



ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS DO MEL DO CACAU

GUSTAVO FERREIRA MACEDO; MARCIA LUCIANA CAZETTA

RESUMO

A bioprospecção microbiana é de grande importância, uma vez que novas espécies isoladas do ambiente podem produzir, ou melhorar a produção, de substâncias de interesse biotecnológico e industrial. O isolamento microbiano pode ser realizado em diferentes ambientes e o cacau, bem como seus subprodutos como a polpa e o “mel” do cacau, são uma fonte rica de microrganismos. O mel do cacau constitui um líquido viscoso e adocicado extraído da prensagem da polpa do cacau. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar leveduras do mel do cacau com potencial biotecnológico para produção de polissacarídeos, pigmentos, cerveja artesanal e outros produtos. Para isso, foram realizadas diluições seriadas do mel do cacau até 10^{-5} em solução salina (0,85% de NaCl) e cada diluição foi plaqueada em meio Agar Saboraud Dextrose. Após o crescimento foram isoladas 12 leveduras, distribuídas em oito grupos de acordo com suas características morfológicas distintas como cor, textura e aparência, predominando as leveduras de cor clara (branco a creme), com textura lisa e aparência opaca. A maioria dos isolados cresceu em ampla faixa de temperatura, de 25 °C a 40 °C, sendo classificados como mesofílicos, entretanto, alguns isolados apresentaram termotolerância, com crescimento a 45 °C. A presença de isolados com características mucilaginosas e cores de amarelo a vermelho sugerem a produção de exopolissacarídeos e pigmentos.

Palavras-chave: fungos; bioprospecção; produtos agroindustriais; frutas; temperatura

1. INTRODUÇÃO

Diante da importância dos microrganismos na economia, é crescente a busca no ambiente por novas espécies que possam produzir ou melhorar a produção de substâncias de interesse biotecnológico e industrial, tendo em vista que muitos microrganismos possuem características singulares e podem ser empregados em processos de biorremediação, produção de fármacos, biocombustíveis, alimentos, cosméticos, entre outros (MORAIS et al., 2014).

A bioprospecção microbiana pode ser realizada nos mais diferentes ambientes como solo, água, plantas e, até mesmo, insetos. A microbiota do cacau (*Theobroma cocoa*) vem sendo bastante estudada devido à sua importância nas características organolépticas do chocolate, já tendo sido isoladas e identificadas diversas espécies de leveduras e bactérias no cacau e seus subprodutos, que podem ter potencial para aplicações biotecnológicas (BORGES et al., 2014; SERRA et al., 2019; LIMA et al., 2021).

A cultura de cacau no Brasil tornou-se próspera devido ao clima favorável. Esse fruto é nativo das florestas tropicais da região Amazônica, sendo conhecido desde a época do Maias e Incas. Em meados do século XVIII foi levado para o estado da Bahia onde prosperou devido aos fatores ambientais propícios para o seu desenvolvimento como o clima, umidade e temperatura, entre outros. De acordo com dados do SENAR (2018), a Bahia continua sendo a principal região produtora, com 62% da produção nacional, seguida pelos estados da Região Norte (34%) e os outros estados com os 4% restantes (CUENCA; NAZÁRIO, 2004; SANTOS

et al., 2014; FIGUEROA- HERNÁNDEZ et al., 2019).

O cacau é a principal matéria-prima de um dos produtos mais comercializados no mundo, o chocolate. Mas além disso, esse fruto despertou interesse da ciência visto que não só as sementes podem ser aproveitadas, mas também seus subprodutos, como a polpa e o “mel” do cacau, que ganharam grande importância na indústria alimentícia. A polpa do cacau, que recobre as sementes, possui uma coloração esbranquiçada e mucilaginosa e, a partir dessa, é extraído o mel do cacau, que é um líquido de coloração amarelo opaco e com textura mucilaginosa, possui um sabor cítrico e alto teor de açúcares em sua composição. A extração deste líquido ocorre por meio de técnicas simples de prensagem da polpa do cacau, que deve ser rapidamente estocado em baixas temperaturas antes que se inicie o processo de fermentação espontânea devido à elevada carga microbiana. Além de ser consumido in natura, o mel do cacau pode ser usado na indústria alimentícia para a fabricação de geleias e de bebidas fermentadas, pois sofre fermentação espontânea quando mantido em temperatura ambiente (SANTOS et al. 2014; DONATTI et al., 2021; GUIRLANDA et al., 2021).

A qualidade dos produtos do cacau está vinculada a uma gama de fatores que resulta em melhor qualidade dos produtos e, dentre eles, está a microbiota presente. Esses microrganismos se adaptaram bem à fruta e fazem parte de alguns processos importantes como a fermentação, sendo este o processo mais importante na produção de moléculas precursoras de aroma, sabor e da cor, tanto nos grãos secos quanto na matéria-prima para a produção do chocolate (GUTIÉRREZ-RIOS et al., 2022; SALAZAR et al. 2022). Dentre os microrganismos que podem ser encontrados no cacau e seus produtos derivados estão, principalmente, leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas, que se sucedem ao longo do processo fermentativo natural (NIELSEN; JESPERSEN, 2013; RUGGIRELLO et al., 2019; DE VUYST; LEROY, 2020;

VIESSER et al., 2021). Neste contexto, este trabalho teve por objetivo isolar as leveduras do mel de cacau para estudos de produção de biopolímeros, pigmentos, entre outras substâncias de interesse biotecnológico e industrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e das leveduras do mel do cacau

O mel do cacau foi obtido congelado do comércio local de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. A partir dessas amostras foram feitas diluições seriadas até 10^{-5} em solução salina (NaCl 0,85%) e alíquotas de 100 µl foram plaqueadas em meio Agar Sabouraud Dextrose (peptona bacteriológica 10 g, glicose 40 g, agar bacteriológico 15 g/ litro) para o crescimento dos isolados. Os ensaios foram realizados em duplicata. Em seguida as placas de Petri foram colocadas em estufa/BOD para o crescimento a 28 ± 2 °C por 48 horas.

Purificação dos isolados:

Após o crescimento nas placas, foram selecionadas e isoladas colônias com características morfológicas distintas e transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura MYP (Manitol Yeast Peptone), composto por: extrato de levedura 5 g, manitol 25 g, peptona 3 g e Agar 15 g/ litro. As placas foram incubadas em estufa do tipo B.O.D sob temperatura de 28 ± 2 °C por 48 horas. Em seguida foi realizada a purificação dos isolados por técnica de esgotamento e as colônias consideradas puras foram conservadas em tubos criogênicos contendo o meio GYMP (extrato de levedura 4 g, extrato de malte 10 g, NaH_2PO_4 2 g/ litro), com glicerol a 30% e colocadas sob congelamento.

Verificação da morfologia celular

Para a verificação da morfologia celular foram feitas lâminas a fresco usando uma alçada das colônias isoladas diluídas em uma gota de água destilada sobre lâminas de vidro cobertas com laminulas para visualização em microscopia óptica. Para identificação, foram colocados códigos com as letras LMC (leveduras do mel do cacau), seguido de um número para diferenciar cada isolado.

Testes de temperatura

Para os testes de temperatura foi utilizado o teste em gotas (drop test, adaptado de LAUER et al., 2007) em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose em triplicata. Para a realizar os testes foram estudadas diferentes temperaturas: 20 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 45 °C, incubando as leveduras em estufa B.O.D durante 4 dias. O crescimento dos isolados foi comparado com um controle positivo (crescimento a 28 ± 2 °C) e controle negativo (crescimento a 45 ± 2 °C) e classificados como: 0 (zero) sem crescimento ou crescimento igual ao controle negativo; +0,5 para crescimento fraco, ou seja, menor que o controle positivo e maior que o controle negativo; +1 para crescimento intermediário; +2 crescimentos menor que o controle positivo; +3 para crescimento igual ao controle positivo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 23 colônias morfologicamente distintas de acordo com características como cor, textura e aparência, entretanto, apenas 12 isolados apresentaram características de leveduras como células grandes, arredondadas ou alongadas, e a presença de brotos que puderam ser facilmente visualizados nas lâminas por meio de microscopia óptica. Os demais isolados foram caracterizados como bactérias por meio de coloração de Gram, sendo todos bacilos Gram negativos. Essas características indicam a presença de bactérias acéticas no mel do cacau.

Os isolados confirmados como leveduras foram agrupados, de acordo com as características morfológicas, em 8 grupos (Quadro 1).

Quadro 1- Agrupamento por meio de características morfológicas das leveduras isoladas do mel de cacau em meio Agar Sabouraud Dextrose.

Grupos	Código dos isolados	Cor	Textura	Aparência
1	LMC-02	Vermelha	Lisa	brilhante
2	LMC-07	Vermelho-alaranjada	Lisa	brilhante
3	LMC-06, LMC-15	Branca	Lisa	brilhante
4	LMC-13	Amarelo claro	Lisa	brilhante
6	LMC-08, LMC-10	Creme rosado	Lisa	opaca
7	LMC-6, LMC-14, LMC-11, LMC-12	Creme	Lisa	opaca
8	LMC-05	Branca	Lisa	opaca

Pode-se constatar que os isolados que apresentaram cores claras (branco a creme) foram predominantes, sendo a cor creme com 33%, seguida da cor branca com 25% e as de cor creme-rosada com 17%. As demais cores como vermelho, vermelho-alaranjado e amarelo claro apresentaram uma porcentagem de 8% de ocorrência cada um. Todas os isolados apresentaram textura lisa e as colônias que apresentaram aparência opaca sobressaíram sobre as demais, com 58%. Camargo et al. (2018), isolando leveduras de frutas do cerrado e ninhos de frango e Freitas et al. (2021) isolando leveduras de vegetação sobre afloramentos rochosos, também descreveram resultados similares, com predominância de leveduras de cores claras, com textura lisa e aparência opaca.

De acordo com os resultados dos testes de temperatura, a maioria dos isolados apresentou melhor crescimento na temperatura de 25 °C, exceto para o isolado LMC-06 que apresentou um baixo crescimento na faixa de 25 °C a 35 °C (Figura 1).

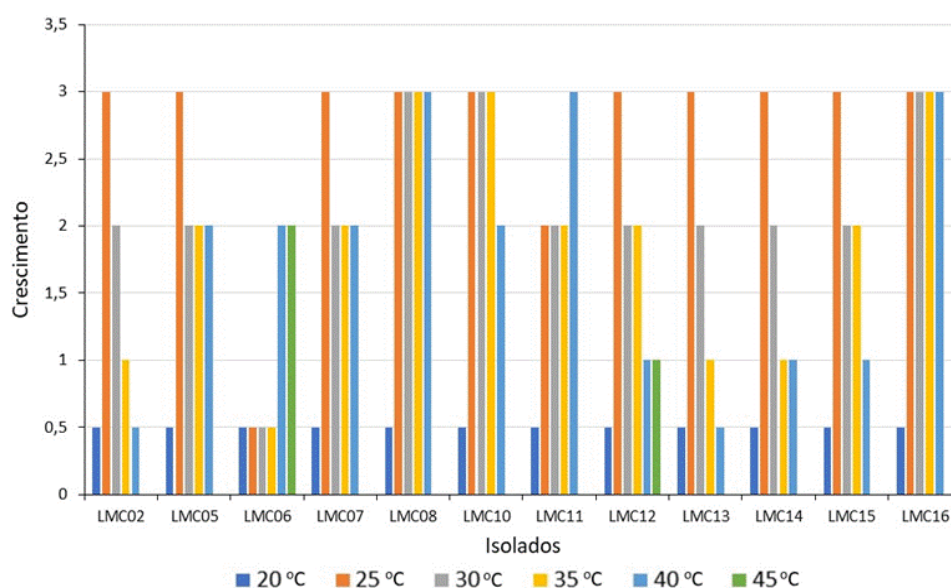


Figura 1. Crescimento das leveduras isoladas do mel do cacau em diferentes temperaturas em meio Ágar Sabouraud Dextrose.

Os isolados LMC-08, LMC-10, LMC-11 e LMC-16 cresceram em uma ampla faixa de temperatura, entre 25 °C e 40 °C. Destaque deve ser dado aos isolados LMC-06 e LMC-12 que apresentaram crescimento intermediário na temperatura de 45 °C. Todos os isolados apresentaram crescimento fraco a 20 °C. Embora os resultados mostrem que os isolados são todos mesofílicos, o crescimento em temperaturas mais elevadas é de interessante do ponto de vista industrial. A temperatura de crescimento é um fator ambiental de grande relevância para a utilização das leveduras nas mais diferentes aplicações como degradação de corantes e poluentes ambientais, produção de biopolímeros e na produção de cervejas, visto que as altas temperaturas são um dos fatores que levam ao estresse e, como consequência pode levar a desnaturação de enzimas e perda da viabilidade celular. Sendo assim, a termotolerância é um atributo de grande valor para sua utilização em processos fermentativos (SILVA et al. 2015; PINTO et al. 2018; DELANE et al. 2020).

4. CONCLUSÃO

O considerável número de leveduras encontradas no mel do cacau demonstra a riqueza de microrganismos existente neste produto e ressalta a importância da prospecção microbiana. As características morfológicas como as cores amarelo e vermelho e textura viscosa de alguns

solados sugerem um potencial para produção de exopolissacarídeos e pigmentos. Os teste de temperatura mostraram que a grande maioria dos isolados se classifica como mesofílicos, embora alguns isolados tenham apresentado características termotolerantes.

REFERÊNCIAS

- BORGES, J. G.; COSTA L. A. S.; DRUZIAN, J. I.; Produção e caracterização de biomassa extracelular obtida por fermentação submersa usando *Lasidiopodia theobromae* isolado do cacau. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v.24, n.1, p.52–57, 2014.
- CAMARGO, J. Z. et al. Biochemical evaluation, molecular characterization and identification of novel yeast strains isolated from Brazilian savannah fruits, chicken litter and a sugar and alcohol mill with biotechnological potential for biofuel and food industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 390-399, 2018.
- CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. **Importância econômica e evolução da cultura do cacau no Brasil e na região dos tabuleiros costeiros da Bahia entre 1990 e 2002**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004. 25 p.
- DELANE, E. I.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; CAZETTA, M. L. Levedura *Pichia kudriavzevii* SD5 como biocatalizador na descoloração do corante Preto Reativo 5. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 2, p. 361-369, 2020.
- DE VUYST, L.; LEROY, F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 4, p. 432-453, 2020.
- DONATTI, J.K.; SOUSA, M.V.F.; PAIXÃO, M.V.S.; REZENDE, J.A.; SOUSA, J.M.; SOUZA, A.H.N.; LOCATELLI, A.L.; SANTOS, T.L. Aproveitamento do subproduto “Mel de Cacau” para produção de bebida alcoólica fermentada. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.6, p.57956-57970, 2021.
- FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C.; MOTA-GUTIERREZ J.; FERROCINO I.; HERNÁNDEZ-ESTRADA, Z.J.; GONZÁLEZ-RÍOS, O.; COCOLIN, L.; SUÁREZ-QUIROZ, M.L. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v.301, p. 41-50, 2019.
- FREITAS, T.S.; CAZETTA, M.L. **Enzimas de leveduras isoladas de vegetação sobre rocha**. In: Bacharelado em biologia: produções científicas. Organizadores: Marcia Luciana Cazetta... [et al.]. Cruz das Almas, Bahia: EDUFRB, 2021, 318 p.
- GUIRLANDA, C. P.; SILVA, G. G.; TAKAHASHI, J. Caracterização, atributos e potencial de mercado do mel de cacau. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 4, e41410413994, 2021.
- GUTIÉRREZ-RÍOS, H.G.; SUÁREZ-QUIROZ, M.; HERNÁNDEZ-ESTRADA, Z.J.; CASTELLANOS-ONORIO, O.; ALONSO-VILLEGAS, R.; RAYAS-DUARTE, P.; CANO-SARMIENTO, C.; FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C.; GONZÁLEZ-RÍOS, O. Yeasts as producers of flavor precursors during cocoa bean fermentation and their relevance as starter cultures: a review. **Fermentation**, v. 8, n. 7, 331, 2022.

LAUER, C. M. LAUER J. **A influência dos íons cálcio e magnésio na toxicidade do cádmio e o envolvimento da proteína Pmr1 no uso da via secretora para desintoxicação de cádmio em *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) -Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

LIMA, C.O.C.; VAZ, A.B.M.; CASTRO, G.M.; et al. Integrating microbial metagenomics and physicochemical parameters and a new perspective on starter culture for fine cocoa fermentation. **Food Microbiology**, v. 93, 103608, 2021.

MORAIS, J. F.; YOSHIMOTO, M.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J.A. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista Uningá**, v. 17, n.1, p.27-34, 2014.

NIELSEN, D.S.; CRAFTACK, M.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. **The microbiology of cocoa fermentation**. In.: Watson, R.R. et al. (eds.). Chocolate in health and nutrition. Nutrition and Health 7, Cap. 4, 2013, pp. 39-60.

PINTO, F. O. **Isolamento, seleção e caracterização de leveduras selvagens com potencial para a produção de cerveja**. 2019. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2018

RUGGIRELLO, M.; NUCERA, D.; CANNONI, M.; PERAINO, A.; ROSSO, F.; FONTANA, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. **Food Research International**, v. 115, p. 519–525, 2019.

SANTOS, C. O.; BISPO, E. S.; SANTANA, L. R. R. et al. Use of “cocoa honey” (*Theobroma cacao* L) for diet jelly preparation: An alternative technology. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 3, pp.640- 648, 2014.

SALAZAR, M.M.M.; ÁLVAREZ, O.L.M.; CASTAÑEDA, M.P.A.; MEDINA, P.X.L. Bioprospecting of indigenous yeasts involved in cocoa fermentation using sensory and chemical strategies for selecting a starter inoculum. **Food Microbiology**, v. 101, 103896, 2022.

SENAR -Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. **Cacau: produção, manejo e colheita**. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, Brasília: Senar, 2018. 145 p.

SERRA, J.L.; MOURA, F.G.; PEREIRA, G.V.M.; SOCCOL, C.R.; ROGEZA, H.; DARNETA. S. Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. **LWT-Food Science and Technology**, v. 106, p. 229–239, 2019.

SILVA, L. A. S.; OLIVEIRA, J.M.; DUARTE, E.A.A.; EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; CAZETTA, M.L. Descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R por leveduras isoladas de moluscos do Rio Subaé, no estado da Bahia, Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1065-1074, 2017.

VIESSER, J.A.; PEREIRA, G.V.M.; CARVALHO NETO, D.P.; ROGEZ, H., GÓES-NETO, A.; AZEVEDO, V.; BRENIG, B.; ABURJAILE, F.; CARLOS RICARDO SOCCOL, C.R. Co-culturing fructophilic lactic acid bacteria and yeast enhanced sugar metabolism and aroma

formation during cocoa beans fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.339, 109015, 2021.