



**NÁDIA NARA BATISTA**

**CULTURAS INICIADORAS DURANTE O  
PROCESSO FERMENTATIVO DO CACAU**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**NÁDIA NARA BATISTA**

**CULTURAS INICIADORAS DURANTE O PROCESSO  
FERMENTATIVO DO CACAU**

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

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

Coorientadora

Dra. Cintia Laceda Ramos

**LAVRAS - MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Batista, Nádia Nara.

Culturas iniciadoras durante o processo fermentativo do cacau /  
Nádia Nara Batista. – Lavras: UFLA, 2015.  
78 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras,  
2015.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.  
Bibliografia.

1. Fermentação de cacau. 2. Chocolate. 3. Culturas iniciadoras. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**NÁDIA NARA BATISTA**

**CULTURAS INICIADORAS DURANTE O PROCESSO  
FERMENTATIVO DO CACAU**

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

APROVADA em 23 de fevereiro de 2015.

Dra. Cintia Lacerda Ramos UFLA

Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima Universidade do Minho, Portugal

Dr. Cledir Rodrigues Santos Universidade do Minho, Portugal

Dra. Rosane Freitas Schwan

Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2015**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e aos programas de pós-graduação em Ciência dos Alimentos e em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela confiança e orientação durante esses anos de pesquisa e por acreditar no meu trabalho.

À Dra. Cintia Lacerda Ramos, pela coorientação, dedicação, profissionalismo e paciência.

Ao professor Whasley Ferreira Duarte, pelos ensinamentos e colaboração nas análises cromatográficas.

À minha família que, mesmo longe, esteve sempre presente na minha vida e acreditando nos meus sonhos, mesmo quando parecia inalcançável. Sempre me incentivando, torcendo e vibrando com as minhas conquistas.

Ao meu namorado, Leandro, por estar sempre do meu lado, me apoiando, incentivando e compreendendo todas as minhas decisões.

Aos meus amigos e técnicos de laboratório, pelo companheirismo, ensinamento e troca de experiências.

A Fazendas Reunidas Vale do Juliana, pela confiança em permitir que o trabalho se concretizasse.

## RESUMO

O desenvolvimento de novos híbridos de *Theobroma cocoa* resistentes ao fungo *Moniliophthora perniciosa* alterou características fisiológicas do fruto e, conseqüentemente, influenciou a qualidade do produto final. A inoculação de microrganismos durante o processo fermentativo do cacau vem sendo investigada como alternativa na melhoria da qualidade do chocolate. Este estudo foi realizado com o objetivo de identificar a comunidade microbiana durante o processo fermentativo do híbrido PS1319, avaliar a dinâmica e a influência da inoculação de três leveduras no perfil de compostos voláteis, nos parâmetros químicos (carboidratos, etanol e ácidos orgânicos), na concentração de alcaloides púricos e na qualidade sensorial dos chocolates. A comunidade microbiana eucariótica do híbrido PS1319 fermentado espontaneamente e inoculado foi obtida por PCR-DGGE. Ambas as fermentações apresentaram perfil semelhante de bandas, sendo identificadas como *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri* e *Saccharomyces cerevisiae*. O comportamento dinâmico da inoculação de *H. uvarum*, *P. kluyveri* e *S. cerevisiae*, durante o processo fermentativo, foi avaliado pela análise de qPCR. A população de *S. cerevisiae* (7,9 log cell/g) e *P. kluyveri* (5,9 log cell/g) foi maior na fermentação inoculada, enquanto a de *H. uvarum* (4,5 log cell/g) manteve-se constante em ambas as fermentações. Carboidratos, etanol e ácidos orgânicos foram avaliados na polpa e no grão, durante a fermentação do cacau. Após 72 horas de fermentação, a concentração de carboidratos estava abaixo de 3 g/kg, em ambas as fermentações. Na fermentação inoculada, a concentração mínima de ácido cítrico (1 g/kg) foi detectada com 72 horas de fermentação, enquanto na fermentação espontânea foi alcançada com 48 horas. A concentração de etanol foi duas vezes maior na fermentação inoculada, porém, não influenciou a concentração de ácido acético que apresentou concentrações similares (2,9 g/kg), em ambas as fermentações. Os compostos voláteis foram detectados e quantificados por GC-FID, no tempo inicial e final da fermentação do híbrido PS1319, sendo identificados 33 compostos voláteis. Os alcaloides púricos foram identificados por meio de análises cromatográficas. A proporção de teobromina em relação à cafeína foi de 5,99, na fermentação espontânea e de 3,82, na fermentação inoculada. Os chocolates foram avaliados sensorialmente pelo teste de aceitação, *check-all-that-apply* (CATA) e dominância temporal das sensações (TDS). Em relação ao teste de aceitação dos chocolates, não houve diferença significativa entre as amostras inoculadas ou não inoculadas. De acordo com o teste CATA, os chocolates se destacaram em relação ao atributo amargo. O perfil sensorial dos chocolates foi obtido por meio do teste TDS. O chocolate elaborado a partir do cacau fermentado espontaneamente destacou-se pelos atributos doce, adstringente e frutado, sendo os atributos amargo e cacau

dominantes durante toda a análise. Para o chocolate elaborado com cacau inoculado, os atributos foram frutado e adstringente, sendo o atributo amargo dominante durante toda a análise. A inoculação influenciou o perfil dos compostos voláteis e sensorial dos chocolates, destacando-se os atributos amargo e frutado.

Palavras-chave: Fermentação de cacau. Chocolate. Culturas iniciadoras.

## ABSTRACT

The development of resistant *Theobroma cocoa* hybrid towards *Moniliophthora perniciosa* mould changes the physiological characteristics of the fruits and consequently influencing the quality of the final product. The inoculation of microorganisms during cocoa fermentation process have been investigated as alternative to improve the quality of chocolate. This study aimed to investigate the effect of yeast inoculation during cocoa fermentation on the volatile compounds profile, chemical parameters (carbohydrates, ethanol and organic acids), concentration of purine alkaloids and sensory quality of chocolates. The eukaryotic microbial community during the spontaneous and inoculated fermentation of PS1319 hybrid was obtained by PCR-DGGE. Both fermentations showed similar profiles, detecting the dominant yeasts *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*. The dynamic behavior of the yeast starter culture (*Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*) during the fermentation process was evaluated by qPCR analysis. The population of *S. cerevisiae* (7.9 log cell/g) and *P.kluyveri* (5.9 log cell/g) was higher in inoculated fermentation, while the *H. uvarum* (4.5 log cell/g) remained almost the same. Carbohydrates, ethanol and organic acids were measured from the pulp and beans during the cocoa fermentations. At 72 h, the concentration of carbohydrates was lower than 3 g/kg for both assays. In the inoculated fermentation, the minimum concentration of citric acid (1g/kg) was detected at 72 hours of fermentation, while in the spontaneous fermentation it was achieved at 48 hours of fermentation. The ethanol concentration was twice higher in inoculated fermentation, but did not affect the concentration of acetic acid, which showed similar concentrations (2,9g/Kg) in the both fermentations. The volatile compounds were detected and quantified by GC-FID at the beginning and end of fermentation process. A total of 33 volatile compounds were identified. The purine alkaloids were identified by chromatographic analysis. The relative proportion of theobromine and caffeine was 5.99 in the spontaneous fermentation and 3.82 in the inoculated fermentation. Chocolates were evaluated by acceptance test, check-all-that-apply (CATA) and temporal dominance of sensations (TDS). In the acceptance test, there was no significant ( $p < 0.05$ ) difference between inoculated or not inoculated samples. According to CATA test, chocolates showed the bitter attribute as dominant. While the TDS test related the chocolate produced by yeast inoculation to sweet, astringent and fruity attributes. The bitter and cocoa attributes were dominant throughout the analysis. The inoculation influenced the profile of volatile compounds and sensory attributes of chocolate, especially regarded to the bitter and fruity attributes.

Keywords: Cocoa fermentation. Chocolate. Starter cultures.



## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	9
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
<b>2.1</b>	<b>Cacau</b> .....	11
<b>2.2</b>	<b>Microbiota presente no cacau</b> .....	13
<b>2.3</b>	<b>Cultura iniciadora</b> .....	15
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	17
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	18
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	24
	<b>ARTIGO 1</b> <i>Dynamic behavior of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Pichia kluyveri</i> and <i>Hanseniaspora uvarum</i> during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate</i> .....	24
	<b>ARTIGO 2</b> <i>Impacto da inoculação de leveduras na concentração dos compostos voláteis e no perfil sensorial do chocolate</i> .....	53

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Sementes da *Theobroma cacao* L. é a principal matéria-prima na elaboração de chocolates. A qualidade e o aroma/sabor do produto final são influenciados tanto pelas características genéticas de cada híbrido quanto pela etapa de fermentação e secagem (CAMU et al., 2008; SCHWAN; WHEALS, 2004; THOMPSON; MILLER; LOPEZ; 2001).

A sucessão microbiana presente durante o processo fermentativo do cacau desencadeia uma série de alterações físico-químicas que são necessárias para o desenvolvimento do aroma/sabor de "chocolate" (SCHWAN; WHEALS, 2004). As leveduras presentes no meio hidrolisam a polpa por meio da despectinização, o que reduz a viscosidade, e produzem etanol a partir da metabolização de carboidratos sob condições ácidas (pH 4,0) e anaeróbicas. Simultaneamente, o ácido cítrico é assimilado por BAL heterofermentativas, causando aumento do pH. Com o aumento da aeração, ocorre o desenvolvimento das bactérias do ácido acético que oxidam o etanol a ácido acético, provocando elevação da temperatura, causando morte do embrião, e desencadeia uma série de reações no interior do cotilédono (NIELSEN et al., 2007; THOMPSON; MILLER; LOPEZ; 2001; SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995).

Os compostos voláteis formados durante o processo fermentativo estão compreendidos entre álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e pirazinas. Altas concentrações de álcoois, aldeídos e cetonas são desejáveis para a obtenção do aroma/sabor floral, doce e frutado (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012). Os alcaloides, como metilxantinas, teobromina e cafeína, contribuem com o amargor e a adstringência no cacau. Os ésteres estão relacionados ao aroma/sabor frutado (CAMU et al., 2008; JINAP; ZESLINDA, 1995).

O Brasil é o sexto país produtor de cacau no mundo (FAO, 2012), sendo seu processo fermentativo caracterizado por apresentar fermentação espontânea, não controlada, processada em fazendas e sem a adição de culturas iniciadoras (PEREIRA et al., 2013). O controle do processo fermentativo, utilizando microrganismos definidos, permite que os produtores forneçam um produto mais uniforme e de alta qualidade, obtendo melhor preço por amêndoas bem processadas (VUYST et al. 2010).

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a dinâmica e a influência da inoculação de três leveduras no perfil dos compostos voláteis, nos parâmetros químicos (carboidratos, etanol e ácidos orgânicos) e na qualidade sensorial dos chocolates produzidos a partir da fermentação do híbrido de cacau PS1319.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cacau

*Theobroma cacao* L., pertencente à família *Malvaceae*, é considerada a espécie mais plantada do gênero *Theobroma* (SCHWAN; FLEET, 2014). Com base nas características morfológicas e nas origens geográficas, o cacau é classificado em três grupos, ‘Criollo’, ‘Forasteiro’ e ‘Trinitário’ (CHEESMAN, 1944).

O cacau Criollo foi à primeira árvore a ser cultivada, sendo encontrada, principalmente, na América Central e na América do Sul (SOUNIGO et al., 2003; CHEESMAN, 1944). A cultivar Forasteiro é subdividida em Lower e Upper Amazonian Forasteiros (IWARO et al., 2001; CHEESMAN, 1944). O ‘Trinitario’ é proveniente do cruzamento entre ‘Criollo’ e ‘Lower Amazonian Forasteiros’ (SOUNIGO et al., 2003; CHEESMAN, 1944).

As plantações de cacau são formadas por três tipos de variedades comerciais: tradicional, híbrido e clonal. As variedades tradicionais são formadas pela polinização aberta, sendo conhecidas como Amenolato, nos países da África, Comum da Bahia, no Brasil e Nacional, no Equador. Os híbridos são formados pela mistura interclonal de híbridos produzidos pela polinização controlada de clones selecionados (SCHWAN; FLEET, 2014).

Por volta de 1989, as plantações de cacau na Bahia foram atacadas pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (*Crinipellis perniciosa*), que culminou tanto na redução da produção quanto no consumo interno e na exportação do cacau. A Comissão Executiva do Plano de Recuperação da Lavoura Cacaueira, CEPLAC, iniciou um programa de melhoramento do cacaueiro, habilitando produtores e trabalhadores rurais a selecionarem plantas com indicativo de resistência e/ou tolerância a *Moniliophthora perniciosa* (*Crinipellis perniciosa*). Essa prática

resultou no surgimento de novos híbridos resistentes a esta doença. Entretanto, as características fisiológicas de cada híbrido interferem no processo fermentativo do cacau, resultando em chocolates com características sensoriais peculiares (RAMOS et al., 2014; MOREIRA, et al. 2013; SCHWAN, WHEALS, 2004; FREIRE; SCHWAN; MORORÓ, 1999; CLAPPERTON et al. 1994).

O processamento do cacau inicia-se com a abertura dos frutos recém-colhidos, sendo transferidos para caixas de madeira, em que se inicia a fermentação espontânea, que dura de 3 a 7 dias. A fermentação é um processo que apresenta alto efeito no perfil dos compostos voláteis, devido à presença de microrganismos, como leveduras, bactérias do ácido acético e bactérias do ácido lático (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012; SCHWAN; WHEALS, 2004).

As leveduras são favorecidas com o baixo pH da polpa, causado pela presença de ácido cítrico, juntamente com baixos níveis de oxigênio, produzindo etanol e enzimas pectinolíticas. As bactérias do ácido lático metabolizam glicose e ácido cítrico da polpa para produzir ácido lático. Após 48 horas de fermentação, as bactérias do ácido lático decrescem, dando espaço para o crescimento das bactérias do ácido acético que atuam, principalmente, na oxidação do etanol em ácido acético. As reações exotérmicas desta oxidação promovem aumento da temperatura na massa fermentante, o que leva à morte do embrião, à desagregação da parede celular e à liberação de enzimas endógenas dos grãos, importante para a formação de precursores de aroma como aminoácidos livres, peptídeos e açúcares redutores. Os sabores e o aroma acentuam-se como resultado da degradação de Strecker, reação de Maillard, e contribuem para o desenvolvimento do aroma específico durante o processamento da amêndoa (SCHWAN; WHEALS, 2004; THOMPSON; MILLER; LOPEZ 2001; VOIGT et al., 1994; QUESNEL, 1965).

Após a fermentação, os grãos de cacau são submetidos ao processo de secagem, o qual pode ser realizado tanto ao sol quanto por secagem artificial, a 70 °C (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012).

Durante o processo de torrefação ocorre o desenvolvimento do aroma/sabor e da cor, observando-se uma redução na adstringência, amargor e acidez. Os principais grupos químicos encontrados estão compreendidos em ésteres, álcoois, ácidos, aldeídos, acetonas e pirazinas. Os álcoois, ésteres e ácidos se desenvolvem durante processo fermentativo, sendo os principais grupos voláteis encontrados no final da fermentação (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011, 2012; JINAP; THIEN; YAP, 1994).

A presença de álcoois é desejável para a obtenção de produtos com aromas florais e doces (ACULEY et al., 2010; FRAUENDORF, SCHIEBERLE, 2008), e a sua concentração, provavelmente, diminui durante o processo fermentativo, devido à oxidação a ácido acético e às perdas por evaporação (GALVEZ et al., 2007; SCHWAN; WHEALS, 2004).

Os aldeídos e as cetonas aumentam com o tempo de fermentação, produzindo aromas frutados e florais (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012). Os ésteres estão relacionados ao aroma/sabor frutado (JINAP; ZESLINDA, 1995).

## **2.2 Microbiota presente no cacau**

O processo fermentativo do cacau é uma associação de diversos microrganismos, como leveduras, bactérias acéticas (BAA) e bactérias lácticas (BAL) (ROMBOUTS, 1952). Inicialmente, as leveduras presentes no meio, sob condições anaeróbicas, metabolizam os monossacarídeos da polpa em etanol e excretam enzimas pectinolíticas que promoverão a despectinização da polpa, permitindo a aeração da massa de cacau. Simultaneamente, as BAL metabolizam o ácido cítrico, promovendo o aumento do pH do meio e, com o aumento da

pressão de oxigênio, oferecem ambiente adequado ao desenvolvimento das BAA que, por meio da reação exotérmica de oxidação etanol em ácido acético, promovem o aumento da temperatura da massa, alcançando 45 °C ou mais. As modificações químicas ocorridas no cacau são fundamentais para o desenvolvimento do aroma/sabor de chocolate (CAMU et al. 2007; NIELSEN et al., 2007; SCHWAN; WHEALS, 2004, 1995)

*Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri* e *Saccharomyces cerevisiae* são algumas espécies de leveduras dominantes durante o processo fermentativo do cacau no Brasil (RAMOS et al., 2014; MOREIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2012, 2013; PEREIRA; GUEDES; SCHWAN, 2013) e contribuem com as alterações físico-químicas ocorridas no cacau.

As principais funções das leveduras são produção de etanol em condições de baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de açúcares, que é eventualmente consumido por processo oxidativo; produção de ácidos orgânicos, que permeabilizam e provocam a morte dos cotilédones dos grãos e produção de alguns compostos voláteis orgânicos que podem contribuir como precursores do aroma/sabor do chocolate e secretam pectinases que reduzem a viscosidade da polpa, permitindo a aeração da massa e criam um ambiente favorável ao desenvolvimento das bactérias acéticas (SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995; OUATTARA et al., 2008; SCHWAN; WHEALS, 2004).

As BAL, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*, são as principais cepas que dominam o processo fermentativo do cacau, caracterizadas como aerotolerantes, tolerantes a ácido e a etanol, além de serem capazes de fermentar o ácido cítrico presente na polpa. O ácido cítrico e os açúcares presentes no meio são convertidos em ácido láctico, ácido acético e manitol, promovendo um ligeiro aumento do pH do meio, estabilidade microbiológica, produzindo moléculas precursoras de sabor e desenvolvimento de cor dentro dos grãos (CAMU et al., 2007, 2008; DANIEL et al., 2009; NIELSEN et al., 2007).

As BAA, principalmente espécies do gênero *Acetobacter*, se desenvolvem durante a fase aeróbica do processo fermentativo. O ácido acético é considerado um dos principais metabólitos produzidos por reação exotérmica (convertendo etanol a ácido acético), promovendo a morte do embrião, o aumento da permeabilidade da parede celular do grão e a liberação de moléculas precursoras do aroma/sabor de chocolate (CAMU et al., 2007; BRITO, E. S. et al., 2000; HANSEN; OLMO; BURRI, 1998; HOLM; ASTON; DOUGLAS, 1993; NIELSEN et al., 2007).

### **2.3 Cultura iniciadora**

A cultura iniciadora pode ser definida como uma preparação microbiana de, pelo menos, um microrganismo, a ser adicionada a uma matéria-prima para produzir um alimento fermentado. Esta cultura acelera e conduz o processo de fermentação (LEROY; VUYST, 2004).

As culturas iniciadoras são amplamente utilizadas na indústria de alimentos para a produção de bebidas alcoólicas, lácteos, embutidos cárneos e no setor de panificação (LEROY; VUYST, 2004). Estes microrganismos contribuem no controle dos processos de fermentação e na padronização do produto final. No entanto, a definição da cultura iniciadora deve ser realizada após a compreensão do processo fermentativo, das características da matéria-prima e do microrganismo que se deseja utilizar.

A fermentação dos grãos de cacau é um processo espontâneo e incontrolado, realizada por meio de processos agrícolas que, geralmente, resultam em produtos finais de qualidade variável. Os problemas comumente encontrados envolvem os níveis de acidez e a falta de aroma/sabor de cacau resultantes da incompleta fermentação, ou o aparecimento do off-aroma/sabor, resultante de um excesso de fermentação e da deterioração dos grãos



(SCHWAN, 1998; SCHWAN; WHEALS, 2004; VUYST et al., 2010). A inoculação de microrganismos durante o processo fermentativo do cacau está sendo investigada como uma alternativa na melhoria da qualidade do chocolate.

Os microrganismos utilizados como culturas iniciadoras durante o processo fermentativo do cacau compreendem espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* e *Kluyveromyces marxianus*), bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus lactis*) e bactérias do ácido acético (*Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans* subsp. suboxydans) (CRAFAK et al., 2013, 2014; RAMOS et al., 2014; LEAL et al., 2008; LEFEBER et al., 2010, 2012; MOENS; LEFEBER; DE VUYST, 2014; SCHWAN, 1998).

A inoculação de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* e *Kluyveromyces marxianus*, apresentou grande impacto na qualidade sensorial do chocolate. Elas atuaram na prevenção do crescimento de microrganismos indesejáveis, devido ao rápido consumo dos carboidratos presentes na polpa e à elevada produção de etanol (RAMOS et al., 2014), influenciaram no perfil sensorial dos chocolates, contribuindo com notas doce, frutado e aroma de cacau (CRAFAK et al., 2013) e melhoraram a drenagem da polpa, aumentando a aeração e a velocidade de degradação das proteínas da semente e reduzindo a acidez dos cotilédones (LEAL et al., 2008).

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O processo fermentativo do cacau é realizado por uma sucessão de microrganismos essenciais ao desenvolvimento do aroma/sabor de chocolate e, quando conduzido de maneira espontânea e incontrolada, resulta em produtos finais com qualidade variada. A inoculação de microrganismos durante a etapa de fermentação auxilia na inibição de microrganismos indesejáveis e contribui com uma maior padronização do produto final. A presença de leveduras no meio é essencial para o sucesso da fermentação e, além disso, sua inoculação tem influenciado o perfil dos compostos voláteis e sensorial do chocolate.

## REFERÊNCIAS

ACULEY, P.C. et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 75, p.300–307, 2010.

BRASIL. Cacau – Informações de Mercado. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC)**. Ano III, nº 11. 2011.

BRITO, E. et al. Structural and chemical changes in cocoa ( *Theobroma cacao* L ) during fermentation , drying and roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 281-288, 2000.

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**, v. 73, n. 6, p. 1809-24, mar. 2007.

CAMU, N. et al. Fermentation of cocoa beans : influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 88, p. 2288-2297, 2008.

CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 21, p. 144-159, 1944.

CLAPPERTON, J. F, et al. Effects of planting materials on flavour. **Cocoa Growers' Bull**, v. 48, p. 47–63, 1994.

CRAFACK, M. et al. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, 2014.

CRAFACK, M. et al. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 103-116, 2013.

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

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations **Food and Agricultural commodities production**. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso dia: 27 jan. 2015

FRAUENDORFER, F.; SCHIEBERLE, P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10244–10251, 2008.

FREIRE, E. S.; SCHWAN, R. F.; MORORÓ, R. C. 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. **Kuala Lumpur: Cocoa Producers Alliance**, 1999, p. 1013–1020.

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

HANSEN, C. E.; OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. **J Sci Food Agric**, v. 77, p. 273 - 281, 1998.

HOLM, C. S.; ASTON, J. W.; DOUGLAS, K. The effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate †. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 61, n. 1, p. 65-71, 1993.

IWARO, A. D. et al. Germplasm evaluation at the International Cocoa Genebank. Trinidad for resistance to Phytophthora pod rot. In: **Annual Report 2000 of the Cocoa Research Unit**. University of the West Indies, Trinidad, p.34- 40, 2001.

JINAP, S., ZESLINDA, A. Influence of organic-acids on flavour perception of Malaysian and Ghanaian cocoa-beans. **Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 153-155, 1995.

JINAP, S; THIEN, J; YAP, T. N. Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, n. 1, .p. 67–75, 1994.

LEAL, G. A. et al. Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 5, p. 788-98, ago. 2008.

LEFEBER, T. et al. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. **Food microbiology**, v. 30, n. 2, p. 379-92, jun. 2012.

LEFEBER, T. et al. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 23, p. 7708-16, dez. 2010.

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

MOENS, F.; LEFEBER, T.; DE VUYST, L. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1848-57, mar. 2014.

MOREIRA, I. M. V et al. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. **Food Research International**, v. 54, p. 9-17, 2013.

NIELSEN, D. S. et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International journal of food microbiology**, v. 114, n. 2, p. 168-86, 10 mar. 2007.

OUATTARA, H. G. et al. Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1753-1760, 2008.

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

PEREIRA, G. V. DE M.; GUEDES, K. T. M.; SCHWAN, R. F. rDNA-based DGGE analysis and electron microscopic observation of cocoa beans to monitor microbial diversity and distribution during the fermentation process. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 482-486, ago. 2013.

PEREIRA, G. V. D. M. et al. Microbiological and Physicochemical Characterization of Small-Scale Cocoa Fermentations and Screening of Yeast and Bacterial Strains To Develop a Defined Starter Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5395-5405, 2012.

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

RAMOS, C. L. et al. Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. **Food Research International**, v. 64, p. 908-918, 2014.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 250-258, jan. 2011.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. et al. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. **Food Chemistry**, v. 132, p. 277-288, 2012.

ROMBOUTS, J. E. Observations on the microflora of fermenting cacao beans in trinidad. **Proceedings of the Society for Applied Bacteriology**, v. 15, n.1, p. 103–111, 1952.

SCHWAN, R. F; FLEET, G. H. **Cocoa and coffee fermentations**, CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, EUA, 2015, 611 p.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality . **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 205-221, 2004.

SCHWAN, R. F. Cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1477-1483, 1998.

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

SOUNIGO, O. et al. Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. **Journal of Applied Genetics**, v. 44, p.339-353, 2003.

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.

VOIGT, J. et al. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. **Food Chemistry**, v. 49, p. 173-180, 1994.

VUYST, L. et al. The functional role of 676 lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In: MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. (Ed.). **Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications**. Ames: Wiley, 2010. p. 301-326.



**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**ARTIGO 1**

**Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate**

Artigo redigido conforme norma da Revista LWT - Food Science and Technology, sujeito a modificações conforme sugestões do conselho editorial da revista.

**Abstract**

One of the most important step in order to obtain chocolate is cocoa beans fermentation that is carried out by a well-defined succession of microbial activities, especially yeasts that are strongly correlated to the development of chocolate characteristics. This study aimed to evaluate the impact of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* starter cultures on the microbial dynamics during cocoa bean fermentations. Moreover, we analyzed their effects on the sensory profiles of chocolate and on chemical parameters such as carbohydrates, ethanol and organic acids. Yeast populations were assessed by qPCR. *S. cerevisiae* was predominant during spontaneous (average 5.4 log cell/g) and inoculated (average 7.2 log cell/g) fermentations. The *H. uvarum* seemed to be suppressed by the other two yeasts, as it showed similar population (approximately 4.0 log cell/g) even in the inoculated assay. Carbohydrates were consumed quickly at inoculated fermentation (68% and 42% were consumed in the inoculated and control assays respectively, at 24 h). Ethanol content was higher in the inoculated (8.3 g/kg at 48 h) than in the control (4.6 g/kg at 96 h) fermentation. Consumers did not report a significant preference for either chocolate ( $p < 0.5$ ). However, differences in the flavour attributes were noted, as consumers reported stronger coffee and sour attributes in the inoculated assay. This is the first time qPCR has been used to assess the dynamic of yeasts during the complex fermentation of cocoa beans. The inoculation accelerated the process. *S. cerevisiae* and *P. kluyveri* likely contributed coffee, sour and bitter flavour to the inoculated chocolate.

Keywords: cocoa fermentation, starter culture, chocolate, qPCR, sensory analysis

## 1.0 Introduction

Cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) are the principal raw material of chocolate manufacture. Fermentation of the beans is essential for removing the pulp that envelops the beans and developing precursors of chocolate flavour (Fowler, 2009; Thompson, Miller, Lopez, & Camu, 2013). Cocoa fermentation consists of well-defined microbial succession that is initially dominated by yeasts and subsequently surpassed by lactic acid bacteria (LAB), acetic acid bacteria (AAB) and then aerobic spore forming bacilli (Ardhana & Fleet, 2003; Garcia-Armisen et al., 2010; Lima, Almeida, Nout, & Zwietering, 2011; Schwan & Wheals, 2004). According to Ho, Zhao, and Fleet (2014), the yeast growth and activity are essential for cocoa bean fermentation and the development of chocolate characteristics. The yeast metabolism results in ethanol production, which will be converted to acetic acid by AAB, causing an increase in temperature during the fermentation, and a very strong vinegar-like aroma. (Schwan & Wheals, 2004). *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*) and *Pichia* have been reported as the predominant genera found during cocoa fermentations (Daniel & Meyer, 2009; Jespersen, Nielsen, Hønholt, & Jakobsen, 2005; Moreira, Miguel, Duarte, Dias, & Schwan, 2013; Nielsen, Hønholt, Tano-Debrah, & Jespersen, 2005; Nielsen et al., 2007; Pereira, Miguel, Ramos, & Schwan, 2012). The use of starter culture for better control of the fermentation process in order to improve the quality of the fermented cocoa have been proposed by some researchers (Crafack et al., 2013; Leal Jr, Gomes, Efraim, de Almeida, & Figueira, 2008; Lefeber, Papalexandratou, Gobert, Camu, & De Vuyst, 2012; Schwan, 1998). In order to observe the dynamic of starter culture during fermentations, plating or denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques have been used for evaluation of starter culture species (Crafack et al., 2013; Lefeber et al., 2012; Schwan, 1998). However, these methods may present some limitations. The plating method

requires different types of media and different culture protocols that influence which species are recovered. The metabolic status of the cells also results in the presence of viable but non-culturable (VBNC) microbes, whose influence on fermentation can be underestimated because the population dynamics cannot be evaluated accurately (Amann, Ludwig, & Schleifer, 1995; Cocolin & Ercolini, 2008). DGGE serve as a fast source of information about the global population structure and may even detect the presence of the VBNC species (Giraffa & Neviani, 2001). However, it is not possible to quantify the population by using this technique. Quantitative real-time PCR (qPCR) is a faster and more reliable alternative to detect to quantify specific yeasts during fermentation (Hierro, Esteve-Zarzoso, González, Mas, & Guillamón, 2006) and is particularly advantageous for VBNC yeasts because of its sensitivity (Zott et al., 2010). Although the technique cannot distinguish living cells from intact dead cells, it remains the most widely used method for the evaluation of yeast dynamics during fermentation because VBNC cells may continue to influence the final product's characteristics regardless of their actual status (Cocolin & Ercolini, 2008). From our knowledge, qPCR has not been used to evaluate the yeast dynamic during the complex fermentation of cocoa. This work aimed to inoculate three yeast species (*S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *P. kluyveri*) during cocoa fermentations via qPCR and evaluate their dynamic behavior. Further, the effect of these inoculations on the sensory qualities of chocolate was evaluated. The chemical parameters (carbohydrates, ethanol and organic acids) during fermentations were also studied.

## **2.0 Material and Methods**

### *2.1 Fermentation and sampling*

The fermentation experiments were conducted at the Vale do Juliana cocoa farm in Igrapiúna, Bahia, Brazil. The ripe cocoa pods from PS1319 hybrid

(Porto Seguro, Uruçuca, BA, Brazil) were harvested in November 2013. The cocoa pods were manually opened with a machete and the beans were immediately transferred to the fermentation house. The fermentation started approximately 4 h after the breaking of the pods and was performed in 0.06 m<sup>3</sup> wooden boxes. Each fermentation used 100 kg of cocoa beans. Fermentations were performed both with and without inoculation (control) of a mixed yeast starter culture containing *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 (LNF- CA11, LNF Latino America, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brazil), *Pichia kluyveri* CCMA 0237 and *Hanseniaspora uvarum* CCMA 0236 at the beginning of the process. The *P. kluyveri* and *H. uvarum* species were separately grown in YPD broth [10 g/L Yeast extract (Merck); 20 g/L Peptone (Himedia); 20 g/L dextrose (Merck)] at 30°C and 150 rpm, and replicated every 24 h. The cells were recovered by centrifugation (7000 rpm, 10 min) and re-suspended in 1 L of sterile peptone water [1 g/L Peptone (Himedia)]. This solution was spread over the cocoa beans, reaching a concentration of approximately 10<sup>5</sup> cells/g of cocoa. The *S. cerevisiae* CCMA 0200 yeast, which is lyophilized by LNF, was weighed (as recommended by the manufacturer's instructions) and mixed in the solution with other yeasts to reach a population of approximately 10<sup>7</sup> cells/g of cocoa. All fermentations were evaluated over a period of 168 h, and samples of approximately 100 g each were withdrawn at 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h of the process. The samples were taken 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°C. All fermentations were performed in triplicate.

## 2.2 DNA extraction and qPCR reaction

The total DNA from the cocoa pulp 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  $-20^{\circ}\text{C}$  for further use.

Specific primers for the *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* and *H. uvarum* yeast species used in this study were previously described by Díaz, Molina, Nähring, & Fischer (2013) and are shown in Table 1. The specificity of each primer pair was confirmed by searching in GenBank using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Real-time PCR was carried out using the Rotor-Gene Q System (Qiagen, Hombrechtikon, ZH, Switzerland). Each reaction comprised 12.5  $\mu\text{L}$  2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Stockach, Konstanz, Germany), 0.8  $\mu\text{M}$  of each primer (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) and 1  $\mu\text{L}$  template DNA extracted from cocoa pulp for a total volume of 25  $\mu\text{L}$ . The mixture was heated to  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 s, and annealing/extension at  $60^{\circ}\text{C}$  for 15 s. The cycling temperature was then increased by  $1^{\circ}\text{C}$  every 5 s from  $50^{\circ}\text{C}$  to  $99^{\circ}\text{C}$  to obtain the melting curve. All analyses were performed in triplicate. The DNA concentration in the samples was limited to 50 ng per analysis, except for standard curves prepared from samples containing a known number of yeast cells. For standard curves, all yeast species were cultivated in YPD agar at  $30^{\circ}\text{C}$  for 24 h. The cells were counted using a Neubauer chamber. DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and serially diluted (1:10) from  $10^8$ – $10^7$  down to 10 cell/mL. Each point on the calibration curve was measured in triplicate.

### *2.3 Carbohydrates, alcohols and organic acids analysis*

The carbohydrates (glucose and fructose), organic acid (acetic, lactic, and citric acids) and alcohol (ethanol) from cocoa pulp and beans were extracted and analyzed 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 × 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. 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 of the samples analyses and the areas obtained were plotted a linear curve whose equation was used to estimate the concentration of the compounds in the sample (Ramos, Dias, Miguel, & Schwan, 2014).

### *2.4 Sensory analysis of chocolate*

After fermentation, the beans were sun dried in drying greenhouses. Thereafter, the dried beans from the two different fermentation processes (control and inoculated) were sent for chocolate production at Sartori and Pedroso Alimentos Ltda. (São Roque, SP, Brazil). The chocolate contained 70% cocoa.

The sensory analyses of the two kinds of chocolates (from control and inoculated fermentations) were performed using a consumer acceptance test followed by a check-all-that-apply (CATA) question. The tests were conducted

on 51 adults over 18 years of age. Participants were 19.3% male and 80.7% female and were consumers of dark chocolate. For the acceptance test, the consumers evaluated how much they liked each sample using a 9-point hedonic scale (1 = dislike extremely; 2 = dislike very much; 3 = dislike moderately; 4 = dislike slightly; 5 = neither like nor dislike; 6 = like slightly; 7 = like moderately; 8 = like very much; 9 = like extremely) (Stone & Sidel, 1993). For the CATA question, the consumers were asked to evaluate seven sensory attributes and select those they considered appropriate to describe the chocolate. The attributes were sour, fruity, bitter, astringent, coffee, nutty and sweet.

The tests were performed in closed cabins with white illumination at the Sensory Analysis Laboratory, Food Science Department, Federal University of Lavras (Lavras, MG). The samples were labeled with three random digits on a white surface. These samples had a monadic form and followed a balanced order of presentation (Walkeling & Macfie, 1995). The chocolate was presented in 50 mL plastic cups containing approximately 2.5 g each. The subjects rinsed their mouths with water between tastings. The sensory analysis was performed with the approval of the local ethics committee (Federal Lavras University, Brazil).



Table 1 Specific primers used for qPCR analysis and qPCR parameters of standard curves obtained from 10-fold dilution of yeast strains DNA by qPCR

Species	Primers		qPCR parameters			
	Name	Sequence	Product size	R <sup>2</sup>	Slope	Efficiency (%)
<i>S. cerevisiae</i>	SC-5fw	5'- AGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAG-3'	215 bp	0.999	-3.420	96
	SC-3bw	5'-TGAAATGCGAGATTCCCCT-3'				
<i>P. kluyveri</i>	PK-5fw	5'-AGTCTCGGGTTAGACGT-3'	169 bp	0.998	-3.634	88
	PK-3bw	5'-GCTTTTCATCTTTCCTTCACA-3'				
<i>H. uvarum</i>	HU-5fw	5'-GGCGAGGATACCTTTTCTCTG-3'	172 bp	0.998	-3.515	93
	HU-3bw	5'- GAGGCGAGTGCATGCAA-3'				

Primers were described by Díaz et al. (2013).

### 3.0 Results

#### 3.1 qPCR analysis

Spontaneous and inoculated fermentations of cocoa in a farm scale were performed in this study. For inoculations, the starter culture containing *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* and *H. uvarum* yeast species was used. The dynamic behavior of the population of the starter culture species during cocoa fermentations in the two assays (control and inoculated) was monitored by qPCR. The sequences and product sizes of the primers are summarized in Table 1, as well as the qPCR parameters obtained for standard curves. Standard curves were established for each primers set. The reaction efficiencies ranged between 88% (*P. kluyveri*) and 96% (*S. cerevisiae*) with high reproducibility. The lowest detection limit was  $10^2$  cells mL<sup>-1</sup>. The melt curve analysis for each PCR showed a single peak (data not shown).

The yeasts *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* and *H. uvarum* were detected and quantified during control and inoculated fermentations by qPCR (Fig.1). *S. cerevisiae* was predominant in both fermentations; however, in the control the population was lower (ranging from 4.4 to 5.9 log cell/g) than in the inoculated fermentation (ranging from 6.7 to 7.9 log cell/g). In the control, the population of *H. uvarum* and *P. kluyveri* ranged from 3.4 to 4.5 log cell/g and 2.8 to 3.7 log cell/g, respectively. Whereas in the inoculated assay, *P. kluyveri* showed higher population than in the control (3.6 to 5.0 log cell/g) and *H. uvarum* showed similar population (3.6 to 4.5 log cell/g). It was expected that higher populations of these species would be found in the inoculated fermentation than in the control; however this was not the case for *H. uvarum*. It seems that the other yeasts, mainly *S. cerevisiae*, detected in highest numbers may inhibit the *H. uvarum* growth.

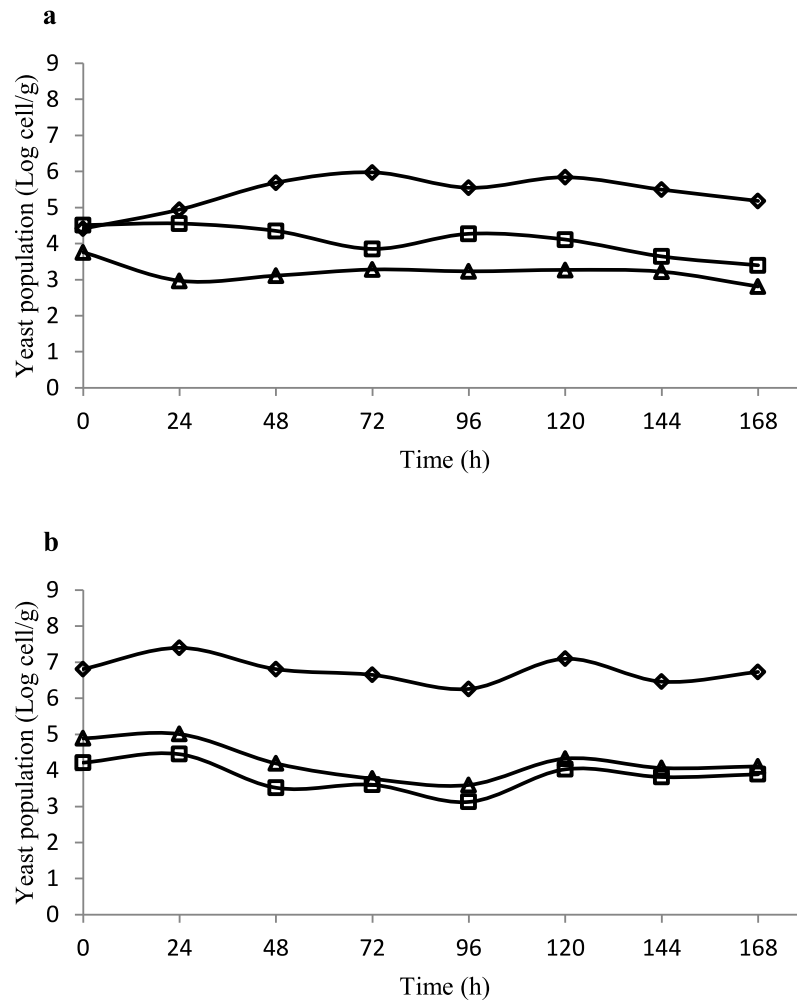


Figure 1 Dynamic behavior of *S. cerevisiae* ( $\diamond$ ), *P. kluyveri* ( $\Delta$ ), and *H. uvarum* ( $\square$ ) yeasts populations during the spontaneous (a) and inoculated (b) fermentations of cocoa, measured by qPCR. Standard deviation of mean ranged from 0.003 to 0.1 log cell g<sup>-1</sup>.

### *3.2 Carbohydrates, ethanol and organic acids during cocoa fermentation*

Carbohydrates, ethanol and organic acids were measured from the pulp and beans during the cocoa fermentations (Fig. 2 and 3). Their concentrations at 0 and 168 h are shown in Table 2. For the pulp, the initial concentrations of glucose, fructose and citric acid were approximately 25, 30 and 90 g/kg, respectively. The consumption of these compounds was observed at the initial time of fermentation (until around 70 h) and carbohydrates were consumed faster in the inoculated fermentation than in the control (Fig. 2). At 24 h of fermentation, glucose decreased to values of 13.8 g/kg (control) and 5.4 g/kg (inoculated), and fructose showed concentrations of 17.4 g/kg (control) and 12.8 g/kg (inoculated). From 72 h, the concentration of carbohydrates was lower than 3 g/kg for both assays. Sucrose was not detected at the beginning of the fermentation, likely because it was hydrolyzed into glucose and fructose given that the fruit harvest was performed three days before fermentation. This procedure is common on Brazilian cocoa farms because the producers have observed that it accelerates the fermentation process. Citric acid present in the pulp was also consumed; however, in the inoculated assay this acid showed concentrations lower than 1 g/kg only at 72 h, while for the control this concentration was reached at 48 h. As observed in Fig. 2, from 96 h for control and 144 h for inoculated fermentation, citric acid showed an increase, likely related to microbial metabolism. At the end of fermentation (168 h) the concentrations of citric acid detected were 14.0 and 12.1 g/kg for control and inoculated assays respectively.

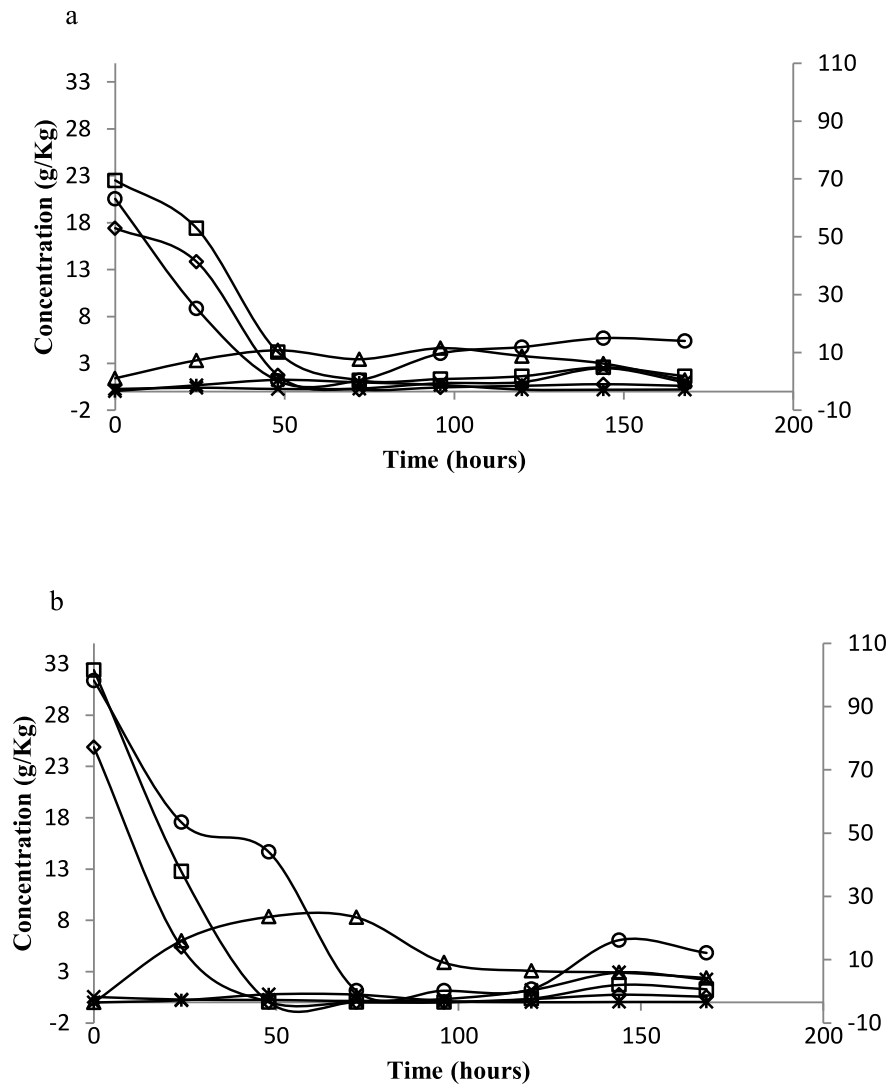


Figure 2 Carbohydrates, organic acids and ethanol detected in the pulp during (a) spontaneous and (b) inoculated fermentations of cocoa.  $\diamond$  = glucose;  $\square$  = fructose;  $\Delta$  = ethanol;  $\times$  = acetic acid;  $*$  = lactic acid;  $\circ$  = citric acid

As expected, the ethanol concentration in the pulp was higher in the fermentation inoculated with yeasts, reaching the peak of ethanol production

(around 8 g/kg) from 48 to 72 h, compared to the control, which showed maximum concentration of 4.6 g/kg at 96 h. This fact may be due mainly to the *S. cerevisiae* inoculation, which was the predominant yeast detected by qPCR. For the acetic acid, the maximum concentrations were similar between the control and inoculated fermentations: 2.5 and 2.9 g/kg respectively, detected at 144 h. As ethanol was metabolized into acetic acid by acetic acid bacteria, it might have been expected that the highest concentrations of this acid would be in the inoculated assay; however, the concentrations of both fermentations were similar. This may be due to the high temperature of the fermentations' mass, around 45-50°C (data not shown), which favors ethanol evaporation and did not affect in the acetic acid concentration at the end of the process. Lactic acid was produced in the middle of the fermentation process (between 48 and 72 h), showing maximum concentrations of 1.2 g/kg (control) and 0.8 g/kg (inoculated) at 48 h.

Fig. 3 shows the concentration of carbohydrates, ethanol and organic acids in the beans. The concentration of carbohydrates (lower than 2.7 g/kg) and lactic acid (lower than 0.2 g/kg) are similar in both experiments. Regarding ethanol, two peaks were observed in both assays. The first peak occurred at 48 h with concentrations of 7.6 and 6.9 g/kg for control and inoculated fermentations, respectively. The second peak for the control assay occurred at 120h (4.3 g/kg) and for the inoculated assay at 96 h (12.6 g/kg). Acetic acid was detected in the beans primarily toward the end of fermentation. The highest concentration of this acid was observed at 144 h with values of 3.1 and 4.9 g/kg for control and inoculated assays respectively. These data show that the production of ethanol (between 48 and 72 h) as well as acetic acid (between 120 and 144 h), by microbial activities in the pulp caused penetration into the cotyledon and in combination with high temperature contributed to the death of the beans.

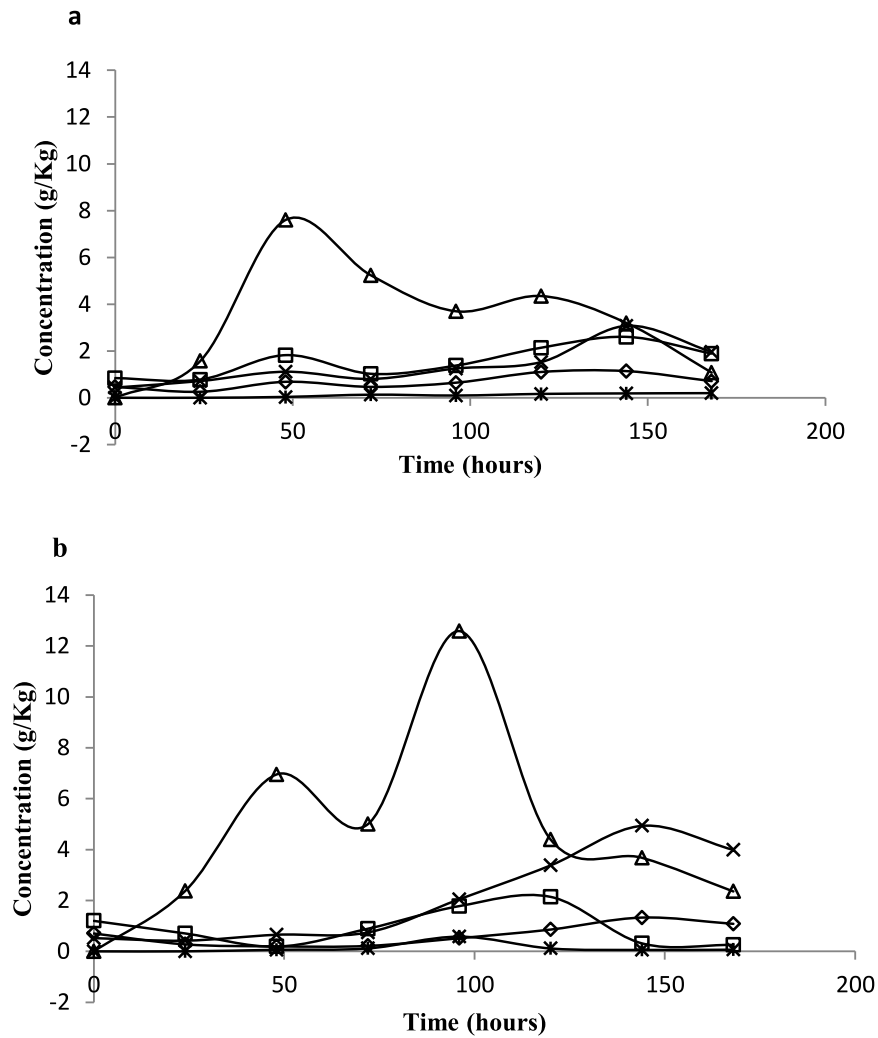


Figure 3 Carbohydrates, organic acids and ethanol detected in the beans during (a) spontaneous and (b) inoculated fermentations of cocoa. ◇ = glucose; □ = fructose; Δ= ethanol; ×= acetic acid; \* = lactic acid; ○= citric acid

Table 2 Chemical compounds detected at 0 and 168 h in the control and inoculated fermentations.

Compounds	Pulp			Beans		
	0 h	Control (168 h)	Inoculated (168 h)	0 h	Control (168 h)	Inoculated (168 h)
Glucose	24.26 ± 2.02 <sup>b</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.55 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.71 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.08 ± 0.09 <sup>b</sup>
Fructose	31.20 ± 2.71 <sup>b</sup>	1.63 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.00 <sup>b</sup>
Citric acid	90.66 ± 3.65 <sup>a</sup>	13.97 ± 1.32 <sup>a</sup>	12.15 ± 0.84 <sup>a</sup>	-	-	-
Lactic acid	0.03 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.21 ± 0.21 <sup>c</sup>	0.05 ± 0.05 <sup>c</sup>	ND	0.20 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>c</sup>
Acetic acid	0.41 ± 0.00 <sup>c</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	2.23 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.98 ± 0.36 <sup>a</sup>
Ethanol	0.71 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.22 ± 0.00 <sup>b</sup>	2.38 ± 0.10 <sup>b</sup>	ND	1.07 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.74 <sup>a</sup>

Mean values ± standard deviation within the same column followed by different superscript letters differ significantly ( $p < 0.05$ ) by Scott-Knott test. Citric acid were not detected in the beans.



### *3.3 Sensory analysis*

Sensory analyses were performed for both the chocolate produced from spontaneous fermentation and that produced by inoculated fermentation. The acceptance test and CATA question were given to untrained dark chocolate consumers. There were no significant differences ( $p < 0.5$ ) in acceptance between the two samples of chocolate. The result showed an average acceptance of 6.5 and 6.4 for chocolates produced by control and inoculated assays respectively. This means that the consumers graded each of the chocolates “like slightly”. Answers to the CATA question show that the consumers found each of the chocolates to be mainly bitter (Fig. 4). However, a few differences were noted between the two chocolate samples. The chocolates produced by spontaneous fermentation were more related to sweetness than the chocolates produced by inoculated assay, while the chocolates produced by inoculated assay were more related to coffee and sour attributes than those from the control (Fig. 4).

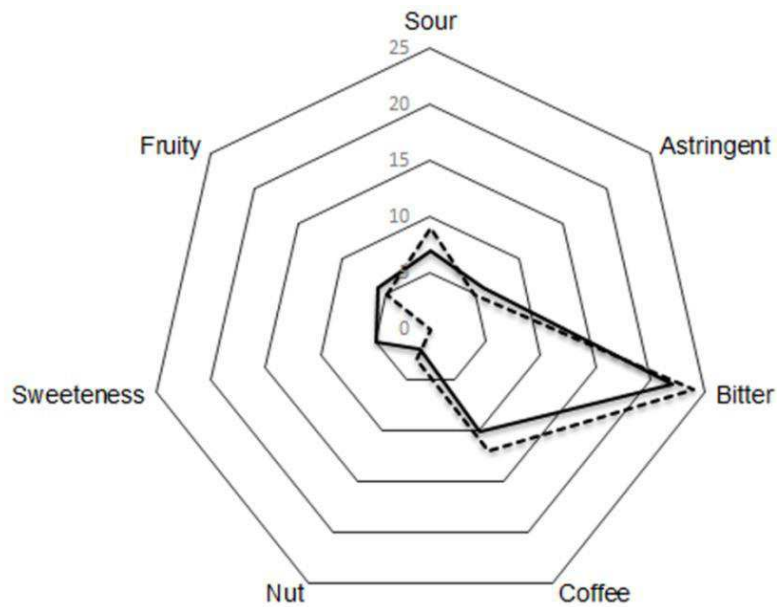


Figure 4 Flavour profiles of the chocolates produced from cocoa beans spontaneously fermented (continuous line) and cocoa beans fermented with inoculations of yeasts starter culture (dotted line). The center of the diagram corresponds to the lowest flavor intensity and the perimeter to the highest flavour intensity

#### 4.0 Discussion

The dynamics of three yeasts (*S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *P. kluyveri*) and their influence on sensory characteristics of chocolate were investigated in this work. Isolates of these yeasts were used as starter culture in order to observe their influence during the fermentation of cocoa beans and on the chocolate produced by these fermented beans. *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 (LNF- CA11, LNF Latino America, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brazil) was previously used as starter culture in fermentations of different cocoa hybrids, including PS1319 (Ramos et al., 2014). According to Ramos et al., the inoculation of this strain accelerated the fermentation process. *H. uvarum* CCMA 0236 and *P. kluyveri* CCMA 0237 were isolated from cocoa

fermentation (Moreira et al., 2013) and selected based on their stress tolerance and fermentation performance in lab assays (data not shown). *Hanseniaspora uvarum* has been described as an important yeast species associated with *S. cerevisiae* detected during Brazilian cocoa fermentations (Moreira et al., 2013; Ramos et al., 2014). Regarding *P. kluyveri*, this species has never been reported as being the dominant yeast species, however it has previously been described in fermentations in Ghana and Brazil (Daniel et al., 2009; Jespersen et al., 2005; Moreira et al., 2013; Nielsen et al., 2005, 2007; Pereira et al., 2012). Crafacek et al. (2013) studied the influence of *P. kluyveri* on cocoa flavour and observed that starter culture containing this yeast seemed to have a positive influence on the flavour profile of chocolate. Further, Pereira et al. suggested testing this species in association with *S. cerevisiae* as starter culture for cocoa bean fermentation.

In this study, a culture-independent method (qPCR) was used to detect *S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *P. kluyveri*, the starter culture species used for cocoa fermentation. The qPCR is a faster and more reliable alternative to identify and quantify yeasts during fermentation (Hierro, Esteve-Zarzoso, González, Mas, & Guillamón, 2006) than the methods based on the culture. Further, VBNC yeasts may be detected (Zott et al., 2010). qPCR has been employed to detect, identify and quantify either pathogens or beneficial populations such as fermenting microbes or probiotics in food products (Hierro, Esteve-Zarzoso, González, Mas, & Guillamón, 2006; Malorny, Lofstrom, Wagner, Kramer, & Hoorfar, 2008; Masco, Vanhoutte, Temmerman, Swings, & Huys, 2007; Zott et al., 2010). However, studies using qPCR for microbial identification from complex environmental samples such as cocoa fermentation are still scarce.

The qPCR revealed that *S. cerevisiae* and *H. uvarum* populations showed similar values in the beginning of spontaneous (control) fermentation. However, after 24 h *S. cerevisiae* was predominant (average 5.4 log cell/g)

among the three species. The stressor conditions during cocoa fermentation, including ethanol concentration and high temperature, influence the prevalence of adapted yeast, such as *S. cerevisiae*, that have been said to dominate fermentation (Andorrà, Berradre, Mas, Esteve-Zarzoso, & Guillamón, 2012; Ardhana & Fleet, 2003; Jespersen et al., 2005; Moreira et al., 2013; Papalexandratou et al. 2013; Pereira et al., 2012; Ramos et al., 2014). *S. cerevisiae* was followed by the *H. uvarum* population (average 4.0 log cell/g). *Hanseniaspora* genus and *S. cerevisiae* have been described as predominant yeasts during different laboratory and pilot-scale cocoa bean fermentations (Moreira et al., 2013; Nielsen et al., 2007; Papalexandratou et al., 2013; Pereira et al., 2012, 2013; Ramos et al., 2014; Schwan et al., 1995). The species *H. uvarum* was previously described as an important yeast during different Brazilian cocoa hybrid fermentations (Moreira et al., 2013; Ramos et al., 2014). As expected, the *P. kluyveri* yeast was detected in low numbers (average 3.1 log cell/g) during spontaneous fermentation.

When the yeast starter culture was employed, the yeast microbial profile showed modifications. As observed in the results, *S. cerevisiae* was still predominant (average 7.2 log cell/g) among the three species, as it was inoculated in higher concentrations than the others. *P. kluyveri* showed its highest (average 4.2 log cell/g) population in the inoculated assay, however *H. uvarum* showed similar numbers between the assays (average 3.9 log cell/g). The highest populations of *S. cerevisiae* and *P. kluyveri* likely suppressed the *H. uvarum* growth in the inoculated fermentation. Although the inoculated yeasts were previously tested for some stressful conditions (data not shown), in a complex system containing different microorganisms a competition is an important issue that should be considerate. The increase in the *Saccharomyces* population matched a large decrease in the *Hanseniaspora* population, as has been widely reported (Hierro, Esteve-Zarzoso, Mas & Guillamón, 2007; Nissen

& Arneborg, 2003; Nissen, Nielsen, & Arneborg, 2003; Pérez-Nevado, Albergaria, Hogg, & Girio, 2006). The ability of *S. cerevisiae* to displace other microbial species during fermentations has always been attributed to its higher fermentative power and capacity to withstand the increasingly adverse conditions established in the medium as the fermentation progresses. These conditions include high levels of ethanol and organic acids, low pH values, scarce oxygen availability, high temperature and depletion of certain nutrients (Bauer & Pretorius, 2000; Goddard, 2008; Hansen, Nissen, Sommer, Nielsen, & Arneborg, 2001). Further, species belonging to *Pichia* genera, including *P. kluyveri* as well as *S. cerevisiae*, have been reported as killer toxin-producing yeast (Branco et al., 2014; Middelbeek, Stumm, & Vogels, 1980; Sangorrín, Lopes, Jofré, Querol, & Caballero, 2008; Santos, Marquina, Leal, & Peinado, 2000). These species produce toxins against other yeast genera including killer-sensitive strains of *H. uvarum* (Santos et al., 2000). All of these attributes probably favored the *S. cerevisiae* and *P. kluyveri* growth relative to *H. uvarum* during inoculated cocoa fermentation. Consequently, some characteristics observed during fermentation, including high ethanol concentration (Fig. 2b and 3b) and the sour, bitter and coffee flavour detected in the chocolate (Fig. 4), may be mainly related to the metabolism of these two yeasts' isolates.

According to the chemical results, carbohydrates were consumed faster (Fig. 2) in the inoculated assay. This is likely due to the higher population of *S. cerevisiae* in the inoculated assay than in the control. Further, higher ethanol concentrations (almost two times the concentration detected in the control) were observed in this assay. However, this was not the case for acetic acid. Similar results were found by Ramos et al. (2014) using *S. cerevisiae* CCMA 0200 as a single inoculant in cocoa fermentation. These authors suggested that ethanol was likely partially eliminated by evaporation and it did not affect in the acetic acid concentration at the end of the process, concluding that the yeast *S. cerevisiae*

CCMA 0200 accelerated the fermentation, preventing undesirable microorganisms growth.

In order to investigate the influence of starter culture on the final product, two chocolates were produced and their sensory characteristics were evaluated. The consumers graded both chocolate samples “like slightly”. Although there were no significant differences ( $p < 0.5$ ) in acceptance for chocolates produced by spontaneous and inoculated fermentations, other differences were observed. Bitter, sour and coffee flavour attributes were more strongly detected in the inoculated sample. It is known that the quantity, nature and distribution of the microorganisms present in the cocoa pulp will determine the speed and intensity of the fermentation as well as the quality of the fermented beans and the chocolate made from them (Camu et al., 2008). The inoculated yeasts *S. cerevisiae* CCMA 0200 and *P. kluyveri* CCMA 0237, which showed higher populations in the inoculated assay, may contribute to the sensory characteristics observed in that assay. Further, the fermentation process seemed to be accelerated in this assay.

## 5.0 Conclusions

This study is the first to use the qPCR technique to assess the dynamic behavior of yeast during the complex fermentation of cocoa beans. A predominance of *S. cerevisiae* was observed during spontaneous fermentation of cocoa hybrid PS1319 compared to *H. uvarum* and *P. kluyveri*. During inoculated fermentation, the population of *H. uvarum* seemed to be suppressed by the high populations of the other two inoculated yeasts, mainly *S. cerevisiae*, which was also predominant in the inoculated assay. Starter culture accelerated the consumption of carbohydrates, and thus the highest ethanol concentrations were observed. Further, the detection of highest and early ethanol and acetic acid into the cotyledon in the inoculated assay, may contribute to acceleration in the death

of the beans and consequently the fermentation process. The acceptance of chocolate samples produced by the two different assays did not differ significantly; however, a few differences in the attributes related to chocolate flavour could be observed. The inoculation produced chocolate with stronger coffee and sour notes than the chocolate produced by spontaneous fermentations. However, studies regarding volatile compounds produced by fermentation and microbial diversity are important in order to better understand the role of these yeasts during cocoa fermentation and in the chocolate made from the fermented beans.

### **Acknowledgments**

The authors thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. The authors gratefully acknowledge the anonymous referees for their comments and constructive suggestions for improving the quality of this manuscript.

### **References**

- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, *59*, 143–169.
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT Food Science and Technology*, *49*, 8-13.

- Ardhana, M., & Fleet, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, *86*, 87–99.
- Bauer, F. F., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine—a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *21*, 27–51.
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M. G., Caldeira, J., & Albergaria, H. (2014). Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*, 843–853.
- Camu, N., De Winter, T., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., & De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*, 2288–2297.
- Cocolin, L., & Ercolini, D. (2008). *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer, Naples.
- Crafack, M., Mikkelsen, M. B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H., & Nielsen, D. S. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology* *167*, 103–116.
- Daniel, H. -M., & Meyer, W. (2003). Evaluation of ribosomal and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, *86*, 61–78.
- Díaz, C., Molina, A. M., Nähring, J., & Fischer, R. (2013). Characterization and Dynamic Behavior of Wild Yeast during Spontaneous Wine



Fermentation in Steel Tanks and Amphorae. *Biomed Research International*, 540465, 1-13.

- Fowler, M. S. (2009). Cocoa beans: From the tree to factory. In S. T. Beckett (Ed.), *Industrial Chocolate Manufacture and Use* (pp.10-47). Chichester: Blackwell Publishing Ltd.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 2281-2292.
- Giraffa, G., & Neviani, E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 19–34.
- Goddard, M. R. (2008). Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*, 89, 2077-2082.
- Hansen, E. H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., & Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 541–547.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, A., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7148–7155.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2007). Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS Yeast Research*, 7, 1340-1349.

- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *174*, 72-87.
- Jespersen, L., Nielsen, D. S., Hønholt, S., & Jakobsen, M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, *5*, 441-453.
- Leal Jr, G. A., Gomes, L. H., Efraim, P., de Almeida, F. C., & Figueira, A. (2008). Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*, *8*, 788-798.
- Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, *30*, 379-392.
- Lima, L. J. R., Almeida, M. H., Nout, M. J. R., & Zwietering, M. H. (2011). *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*, *51*, 731-761.
- Malorny, B., Lofstrom, C., Wagner, M., Kramer, N., & Hoorfar, J. (2008). Enumeration of salmonella bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*, 1299-1304.
- Masco, L., Vanhoutte, T., Temmerman, R., Swings, J., & Huys, G. (2007). Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and recA genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, *113*, 351-357.

- Middelbeek, E. J., Stumm, C., & Vogels, G. D. (1980). Effects of *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. *Antonie van Leeuwenhoek*, *46*, 205-220.
- Moreira, I. M. V., Miguel, M. G. C. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, *54*, 9-17.
- Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., & Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, *22*, 271–284.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture dependent and culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, *114*, 168–186.
- Nissen, P., & Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, *180*, 257–263.
- Nissen, P., Nielsen, D., & Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, *20*, 331–341.
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & Vuyst, L. D. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species

- for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, *35*, 73-85.
- Pereira, G. V. M., Miguel, M. G. C. P., Ramos, C. L., & Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*, 5395–5405.
- Pereira, G. V. M., Magalhães, K. T., Almeida, E. G., Coelho, I. S., & 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. *International Journal of Food Microbiology*, *161*, 121-133.
- Pérez-Navado, F., Albergaria, H., Hogg, T., & Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, *108*, 336–345.
- Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G. C. P., & Schwan, R. F. (2014). Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, *64*, 908-918.
- Santos, A., Marquina, D., Leal, J. A., & Peinado, J. M. (2000). (1→6)-b-DGlucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 1809–1813.
- Sangorrín, M. P., Lopes, C. A., Jofré, V., Querol, A., & Caballero, A. C. (2008). Spoilage yeasts from Patagonian cellars: characterization and potential biocontrol based on killer interactions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*, 945-953.

- Schwan, R. F. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 1477–1483.
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*, 205–221.
- Stone, H. S., & Sidel, J. L. (1993). *Sensory evaluation practices*. Academic Press, California.
- Thompson, S. S., Miller, K. B., Lopez, A., & Camu, N. (2013). Cocoa and coffee. In M. P. Doyle, & R. L. Buchanan (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (pp. 881–889). Washington: ASM Press.
- Walkeling, I. N., & Macfie, J. H. (1995). Designing consumer trials balanced for first and higher orders of carry-over effect when only a subset of  $\kappa$  samples from  $\tau$  may be tested. *Food Quality and Preference*, *6*, 299–308.
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., & Masneuf-Pomarede, I. (2010). Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology*, *27*, 559–567.

## **ARTIGO 2**

**Impacto da inoculação de leveduras na concentração dos compostos voláteis  
e no perfil sensorial do chocolate**

**Resumo**

Os chocolates são elaborados a partir das sementes fermentadas de *Theobroma cocoa*. Durante o processo fermentativo ocorre uma sucessão de microrganismos responsáveis pelas alterações físico-químicas ocorridas na polpa e no interior da semente de cacau. Este estudo foi realizado com o objetivo de observar o efeito da inoculação de leveduras no perfil de compostos voláteis e da concentração de teobromina e de cafeína do processo fermentativo do cacau. Análise sensorial dos chocolates contendo 70% de cacau também foi avaliada. A comunidade eucariótica presente em amostras de cacau fermentadas espontaneamente e inoculadas com *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum*, durante o processo fermentativo do cacau, foi obtida pela análise de PCR-DGGE. Os microrganismos dominantes em ambas as fermentações foram *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* e *H. uvarum*. Os compostos voláteis foram detectados e quantificados por GC-FID, no tempo inicial e final da fermentação do híbrido PS1319, sendo identificados 33 compostos voláteis. A cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada na identificação de teobromina e cafeína. A proporção de teobromina em relação à cafeína foi de 5,99, na fermentação espontânea, e de 3,82, na fermentação inoculada. A inoculação de leveduras influenciou o perfil dos compostos voláteis e sensorial, resultando em chocolates com dominância dos atributos amargo e frutado.

Palavras-chave: Comunidade microbiana, cultura iniciadora, análise sensorial.

## 1. Introdução

A semente da *Theobroma cocoa* é a principal matéria-prima para a elaboração de chocolate. Durante muitos anos, a plantação de cacau foi a principal commodity produzida e comercializada no Brasil. Atualmente, o país ocupa a sexta posição na produção mundial (FAO, 2012).

O processamento pós-colheita é uma etapa fundamental que determina a qualidade do produto final. A etapa de fermentação ocorre devido à presença de diversos microrganismos responsáveis pelas modificações ocorridas no grão de cacau, na produção de metabólitos e no desenvolvimento de precursores do aroma/sabor.

A sucessão microbiana inicia-se em um ambiente anaeróbico propício ao desenvolvimento de leveduras que transformam os açúcares presentes na polpa em etanol, e de bactérias do ácido láctico, que metabolizam o ácido cítrico em ácido láctico, promovendo aumento do pH. As bactérias do ácido acético em condições aeróbicas transformam o etanol em ácido acético e a alta temperatura resultante da reação exotérmica contribui para a morte do embrião e a liberação de enzimas endógenas (SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995; NIELSEN et al., 2007).

O metabolismo das leveduras é fundamental para o desenvolvimento do aroma/sabor de chocolate, além de contribuir com a produção do etanol e de enzimas pectinolíticas. São os maiores produtores de ésteres e álcoois superiores (HO; ZHAO; FLEET, 2014; CRAFTACK et al., 2013; OWUSU et al., 2011; SCHWAN & WHEALS, 2004).

Os compostos voláteis formados durante o processo fermentativo estão compreendidos entre álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e pirazinas. Altas concentrações de álcoois, aldeídos e cetonas são desejáveis para a obtenção do aroma/sabor florais, doces e frutados (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012). Os



alcaloides, como as metilxantinas, teobromina e cafeína, contribuem com o amargor e a adstringência no cacau, no entanto, suas concentrações diminuem durante a fermentação (LEFEBER et al., 2012; PAYNE et al., 2010; CAMU et al., 2008; NAZARUDDIN et al., 2006; JINAP; ZESLINDA, 1995; KIM; KEENEY, 1984).

A compreensão da comunidade microbiana e as alterações físico-químicas durante a fermentação do cacau são fundamentais ao desenvolvimento de procedimentos de gestão e para a produção de cacau de alta qualidade (RAMOS et al., 2014). Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar a comunidade microbiana durante o processo fermentativo do cacau e a influência da inoculação de diferentes leveduras na concentração dos compostos voláteis e no perfil sensorial.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Fermentação e amostragem*

O experimento foi conduzido na Fazenda Vale do Juliana, Igrapiúna, Bahia, Brasil. Os frutos maduros do híbrido PS1319 foram colhidos durante a safra de 2013 (novembro), sendo abertos manualmente e conduzidos, imediatamente, para a casa de fermentação, onde se iniciou a fermentação em caixas de madeiras, contendo, aproximadamente, 100 kg de cacau. A inoculação das leveduras foi realizada na massa de cacau, no início do processo. A biomassa de cada levedura foi diluída em 500 mL de água peptonada (0,1%) contendo aproximadamente  $10^7$  células/mL.

As fermentações foram conduzidas de forma espontânea, ou seja, sem adição de culturas iniciadoras (controle) e com a adição de cultura iniciadoras. As culturas utilizadas foram *Hanseniaspora uvarium* (CCMA 0236) e *Pichia*

*kluuyveri* (CCMA 0237), as quais foram previamente selecionadas como potenciais culturas iniciadoras, baseando-se em estudos anteriores (MOREIRA et al., 2013), e *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200, armazenada na forma liofilizada (LNF- CA11, LNF Latino America, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil).

As fermentações de cacau foram avaliadas durante 168 horas, sendo coletados 100 g de amostra a cada 24 horas. As coletas foram realizadas a, aproximadamente, 40 cm da superfície em direção ao centro do fermentador, sendo estocadas, a -20 °C, até a realização dos testes.

## 2.2 Análises das comunidades microbianas por PCR-DGGE

O DNA total das amostras obtidas das diferentes fermentações foi extraído com DNA QIAamp Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de PCR foram realizadas em 25 µL contendo 0,125 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, EUA), 5 mL de 5x green go taq buffer, 0,2 mM dNTP, 1 µM de cada iniciador, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,5 µl de DNA extraído. A região do gene 18S rDNA utilizando os iniciadores NS3 (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC GGG GGG GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC-3') (GC clamp está sublinhado) e YM951r (5'-TTG GCA AAT GCT TTC GC-3') (HARUTA et al., 2006). As amplificações foram realizadas de acordo com Ramos et al. (2010).

Os produtos da PCR foram analisados por PCR-DGGE, utilizando-se o sistema BioRad DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, Richmond, CA, USA). As amostras foram aplicadas em gel contendo 8% (m/v) de poliacrilamida (8% (v/v) acrilamida:bisacrilamida (37.5:1) em 0,5 x TAE). Soluções contendo de 35% a 60% de gradiente desnaturante foram utilizadas

para as análises da comunidade eucariótica (100% de desnaturante corresponde a 7M de ureia e 40% [v/v] formamida). A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 200 V, por 5 horas, à temperatura constante de 60 °C. Após a corrida, o gel foi retirado da placa e corado com SYBR Green® (Molecular Probes, Oregon, EUA) (1:10,000 v/v), por 30 minutos e as imagens foram visualizadas e fotografadas utilizando-se transluminador LPix Image (LTB 20 × 20HE, LPix®, Brazil).

Os fragmentos de DNA presentes no gel foram excisados e reamplificados com os mesmos *primers* descritos anteriormente. Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul) e as sequências disponíveis na base de dados GenBank foram comparadas com as do algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, EUA).

### 2.3 Análise de alcaloides púricos

Os alcaloides púricos, teobromina e cafeína, foram extraídos de acordo com a metodologia descrita por Risner (2008), com pequenas modificações. A extração consistiu em homogeneizar 0,02 g de grãos de cacau com 5 mL de água MiliQ, por 5 minutos, em vortex, sendo 2 mL do sobrenadante filtrados através de uma membrana de 0,22 µm (Millipore), para a análise de HPLC.

A análise foi realizada em cromatógrafo (Shimadzu , modelo LC - 10AI , Shimadzu Corp , Japão) equipado com o detector UV, a 273 nm. A coluna C18 Shimadzu foi utilizada e operada a 30 °C. A fase móvel consistiu de água e acetonitrila (80:20 v/v), a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. As curvas de calibração foram construídas a partir das diferentes concentrações do padrão, injetadas nas mesmas condições das amostras analisadas. As áreas foram obtidas

plotando-se a curva de linearidade e a equação foi utilizada para estimar a concentração dos componentes da amostra

#### *2.4 Identificação dos compostos voláteis*

Os compostos voláteis das amostras de cacau (2,0 g) foram extraídos no início e no final da fermentação, usando a técnica SPME-HS, descrita por Rodriguez-Campos et al. (2011), com pequenas modificações. A fibra 50/30  $\mu\text{m}$  de divinilbenzeno/carboxene/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) fornecida por Supelco foi utilizada para extrair compostos voláteis. A fibra foi equilibrada durante, 15 minutos, a 60 °C e, em seguida, expostos ao cacau em pó, durante 30 minutos.

A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso (GC), Shimadzu modelo 17 A, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar de sílica DB Wax (30 m  $\times$  0,25 mm i.d.  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ) (J & W Scientific, Folsom, CA, USA). A temperatura do forno foi mantida a 50 °C, durante 5 minutos, aumentando para 190 °C por incrementos de 3 °C/min e, em seguida, mantida a 190 °C, durante 10 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 230 e 240 °C, respectivamente e o gás de arraste ( $\text{N}_2$ ) foi mantido a uma vazão de 1,2 mL/min. A identificação dos compostos voláteis foi feita por comparação de seus tempos de retenção com os dos padrões (DUARTE et al., 2011).

#### *2.5 Análise sensorial*

Os provadores treinados e previamente selecionados foram submetidos ao teste de dominância temporal das sensações (TDS) de chocolates, os quais foram elaborados a partir de amêndoas fermentadas espontaneamente (controle)

e inoculadas com *Hanseniaspora uvarum* CCMA 0236, *Pichia kluyveri* CCMA 0237 e *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200, seguindo a metodologia proposta por Albert et al. (2012). Na primeira sessão, os provadores descreveram todas as sensações percebidas durante a degustação dos chocolates. Os atributos mais citados foram selecionados para análise de TDS, sendo eles ácido, amargo, castanha, doce, adstringente, café, frutado e cacau. Na segunda sessão, os provadores foram familiarizados ao programa e à metodologia proposta. Nesta sessão foram definidos o tempo de 2 segundos de *delay* e a duração total análise de 35 segundos.

Os chocolates foram apresentados em copos plásticos de 50 mL, codificados com três dígitos, contendo, aproximadamente, 2,5 g do chocolate em barra. Água foi utilizada para lavar a boca entre as amostras provadas. As curvas de TDS foram obtidas de acordo com a metodologia proposta por Pineau et al. (2009) para o software SensoMaker. O gráfico TDS contém duas linhas que correspondem ao “nível de chance”, que é a taxa de dominância que um atributo foi escolhido ao acaso, e o “nível de significância”, que é o valor mínimo para que o atributo seja considerado significativo (PINEAU et al. 2009). O cálculo utiliza o intervalo de confiança de uma proporção binomial, baseado na aproximação normal, de acordo com Pineau et al. (2009).

$$P_s = P_o + 1.645 \sqrt{\frac{P_o(1 - P_o)}{n}}$$

em que  $P_s$  é o menor valor significativo ( $\alpha = 0,05$ ) em qualquer ponto no tempo para uma curva TDS;  $n$  é o número provadores x repetições e  $P_o$  é igual a  $1/p$ , sendo  $p$  o número de atributos.

### 3. Resultados

#### 3.1 Comunidades eucarióticas encontradas durante o processo fermentativo

Na Figura 1 observa-se o perfil da comunidade microbiana eucariótica obtida por PCR-DGGE, durante o processo fermentativo do híbrido PS1319, fermentado espontaneamente e inoculado com culturas iniciadoras. A fermentação inoculada apresentou bandas correspondentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora uvarium* e, na fermentação inoculada, foram encontradas bandas de *Hanseniaspora uvarium*, *Pichia kluyveri* e *Saccharomyces cerevisiae*. Fragmento correspondendo à *Theobroma cocoa* também foi detectado.

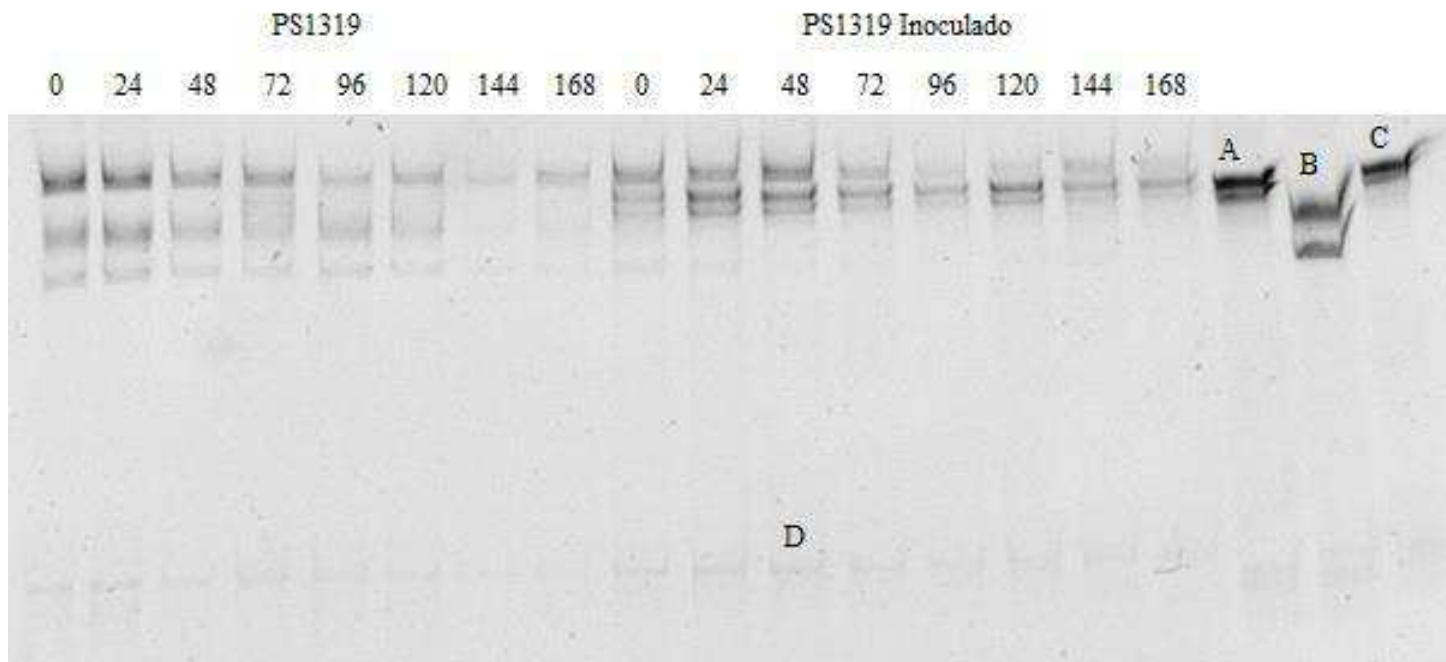


Figura 1 Comunidade eucariótica encontrada durante a fermentação espontânea e inoculada do híbrido PS1319. As letras representam os microrganismos identificados. A *Pichia kluyveri*, B *Hanseniaspora uvarum*, C *Saccharomyces cerevisiae* e D *Theobroma cocoa*

### 3.2 Análise de teobromina e cafeína

A concentração dos alcaloides púricos, teobromina e cafeína, na amêndoa seca da fermentação espontânea, foi, respectivamente, de 6,23 g/kg e 1,04 g/kg e, na fermentação inoculada, de 5,47 g/kg e 1,43 g/kg (Figura 2). A concentração de teobromina foi mais elevada na fermentação controle e a de cafeína, na fermentação inoculada.

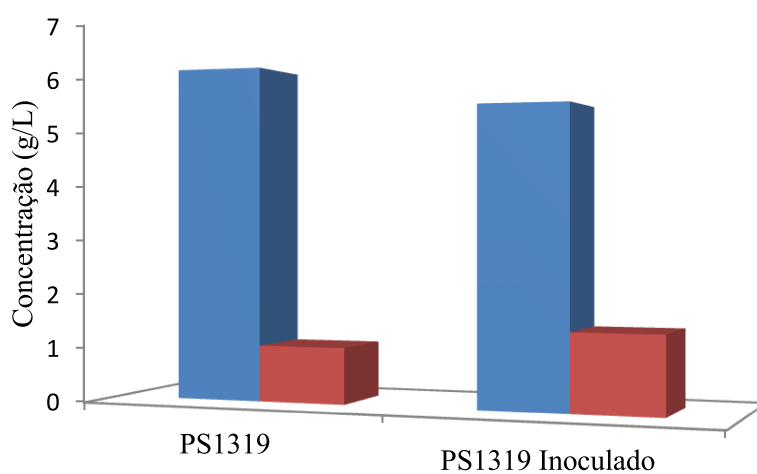


Figura 2 Teobromina e cafeína. Barra azul: teobromina, barra vermelha: cafeína

### 3.3 Análise dos compostos voláteis

Os compostos voláteis foram detectados e quantificados por GC-FID no tempo inicial e final da fermentação do híbrido PS1319, conduzida espontaneamente e inoculada. Os compostos voláteis detectados foram agrupados em álcoois (12), ésteres (9), ácido (7), aldeídos e cetonas (5) (Figura 3), totalizando 33 compostos, descritos na Tabela 1.

Os ésteres foram detectados em maiores concentrações no tempo final da fermentação inoculada (17,50%). O composto etil acetato, correlacionado ao sabor abacaxi, foi o principal composto produzido após as 168 horas de fermentação. Em ambas as fermentações os álcoois foram



detectados em maiores concentrações no início da fermentação, sendo, 2-heptanol e metanol encontrados, principalmente, da fermentação espontânea e inoculado, respectivamente. Dos aldeídos e cetonas, o volátil 2-nonanone atribuído ao sabor doce foi o principal composto detectado (7,24%) no início da fermentação espontânea. Os ácidos foram encontrados em baixas concentrações, em ambas as fermentações.

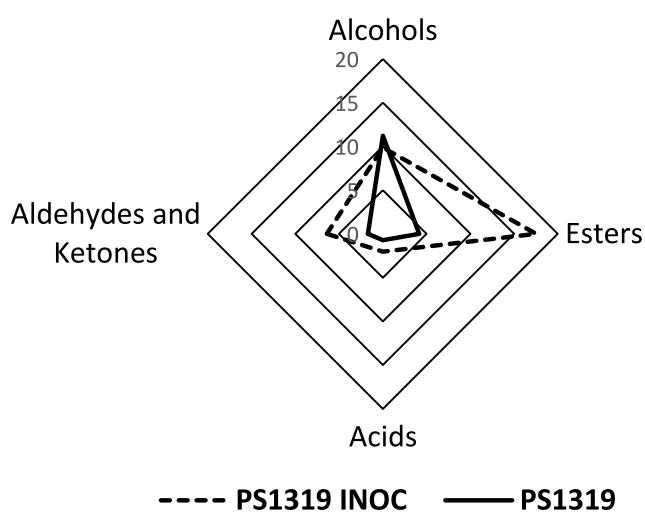


Figura 3 Grupos de compostos voláteis encontrados no final da fermentação espontânea (linha contínua) e inoculada (linha pontilhada)

Tabela 2 Concentração dos compostos voláteis presentes no início (TI) e no final (TF) da fermentação espontaneamente e inoculada do híbrido PS1319

Componentes	Odor <sup>a</sup>	Concentração (%)			
		PS1319 TI <sup>b</sup>	PS1319 TF <sup>b</sup>	PS 1319 I TI <sup>c</sup>	PS1319 I TF <sup>c</sup>
<i>Alcoois</i>					
1-butanol		ND <sup>d</sup>	1,01	3,50	0,77
1-propanol	Doce	0,69	ND	0,65	0,13
1,3-butanodiol		1,63	0,12	0,69	ND
2-fenil etanol	Mel, floral	ND	0,54	ND	1,13
2-heptanol	Doce, cítrico	13,73	2,15	10,35	3,66
2-metil-1-butanol	Frutado, uva	ND	ND	ND	0,26
2-metil-1-propanol	Vinho	ND	2,13	ND	ND
3-metil 1 butanol	Chocolate	0,56	ND	ND	ND
Furfuril álcool	Caramelo, doce	1,17	ND	ND	ND
Metanol		5,50	2,08	12,11	2,711
Octanol		ND	3,22	ND	ND
Total		22,13	11,21	27,33	9,87
<i>Ésteres</i>					
Etil acetato	Abacaxi	0,14	3,05	3,27	15,17
Feniletil acetato	Mel, frutado	ND	0,34	ND	0,23
Etil lactato	Frutado	ND	0,20	0,78	0,29
Etil octanoato	Frutado, floral	ND	0,32	ND	0,08
Furfuril acetato	Frutado, banana	0,04	ND	0,25	ND
Isoamil acetato	Frutado, banana	ND	ND	ND	0,69
Isobutil acetato	Frutado	2,97	0,07	0,25	ND
Propil acetato		ND	0,15	7,95	0,55
Propil butirato		ND	ND	ND	0,46
Total		3,16	4,15	12,53	17,50

Tabela 2, conclusão

Componentes	Odor <sup>a</sup>	Concentração (%)			
		PS1319 TI <sup>b</sup>	PS1319 TF <sup>b</sup>	PS 1319 I TI <sup>c</sup>	PS1319 I TF <sup>c</sup>
<i>Ácido</i>					
Ácido benzoico		0,42	ND	ND	0,35
Ácido decanoico	Ranço	0,17	ND	ND	0,32
Ácido hexanoico	Pungente	ND	0,12	ND	0,38
Ácido isobutírico	Ranço, manteiga	ND	0,19	ND	0,40
Ácido nonanoico	Gordura	0,95	0,26	1,05	0,55
Ácido octanoico	Doce, frutado	1,36	ND	ND	ND
Ácido propanoico	Pungente, ranço	ND	0,12	ND	ND
Total		2,91	0,71	1,05	2,02
<i>Aldeído e cetona</i>					
1,1-dietoxietano		0,24	0,05	1,15	0,07
2-nonanone	Doce	7,24	1,57	ND	3,09
Acetaldeído		0,12	0,06	0,39	0,64
Hexanal		0,13	ND	ND	ND
Octanal		ND	ND	ND	2,59
Total		7,74	1,69	1,54	6,04

<sup>a</sup> Obtido na literatura<sup>b</sup> Fermentação conduzida espontaneamente<sup>c</sup> Fermentação inoculada com *Hanseniaspora uvarium* (CCMA 0236), *Pichia kluyveri* (CCMA 0237) e *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA.0200)<sup>d</sup> nd: não detectável

### *3.2 Análise sensorial de chocolate*

Os chocolates produzidos a partir de amêndoas fermentadas espontaneamente e inoculadas foram submetidos ao teste de TDS. Os gráficos da Figura 4 representam os perfis sensoriais em relação aos atributos ácido, amargo, castanha, doce, adstringente, café, frutado e cacau, durante 35 segundos.

Os atributos amargo e cacau foram semelhantemente perceptíveis durante os 35 segundos de análise do chocolate fermentado espontaneamente. O atributo doce foi perceptível aos 4,9 segundos, seguido dos atributos adstringente, perceptível aos 9,1 e 33,6 segundos, e frutado, aos 12,95 e 28,35 segundos de análise. O chocolate inoculado apresentou o atributo amargo dominante durante toda a análise sensorial e o atributo cacau foi perceptível aos 30 segundos. O atributo frutado foi perceptível aos 9,1 e aos 25 segundos, e a adstringência foi perceptível aos 19,6 segundos de análise.

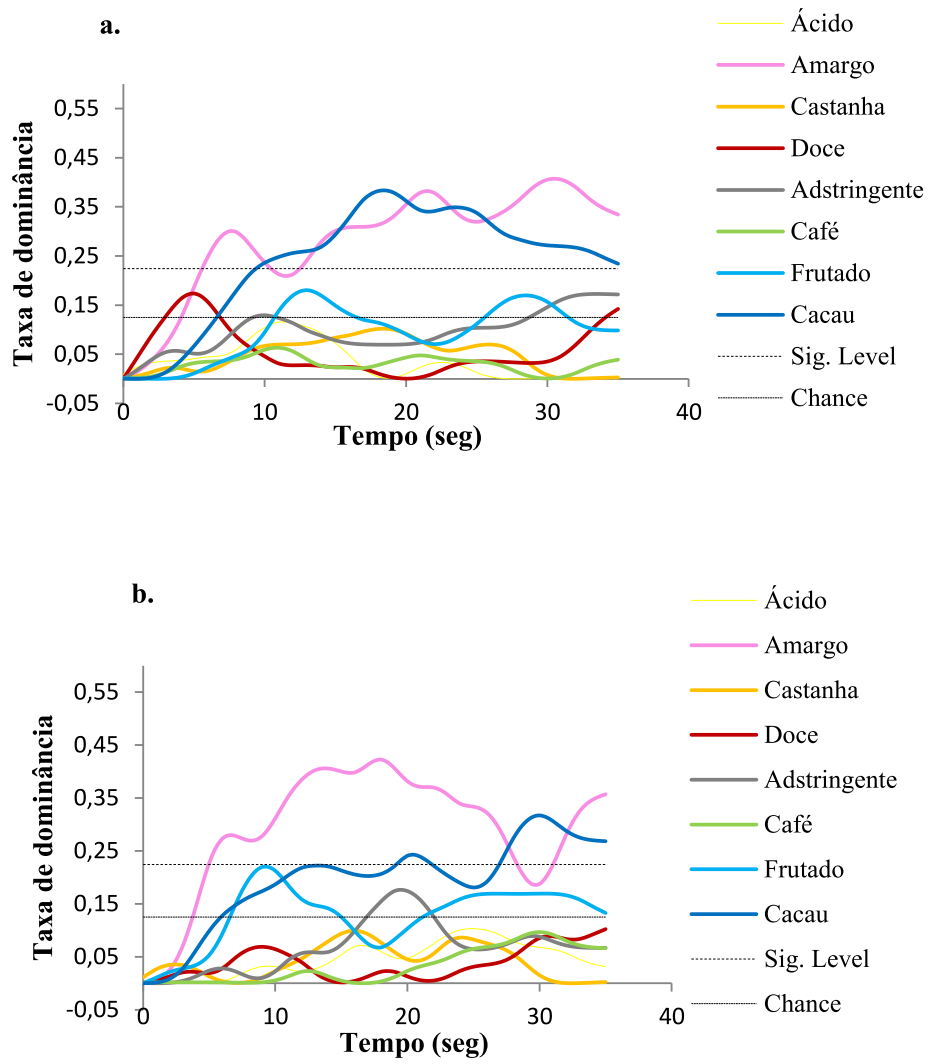


Figura 4 Perfil da dominância temporal das sensações para chocolates produzidos a partir de amêndoas fermentadas de forma espontânea (a) e inoculada (b)

#### 4. Discussão

A fermentação do cacau consiste em uma sucessão microbiana bem definida, inicialmente dominada por leveduras, bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético (ARDHANA; FLEET, 2003; GARCIA-ARMISEN et al., 2010; LIMA, et al. 2011; SCHWAN; WHEALS, 2004). A quantidade e a distribuição dos microrganismos presentes na polpa irão determinar a velocidade e a intensidade da fermentação, bem como a qualidade do grão fermentado e o produto final (CAMU et al., 2008).

*Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora uvarum* são espécies predominantes durante o processo fermentativo do cacau no Brasil (RAMOS, 2014; MOREIRA, 2013; PEREIRA et al., 2012; SCHWAN; WHEALS, 2004). No entanto, a inoculação de *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* e *H. uvarum* modificou o perfil eucariótico do processo fermentativo do cacau. As elevadas concentrações de *S. cerevisiae* e *P. kluyveri* no meio inibiram o desenvolvimento da *H. uvarum*, que foi observado pela diminuição da intensidade da banda do PCR-DGGE.

*Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia kluyveri* são relatadas como produtoras de toxina *killer* e, quando presentes no meio, são capazes de inibir o desenvolvimento de células sensíveis (SCHMITT; BREINING, 2006; MAGLIANI et al., 1997;). A produção de compostos antimicrobianos por leveduras já foi descrita em mais de cem espécies, sendo capazes de inibir *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii* e *Hanseniaspora anomala*, entre outros gêneros (PÉREZ-NEVADO et al., 2006; STARMER; GANTER; ABERDEEN, 1992; BEVAN; MAKOWER, 1963).

A atividade microbiana gera metabólitos e condições responsáveis pela morte do grão, desencadeando uma série de alterações bioquímicas essenciais ao desenvolvimento do aroma/sabor de chocolate (PEREIRA, et al 2012).

A atividade metabólica das leveduras é essencial para o sucesso da fermentação de cacau, permitindo o aumento da concentração de oxigênio no meio, devido à degradação a polpa, e diminui a acidez do meio devido à metabolização do ácido cítrico. Além disso, a produção de etanol contribui para a morte do embrião, auxiliando na liberação de enzimas endógenas essenciais ao desenvolvimento dos precursores do *flavour* (SCHWAN; WHEALS, 2004; HANSEN; OLMO; BURNS, 1998; LEHRIAN; PATTERSON, 1983; LOPEZ; DIMICK, 1995). A produção de metabolitos secundários pelas leveduras (ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas, álcoois superiores e ésteres) é conhecida por suas propriedades aromáticas, contribuindo com a qualidade do chocolate (OWUSU et al. 2011; SWIEGERS et al., 2005; SCHWAN; WHEALS, 2004; ARDHANA, 2003).

A presença de álcoois contribui com nota floral e doce, sendo encontradas, no final do processo fermentativo, concentrações similares em ambas as fermentações (ACULEY et al., 2010; FRAUENDORFER; SCHIEBERLE, 2008). A presença de leveduras apiculadas no meio fermentativo, como *Hanseniaspora uvarum*, contribui para o aumento da produção de álcoois superiores (GIL, 1996). A concentração de ésteres foi 4,21 vezes maior na fermentação inoculada. A inoculação de *Pichia kluyveri* promove aumento na concentração de ésteres, contribuindo positivamente no perfil do sabor/aroma do chocolate (CRAFACK et al. 2013). Os ácidos foram encontrados em baixas concentrações, e o seu excesso de acidez nos cotilédones durante a fermentação resulta em um chocolate com aroma/sabor indesejáveis (WOOD; LASS, 1985, BIEHL; PASSERN, 1982, BIEHL et al., 1985). O ácido isobutírico foi detectado em baixas concentrações na fermentação espontaneamente (0,19%) e na fermentação inoculada (0,4%), sendo sua presença indesejável devido ao aroma/sabor estranhos produzido no cacau (JENNING; SHIBAMOTO, 1980; SERRA-BONVEHÍ, 2005). Aldeídos e

cetonas foram identificados em ambas as fermentações, apresentando concentração maior na fermentação inoculada (6.04%).

A concentração de metilxantinas (teobromina e cafeína) varia de acordo com o genótipo e contribui com o amargor e a adstringência do chocolate (LEFEBER et al., 2012; ; PAYNE et al., 2010; CAMU et al., 2008; NAZARUDDIN et al., 2006; KIM; KEENEY, 1984). A elevada concentração de teobromina, comparada à da cafeína, é consequência do fato de o metabolismo catalítico da teobromina à cafeína apresentar taxa limitada de conversão na biossíntese da cafeína. A proporção de teobromina em relação à cafeína foi de 5,99, fermentação espontânea, e 3,82, fermentação inoculada, e esta taxa varia de 1,9 a 10,6 (ASHIHARA, 2008; FRANCO; OÑATIBIA-ASTIBIA; MARTÍNEZ-PINILLA, 2013).

Os alcaloides púricos, teobromina e cafeína, estão associados a efeitos psicológicos atuando no sistema nervoso central, gastrointestinal, respiratório e renal (LI et al., 2012).

De acordo com o teste TDS, os chocolates apresentaram perfis diferenciados. A inoculação de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* contribuiu com a percepção mais intensa dos atributos amargo e frutado. O volátil isoamil acetato apresentou concentração mais elevada (0,69%) dentre os ésteres caracterizados, por apresentar odor frutado. Crafacck et al (2014) constataram que a inoculação de leveduras durante o processo fermentativo do cacau influenciou o perfil sensorial, quando comparado com a fermentação espontânea.



## 5. Conclusão

As leveduras que dominaram o processo fermentativo inoculado do híbrido PS1319 foram *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum*. A inoculação das cepas selecionadas influenciou a concentração dos compostos voláteis e o perfil sensorial, apresentando chocolate com maior dominância no atributo amargo e frutado. Entanto, a identificação dos compostos fenólicos dos híbridos deve ser avaliada para compreender a influência deles no perfil sensorial do chocolate.

## Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de financiamento Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

**Referências bibliográficas**

ACULEY, P.C. et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 75, p.300–307, 2010.

ALBERT, A. et al. Comparison between temporal dominance of sensations (TDS) and key attribute sensory profiling for evaluating solid food with contrasting textural layers: fish sticks. **Food Quality and Preference**, v. 24, p. 111-118, 2012.

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

ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, p. 841–856, 2008.

BEVAN, E.A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proceeding of the IIth International Conference on Genetics**, v. 1, p. 203, 1963.

BIEHL, B.;PASSERN, D. Proteolysis during fermentation- like incubation of cocoa seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 33, p. 1280-90, 1982.

BIEHL, B. et al. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 583-98, 1985.

CAMU, N. et al. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 2288-2297, 2008.

CAMU, N. et al. Influence of Turning and Environmental Contamination on the Dynamics of Populations of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Cocoa Bean Heap Fermentation in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 86-98, 2008.

CRAFACK, M. et al. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, 2014.

CRAFACK, M. et al. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 103-116, 2013.

DUARTE, W. F. et al. Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. **Journal of food science**, v. 76, n. 9, p. C1307-18, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations **Food and Agricultural commodities production**. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso dia: 27 jan. 2015

FRANCO, R.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. **Nutrients**, v. 5, p. 4159-73, out. 2013.

FRAUENDORFER, F.; SCHIEBERLE, P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10244–10251, 2008.

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**, v. 87, p. 2281–2292, 2010.

GIL, J.V. et al. Aroma Compounds in Wine as Influenced by Apiculate Yeasts. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p.1247–1250, 1996.

HANSEN, C. E.; OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. **J Sci Food Agric**, v. 77, p. 273 - 281, 1998.

HARUTA, S. et al. Sucession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**. v. 109. p.79-87. 2006.

HO, V.T.T., ZHAO, J., FLEET, G. Yeasts are essential 760 for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p.72-87, 2014.

JINAP, S., ZESLINDA, A. Influence of organic-acids on flavour perception of Malaysian and Ghanaian cocoa-beans. **Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 153-155, 1995.

JENNINGS, W., SHIBAMOTO, T. **Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography**. Academic Press, New-York. 1980, p. 472 .

KIM, H.; KEENEY, P. G. (-)Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 1090-1092, 1984.

LEFEBER, T. et al. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. **Food microbiology**, v. 30, n. 2, p. 379-92, jun. 2012.

LEHRMAN, D.W., PATERSON, G.R. Cocoa fermentation, In: REED, G. (Ed.), **Biotechnology, a comprehensive treatise**. Verlag Chemie, Basel, Switzerland, 1983. p. 529-575.

LI, Y. et al. The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 17–23, 2012.

LIMA, L. J. R., et al (2011). *Theobroma cacao* L., “The Food of the Gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical reviews of food science and nutrition**, v. 51, p. 731–761, 2011.

LOPEZ, A. S.; DIMICK, P.S. Cocoa fermentation. In: REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. (Eds.), **Enzymes, biomass, food and feed** . Weinheim: VCH, 1995. p. 561-577.

MAGLIANI, W. et al. From yeasts killer toxins to antibodies and beyond . **FEMS Microbiology Letters**, v.288, p.1-8, 2008.

MOREIRA, I. M. V et al. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L .) hybrids. **Food Research International**, v. 54, p. 9-17, 2013.

NAZARUDDIN, R., et al. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 1, p. 87-94, 2006.

NIELSEN, D. S. et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International journal of food microbiology**, v. 114, n. 2, p. 168-86, 10 mar. 2007.

OWUSU, M.; PETERSEN, M. A.; HEIMDAL, H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, p. 1–11, 2011.

PAYNE, M. J. et al. Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 10518-10527, 2010.

PEREIRA, G. V. D. M. et al. Microbiological and Physicochemical Characterization of Small-Scale Cocoa Fermentations and Screening of Yeast and Bacterial Strains To Develop a Defined Starter Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5395-5405, 2012.

PÉREZ-NEVADO, F. et al. Cellular death of two non-Saccharomyces wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 336-345, 2006.

PINEAU, N. et al. Temporal dominance of Sensations: construction of the TDS curves and comparison with timeintensity. **Food Quality and Preference**, v. 20, p. 450-455, 2009.

RAMOS, C. L., et al. Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. **Food Research International**, v. 64, p. 908-918, 2014.

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**, v. 140, p. 225-23, 2010.

RISNER, C. H. Simultaneous Determination of Theobromine, (+)-Catechin, Caffeine, and (-)-Epicatechin in Standard Reference Material Baking Chocolate 2384, Cocoa, Cocoa Beans, and Cocoa Butter. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 892-899, 2008.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 250-258, jan. 2011.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. et al. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. **Food Chemistry**, v. 132, p. 277-288, 2012.

SCHMITT, M.J.; BREINIG, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews**, v.4, p.212-221, 2006.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality . **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 205-221, 2004.

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

SERRA BONVEHÍ, J. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 1-2, p. 19-29, 2005.

STARMER, W. T.; GANTER, P. F.; ABERDEEN, V. Geographic Distribution and Genetics of Killer Phenotypes for the Yeast *Pichia kluyveri* across the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 990-997, 1992.

SWIEGERS, J.H. et al.. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, p. 139-173, 2005.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4th ed. London: Longman, 1985. 620 p.