fig. 1. Each fruit showed a different but characteristic size, peel, seed, pulp and number of beans. The PH 9 hybrid (Fig. 1A) fruit is  $16.32 \pm 1.27$  cm in length and  $9.75 \pm 0.75$  cm in diameter with yellowish color, a rind thickness of  $522.35 \pm 49.7$  g, and 34-47 seeds per fruit, and the seeds weigh  $3.19 \pm 0.26$  g each. The PH 15 hybrid (Fig. 1B) has a red color, thin and smooth bark ( $431.40 \pm 55.3$  g), a rind that is thinner than hybrids

PH 9 and PH 16, fruit measuring  $14.75 \pm 0.93$  cm in length and  $9.55 \pm 0.53$  cm in diameter, 42-47 seeds per fruit and seeds weighing  $3.39 \pm 0.18$  g each. The PH 16 hybrid (Fig. 1C) produces red fruits measuring  $20.5 \pm 0.35$  cm and  $9.60 \pm 0.37$  cm in length and diameter, respectively, and has a rind thickness of  $665.01 \pm 45.5$  g, 33-48 seeds per fruit and seeds weighing  $4.39 \pm 0.49$  g.

### *3.2. Microbial growth*

The fermentation of different cocoa hybrids resulted in the typical succession of yeast, LAB and AAB (Fig. 2). Fermentation of the PH 9 cocoa hybrid produced a higher initial yeast population (Fig. 2A). The yeast population of the fermented PH 9 cocoa hybrid increased from 3.39 log CFU/mL at 0 h of fermentation to 4.93 log CFU/mL at 36 h and remained stable up to 96 h (Fig. 2A). The yeast population in the PH 15 hybrid increased slightly during the first 36 h of fermentation, and after this period, the populations decreased to 1.69 log CFU/mL (Fig. 2 B). The yeast population during the fermentation of the PH 16 hybrid reached its highest values at 24 and 72 h of fermentation (4.84 log CFU/mL and 4.11 log CFU/mL, respectively) (Fig. 2C).

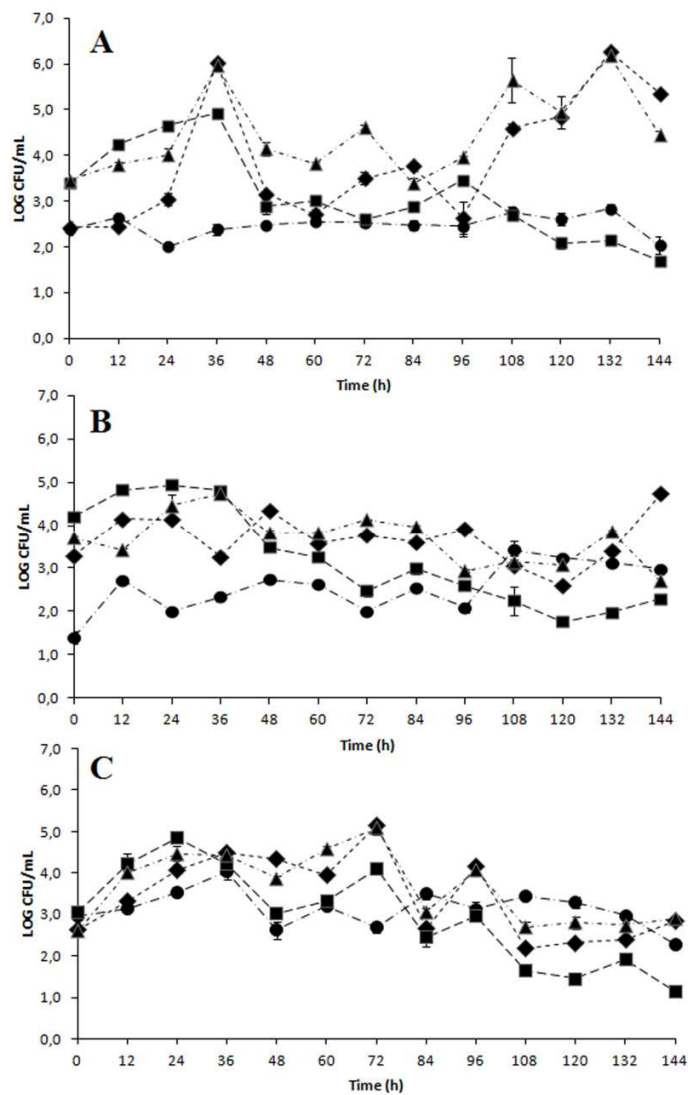


Figure 2 Microbial succession of LAB (MRS counts, ♦), yeasts (YEPG counts, ■), aerobic mesophilic bacteria (Nutrient Agar counts, ●) and AAB (GYC counts, ▲) during cocoa bean fermentation using three different hybrid PH 9 (A), PH 15 (B) and PH 16 (C)



Differences in LAB group populations were observed in all fermentation experiments (Fig. 2). The highest initial count was found for hybrid PH 15 (3.30 log CFU/mL), followed by hybrids PH 16 (2.62 log CFU/mL) and PH 9 (2.43 log CFU/mL). Hybrid PH 15 showed the highest initial population of AAB (3.70 log CFU/mL), followed by hybrids PH 9 (3.46 log CFU/mL) and PH 16 (2.60 log CFU/mL). The population of AAB in the fermentation PH 9 hybrid increased from 3.46 log CFU/mL to 5.97 log CFU/mL at 36 h; afterwards, AAB decreased until the end of fermentation. The AAB during the fermentation of the PH 15 hybrid reached values between 2.70 log CFU/mL and 4.73 CFU/mL. The AAB population in the PH 16 hybrid started at 2.60 log CFU/mL, increased to 5.08 log CFU/mL at 72 h of fermentation.

The microbial count in nutrient agar medium ranged from 2.04 log CFU/mL to 2.39 log CFU/mL for the PH 9 hybrid. The bacterial counts on nutrient agar for the PH 15 hybrid varied between 1.40 and 2.98 log CFU/mL. The microbes counted on nutrient agar during the fermentation of the PH 16 hybrid varied between 2.96 and 2.28 log CFU/mL.

In fermentation times, 0, 48, 84, 120, and 144 h, significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed between the average counts of the hybrids for all groups of microorganisms, except in time of fermentation 84 h, averages counts of yeasts were statistically equal between hybrids (data not shown).

### *3.3. Culture-independent analysis with PCR-DGGE*

Figures 3 and 4 show the PCR-DGGE fingerprints for the eukaryotic and prokaryotic communities, respectively, of samples taken during the fermentations of the PH 9, PH 15 and PH 16 cocoa hybrids. The PCR-DGGE fingerprints demonstrate that the PH 9 hybrid had more diverse prokaryotic and eukaryotic communities than the PH 15 and PH 16 hybrids.

Fifteen DNA fragments from eukaryotes were detected by DGGE (Fig. 3 and Table 1). *T. cacao* was identified because universal eukaryote primers were used. The greatest diversity of yeast was found within 72-96 h of fermentation of the three cocoa hybrids. The eukaryotic DGGE profile detected *Saccharomyces cerevisiae* (bands 2, 5 and 7) and *Hanseniaspora uvarum* (bands 1 and 3) throughout the fermentation of all hybrids. *Pichia kudriavzevii* (band 12) was found only during fermentation of the hybrid PH 15. Particularly, *Rhodotorula mucilaginosa* (band 4) was detected only in the fermentation of PH 9 and PH 15 hybrids. *Issatchenkia terricola* (bands 13 and 14) and *Aspergillus heteromorphus* (band 15) were detected during fermentation PH 9 and PH 16 hybrids. It is the first report of the presence of these species in the spontaneous fermentation of cocoa in Brazil.

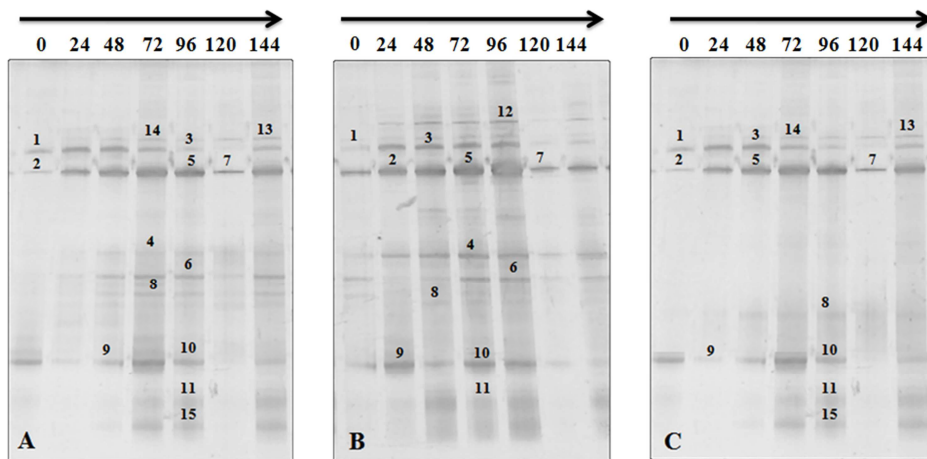


Figure 3 Changes in eukaryote communities during cocoa beans fermentation using three different hybrid. The fingerprints were generated by PCR-DGGE of the D1/D2 region of the 26S rRNA gene for PH 9 (A), PH 15 (B) and PH 16 (C). The identities of the bands are presented in Table 1, bands indicated by numbers were excised and after reamplification they were subjected to sequencing

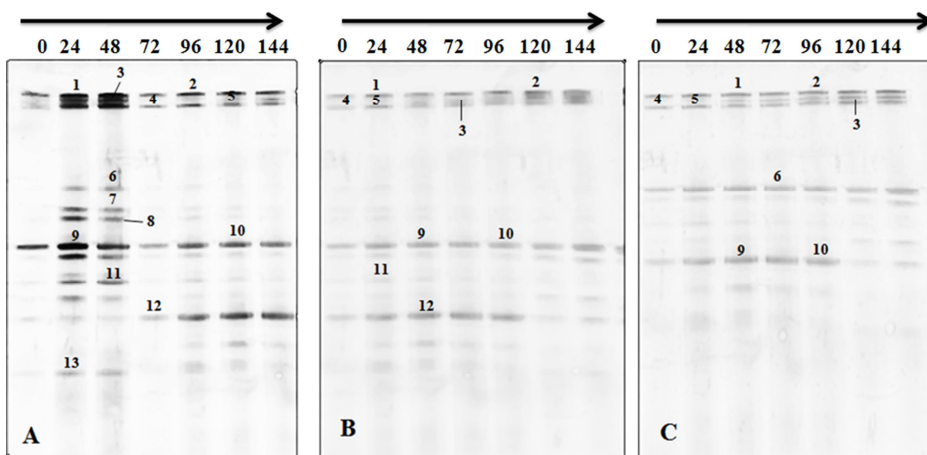


Figure 4 Changes in prokaryote communities during cocoa beans fermentation using three different hybrid. The fingerprints were generated by PCR-DGGE of the V3 region of the 16S rRNA gene for PH 9 (A), PH 15 (B) and PH 16 (C). The identities of the bands are presented in Table 1, bands indicated by numbers were excised and after reamplification they were subjected to sequencing

Table 1 Identification based on BLAST comparison in GenBank, of the bands obtained by PCR–DGGE using universal primers

<b>Bands<sup>a</sup></b>	<b>Access number</b>	<b>Similarity (%)</b>	<b>Eukaryotes</b>
1, 3	EU 441886.1	99	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
2, 5, 7	EU 441887.1	100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	EU 250050.1	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
6	EF 550190.1	98	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
8	EU 239379.1	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>
9, 10	JQ 228377.1	97	<i>Theobroma cação L.</i>
11	EU 293421.1	98	<i>Pichia kluyveri</i>
12	JQ 419961.1	99	<i>Pichia kudriavzevii</i>
13, 14	EU 441898.1	97	<i>Issatchenkia terricola</i>
15	HQ 876769.1	100	<i>Aspergillus heteromorphus</i>
			<b>Prokaryotes</b>
1, 2	HQ 293047.2	97	<i>Lactobacillus fermentum</i>
3	CP 002047.1	99	<i>Streptomyces bingchenggensis</i>
4, 5	JQ 301797.1	100	<i>Lactobacillus casei</i>
6	JQ 455591.1	98	Uncultured bacterium
7	HM 058571.1	99	<i>Leuconostoc lactis</i>
8	--	--	unidentified
9, 10	HE 661292.1	98	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
11	FJ 483515.1	97	<i>Gluconobacter liquefaciens</i>
12	AP 011170.1	99	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
13	AY 176766	98	<i>Bacillus sp.</i>

<sup>a</sup>Bands are numbered as indicated on the DGGE gel.

The bacterial DGGE profile indicated that LAB were present throughout the fermentation of all hybrids; *Lactobacillus fermentum* (bands 1 and 2), *L. casei* (bands 4 and 5) and *L. rhamnosus* (bands 9 and 10) were found throughout the fermentation period. The PH 9 cocoa hybrid contained a greater diversity of bacteria at 24 and 48 h of fermentation (Fig. 4A). *Leuconostoc lactis* (band 7), *Acetobacter*

*pasteurianus* (band 12), *Gluconobacter liquefaciens* (band 11) and one bacteria of the genus *Bacillus* (band 13) were detected only during the fermentation of PH 9 hybrid. Regarding the prokaryote DGGE profile (Fig. 4B and C), no significant differences were detected during the fermentation of PH 15 and PH 16 hybrids.

### 3.4. Physico-chemical analysis

The environmental temperature ranged from 18.8 to 26 °C during the fermentation of each hybrid, but the initial temperatures inside the cocoa fermentation boxes were different. The PH 16 hybrid fermentation temperature ranged from 24.3 °C at 24 h to a maximum of 47.4 °C at 144 h. The temperature of the PH 15 cocoa ranged from 23.7 to 49.6 °C at 132 h; hybrid PH 9 reached its maximum temperature (49.3 °C) at 132 h of fermentation. . The temperatures at the end of fermentation (144 h) for the PH 9 and PH 15 hybrids were 44 °C and 45.1 °C, respectively. The pH were measured at the beginning and end of the fermentation studied for each hybrid, and hybrid PH 16 pH ranged 4 to 4.06, the hybrid PH 15 ranged from 4.03 to 4.79 and the hybrid PH 9 ranged from 3.84 to 4.3.

#### 3.4.1. Sugars and fermentation products

The consumption of sugars and citric acid, and the formation of metabolites during fermentation of the three hybrids were assessed in Fig. 5. The concentrations of the sugars were consumed rapidly during the first hours (0-72 h) (Fig. 5). At the beginning of the fermentation the PH 9

hybrid contained 10.10 g glucose, 5.87 g sucrose, 12.64 g fructose and 1.42 g citric acid per kg of pulp (Fig. 5A).

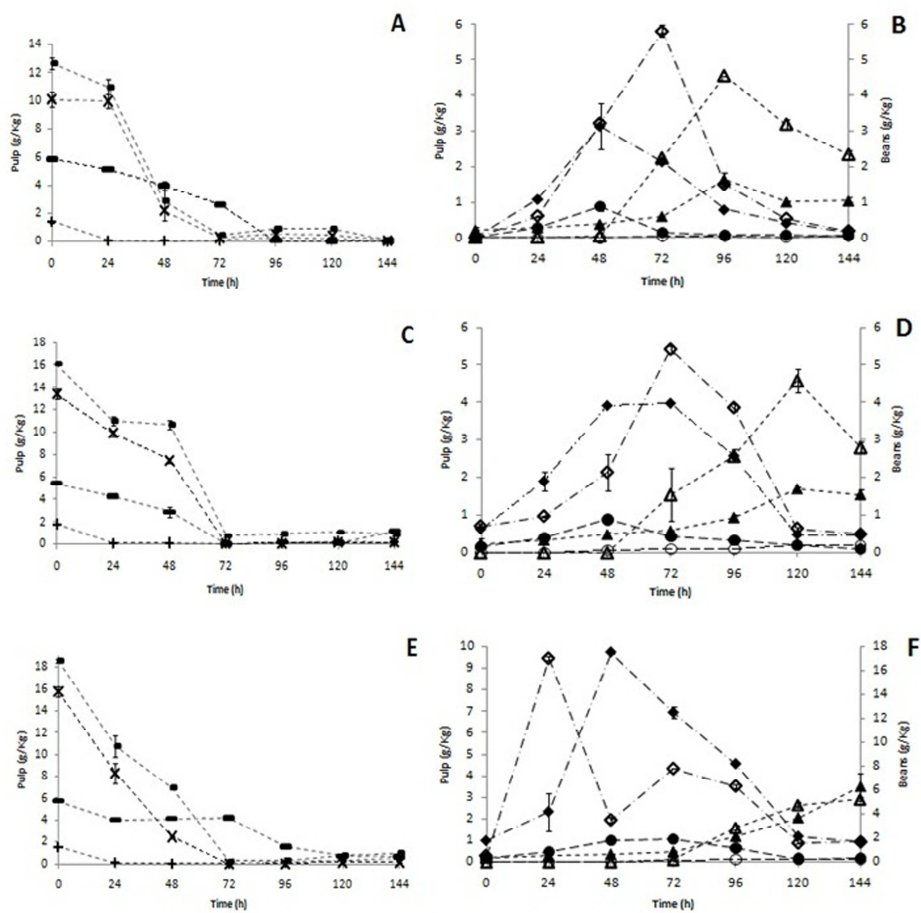


Figure 5 Carbohydrates, acids and alcohols produced in the pulp and inside the beans during fermentation of cocoa three different hybrid PH 9 (A and B), PH 15 (C and D) and PH 16 (E and F). Course of glucose (X), sucrose (■), fructose (●) and citric acid (+) in the pulp cocoa (A, C and E), and course of ethanol (◆), lactic acid (●) and acetic acid (▲) in the pulp and inside the beans (open symbols).

The PH 15 hybrid contained 13.41 g/kg glucose, 5.44 g/Kg sucrose, 16.10 g/kg fructose and 1.81 g/Kg citric acid (Fig. 5C). The PH 16 hybrid contained the largest initial concentrations of glucose (15.77 g/kg) and fructose (18.61 g/kg), sucrose and citric acid showed values of 5.74 g/kg and 1.54 g/Kg , respectively (Fig. 5E). The consumption of these compounds was similar during fermentation for the three hybrids.

The Figure 5 (B, D, and F) showed the maximum values of some compounds (such as ethanol and acetic acid) in the pulp and inside the beans; the measurements were made at the same time or with a range of 24 hours. Acetic acid peaked in the pulp (1.65 g/kg) and inside the beans (4.54 g/kg) of the PH 9 hybrid at 96 hours of fermentation (Fig. 5B). Similar peaks occurred in the PH 15 (120 h) and PH 16 (144 h) (Fig. 5D and F). The final concentration of acetic acid inside the beans was 5.25 g/kg (PH 16), 2.80 g/kg (PH 15) and 2.33 g/kg (PH 9) (Fig. 5B, D and F). The lactic acid concentrations were similar in all beans, the final concentrations of lactic acid in the pulp and inside the beans. The PH 9 hybrid showed the highest concentration of lactic acid at the end of the fermentation process (Fig. 5B, D and F). The ethanol concentration peaked at the same time (72 h) in the pulp (3.98 g/kg) and inside the beans (5.40 g/kg) only in the PH 15 hybrid (Fig. 5D). The ethanol in cocoa beans reached a maximum concentration at 72 h and measured 7.81 g/kg in PH 16, 5.81 g/kg in PH 9 and 5.40 g/kg in PH 15. The final concentration of ethanol inside the beans was 1.66 g/kg (PH 16), 0.48 g/kg (PH 15) and 0.19 g/kg (PH 9) (Fig. 5B, D and F).

The ethanol in cocoa beans reached a maximum concentration at 72 h and measured 7.81 g/kg in PH 16, 5.81 g/kg in PH 9 and 5.40 g/kg in PH 15. After 96 h, the ethanol concentration decreased in all fermentations (Table 2). The final concentration of ethanol inside the beans was 1.66 g/kg (PH 16), 0.48 g/kg (PH 15) and 0.19 g/kg (PH 9). Acetic acid was detected inside all beans after 48 h of fermentation (Table 2). Acetic acid increased in the beans of hybrid PH 16 throughout fermentation, reaching a maximum value of 5.25 g/kg at 144 h. Acetic acid in the beans of PH 9 peaked at 4.54 g/kg at 96 h and then decreased until the end of fermentation. A similar result was observed in hybrid PH 15, but the maximum (4.58 g/kg) was reached at 120 h. Citric, succinic, malic, and lactic acids were also determined throughout fermentation (Table 2). Citric acid was present in the beans at initial concentrations of 2.48 (PH 9), 3.53 (PH15) and 2.30 g/kg (PH 16). The lactic acid concentrations were similar in all beans.

#### **4. Discussion**

This study is the first to assess the microbial populations and activities in different cocoa hybrids (PH 9, PH 15 and PH 16). The PH 16 hybrid has larger fruit and more seeds than the other hybrids. Mandarino and Gomes (2009) published a technical report about the productivity of cacao (*T. cacao* L.) grown in monoclonal blocks in southern Bahia, Brazil. In this report, 9 hybrids were evaluated for their production of dry beans per plant; clones PH 16 and PH 15 were the third and fifth best producers, respectively. Schwan, Rose, & Board (1995) described the



features of Brazilian cocoa; the mature fruits develop directly from the stem of the tree and have pods with a thick outer husk and 30-40 seeds.

During fermentation of the hybrids, significant differences were observed in microbial counts. Variations in microbial counts and species depend on the type/variety of cocoa, country, farm, season, weather conditions, pod ripeness, pod diseases, post-harvest pod storage, pulp/bean ratios, fermentation method and time, batch size and frequency of bean mixing or turning (or lack thereof) (Schwan, 1998). The PH 9 hybrid showed a defined microbial succession, and it harbored the greatest diversity of microbial species, as determined by PCR-DGGE (Fig. 3 and 4).

In the present study, fewer microbes were counted in each of the three hybrids than in Comun cocoa hybrids cultivated in Brazil (Schwan, 1998, Schwan and Wheals, 2004, Pereira, Magalhães, Almeida, Coelho, & Schwan, 2013). The presence of microorganisms during cocoa bean fermentation reflects the environment (temperature, pH, and oxygen concentration) and the substrates available (which depend on the pulp composition and harvest conditions); consequently, significant amounts of ethanol, lactic acid, and acetic acid can be produced.

The biodiversity, population dynamics, and chemical content (sugars, alcohols and organic acids) of three different cocoa hybrids cultivated in Brazil were evaluated during their spontaneous fermentation. The PH 9 hybrid produced large fruits (Fig. 1) and the end of the fermentation the higher concentrations of sugars (glucose and fructose) (data not show) and minor concentrations of acids (lactic and acetic) inside the beans (Fig. 5B), indicating that this hybrid could produce good

quality chocolate. A pleasant sensory impression of chocolate flavor can be described as flowery, green, roasted malt, caramel and nuts (Jinap, Dimick, & Hollender, 1995). Highly acidic beans have decreased flavor precursors and result in overly acidified final products (Camu et al., 2008). The yeast and bacterial community profiles of fermented PH 9 were more complex than in the PH 15 and PH 16 hybrids.

PCR-DGGE fingerprinting showed that the most common yeast (*S. cerevisiae*) (Fig. 3) and bacteria (*L. fermentum*, *L. casei* and *L. rhamnosus*) (Fig. 4) were present during the fermentation of each cocoa hybrid. A global investigation of the microbial diversity in cocoa bean fermentations would elucidate this complex process and promote the inclusion of starter cultures in fermentation methods (Schwan, 1998).

This study reports for the first time the presence of *R. mucilaginosa* (detected in hybrids PH 9 and PH 15), *I. terricola* (PH 9 and 16) and *A. heteromorphus* (PH 9 and PH 16) in Brazilian cocoa fermentations (Fig. 3). As previously reported (Ravelomanana, Guiraud, Vincent, & Galzy, 1985; Schwan, Cooper, & Wheals, 1997), yeasts accelerate fermentation by degrading pectin in cocoa pulp. *S. cerevisiae* and *H. uvarum* were the dominant yeast species during fermentation of the PH 9, PH 15 and PH 16 hybrids (Fig. 3). This result confirms the observations of Schwan and Wheals (2004) and Pereira, Miguel, Ramos, & Schwan (2012), who suggested that *S. cerevisiae* and *Hanseniaspora* spp. could be used in cocoa fermentation to enhance the aroma and flavor of chocolate. *P. kudriavzevii* was identified only in the PH 15 hybrid at 24, 48, 72, 96 and 144 h of fermentation. These results agreed with those of Daniel et al. (2009), who studied yeast diversity in heap cocoa

fermentation in Ghana. *H. opuntiae* grew primarily during the early phase of fermentation, but *P. kudriavzevii* and *S. cerevisiae* had no specific temporal distribution.

*L. fermentum*, *L. casei* and *L. rhamnosus* appeared in all three cocoa hybrids. *Leuconostoc lactis* was identified only in the PH 9 hybrid at 24 and 48 h (Fig. 4). The homo- and heterofermentative species *L. casei* and *L. fermentum*, respectively, were the most prevalent LAB species. These species corresponded with increased concentrations of lactic acid, acetic acid and ethanol. *L. fermentum* and *A. pasteurianus* - identified during PH 9 and PH 15 fermentations - are commonly found during the fermentation of cocoa beans in other countries (Ardhana and Fleet, 2003; Nielsen et al., 2007). *L. fermentum* is strictly heterofermentative. This species converts citric acid, ferments glucose, oxidizes ethanol, and uses fructose as an alternative external electron acceptor to convert it into mannitol, as can be seen in Figure 5A, B, C and D with 72 h of fermentation there was a decrease in glucose concentration and citric acid and an increase in ethanol concentration.

*A. pasteurianus* strains are desirable during cocoa bean fermentation because they produce acetic acid from carbohydrates, citric acid and ethanol (Schwan and Wheals, 2004). *A. pasteurianus*, *G. liquefaciens* and *Bacillus* sp. were found during PH 9 fermentation. These species are present in cocoa fermented in Ghana, Indonesia and Brazil (Ardhana and Fleet, 2003; Schwan and Wheals, 2004; Nielsen et al., 2007). *A. pasteurianus* was identified in the PCR-DGGE profiles of hybrids PH 9 and PH 15. The genus *Acetobacter* is composed of acetic acid bacteria that oxidize acetic acid, yielding CO<sub>2</sub> (Nielsen et al., 2007).

This information was confirmed by chemical analysis (Fig. 5). The acetic acid concentration first increased but eventually decreased by the end of fermentation of the PH 9 and PH 15 hybrids (Fig. 5B and D).

*Bacillus* spp. were identified in the PH 9 samples (Fig. 4). The role of *Bacillus* in cocoa fermentation is not well understood. These microorganisms are commonly used in biotechnological industries because they produce large quantities of extracellular enzymes (Schallmeyer, Singh, & Ward, 2004), short-chained free fatty acids and flavorings such as pyrazines and 2,3-butanediol (Schwan and Wheals, 2004).

Changes in the concentrations of sucrose, glucose and fructose demonstrated that there were metabolic changes during the fermentation of all three hybrids (Fig. 5). In the first 48 hours of fermentation, the sugars decreased, which favored the growth of yeasts and LAB (Fig. 2 and Fig. 5), similar results were described in spontaneous fermentation of cocoa in Brazil, Ghana, Ecuador and others (Schwan, Rose, & Board, 1995; Ardhana and Fleet, 2003; Nielsen et al., 2007; Papalexandratou, Vranckena, De Bruyneb, Vandammeb, & De Vuys, 2011). The sucrose concentration was low at the beginning of the fermentation because the pods were opened in the field before they were transported to the fermentation house. During this period, sucrose was hydrolyzed into glucose and fructose (Fig. 5). The utilization of sugars and the production of ethanol in the cocoa pulp and cotyledons (Fig. 5) were correlated with yeast and LAB growth (Fig. 2). The ethanol was evaporated, consumed and/or converted into acetic acid, through the action of AAB, noting Fig. 2 there is a relationship in the growth in this group of microorganisms

with the fall the amount of ethanol in the pulp shown in Fig 5. These findings agree with the classic descriptions of these bacteria in the literature (Schwan and Wheals, 2004).

The organic acids detected during cocoa bean fermentation were lactic, acetic and citric acids. In this study, the citric acid concentration decreased and the concentrations of lactic and acetic acids increased in all three hybrid fermentations. *L. fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *Leuc. lactis*, *P. kluyveri* and *P. kudriavzevii* were present in all fermentations. According to Thompson, Miller, & Lopez (2001), species in the genera *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* and *Pichia* metabolize citric acid into acetic acid, carbon dioxide and lactic acid.

AAB, in particular *A. pasteurianus*, are able to grow on ethanol, mannitol and lactate, and they convert ethanol into acetic acid. This oxidation process is responsible for the temperature increase inside the fermenting cocoa mass (Schwan and Wheals, 2004). In this study, there was an increase in the AAB population (Fig. 2), a decrease in the ethanol concentration and an increase in the acetic acid concentration (Fig. 5), which together increased both the cocoa mass temperature and the penetration of ethanol into the beans of all the hybrids. Furthermore, the acetic acid concentration inside the beans was increased. Brito et al. (2000) reported that part of the acetic acid evaporates and the remainder penetrates into the bean cotyledons. The acetic acid, ethanol and heat kill the cocoa seed embryo, change the subcellular structure of the bean and eventually develop the flavor precursors.

The total amount of alcohols and organic acids present at the end of fermentation differed between the hybrids. Ethanol, lactic acid and

acetic acid were present in lower concentrations in the PH 9 hybrid fermentation. These compounds could interfere with the chocolate aroma, which may also vary with the microbial population and the amount of sugar available in the cocoa pulp (Camu et al., 2007). Future studies of fermented cocoa hybrids should define the standards for production of high quality chocolates.

## **5. Conclusions**

The efficiency of the integrated management, especially the genetic breeding for the control witches' broom is indisputable, because production data indicate that productivity Brazilian cocoa is recovering. A better understanding of the microbial communities and the physicochemical changes during the spontaneous fermentation of cocoa hybrids is a prerequisite for developing management procedures and for the production of high quality cocoa. Future studies with more cocoa hybrids should investigate the impact of cocoa breeding and define the standards for producing high quality chocolate from hybrid cocoa plants.

## **Acknowledgements**

The authors thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of Brasil (CNPQ), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

for scholarships, and Fazendas Reunidas Vale do Juliana (Igrapiúna, Bahia, Brazil) by collecting samples.

## REFERENCES

- Afoakwa, E.O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 48, 840 – 857.
- Ardhana, M., Fleet, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 87-99.
- Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesnel, V.C., Adomako, D. (1985). Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.*, 36, 583-598.
- Brito, E.S., García, N.H.P., Gallão, M.I., Cortelazzo, A.L., Fevereiro, P.S., Braga, M.R. (2001). Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cocoa* L.) during fermentation, drying and roasting. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 281-288.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M., De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *App. Environ. Microbiol.*, 73, 1809–1824.
- Camu, N., De Winter, T., Addo, S. K., Takarama, J. S., Bernaert, H., De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *J. Sci. Food Agric.*, 88, 2288–2297.
- Cheesman, E.E. (1944). Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Trop. Agric.*, 21, 144-159.
- Clapperton, J.F., Lockwood, R., Yow, S.T.K., Lim, D.H.K. (1994). Effects of planting materials on flavour. *Cocoa Growers' Bulletin*. 48, 47-63.



- Cleenwerck, L., Gonzalez, A., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P., De Vuyst, L. (2008). *Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 2180–2185.
- Daniel, H.M., Vrancken, G., Takrama, J.S., Camu, N., De Vos, P., De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Res.*, 9, 774–783.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Letter*, 189, 81–87.
- Freire, E.S., Schwan, R.F., Mororó, R.C. (1999). The cocoa pulp agroindustry and the use of its residues in Bahia: progress achieved in the last ten years. In: Proceeding of the 12<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference. Pp. 1013-1020. Kuala Lumpur: Cocoa Producers Alliance.
- Garcia-Armisen, T., Papalexandratou, Z., Hendryckx, H., Camu, N., Vrancken, G., De Vuyst, L., Cornelis, P. (2010). Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 2281-2292.
- Jinap, S., Dimick, P.S., Hollender, R. (1995). Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control*. 6, 105-110.
- International Cocoa Organization. 2012. ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XXXVIII, No. 4, Cocoa year 2011/12. [Internet document] URL [http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/30-related-documents/46-statistics-production.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html). Accessed 12/18/2012.

- Mandarino, E. P., Sena Gomes, A. R. (2009). Produtividade do cacauero (*Theobroma cacao* L.) cultivados em blocos monoclonais, no sul da Bahia, Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico n° 197. 32p.
- Miguel, M.G.C.P., Santos, M.R.R.S., Duarte, W.F., Almeida, E.G., Schwan, R.F. (2012). Physico-chemical and microbiological characterization of corn and rice ‘calugi’ produced by Brazilian Amerindian people. *Food Res. Int.*, 49, 524–532.
- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S., Holzappel, W.H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 114, 168–186.
- Noor-Soffalina, S.S., Jinap, S., Nazamid, S., Nazimah, S.A.H. (2009) Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavor precursors in a lipidic model system. *Int. J. of Food Sci. and Tech.*, 44, 168-180.
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F.L., Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *App. Environ. Microbiol.*, 63, 3367–3373.
- Papalexandratou, Z., Vranckena, G., De Bruyneb, K., Vandammeb, P., De Vuys, L. (2011). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiol.*, 28, 1326–1338.
- Pereira, G.V.M., Miguel, M.G.C.P., Ramos, C.L., Schwan, R. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. *App. Environ. Microbiol.*, 78, 5395–5405.

- Pereira, G.V.M., Magalhães, K.T., Almeida, E.G., Coelho, I.S.C., Schwan, R.F. (2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. *Int. J. Food Microbiol.*, 161, 121–133.
- Ramos, C.L., Almeida, E.G., Pereira, G.V.M., Cardoso, P.G., Dias, E.S., Schwan, R.F. (2010). Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 140, 225 – 231.
- Ravelomanana, R., Guiraud, J.P., Vincent, J.C., Galzy, P. (1985). The yeast flora of cocoa bean fermentation in the Ivory Coast. *Miercen J.*, 1, 319– 326.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-buendía, H.B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., Jaramillo-Flores, M.E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cocoa* L.) during fermentation and drying process using principal components analysis. *Food Res. Int.*, 44, 250-258.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, 50, 1-17.
- Schwan, R.F., Rose, A.H., Board, R.G. (1995). Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, 79:96S–107S.
- Schwan, R.F., Cooper, R.M., Wheals, A.E. (1997). Endo-polygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other pulp degrading yeasts. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 21, 234– 244.
- Schwan, R.F. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1477–1483.

- Schwan, R.F., Wheals, A.E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44, 205–221.
- Sukha, D.A., Butler, D.R., Umaharan, P.E., Boulton, E. (2008) The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European J. of Food Tech.* 226, 405-413.
- Thompson, S.S., Miller, K.B., Lopez, A.S. (2001). Cocoa and coffee. In: Doyle, M.J., Beuchat, Wollgast, J., Anklam, E., 2000. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Res. Int.*, 33, 449–459.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melhoramento genético do cacauero em busca do aumento da produtividade e resistência a doenças influencia algumas características do cacau, como tamanho, cor, quantidade e peso das sementes, quantidade de polpa, sabor, composição química. Com os resultados obtidos neste trabalho foi observado que estas alterações nos clones afetaram também o desempenho fermentativo, alterando a microbiota presente e conseqüentemente os metabólitos produzidos durante o processo de fermentação.

Os clones avaliados (PH 9, PH 15 e PH 16), foram submetidos aos mesmos protocolos de fermentação, sendo PH 9 o híbrido que apresentou uma sucessão microbiana melhor definida e com valores de contagem maiores em relação aos outros dois clones. O perfil de PCR-DGGE eucarioto e procarioto do clone PH 9 apresentou maior diversidade microbiana.

A eficiência do manejo integrado, especialmente o melhoramento genético, para o controle da vassoura-de-bruxa é incontestável, pois dados sobre produção indicam que a produtividade brasileira está se recuperando.

Estudos futuros com novas variedades de cacau, bem como pesquisas sobre o processo fermentativo, devem ser conduzidos, a fim de se alcançar uma melhor compreensão sobre esse processo. Espera-se que um clone com elevada produção, apresente melhores respostas sobre o processo fermentativo e análise sensorial, podendo ser considerado um clone padrão para a produção do bom chocolate.