

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



VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
ACOMPANHAMENTO DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM*
EM FERMENTAÇÃO DE CACAU

LUAN MELO ANDRADE

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2020

LUAN MELO ANDRADE

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ACOMPANHAMENTO DE
LACTOBACILLUS PLANTARUM EM FERMENTAÇÃO DE CACAU**

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

Orientadora: Rachel Passos Rezende

Área de Concentração: Genética e
Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2020

A553

Andrade, Luan Melo.

Validação de metodologia para acompanhamento de *Lactobacillus plantarum* em fermentação de cacau / Luan Melo Andrade. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.

56f. : il.

Orientadora: Rachel Passos Rezende.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Cacau. 2. Fermentação. 3. Cacau – Melhoria genética. 4. *Lactobacillus*. 5. Genótipos.
I. Título.

CDD 633.74

LUAN MELO ANDRADE

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ACOMPANHAMENTO DE
LACTOBACILLUS PLANTARUM EM FERMENTAÇÃO DE CACAU

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

Área de Concentração: Genética e
Biologia Molecular

APROVADA EM: 10/02/2020

Prof. Dr^a Rachel Passos Rezende
Orientadora e Presidente da Banca
(UESC)

Prof. Dr^a Bianca Mendes Maciel
(UESC)

Prof. Dr^a Elizama Aguiar de Oliveira
(UESC)

Prof. Dr. Thalís Ferreira dos Santos
(UFOPA)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus pela inspiração e iluminação diária, aos meus pais por todo apoio que me foi dado e sacrifício que fizeram me possibilitando chegar até aqui, e a meus familiares e amigos que também fizeram parte dessa trajetória e a minha orientadora que sempre acreditou em mim.

“O que você sabe não tem valor, o valor está no que você faz com o que sabe!”

Bruce Lee

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Rachel Passos Rezende pelo apoio e pela confiança que me foi depositada

A Fapesb pela concessão da bolsa, que permitiu a manutenção de meus estudos e pesquisa

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Microbiana pela ajuda em minha pesquisa, em especial ao Eric e a Adriana

Aos meus coorientadores João Dias e Carla Romano por sempre serem solícitos e por toda ajuda

Aos professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular que sempre me incentivaram e me ajudaram em horas mais críticas

A secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular que sempre ajudou com minhas dúvidas e pela paciência constante

Ao João Tavares pela contribuição, cedendo seu ambiente de trabalho como parte experimental

Ao Centro de Biotecnologia e Genética e a UESC e seus funcionários e pesquisadores que sempre me ajudaram em horas precisas e pela possibilidade de pesquisa e formação

Ao meu amigo Adison Santos (Dodô), que sempre se disponibilizou a me levar na rodoviária nas madrugadas e me buscar sempre com seu horário de trabalho corrido

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

dNTP's- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

ISSR - Inter Simple Sequence Repeat

ISO - International Organization for Standardization

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídio (forma reduzida)

NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídio (forma oxidada)

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

T_M – Temperature of Melting (Temperatura de fusão)

UFC - Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cocho de madeira utilizado na fermentação com dimensões de 35x40x38 cm (vista superior)	19
Figura 2: Revolvimento das amêndoas do cocho sendo realizada de forma manual.....	20
Figura 3: Diagrama de Venn mostrando a quantidade de compartilhamento das características morfológicas entre as sete linhagens de <i>Lactobacillus plantarum</i> . (Lp = <i>Lactobacillus plantarum</i>)	26
Figura 4: Dendograma de similaridade fenética, pelo programa “Past” 3.26, utilizando o coeficiente “Jaccard” de similaridade, feito com dados morfológicos utilizando produtos de PCR amplificados com o <i>primer</i> (GTG) ₅	27
Figura 5: Gráfico de otimização de PCR relacionando o tempo com a temperatura de anelamento com notas obtidas de 5 a 10.....	31
Figura 6: Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose 1,7 % das sete linhagens de <i>Lactobacillus plantarum</i> , usando o <i>primer</i> (GTG) ₅ . Marcador de peso molecular: 1kb Ludwig Biotec.....	32
Figura 7: Dendograma de similaridade fenética, pelo programa “Past” 3.26, utilizando o coeficiente “Jaccard” de similaridade, feito com dados genéticos utilizando produtos de PCR amplificados com o <i>primer</i> (GTG) ₅	34
Figura 8: Variação do pH nas amêndoas de cacau, no cocho de fermentação ao longo dos tempos do processo fermentativo. Coleta na fazenda Leolinda (Uruçuca – BA)	36
Figura 9: Variação da temperatura nas amêndoas de cacau, no cocho de fermentação ao longo dos tempos do processo fermentativo. Coleta na fazenda Leolinda (Uruçuca – BA)	38

Figura 10: Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose 1,7 % dos isolados da fermentação no tempo de 48 a 96 horas, usando o primer (GTG)₅. Marcador de peso molecular: 1kb Ludwig Biotec.....40

Figura 11: Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose 1,7 % dos isolados da fermentação no tempo de 108 a 144 horas, usando o primer (GTG)₅. Marcador de peso molecular: 1kb Ludwig Biotec.....40

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Características morfológicas das colônias (macroscópicas) e das células (microscópicas) observadas das sete linhagens de *Lactobacillus plantarum*. (Lp = *Lactobacillus plantarum*)25

Quadro 1: Relação entre temperatura (°C) e tempo (min) de anelamento para amplificação de fragmentos de DNA. (NA)-Não amplificou, (RA)-Rastros, (AP)-Amplificou pouco, (AN)-Amplificou, mas não diferenciou, (AD)- Amplificou e diferenciou.....30

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. FERMENTAÇÃO.....	5
2.2. LACTOBACILOS.....	7
2.2.1. <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	9
2.3. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	10
2.3.1. PROVAS MOLECULARES.....	11
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. GERAL	14
3.2. EPECÍFICOS	14
4. METODOLOGIA	15
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	15
4.2 REATIVAÇÃO DOS LACTOBACILOS	15
4.3 CARACATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS LINHAGENS	15
4.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS LINHAGENS DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	16
4.5 PCR E OTIMIZAÇÃO	17
4.6 GENOTIPAGEM DAS LINHAGENS DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	17
4.7 PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	18
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO INÓCULO	18
4.9 FERMENTAÇÃO E INOCULAÇÃO.....	19
4.10 DETERMINAÇÃO DE TEMPERATURA E pH DURANTE A FERMENTAÇÃO.....	20
4.11 COLETA DE AMÊNDAS, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COLÔNIAS DURANTE A FERMENTAÇÃO.....	21
4.12 MONITORAMENTO DE <i>Lactobacillus plantarum</i> 7.1.....	21
4.13 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ÍNDICE DE FERMENTAÇÃO	22
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

A fermentação é a etapa mais importante no processamento do cacau, que consiste de uma sucessão microbiológica fazendo parte dela as leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas. Os lactobacilos representam o grupo de organismos funcionalmente relacionados pela sua capacidade principalmente de produzir ácido láctico durante o metabolismo. Trabalhos de rastreamento e identificação desses microrganismos são realizados, sendo as técnicas de biologia molecular mais utilizadas recentemente. Com isso o objetivo deste trabalho foi validar uma metodologia de genotipagem de *Lactobacillus plantarum* para seu monitoramento durante a fermentação de cacau. Foi realizada a reativação de sete linhagens de *L. plantarum* e feito a caracterização morfológica dos mesmos e posteriormente feito uma matriz de dados para comparação dessas características. O DNA genômico foi extraído de todas as linhagens e realizado uma otimização de PCR, utilizando diferentes tempos e temperaturas de anelamento, sendo posteriormente visualizados os resultados em gel de agarose por eletroforese e analisados conforme a amplificação e diferenciação dos fragmentos de DNA. Foi feita uma matriz de dados para analisar a similaridade genética entre as linhagens e o grau de diferenciação de acordo com o perfil dos fragmentos. Uma das linhagens, o *Lactobacillus plantarum* 7.1 foi inoculado na fermentação de cacau com 48 horas desde o início do processo, sendo avaliados temperatura e pH. Foram coletadas amostras de 12 em 12 horas para realizar o monitoramento do *L. plantarum* 7.1. A caracterização morfológica agrupou as sete linhagens em apenas 4, divergindo da caracterização que manteve as sete linhagens apenas mostrando as distâncias entre elas, a otimização do PCR teve como resultado melhor temperatura e tempo de anelamento respectivamente em 53°C e 1 minuto, apresentando de 4 a 15 fragmentos polimórficos. A média do pH do cocho controle e do cocho inoculado foram respectivamente 3,91 e 3,93 com um $p=0,9$. A média da temperatura do cocho controle e do cocho inoculado foram respectivamente 44,3°C e 41,3°C com um $p=0,19$. No monitoramento não foi encontrado vestígios de *L. plantarum* 7.1. A metodologia mostrou-se eficaz na diferenciação a nível de linhagem bacteriana, não foi significativo a interferência do inóculo no pH e temperatura durante a fermentação, e o inóculo obteve melhor índice de fermentação e índice de amêndoas bem fermentadas.

ABSTRACT

Fermentation is the most important step in cocoa processing, which consists of a microbiological succession of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. Lactobacilli represent the group of functionally related organisms by their ability mainly to produce lactic acid during metabolism. Screening and identification work on these micro-organisms is carried out, with the most recently used molecular biology techniques. The aim of this work was to validate a genotyping methodology of *Lactobacillus plantarum* for its monitoring during cocoa fermentation. Seven *L. plantarum* strains were reactivated and morphological characterization was done, and then a data matrix was made to compare these characteristics. The genomic DNA was extracted from all strains and a PCR optimization was performed, using different ringing times and temperatures, and later the results were visualized in agarose gel by electrophoresis and analyzed according to the amplification and differentiation of the DNA fragments. A data matrix was made to analyze the genetic similarity between the strains and the degree of differentiation according to the profile of the fragments. One of the strains, *Lactobacillus plantarum* 7.1 was inoculated in cocoa fermentation with 48 hours since the beginning of the process, being evaluated temperature and pH. Samples were collected every 12 hours to monitor *L. plantarum* 7.1. The morphological characterization grouped the seven strains into only 4, diverging from the characterization that kept the seven strains only showing the distances between them, the optimization of PCR resulted in better temperature and ringing time at 53°C and 1 minute respectively, presenting 4 to 15 polymorphic fragments. The mean pH of the control trough and the inoculated trough were respectively 3.91 and 3.93 with a $p=0.9$. The mean temperature of the control and inoculated troughs were respectively 44.3°C and 41.3°C with a $p=0.19$. No traces of *L. plantarum* 7.1 were found in the monitoring. The methodology proved to be effective in differentiating bacterial lineage, there was no significant interference of inoculum at pH and temperature during fermentation, and the inoculum obtained a better fermentation index and index of well fermented almonds.

1. INTRODUÇÃO

A genotipagem é um método de identificação molecular em que utiliza técnicas que podem ser de sequenciamento, PCR seguido de eletroforese em gel, que vai permitir e observar a diferenciação de organismos, seja eles macroscópico ou microscópico. A genotipagem por eletroforese é uma técnica simples e rápida que permite identificar e separar microrganismos através de um perfil em um gel de agarose ou poliacrilamida, sob diferentes níveis, desde gênero a linhagens. Essa técnica é utilizada para monitoramento de microrganismos em várias situações para vários objetivos, como fermentações, controle de qualidade, controle biológico e até mesmo no ramo da saúde.

A fermentação do cacau é um processo bastante importante, pois é nessa etapa que todo o sabor do chocolate é formado, obtendo como resultado diferentes aromas e sabores mediante característica genética e diferenças no manejo fermentativo. Um fator importante durante a fermentação está relacionado aos microrganismos atuantes, que são responsáveis por todas essas mudanças que dão origem ao sabor característico. Tanto em indústrias como em produções em pequena escala, inóculos são utilizados, pelo conhecimento do seu potencial biotecnológico. Com isso a inoculação em cacau ou outros produtos fermentáveis, mostra um caminho para revolucionar a indústria alimentícia, com um grande aumento de produtividade ou um produto com características únicas dentro do mercado

Um dos grupos de microrganismos que agem no processo fermentativo são os lactobacilos, que possuem componentes fundamentais responsáveis pelas características do produto final e que também são amplamente usados como inóculos. A identificação desses microrganismos no processo fermentativo é feita através do isolamento do microrganismo seguido de identificação molecular. Essas técnicas permitem a visualização e identificação de microrganismos atuantes tanto na fermentação quanto em outros processos.

A necessidade de estudar a caracterização genética das linhagens microbiana permite o seu monitoramento na fermentação de cacau, podendo inferir de acordo com a sua identificação, os tempos de atuação dos microrganismos. Esses processos correlacionam a identificação com possível influência do microrganismo na fermentação, mostrando quais estão atuando na

faixa determinada de tempo de coleta. Isso permite um melhor entendimento dos microrganismos atuantes onde são desenvolvidos inóculos modificando as características físico-químicas das amêndoas podendo resultar em um chocolate de sabor melhor.

As metodologias e protocolos são produzidos através de vários testes, em que se observa o melhor resultado para poder ser aplicado em pesquisas futuras como um modelo. É visto que trabalhos são amplamente realizados com a função de otimização desses processos para poder ser utilizados nas pesquisas em desenvolvimento. Com isso o objetivo principal deste trabalho é validar uma metodologia de genotipagem de *Lactobacillus plantarum* para a realização de monitoramento durante o processo de fermentação de cacau, após sua inoculação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FERMENTAÇÃO

O cacaueteiro pertence à ordem Malvales, família *Malvaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L. (BAYER et al., 1999; QIN et al., 2016). De todas as espécies, a atenção especial para o cultivo de *Theobroma cacao* L. está no aproveitamento de suas amêndoas para produção de seus derivados, principalmente o chocolate (CORNEJO et al., 2018). O cacau abriga as amêndoas que são a principal matéria prima do chocolate, e que são naturalmente amargas e adstringentes e precisam ser fermentadas, secas e torradas para adquirirem o aroma e também o sabor característico do chocolate (SCHWAN et al., 2004; NIELSEN et al., 2007).

A fermentação é a etapa mais importante do processamento do cacau, que é a obtenção das amêndoas que são destinadas à produção do chocolate, onde os compostos precursores responsáveis pelo aroma e sabor (*flavor*) são gerados (CASCANTE et al., 1994; SCHWAN et al., 2014), pois esse processo alavanca transformações bioquímicas no interior das sementes (COUNET et al., 2004). A fermentação espontânea da polpa de cacau começa logo após a abertura e remoção das sementes com um processo que pode durar de 3 a 10 dias (CAMU et al., 2007). O interior dos frutos são considerados estéreis, então a fermentação ocorre devido à presença natural de microrganismos que estão na casca dos frutos, no ar, no cocho e na mão dos funcionários, fazendo com que aconteça uma inoculação natural de microrganismos (NIELSEN et al. 2007; LEAL, G. et al., 2008).

A boa qualidade das amêndoas depende principalmente da fermentação como também a microbiota envolvida, bem como o tempo de fermentação além das etapas de pré-processamento como colheita e secagem que serão essenciais para o desenvolvimento característico do sabor de qualidade (SAMAH et al., 1993; ROCHA et al., 2014). Para que se tenha uma boa fermentação, durante o processo, o revolvimento periódico da massa é necessário (SCHWAN et al., 1995) para promover a homogeneidade da diversidade microbiológica, da concentração de polpa e da temperatura na

massa de cacau, com o objetivo de garantir o mesmo grau de fermentação no lote (GALVÈZ et al., 2007).

O processo da fermentação do cacau consiste de uma sucessão microbiológica, tendo como principais microrganismos dessa sucessão as leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas (ROELOFSEN, 1958; NIELSEN et al., 2005). Essa sucessão microbiana vai ter início quando em altas concentrações de açúcares, baixo pH (menor que 4,0) e limitada disponibilidade de oxigênio devido a consistência física da polpa, fazendo com que ocupe os espaços vazios entre as sementes, se torna o ambiente ideal para favorecer o crescimento das leveduras, que convertem a glicose, frutose e sacarose em etanol (LOPEZ, 1974; SCHWAN, 1998; NIELSEN et al., 2005).

A viscosidade natural da polpa, causada pela presença de pectina, pode ser reduzida pela ação das enzimas pectinolíticas devido a degradação dos polissacarídeos da parede celular, permitindo seu escoamento em forma de mel de cacau (THOMPSON et al., 2007). Com a abundância de açúcares, a glicose ou monossacarídeos convertidos em glicose por enzimas isomerases entram em um processo químico chamado de glicólise, no qual fosfatos são incorporados na molécula de glicose, favorecendo sua quebra em duas moléculas de piruvato, entrando em processo fermentativo em que o piruvato formado é descarboxilado gerando acetaldeído por meio da enzima piruvato descarboxilase, oxidando o NADH em NAD^+ e formando o etanol (MADIGAN et al., 2016).

O ácido cítrico, principal ácido orgânico da polpa, é metabolizado pelas leveduras provocando o aumento do pH nas 48 horas iniciais da fermentação. A elevação do pH associada a um aumento da temperatura na presença de etanol e processo de aeração favorece o desenvolvimento de bactérias lácticas e posteriormente as bactérias acéticas (SCHMIDT et al., 2016).

Com o aumento de pH e temperatura e uma baixa concentração de oxigênio, o desenvolvimento de bactérias lácticas é favorecido. Essas, também fermentam os açúcares e utilizam o ácido cítrico da polpa, exibindo um crescimento rápido entre 16 e 48 horas de fermentação e alcançando um pico máximo quando houver declínio das leveduras. As bactérias lácticas produzem ácido lático e outros ácidos orgânicos que contribuem no processo de aromatizar as amêndoas e acidificar o ambiente que está sofrendo fermentação

(ARDHANA; FLEET, 2003). A enzima desidrogenase láctica converte o piruvato por uma reação de redução, a ácido láctico ($C_3H_6O_3$), quando a carbonila torna-se uma hidroxila (NELSON; COX, 2014).

A elevação do pH, temperatura e oxigênio permite também o crescimento das bactérias ácido acéticas (GÁLVEZ et al., 2007). Iniciando a partir de 24 horas de fermentação, as bactérias acéticas estão envolvidas com a oxidação do etanol em ácido acético, convertendo uma molécula de álcool com uma de oxigênio em uma molécula de ácido acético e outra de água, consistindo em uma oxidação parcial do álcool etílico. Também estão envolvidos na superoxidação de ácido acético e de ácido láctico em dióxido de carbono e água, em uma reação exotérmica. (NELSON; COX, 2014).

A alta concentração de ácidos e álcoois que se difundem para o interior dos cotilédones (SCHUWAN, 1998), origina uma série de transformações bioquímicas (ALMEIDA, 1999) que juntamente com uma alta temperatura causam a morte das sementes (BAREL, 1987), acabando com seu poder de germinação (SANCHEZ et al., 1985; SCHWAN et al., 2014). No processo de fermentação do cacau, é observada duas fases bem distinta: a fase anaeróbica, governada principalmente por leveduras e a fase aeróbica, promovida principalmente por bactérias lácticas e acéticas (BECKETT, 2008).

2.2. LACTOBACILOS

Os lactobacilos são microrganismos pertencentes ao Domínio Bacteria, filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae e gênero *Lactobacillus* (LPSN, 2019). Esses microrganismos possuem células que variam de longas e finas, a hastes curvadas e curtas, em forma de cocobacilos ou bastonetes, normalmente sem mobilidade, por flagelos peritríquios (quando presentes) e cadeia de formação comum (WILEY, 2019). São Gram-positivos, não esporulados, geralmente catalase negativa (PORFFO; SILVA, 2011), algumas espécies podem produzir uma pseudo catalase, outras podem apresentar reações positivas em meios específicos (BOTELHO, 2005). São quimiorganotróficas e anaeróbias facultativa ou microaerofílicas (BERNARDEAU

et al., 2008). Até o momento, o gênero *Lactobacillus* apresenta 241 espécies e 29 subespécies (LPSN, 2019).

Essas bactérias representam um grupo de organismos funcionalmente relacionados pela sua capacidade geral de produzir ácido láctico durante o metabolismo (O'SULLIVAN et al., 2009). Podem ser homofermentativas caso convertam açúcares em ácido láctico ou heterofermentativas, que promovem a conversão de açúcares em ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂ (GIRAFFA et al., 2010). O fato de os lactobacilos apresentarem como produto principal ou único produto de fermentação o ácido láctico (CAMU et al., 2007), em associação com outras características do gênero, faz com que sejam considerados Bactérias do Ácido Láctico (BAL) (CROSS, 2002). Possuem crescimento em temperaturas com variedade de 2°C a 53°C, com seus valores ótimos, geralmente, de 30°C a 40°C. São tolerantes a ambientes ácidos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2; o seu crescimento ocorre com valores menores e igual a 5,0. A taxa de crescimento em meios neutros ou alcalinos geralmente é reduzida (KANDLER; WEISS, 1986).

As bactérias lácticas possuem habitats bastante variados na natureza, com capacidade de se desenvolverem sob diferentes condições, sendo associadas a ambientes ricos em nutrientes (SALMINEN et al., 2004). Os lactobacilos ocupam diversos nichos em que carboidratos fermentescíveis encontram-se disponíveis (FELIS; DELLAGLIO, 2007), em alimentos como leite, carnes, vegetais, grãos, frutas e bebidas (CHEN et al., 2005; NAJJARI et al., 2008; GÄNZLE; ZHENG, 2019), além da matéria orgânica dos solos e associados aos vegetais (SARAVANAKUMAR et al., 2018). Algumas delas também fazem parte da microbiota natural dos tratos respiratório, trato gastrointestinal e vaginal, pele, pulmões e de cavidades naturais de humanos e animais (AXELSSON, 2004; MAGALHÃES et al., 2007; ERYILMAZ et al., 2018 HE et al., 2019).

O grande grupo de bactérias que pertencem ao gênero *Lactobacillus* não é patogênico e também não é capaz de transmitir os fatores de resistência para bactérias patogênicas (GOMES; MALCATA, 1999; SAAD, 2006). Possuem muito potencial biotecnológico em diversas áreas, como a alimentícia, médica e até mesmo químicos de uso industrial, tendo atividades antibacterianas e antioxidante (HASHEMI et al., 2017). São amplamente utilizadas há muito tempo como fermentos lácticos devido a sua propriedade na conservação de alimentos

e de fornecer uma proteção eficaz ao homem e animais contra infecções gastrointestinais (DELLAGLIO et al., 1994; CROSS, 2002). Tal conservação de alimentos está no fato de que esse grupo de bactérias é capaz de provocar a redução do pH, assim como produção de substâncias antimicrobianas, inibindo a ação de outros microrganismos (CARIONI et al., 2001), fornecendo produtos mais seguros ao consumidor, tendo também aumento no tempo de prateleira (COSTA et al., 2012).

Os lactobacilos também são bastante utilizados na preparação de uma variedade de alimentos como organismos “starter” na fermentação de diversos produtos, como salsichas (QUIJADA et al., 2017), azeitonas fermentadas industrialmente (BLANA et al., 2014), mas sendo utilizados principalmente em laticínios (BOTTAZZI, 1988). Não menos importante, o cacau é um produto que também utiliza os lactobacilos como “starter” na fermentação (DE VUYST; WECKX, 2016). A ação das bactérias lácticas na fermentação do cacau resulta na promoção da desnaturação de proteínas, inibição de crescimento de microrganismos indesejáveis, diminuição da atividade da água, que é a principal responsável pela modificação na textura das amêndoas e obtenção dos precursores do *flavor* característico dos produtos do cacau (CARIONI et al., 2001). Também são precursores do *flavor* de outros produtos fermentados (SMIT et al., 2005).

2.2.1. *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Do grupo dos lactobacilos, uma espécie bastante importante é o *Lactobacillus plantarum*, responsável pelo processo produtivo do chucrute (HARRIS et al., 1992) e de outros alimentos fermentados (BEHERA et al., 2018). A utilização de culturas dessa espécie na obtenção de produtos fermentados é bastante oportuna já que apresentam atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos (MELO et al., 2016). A espécie *Lactobacillus plantarum* é microaerófila de perfil heterofermentativo de coloração Gram-positiva, em forma de bastonete encontrado em uma grande variedade de nichos, como legumes, carne, peixe, e o trato gastrointestinal (SIEZEN; VIEGLEN, 2011, JESSIE LAU; CHYE, 2018).

Lactobacillus plantarum 7.1 é uma linhagem que foi isolada da fermentação de cacau (DOS SANTOS et al., 2016), e que já foi evidenciado em estudos sua eficiência como probiótico, mostrando a produção de moléculas antagônicas contra possíveis patógenos e sendo linhagens promissoras para o desenvolvimento de agentes profiláticos (PESSOA et al., 2017).

Dentro do grupo de lactobacilos, a espécie *Lactobacillus plantarum* é bastante versátil (GHEZIEL et al., 2019), isso ocorre porque suas cepas são encontradas em uma variedade maior de habitats em comparação com outros lactobacilos (CHOI et al., 2018), contrastando com as condições químicas e físicas que estressoras dentro destes habitats (STEFANOVIC et al., 2017). Essa espécie possui um conjunto universal de genes, incluindo ilhas de adaptação ao meio que se encontra, permite que essa espécie prospere em muitos habitats diferentes e se proteja das pressões de seleção impostas por condições flutuantes (FILANNINO et al., 2018).

É uma das espécies de lactobacilos mais conhecidas no processo de fermentação de amêndoa de cacau que tem a função de liquefazer parte da massa cacaueira que é drenada para fora das caixas facilitando a difusão de oxigênio na massa (ILLEGHEMS et al., 2012). A espécie de *Lactobacillus plantarum* é utilizado como *starter* em muitos trabalhos de fermentação do cacau (DE VUYST; WECKX, 2016), podendo levar a uma melhor fermentação e processos mais controlados e confiáveis, oferecendo um chocolate de bom gosto e saboroso (LEFEBER et al., 2010). A caracterização e uso de microrganismos isolados de fermentação de cacau com potencial de aplicação industrial possui um futuro promissor (SAITO et al., 2014).

2.3. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A identificação de microrganismos é geralmente feita por técnicas de observação morfológica, além de testes bioquímicos (FLORES et al., 2019). A caracterização do gênero *Lactobacillus* pode ser realizada com base nos testes de coloração pelo método de Gram, catalase, produção de gás em glicose e H₂S em TSI em entre outros (HANMOUNGJAI et al., 2007; MORAES et al., 2013).

As identificações por testes morfológicos e bioquímicos ainda são utilizados hoje em dia (SOUZA et al., 2019) pelo fato de serem testes rápidos que podem descartar de imediato resultados de caracterização ampla (GANDRA et al., 2008), diminuindo erros e minimizando metodologias posteriores que seriam feitas sem necessidade.

A maioria desses trabalhos envolvendo testes morfológicos e bioquímicos são em pesquisas em áreas de saúde, pois são feitos muitos testes por dia e precisa-se de um diagnóstico rápido (KÄFER et al., 2018; SILVA et al., 2019). No entanto ensaios morfológicos visando à designação de diferenciação nas culturas e os ensaios, bioquímicos tem promovido divergências na identificação (KLEIN et al., 1998), podendo ter resultados errôneos sendo mais comumente feita também a identificação por processos moleculares para um resultado mais confiável (SANCHES et al., 2019).

2.3.1. PROVAS MOLECULARES

Hoje em dia o processo utilizado na diferenciação e caracterização mais detalhada dos microrganismos é a tipagem molecular, que utiliza técnicas de biologia molecular para evidenciar uma possível relação genética entre eles (SALES et al., 2017). As maiores vantagens dos métodos de tipagem molecular são em decorrência de seu poder discriminatório (KLEIN et al., 1998, PLENGVIDHYA et al., 2004). Marcadores moleculares de DNA são mais utilizados na identificação, podendo ser aplicado por diversas técnicas para as bactérias ácido lácticas como instrumento para a identificação de espécies ou diferenciação das culturas, como por exemplo o PCR (DE VUYST et al., 2008). Para a identificação molecular, o DNA das linhagens de lactobacilos primeiro é extraído e purificado, depois é realizada a técnica de PCR para a identificação de espécie de microrganismos (BROLAZZO et al., 2009).

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) baseia na reação de polimerização em cadeia, que foi concebida em 1983 por Kary Mullis, publicada em 1985, mas utilizada de forma rotineira a partir de 1988 (SAIKI et al., 1988). A técnica permite a obtenção *in vitro* de várias cópias de um determinado

segmento de DNA (SAIKI et al., 1985). Esse método tem a habilidade de amplificar um fragmento de DNA, normalmente de 100 até 10.000 pares de base, mas em condições especiais de até 40 mil pares de base (CARR; MOORE, 2012). O PCR é uma reação enzimática catalisada por uma enzima termoestável que é a DNA polimerase, juntamente com alguns componentes como desoxirribonucleotídeos (dNTP's) e primers (ou oligonucleotídeos) (DELIDOW et al., 1993).

Para amplificar, o *primer* (ou iniciador) utilizado, que é um oligonucleotídeo de aproximadamente 10 nucleotídeos, precisa anelar com sequências complementares e invertidas com relação as duas fitas que foram previamente separadas pelo aumento da temperatura (92-94°C). O anelamento entre os *primers* e as sequências complementares é efetuada a uma temperatura de 40 a 72°C (50°C é geralmente utilizada). Uma *Taq* DNA polimerase estende (ou sintetiza) as cadeias originadas pelos *primers*, cuja temperatura ótima de catálise é de 72°C (MCPHERSON; MELLER, 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008).

Existem máquinas programáveis de PCR, os termocicladores, capazes de modificar a temperatura rapidamente. A rigor, uma vez atingida as temperaturas de cada fase, são necessários poucos segundos para que a reação ocorra. E as máquinas de PCR tem a capacidade de alterar a temperatura de forma rápida e repetir o ciclo tantas vezes quantas ordenadas. O número de fragmentos amplificados duplica a cada ciclo. Sucessivos ciclos de separação, anelamento e de síntese produzem milhões de fragmentos virtualmente idênticos, em apenas algumas horas (MCPHERSON; MELLER, 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008). A identificação das espécies de *Lactobacillus* é mais precisa e rápida com a utilização da PCR quando comparada com as identificações tradicionais microbiológicas (BARROS et al., 2009).

Dentre os marcadores de DNA baseados em PCR, tem-se o ISSR (Inter simple sequence repeat) (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Os produtos que são obtidos através da reação de ISSR na reação de PCR, possuem sequências de tamanho diferentes que se localizam entre regiões repetidas microssatélites, iguais e orientadas em direções opostas. As regiões microssatélites são sequências curtas com até seis nucleotídeos repetidas no genoma de vários organismos e distribuídas ao acaso (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A taxa de evolução dentro dos microssatélites é considerada elevada, de modo

que a probabilidade de polimorfismo nestas sequências é maior (REDDY et al., 2002). As sequências nucleotídicas simples entre as regiões microssatélites são amplificadas por meio de iniciadores homólogos (REDDY ET AL., 2002). É utilizado um único *primer* na reação que contém de 16 a 25 pares de bases compostos de dinucleotídeos ou trinucleotídeos que ancoram na extremidade 5' ou 3' na fita de DNA (WOLFE; LISTON, 1996). Os marcadores ISSR possuem grande importância, pelo seu alto grau de polimorfismo, alta reprodutibilidade e o baixo custo (SALIMATH et al., 1994).

Um exemplo dessa sequência repetitiva é o polinucleotídeo (GTG)₅, (RIEDL et al., 2018) que se baseia na amplificação de regiões entre microssatélites GTG e CAC para diferenciar microrganismos inter e intraespecíficos de forma segura (LIECKFELDT et al., 1993; ILLEGHEMS et al., 2012; KAUR et al., 2018). Esta região não codifica sozinha, mas está amplamente dispersa por todo o genoma bacteriano (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992). O *primer* (GTG)₅ foi descrito como sendo altamente aplicável à diferenciação de LAB em subespécies e níveis de estirpe. Referido como *fingerprint* PCR-(GTG)₅, é uma ferramenta genotípica para especiação e tipagem de lactobacilos (GEVERS et al., 2001). Os produtos da PCR podem ser facilmente visualizados em gel, com base na separação física de fragmentos de ácidos nucleicos, através de uma matriz sólida que pode ser um polímero de agarose ou poliacrilamida (ERCOLINI, 2004).

Trabalhos de identificação molecular baseada na técnica de PCR são feitos de forma contínua na diferenciação entre grupos de microrganismos, aplicado em várias áreas do campo científico, como ecologia (JEEWON et al., 2018), alimentícia (WANG et al., 2018) e em área de saúde (MOREIRA et al., 2018). A identificação de microrganismos no processo fermentativo de alimentos, como por exemplo o cacau para potenciais estudos dos isolados, é feita com a técnica de PCR como demonstrado na pesquisa de Bo et al., (2020) e So'aib et al., (2020). O uso da ferramenta *fingerprint* PCR-(GTG)₅ também é observado para diversidade microbiana me fermentação de cacau, realizado por Serra et al., (2019).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

- Validação de metodologia de genotipagem de *Lactobacillus plantarum* para monitoramento em fermentação de cacau.

3.2. EPECÍFICOS

- Amplificação diferenciada de fragmentos para diferentes linhagens de *Lactobacillus plantarum* através do primer (GTG)₅;
- Diferenciação genotípica do *Lactobacillus plantarum* 7.1;
- Análise da influência do inóculo com a linhagem *Lactobacillus plantarum* 7.1 durante o processo fermentativo.

4. METODOLOGIA

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

As análises genéticas e microbiológicas foram realizadas nos laboratórios de Biotecnologia Microbiana, Biologia Molecular e Monitoramento Ambiental que estão localizados na Universidade Estadual de Santana Cruz em Ilhéus-BA. A fermentação foi feita na fazenda Leolinda localizada no município de Uruçuca-BA (Latitude: 14° 35' 35" S, Longitude: 39° 17' 04" W).

4.2 REATIVAÇÃO DOS LACTOBACILOS

Isolados de *Lactobacillus plantarum* 7.1, previamente isolado e caracterizado por nosso grupo de pesquisa (SANTOS et al., 2016), foram reativados através de inoculação em meio líquido em caldo de MRS (Acumedia). Após inoculação, foram incubadas a 37°C até apresentar crescimento e feitas novas tentativas com os lactobacilos que não crescerem em até sete dias. Após o crescimento em meio líquido, os lactobacilos foram inoculados em placas com meio Agar MRS, por estriamento descontínuo, para obtenção de colônias puras. A coloração de Gram foi realizada com cada colônia isolada das placas.

Após isolamento do *Lactobacillus plantarum* 7.1 foram reativadas mais 6 linhagens dessa mesma espécie, sendo eles *Lactobacillus plantarum* 6.2, 1.1, 2.1, 2.2, A.1, A.2.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS LINHAGENS

Para caracterização morfológica das colônias das linhagens foram realizadas observações quanto à forma, tamanho, cor, opacidade, elevação, superfície, borda e produção de exopolissacarídeos. As características microscópicas como forma e arranjo foram observadas através da coloração de Gram em microscópio ótico Motic B1 Advanced Series.

Todas as características foram anotadas em uma tabela, e posteriormente foi feita uma matriz de dados com a presença e ausência de cada característica,

seguido por um diagrama de Venn e análise de similaridade morfológica entre as linhagens através do programa PAST 3.26.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS LINHAGENS DE *Lactobacillus plantarum*

A extração do DNA genômico das linhagens de *Lactobacillus plantarum* foi realizada através do protocolo Silva-Filho et al., (2005) com modificações. As colônias isoladas das linhagens de *Lactobacillus plantarum* foram colocadas para crescer em meio líquido MRS e posteriormente 1 ml dos meios foi transferido para microtubos de 2 ml e utilizados para extração do material genético.

As amostras foram então centrifugadas a 5.000 g durante 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida foi adicionado 500 µl de solução de lise contendo 2 ml Tris-HCL 1 M (pH 8), 0,5 ml EDTA 0,5 M (pH 8), 1ml SDS 10%, 0,5 ml NaCl 0,5 M e 6 ml de água destilada esterilizada e posteriormente foram colocados em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Posteriormente foram acrescentados 600 µl de fenol-clorofórmio (1:1) e centrifugados a 10.000 g por 10 minutos, passando a fase superior (aproximadamente 500 µl), para outro tubo. Passados essa etapa, foi adicionado 500 µL de clorofórmio álcool isoamílico (29:1) e novamente centrifugado a 10.000 g por 10 minutos, passando a fase superior para outro tubo. Para precipitação do DNA foram colocados 900 µl de isopropanol e 5 µl de acetato de sódio 5 M e a solução foi deixada por 18 horas a -20°C.

No dia seguinte a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 30 minutos, o precipitado lavado com etanol 70% (a -20°C). O precipitado foi colocado para secar a 37°C por 30 minutos aproximadamente e então foi ressuspenso em 100 µl de água ultrapura estéril.

4.5 PCR E OTIMIZAÇÃO

Para amplificação dos fragmentos de DNA dos isolados da fermentação foi utilizado o primer (GTG)₅ realizado através dos protocolos de Lieckfeldt et al., (1993) e Versalovic et al., (1994), onde as modificações foram com a concentração do MgCl₂ e primer. Todas as reações feitas durante o trabalho foram realizadas em um mix de 25 µl, sendo 23 µl de reagentes e 2 µl de DNA extraído. O protocolo testado a partir dos dois autores citados acima tinha um mix de 2,5 µl 10x de tampão de reação, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP's, 10 mM de primer, 5 U/ml de *Taq* polimerase e 14,8 µl de água Mili-Q estéril.

A desnaturação foi de 5 min a 95 °C; 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 55 °C por 1 min e 30 s, 72 °C por 1 min e 30 s; seguido por um passo de extensão final de 6 min. Nesse protocolo foram feitas amplificações mudando a temperatura de anelamento de 40 a 55 °C, com variação de 1 em 1 °C, e com o tempo entre 30 s e 1 min e 30 s, variando de 5 em 5 segundos. O PCR foi feito no termociclador Eppendorf AG 22331 Hamburg (6331BO602478).

O tamanho e a quantidade do produto de PCR foram analisados a partir de 15 µl da amostra total de PCR, através de eletroforese em gel de agarose 1,7%, corrida por 3 horas a 50 V, e o gel corado com GelRed e observado através de UV.

Por fim, com os dados obtidos dos géis foram dispostos em uma tabela em forma de matriz binária, descartando os géis que não amplificaram, tiveram pouca amplificação ou amplificação sem diferenciação entre as linhagens. Os que amplificaram foram dados notas entre 1 e 6 sendo avaliados a melhor visualização dos fragmentos e feito um gráfico para observação com o protocolo de melhor resultado.

4.6 GENOTIPAGEM DAS LINHAGENS DE *Lactobacillus plantarum*

Os géis foram analisados por observação simples e as análises de agrupamentos de similaridade genética com o programa PAST 3.26, realizadas a partir da matriz de dados de presença e ausência de fragmentos que foram observados no gel. As imagens dos géis assim como os perfis obtidos e o

tamanho de cada fragmento foram considerados para a criação da base de dados para uso interno e para validação da metodologia de diferenciação de *Lactobacillus plantarum* e para rastreamento durante o processo de fermentação do cacau.

4.7 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Depois de isolar as colônias de *Lactobacillus plantarum* 7.1 para os testes microbiológicos e genéticos, foi realizada a coloração de Gram para confirmar a pureza dos isolados, e novamente inoculados em meio líquido MRS em frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio cada. Os frascos de Erlenmeyer com os meios inoculados foram colocados em agitadores orbital durante 48 a 72 horas em temperatura ambiente.

Passado esse tempo de crescimento, os frascos foram retirados dos agitadores e os meios com os lactobacilos crescidos foram armazenados em frascos tipo schott e deixados na geladeira de 3 a 5 dias para que as células decantassem para o fundo do frasco, para facilitar o processo de separação. Com uma pipeta de vidro autoclavada o excesso de foi meio retirado, e o meio celular restante foi centrifugado a 6.000 g por 10 minutos para separação. Posteriormente foram feitas duas lavagens com água peptonada a 1%, centrifugando a 6.000 g por 10 minutos. Feito isso, a peso seco celular foi medido e ressuspenso em 200 ml de água peptonada a 1%.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO INÓCULO

Foi feita a quantificação da viabilidade celular do inóculo no dia de sua inoculação a partir da contagem de UFC (Unidade Formadora de Colônia), com uma diluição seriada de 10^{-2} a 10^{-10} e 100 µl para plaqueamento em ágar MRS. Depois de 48 horas de crescimento as placas que continha um número de colônias entre 30 e 300 foram contadas. O número de células obtidos foi multiplicado pelo fator de diluição e o resultado expresso como UFC/ml.

4.9 FERMENTAÇÃO E INOCULAÇÃO

Os frutos foram provenientes da fazenda Leolinda, localizada no município de Uruçuca, Bahia-Brasil. As amêndoas foram homogeneizadas e separadas em 4 lotes de 45 kg postos em cochos de madeira, todos contendo o mesmo volume de amêndoas. Os cochos possuem uma dimensão de 35 cm de largura, 40 cm de comprimento e 38 cm de profundidade (Figura 1), que já foram usados em fermentações anteriores. As fermentações foram realizadas em duplicata, sendo 2 caixas inoculadas e 2 caixas sem inóculo (fermentação natural) que foram utilizadas como controle negativo. As caixas foram inoculadas com 48 horas de fermentação, com 100 ml contendo células de *Lactobacillus plantarum* 7.1. A fermentação ocorreu por um período de 144 horas, com revolvimento da massa a cada 48 horas de forma manual (Figura 2).

Figura 1: Cocho de madeira utilizado na fermentação com dimensões de 35x40x38 cm (vista superior).



Fonte: TAVARES (2019)

Figura 2: Revolvimento das amêndoas do cocho sendo realizada de forma manual



Fonte: TAVARES (2019)

4.10 DETERMINAÇÃO DE TEMPERATURA E pH DURANTE A FERMENTAÇÃO

A temperatura foi aferida pela inserção de um termômetro digital de haste metálica no centro da massa fermentativa, com uma distância em relação a largura de 17,5 cm, 20 cm em relação ao comprimento e 19 cm em relação a profundidade do cocho. O pH foi aferido diretamente na polpa de cacau, com o pHmetro Ion PHS-3E. As análises foram feitas a cada 12 horas, durante o

processo fermentativo, sendo o pH aferido posteriormente a fermentação com as amostras congeladas.

4.11 COLETA DE AMÊNDOAS, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COLÔNIAS DURANTE A FERMENTAÇÃO

As amostras de amêndoas de cacau (50 g) foram coletadas a cada 12 horas durante o processo de fermentação. As amostras da polpa foram coletadas da região central do cocho, no meio da massa fermentativa aproximadamente a uma distância em relação a largura de 17,5 cm, 20 cm em relação ao comprimento e 19 cm em relação a profundidade e foram transferidas para sacos plásticos estéreis. Amostras de sementes foram coletadas a partir do tempo de inoculação do lactobacilo, para realização de diluições seriadas e posterior isolamento das linhagens de microrganismos.

Essas amostras foram homogeneizadas com solução salina de NaOH a 1%, sendo 1 ml de solução salina para cada semente. Diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-6} foram feitas em solução salina e retirados 100 μ l e posteriormente plaqueadas em Agar MRS e as placas incubadas a 37°C por 48 h. As colônias foram repicadas para obtenção de colônias puras para isolamento. Colônias que possuíam morfologia muito distinta da linhagem de *Lactobacillus plantarum* 7.1 foram desprezadas.

4.12 MONITORAMENTO DE *Lactobacillus plantarum* 7.1

As amostras coletadas e isoladas da fermentação a partir do tempo da inoculação tiveram seu DNA extraído de acordo com o protocolo descrito anteriormente e posteriormente feito PCR para amplificação dos fragmentos de DNA a partir do protocolo resultante do processo de otimização. O DNA extraído e amplificado da linhagem de *Lactobacillus plantarum* 7.1 foi analisado em gel como controle positivo para analisar a semelhança entre algum microrganismo coletado e isolado durante o processo de fermentação fazendo o seu monitoramento.

4.13 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ÍNDICE DE FERMENTAÇÃO

Foi feito a análise dos parâmetros de índice de fermentação de acordo com o Centro de Inovação do Cacau localizado na Universidade Estadual de Santa Cruz- Ilhéus, seguindo os critérios das normas da ISO de padrões de qualidade e identidade de amêndoa de cacau Cocoa Beans -Specification ISSO 2451:2017 (ISSO, 2017), avaliando o índice de fermentação e o índice de amêndoas bem fermentadas.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado o teste de média e o desvio padrão da média da temperatura e pH dos cochos de fermentação controle e inoculado com o *Lactobacillus plantarum* 7.1, além do desvio padrão da temperatura e pH dos pontos coletados dos cochos controle e inoculado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS LINHAGENS

As observações macroscópicas e microscópicas foram observadas e anotadas (Tabela 1), na qual apenas características como tamanho e cor mostraram ser diferente entre algumas linhagens, algumas apresentando tamanho pequeno e outras puntiforme, e cores branca e bege. Para as demais características, todas as linhagens apresentaram forma circular, brilhante, elevação convexa, superfície lisa, borda lisa, presença de produção de exopolissacarídeos, forma celular de bacilos, arranjo simples e Gram-positiva.

Observações morfológicas são importantes para diferenciação e classificação de microrganismos. A morfologia microscópica e macroscópica é o primeiro parâmetro utilizado para agrupar ou descartar os microrganismos estudados. Os dados obtidos fenotipicamente auxiliam e são significativos para uma classificação prévia de diferentes espécies de *Lactobacillus* (SATWISKY et al., 2006).

A análise morfológica das colônias é mais descritiva e serve para ajudar na diferenciação inicial durante o isolamento dos lactobacilos, porém não chega a uma conclusão taxonômica precisa no nível de espécie, pois existem muitas espécies com as características morfológicas muito parecidas, um exemplo disso é o *Lactobacillus fermentum* que possuem similares características morfológicas (AHMAD et al., 2018), com diferenciações mínimas e então, a diferenciação é apenas um agrupamento mais genérico. Algumas mudanças em características como colônias de *Lactobacillus* podem variar, se o meio utilizado pra crescimento tiver alguma alteração (MCDONALD; FRAZIER, 1951), que não foi o caso do trabalho, todos os meios foram padronizados.

Várias espécies de lactobacilos possuem fenótipos heterogêneos sendo mais fácil a sua classificação e diferenciação em relação a outros grupos, porém existem aquelas com cepas muito semelhantes que torna bastante complicado ou impossível diferenciar apenas morfolologicamente. Muitas classificações empregam a fisiologia do microrganismo para a classificação, contudo existem casos que algumas cepas se comportam exatamente iguais, como observado no

trabalho de Burity e Saad (2007). Nas nossas observações vimos que 81% das características foram comuns as linhagens estudadas, resultando em uma dificuldade de diferenciação por morfologia, mostrando muitas similaridades entres as cepas de *L. plantarum*.

O diagrama de Venn (Figura 3) é um gráfico que representa um ou vários conjuntos de maneira simultânea e suas intersecções. O diagrama de Venn (Figura 3) feito no trabalho mostrou em suas intersecções que 9 características foram comuns a todas a linhagens, 1 característica em comum entre *L. plantarum* 7.1, 6.2, 2.2 e *L. plantarum* 1.1; assim como 1 característica em comum com *L. plantarum* 7.1, 6.2, 2.2 e *L. plantarum* A.2; 1 característica entre *L. plantarum* 1.1 e *L. plantarum* 2.1, A.3 e por fim 1 característica em comum entre *L. plantarum* 2.1, A.3 e *L. plantarum* A.2, onde podem ser observados.

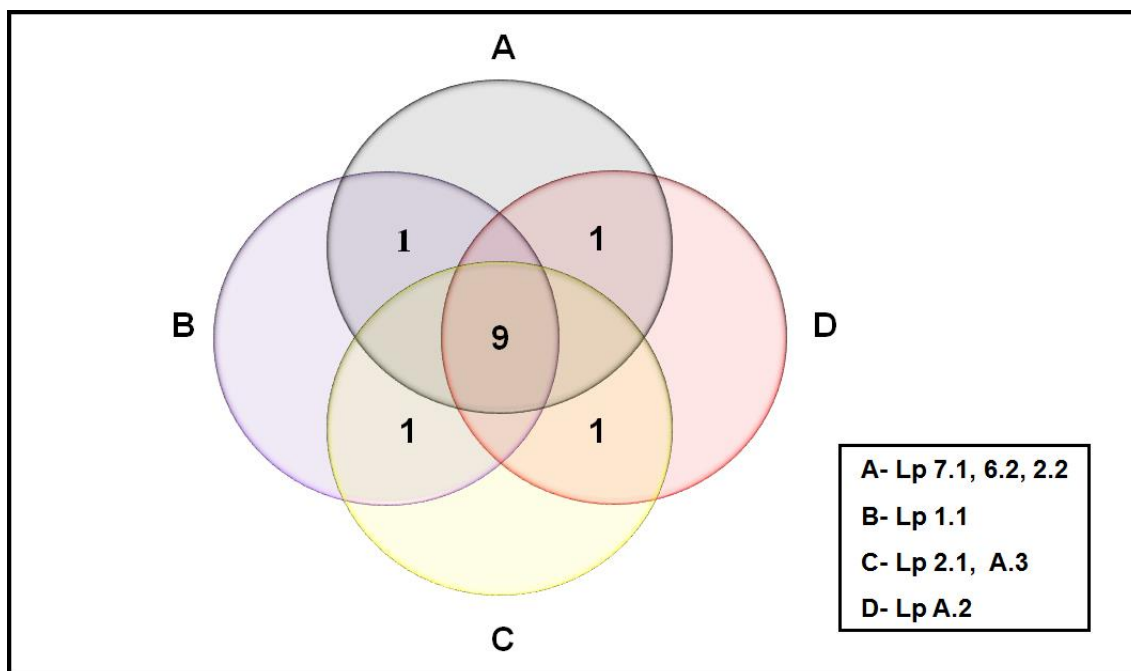
O diagrama de Venn é utilizado para mostrar a relação entres todas as amostras estudadas, mostrando quais são, quantas e com quem as são relacionadas. Isso tudo acontece a partir da análise das características e agrupamento, através de suas intersecções. Dentro da microbiologia também é utilizado para análise de diversidade pelo fato de agrupar, como é observado em um estudo feito por Zhang et al. (2019), contudo não nos pode dizer com total precisão pois apenas característica fenotípicas foram analisadas. O diagrama observado mostrou visualmente as características compartilhadas mostrando as relações que existe entre eles, resultando em 4 linhagens das 7 amostras estudadas.

Tabela 1: Características morfológicas das colônias (macroscópicas) e das células (microscópicas) observadas das sete linhagens de *Lactobacillus plantarum*. (Lp = *Lactobacillus plantarum*).

Características	Lp 7.1	Lp 6.2	Lp 1.1	Lp 2.1	Lp 2.2	Lp A.2	Lp A.3
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Tamanho	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Puntiforme	Pequeno	Puntiforme	Puntiforme
Cor	Branco	Branco	Bege	Bege	Branco	Branco	Bege
Opacidade	Brilhante	Brilhante	Brilhante	Brilhante	Brilhante	Brilhante	Brilhante
Elevação	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Superfície	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Borda	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Produção de Exopolissacarídeos	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Gram	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Forma	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Arranjo	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples

Fonte: ANDRADE (2019)

Figura 3: Diagrama de Venn mostrando a quantidade de compartilhamento das características morfológicas entre as sete linhagens de *Lactobacillus plantarum*. (Lp = *Lactobacillus plantarum*).

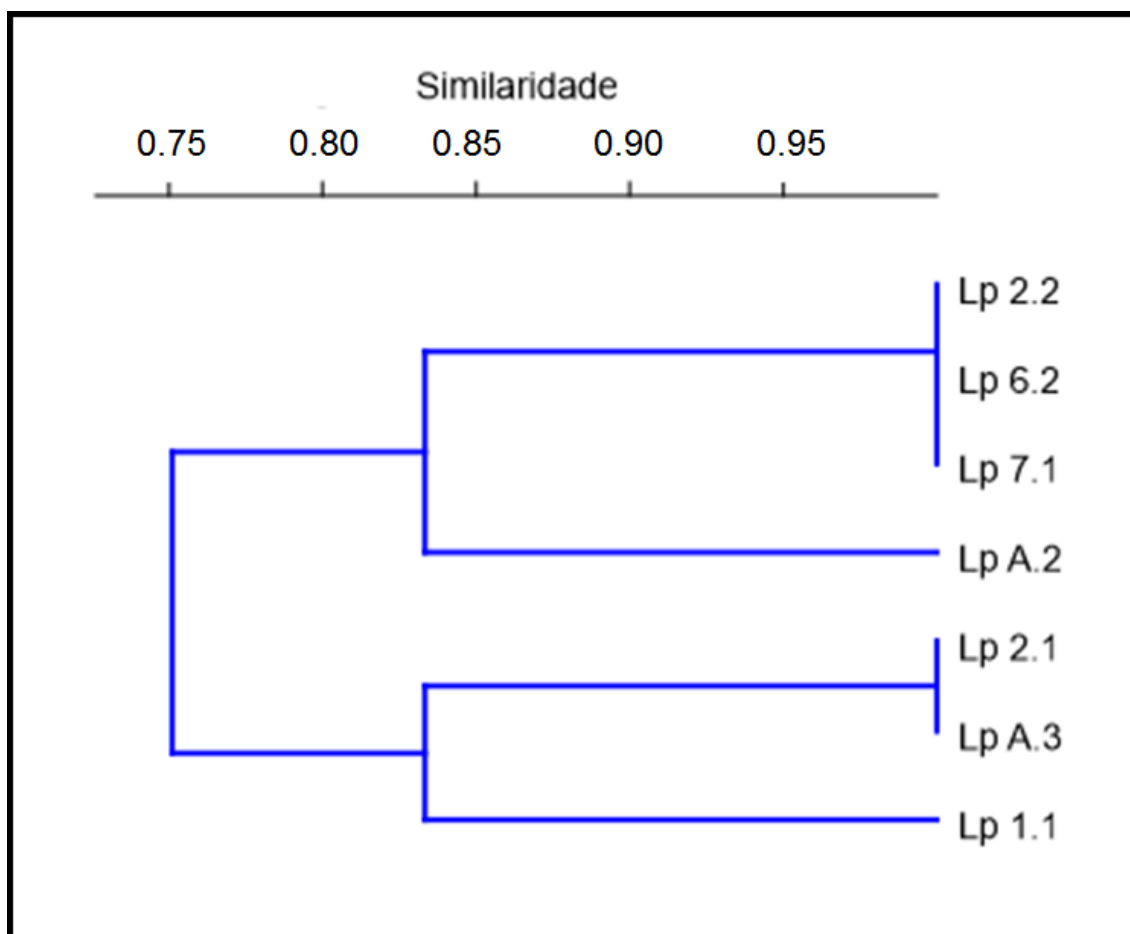


Fonte: ANDRADE (2019)

A matriz binária só apresentou diferença nos tamanhos e cores das colônias, e a análise de similaridade morfológica entre as linhagens mostrou uma divisão em 4 linhagens dentro da espécie, sendo *L. plantarum* 7.1, 6.2, 2.2 uma linhagem, *L. plantarum* A.2 outra linhagem, *L. plantarum* 2.1, A.3 outra linhagem e por último *L. plantarum* 1.1. A análise mostrou também que *L. plantarum* 7.1, 6.2, 2.2 e *L. plantarum* A.2 estão mais próximo assim como *L. plantarum* 2.1, A. e *L. plantarum* 1.1 estão entre si. Ambos grupos que se mostraram mais próximos tiveram uma similaridade de aproximadamente 84% e entre os que não estão próximos uma similaridade de 75% (Figura 4).

A análise de similaridade morfológica feita apresentou que para as 7 linhagens estudadas, existem apenas 4, mostrando que algumas amostras seriam da mesma linhagem. Diferente do diagrama de Venn, essa análise permite observar a proximidade e distância entre os grupos estudados, que apesar de mostrar o mesmo número de grupos, nos permitiu inferir qual grupo é mais próximo do outro assim também como eles todos estão entre si.

Figura 4: Dendograma de similaridade fenética, pelo programa “Past” 3.26, utilizando o coeficiente “Jaccard” de similaridade, feito com dados morfológicos



Fonte: ANDRADE (2019)

PCR E OTIMIZAÇÃO

O protocolo que teve melhor resultado nos testes foi o mix de 2,5 µl 10x de tampão de reação, 3,0 mM de $MgCl_2$, 10 mM de dNTP's, 2 µl a 10 mM de primer, 5 U/ml de *Taq* polimerase e 12,3 µl de água Mili-Q estéril para 1 amostra de DNA. O aumento em 2x na concentração do $MgCl_2$ e do *primer* resultou em um gel com melhor visualização. A partir de uma fusão do protocolo de Lieckfeldt et al., (1993) e Versalovic et al., (1994), esse resultado foi o melhor obtido dentro das condições, uma vez que a busca pela melhoria do protocolo faz com que haja uma melhor identificação e menor probabilidade de erro.

O melhoramento de visualização do gel quando aumentado a concentração do $MgCl_2$ e do *primer* em duas vezes pode ser explicado pelo fato de que o $MgCl_2$

é um reagente importante para o funcionamento da enzima DNA polimerase, pois libera íons Mg^{2+} que é um cofator indispensável para a enzima, além disso afetam as temperaturas de desnaturação das fitas de DNA e de anelamento de *primers* (SAIKI, 1989; VIEIRA, 1993), então esse aumento pode ter ajudado com a funcionalidade da enzima e também nos processos de desnaturação e anelamento. Contudo em altas concentrações podem ser responsáveis pelo aparecimento de produtos inespecíficos, formados por aumento excessivo da atividade da polimerase e pela formação de dímeros de *primers* (SAIKI, 1989), evidenciando que uma medida crítica deve ser fornecida para o bom funcionamento do PCR. A concentração final de $MgCl_2$ utilizada condiz perfeitamente com o trabalho realizado por De Carvalho e Vieira (2001) mostrando uma faixa de concentração ótima entre 2,0 e 3,2 Mm para $MgCl_2$.

O aumento da concentração do *primer* eleva o rendimento da reação, essa pode ser a explicação, porém o mesmo cuidado deve ser mantido em relação a altas concentrações, pois o rendimento pode ser muito alto enquanto a reação diminui a especificidade, fazendo com que a obtenha-se erros nos resultados (SAIKI, 1989; VIEIRA, 1993). O $MgCl_2$ está diretamente ligado ao *primer*, a otimização desse reagente pode diminuir os efeitos de anelamento entre *primers*, diminuindo sua concentração em relação ao produto de interesse (KRAMER: COEN, 2001).

As temperaturas de anelamento testadas com 40 a 42°C não mostraram amplificação, as temperaturas de 43 e 44°C resultaram em apenas rastros de amplificação no gel, as temperaturas de 45 e 46°C tiveram pouca amplificação, as temperaturas de 47 a 50°C amplificaram porém não diferenciaram uma linhagem da outra e as temperaturas de 51 a 55°C amplificaram e diferenciaram (Quadro 1). A temperatura de anelamento é muito está diretamente ligada ao Ponto de Fusão Médio do *primer*, denominado de T_M (Temperature of Melting) que é a temperatura em que metade dos primers estão anelados no DNA e a outra metade livre na reação, na qual a metade livre estará disponível pro próximo ciclo (VIEIRA, 1993). Se a temperatura de anelamento não estiver relacionado com o T_M , pode ocorrer de que grande parte dos primers estejam anelados entre si, prejudicando a reação de PCR, e por esse motivo foi feito uma otimização utilizando uma grande escala de temperatura de anelamento para (GTG)₅.

Em relação ao tempo de anelamento, não foi observado tanta diferença entres os tempos experimentados, alguns trabalhos realizados falam sobre tempos utilizados que não afetaram o resultado da PCR como o de Bercovich et al. (1999). Porém a composição do primer é de grande influência para o tempo de anelamento, quantidades ricas em GC podem afetar esse tempo, fazendo com que acréscimos ou decréscimos de 5 segundos possam fazer muita diferença, conforme observado no trabalho de Yu e Paul (1993).

Foi observado que dentre as temperaturas que tiveram amplificação e diferenciação, quanto mais se aproximavam da temperatura de 53°C de anelamento e no tempo de 1 minuto (Figura 5), mostravam melhores resultados, tendo a temperatura de 53°C e o tempo de 1 minuto com o melhor resultado apresentado. Muitos *primers* ISSR tem sua temperatura ótima de anelamento entre 45 e 55°C, como foi observado no trabalho de otimização realizado Gomes et al. (2012), que obteve como resultado uma faixa de temperatura de anelamento de 47,4 a 52,4°C, no trabalho de Ryberg et al. (2011) com uma temperatura ótima de 51°C, porém também já foi observado para primer (GTG)₅ temperatura ótima de anelamento em 60°C como foi mostrado no trabalho de Korvin et al. (2014). Mesmo observando esses trabalhos, é justificável testar temperatura abaixo de 45°C, já que muitos *primers* com 12 a 15 pares de base são acessíveis a uma temperatura de anelamento entre 40 e 45°C (SAIKI, 1989) que pode ser evidenciado no trabalho de Švec et al. (2010) que tem 40°C como temperatura de anelamento para o *primer* (GTG)₅.

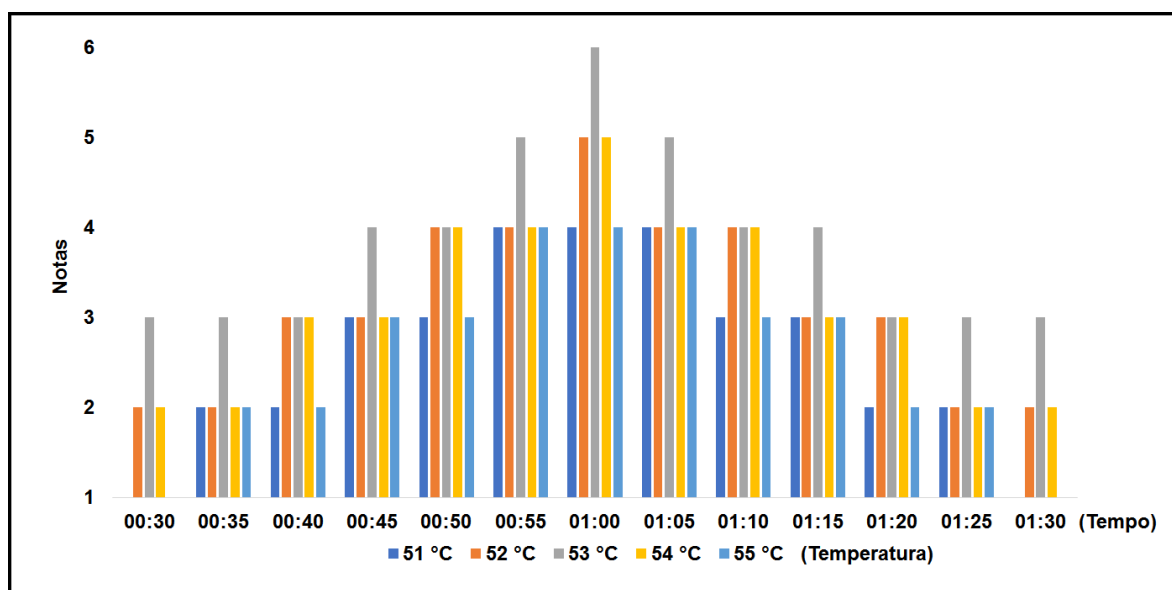
Quadro 1: Relação entre temperatura (°C) e tempo (min) de anelamento para amplificação de fragmentos de DNA.

■ - Não amplificou, ■ - Rastros, ■ - Amplificou pouco, ■ - Amplificou, mas não diferenciou, ■ - Amplificou e diferenciou.

	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C	46 °C	47 °C	48 °C	49 °C	50 °C	51 °C	52 °C	53 °C	54 °C	55 °C
00:30 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
00:35 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
00:40 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
00:45 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
00:50 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
00:55 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
01:00 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
01:05 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
01:10 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
01:15 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
01:20 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
01:25 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
01:30 min	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Fonte: ANDRADE (201

Figura 5: Gráfico de otimização de PCR relacionando o tempo com a temperatura de anelamento com notas obtidas de 1 a 6



Fonte: ANDRADE (2019)

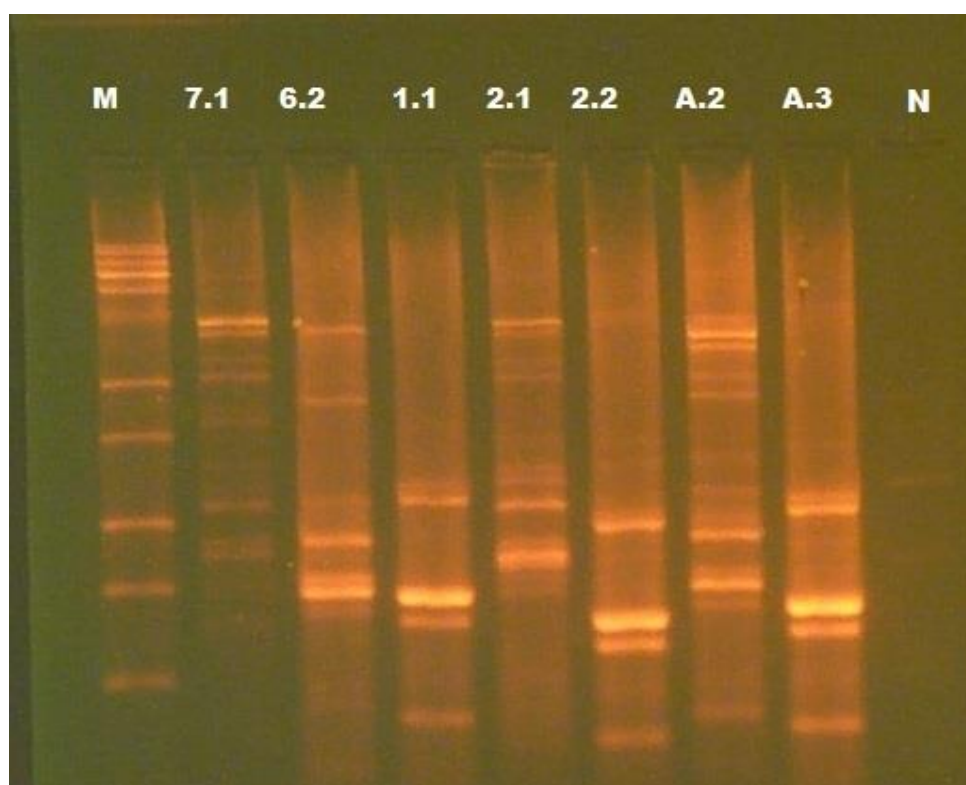
GENOTIPAGEM DAS LINHAGENS DE *Lactobacillus plantarum*

No gel feito com o protocolo já estabelecido, foi observado um total de 21 fragmentos polimórficos de DNA, não existindo nenhum fragmento monomórfico (Figura 6). A amplificação do DNA dos lactobacilos com o *primer* (GTG)₅ gerou perfis de 4 a 10 fragmentos polimórficos. A falta de fragmentos monomórficos mostra uma grande heterogeneidade entre as amostras, no que diz a respeito à amplificação dos fragmentos apresentados. O PCR-(GTG)₅ mostrou-se bastante eficaz na amplificação e diferenciação das linhagens em gel de agarose, pode-se notar que sendo a mesma espécie, diferentes fragmentos foram amplificados mostrando existem diferenças em suas sequências de DNA.

A técnica de PCR-(GTG)₅, é uma técnica *fingerprint* que resulta em um padrão de bandas visualizadas no gel que correlaciona o tamanho molecular desses fragmentos (VOET; VOET, 2011), no entanto é possível que bandas com sequências diferentes tenham o mesmo padrão de mobilidade num gel de agarose. Isso pode acontecer pelas sequências terem a mesma quantidade de nucleotídeos, porém em posições diferentes que irá resultar em um fragmento

de mesmo tamanho, levando a uma identificação falsa positiva. Porém sequências iguais não podem ter mobilidade diferentes, então uma vez com perfis diferenciados em um gel, podemos afirmar que existe diferença em alguma sequência do DNA.

Figura 6: Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose 1,7 % das sete linhagens de *Lactobacillus plantarum*, usando o *primer* (GTG)₅. Marcador de peso molecular: 1kb Ludwig Biotec.



. Fonte: ANDRADE (2019)

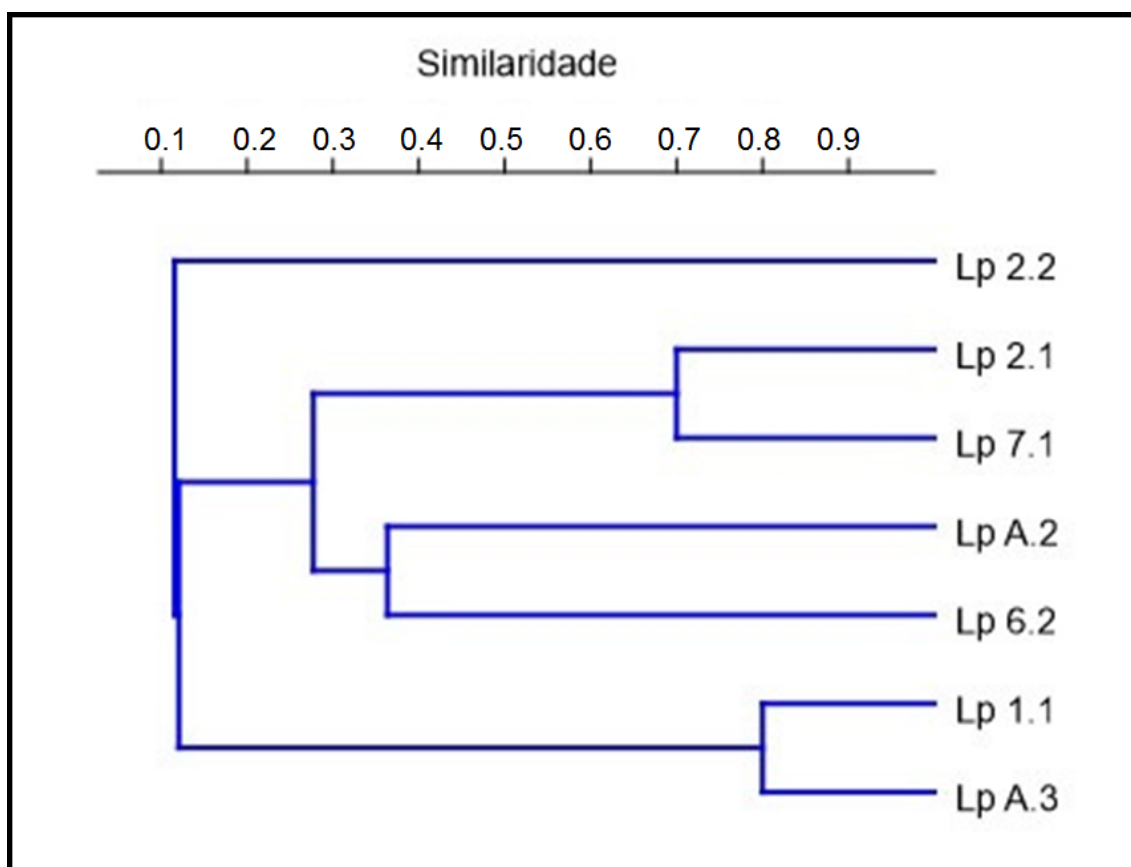
Na análise de similaridade genética foi observado que as 7 linhagens se comportavam como sendo todas diferentes entre si, mostrando que o *L. plantarum* 1.1 e A.3 possui o maior grau de aproximação genética entre si com 80% de similaridade, seguido de *L. plantarum* 7.1 e 2.1 com 70% de similaridade, depois *L. plantarum* 6.2 e A.2 com 35% de similaridade. As linhagens de *L. plantarum* 7.1 e 2.1 possuem um pouco mais de 27% de similaridade com as linhagens de *L. plantarum* 6.2 e A.2. A linhagem de *L. plantarum* 2.2 é a mais distante geneticamente das outras linhagens, compartilhando 10% de similaridade com os outros lactobacilos (Figura 7).

Em comparação com os resultados obtidos pela caracterização morfológica, a análise genética mostrou-se muito mais sensível, resultando em uma diferenciação mais específica. Zanini et al. (2012) relatou que a reação de PCR para identificação de *Lactobacillus* spp possui maior sensibilidade do que outras metodologias, não descartando-as, mas mostrando sua importância pelo alto fator discriminatório.

Muitos trabalhos vêm sido relatados com o uso de marcadores ISSR, com técnicas de PCR-(GTG)₅ pelo fato de ser uma técnica rápida, simples e barata com uma alta reprodutibilidade. Gevers et al. (2003) e Švec et al. (2011) utilizaram o iniciador (GTG)₅ para a caracterização molecular de lactobacilos e como resultado observou variação inter e intraespecífica, evidenciando um poder discriminatório para diferenciar linhagens e espécies.

Comparando os resultados dos dados morfológicos com os dados de identificação molecular, é possível identificar uma grande divergência entre os padrões de classificação que foram obtidos. Quando observados os agrupamentos resultantes não foi possível relacionar o perfil genético com as características morfológicas.

Figura 7: Dendograma de similaridade fenética, pelo programa “Past” 3.26, utilizando o coeficiente “Jaccard” de similaridade, feito com dados genéticos utilizando produtos de PCR amplificados com o *primer* (GTG)₅.



Fonte: ANDRADE (2019)

PREPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo teve crescimento celular em todos os frascos Erlenmeyer com 48 horas em temperatura ambiente. A peso seco celular foi medido e teve como resultado 23,988 gramas. O peso seco calculado garante uma estimativa de uso comum por partes de produtores em que a “dose” do inóculo será calculada pelo peso em relação a quantidade de cacau utilizado e não por número celular ou unidades formadora de colônias, sendo uma forma de comercializar em forma de produto e garantir o uso mais facilitado para o produtor de pequena e grande escala.

O número estimado de células viáveis que foi de $1,31 \times 10^8$ UFC/ml, sendo $3,2 \times 10^3$ UFC/g. O número de células viáveis contadas, é um número aproximado que condiz com trabalhos feitos de inoculação de *Lactobacillus* em cacau, tendo em vista que foram feitas inoculações em ordem de 10^6 UFC/ml (MISNAWI et al., 2017) e 10^{10} UFC/ml (DJAAFAR et al., 2019), ambos obtendo bons resultados em suas fermentações. Então a concentração intermediária foi uma estratégia a obter um resultado satisfatório. É observado também que a maiorias dos trabalhos com inoculação de lactobacilos, é feito como inóculo *starter*, momento em que há uma maior competição com as leveduras. Observado que no início da fermentação as condições são mais propícias para as leveduras, no nosso trabalho foi inoculado num tempo de 48 horas onde o favorecimento ambiental é maior para as bactérias lácteas, assumindo que esse número de unidade formadoras de colônias é suficiente.

TEMPERATURA E PH DURANTE A FERMENTAÇÃO

Na fermentação observou-se um declínio de pH nas primeiras 36 horas de aproximadamente 4,4 para 3,4 para todos os cochos, seguido de um aumento progressivo para o cocho controle, subindo de 3,47 para 4,4 enquanto o cocho inoculado teve um aumento menor comparado com o controle, subindo de 3,47 para 3,86 (Figura 8). Com 48 horas de fermentação houve mais um declínio para todos os cochos, porém o cocho controle se manteve com o pH mais elevado que o inoculado, obtendo uma estabilidade e com proximidade de valores entre 72 e 84 horas. A introdução do inóculo pode ter tido uma relevância para a diminuição do pH em comparação com o cocho controle nessa faixa de tempo.

O cocho controle se permaneceu estável até aumentar novamente em 108 horas não declinando mais até o fim da fermentação. O cocho inoculado teve outro aumento súbito com 84 horas seguido de declínio com 96 horas, aumentando novamente em 108 horas, se mantendo similar ao cocho controle até o fim do processo fermentativo, finalizando com valores para o grupo controle e o inoculado respectivamente 4,42 e 4,65 (Figura 8).

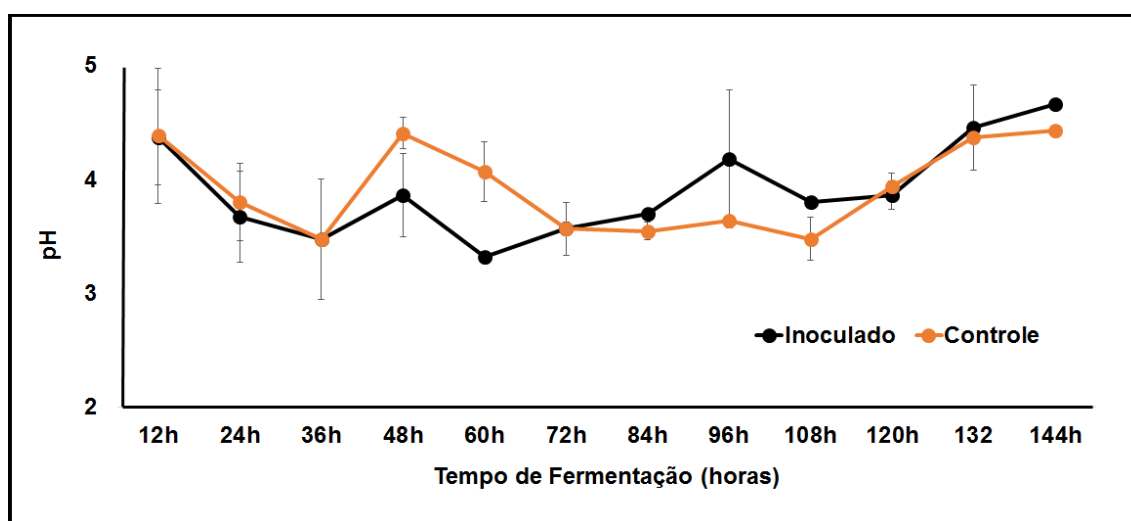
Os valores observados do pH no experimento de ambos os tratamentos (controle e inoculado), estão dentro da normalidade para uma faixa entre 3 e 5,

começando com valores mais baixos com uma tendência natural a alcançar valores próximo a 5 no final do processo fermentativo (LEHRIAN; PATTERSON, 1983). Valores aproximados a estes também coincidindo com o nosso trabalho, são encontrados com outros trabalhos realizados em fermentação de cacau, como o de Camu et al. (2007) e Papalexandratou et al. (2011), com seus valores finais de pH dentro da faixa considerado normal na fermentação.

Essa faixa de pH no processo de fermentação faz com que haja um favorecimento da proliferação de microrganismos acidófilos como as leveduras, bactérias lácteas e bactérias acéticas na polpa de cacau, além da inibição do crescimento de outros microrganismos indesejáveis (BIEHL; ZIEGLEDER, 2003). Isso tudo permite uma maior concentração desses microrganismos fermentadores.

A média do pH do cocho controle foi de 3,93 com um desvio padrão de 0,391 e a média do pH do cocho inoculado foi de 3,91 com um desvio padrão de 0,416. Com um valor de p igual a 0,9, não foi observado diferenças significativas entre os níveis de pH das amêndoas do cocho controle e do cocho que foi inoculado. Isso mostra que a inoculação com o *L. plantarum* 7.1 não teve efeito significativo sobre os valores de pH ao longo do processo fermentativo.

Figura 8: Variação do pH nas amêndoas de cacau, no cocho de fermentação ao longo dos tempos do processo fermentativo. Coleta na fazenda Leolinda (Uruçuca – BA).



Fonte: ANDRADE (2019)

A temperatura de todos os cochos eleva-se nas primeiras 48 horas, onde o cocho controle tem seu crescimento sem declínios até 72 horas com um aumento de 21°C, chegando a ficar com 48,8°C e variando posteriormente entre 0,7°C pra cima e 3°C para baixo (Figura 9). O cocho inoculado teve seu crescimento sem declínios até 60 horas de fermentação, onde obteve seu pico máximo de valor de temperatura de 51,3°C, com um aumento de 17,7°C do valor inicial. Posteriormente seus valores diminuíram e aumentaram, sendo o declínio mais significativo de 6,85°C. É observado que a temperatura do cocho controle é mais baixa que o do controle antes e pós inoculação, mantendo-se similares após 72 horas de fermentação.

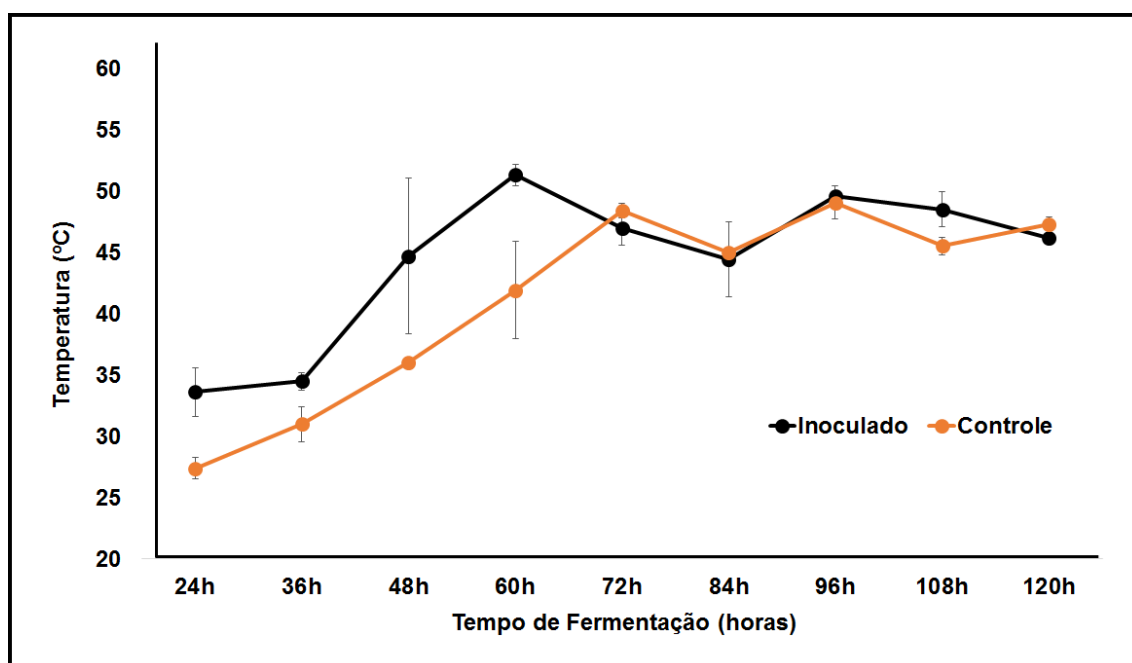
A temperatura do cocho de fermentação atinge entre 40 e 45°C nas primeiras 48 horas do processo de acordo com a literatura, podendo aumentar ainda mais com o revolvimento, chegando até 50°C ou superior (ARDHANA; FLEET, 2003; THOMPSON et al., 2007). O aumento da temperatura é observado em ambos tratamentos, porém apenas o cocho controle não seguiu o padrão de valor de temperatura nas 48 horas, devido ao fato do cocho está com uma temperatura menor em relação aos cochos inoculados desde o tempo 0, sabendo que a inoculação foi feita depois desse tempo, não indica qualquer sinal de influência do lactobacilo da temperatura ser mais alta. Depois do revolvimento com 48 horas observou-se um aumento contínuo em ambos tratamentos, porém o cocho controle levou 12 horas a mais para atingir a proximidade dos 50°C, por estar com uma temperatura menor desde o início do processo.

As temperaturas dos tempos finais de coleta de fermentação coincidem com as temperaturas de outros trabalhos como o de Camu et al. (2007), Pereira et al. (2012) e Miguel et al. (2017). Os lactobacilos apresentam faixa de temperatura ótima entre 30 e 40°C, sendo uma temperatura padrão de incubação de 35 a 37°C (AIT OUALI et al., 2014; PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2017). No experimento foi inoculado coincidentemente no cocho com temperatura maior com valor de 44,7°C, enquanto o cocho controle nesse mesmo tempo media 36°C.

A média da temperatura do cocho controle foi de 41,3°C com um desvio padrão de 7,946 e a média do cocho inoculado foi de 44,3°C com um desvio padrão de 6,287. Com um valor de p igual a 0,19, não foi observado diferenças significativas entre os níveis de temperatura das amêndoas do cocho controle e

do cocho que foi inoculado, mostrando que a inoculação com o *L. plantarum* 7.1 não teve efeito significativo sobre os valores de temperatura no processo fermentativo.

Figura 9: Variação da temperatura nas amêndoas de cacau, no cocho de fermentação ao longo dos tempos do processo fermentativo. Coleta na fazenda Leolinda (Uruçuca – BA).



Fonte: ANDRADE (2019)

COLETA DE AMÊNDAS, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COLÔNIAS DURANTE A FERMENTAÇÃO

Do total de 180 placas plaqueadas das diluições das coletas, 30 não tiveram crescimento, 90 apenas crescimento fúngico e 60 com crescimento fúngico e possivelmente bacteriano. De 60 placas com crescimento fúngico e possivelmente bacteriano, 12 placas tiveram crescimento de colônias similares a *L. plantarum* 7.1. Das 12 placas que tiveram colônias similares a *L. plantarum* 7.1 obtivemos um total de 32 colônias para análise de monitoramento. Essas 32 colônias estavam dispostas em todos os cochos ao longo dos tempos de fermentação a partir do dia de inoculação.

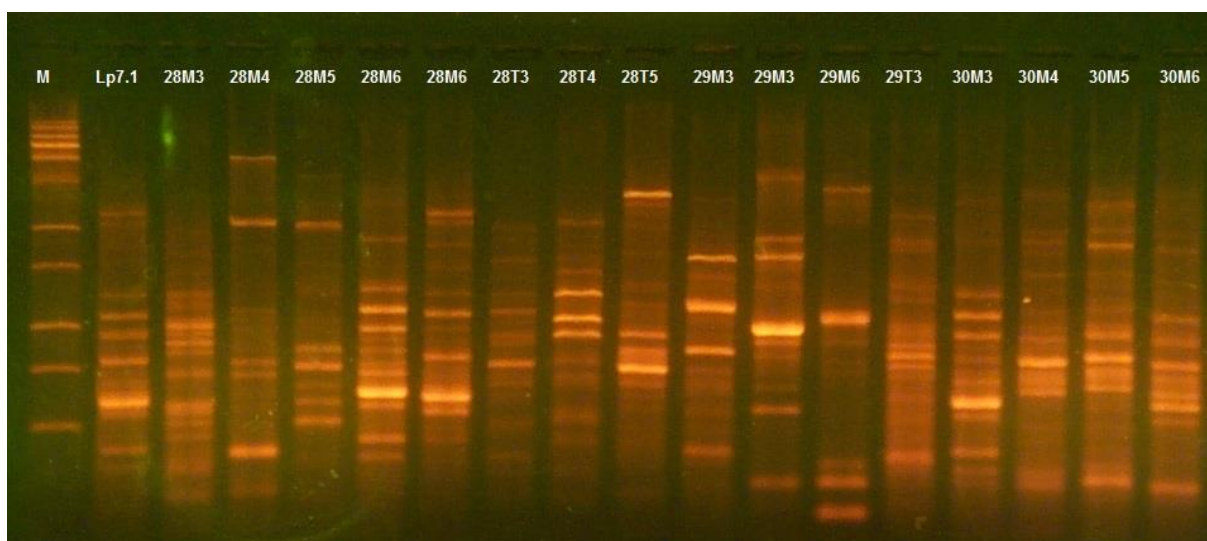
Apesar de ter tido crescimento de colônias, a quantidade de placas e de UFC foram bem abaixo do que se é esperado nessas condições, e podemos inferir uma série de motivos para esse acontecimento. A quantidade de amêndoas utilizadas foi bem abaixo da média de trabalhos feitos, que utilizam de 100 a 500 g (LEFEBER et al., 2012; ILLEGHEMS et al., 2012; SANDHYA et al., 2015). No nosso trabalho foram retiradas 50 g de amostra sendo utilizada para diluição apenas 15 gramas (9 amêndoas). Esse foi um fato que podemos atribuir ao baixo número de colônias por placas, assim também como o congelamento das amêndoas, que pode ter afetado no metabolismo das bactérias ou até mesmo matando-as, apesar de que a *L. plantarum* tem uma boa adaptação e resistência a baixas temperaturas (FIOCCO et al., 2007), o tempo de congelamento pode se tornar crítico (FOSCHINO et al., 1996). A temperatura e pH também pode ter sido uma causa da diminuição da resistência do lactobacilo ao congelamento como mostra o trabalho de Wang et al. (2005).

MONITORAMENTO DE *Lactobacillus plantarum* 7.1

No gel foram visualizadas amostras de 48 horas até 144 horas nos cochos controles e cochos inoculados. Das 32 amostras, 16 amostras ficaram no primeiro gel que são de tempos de 48 horas a 96 horas e 16 amostras ficaram no gel 2, que possui tempos de 108 a 144 horas. Nos dois géis que foram feitos não se viu o *L. plantarum* 7.1, apesar de que no primeiro gel, observa-se duas amostras, o 28M6 e 30M3 que são iguais e diferem apenas em 3 fragmentos com *L. plantarum* 7.1 (Figura 10), sendo as amostras mais próximas. O gel 2 possui a amostra 30T3 que difere também em apenas 3 fragmentos do *L. plantarum* 7.1 (Figura 11).

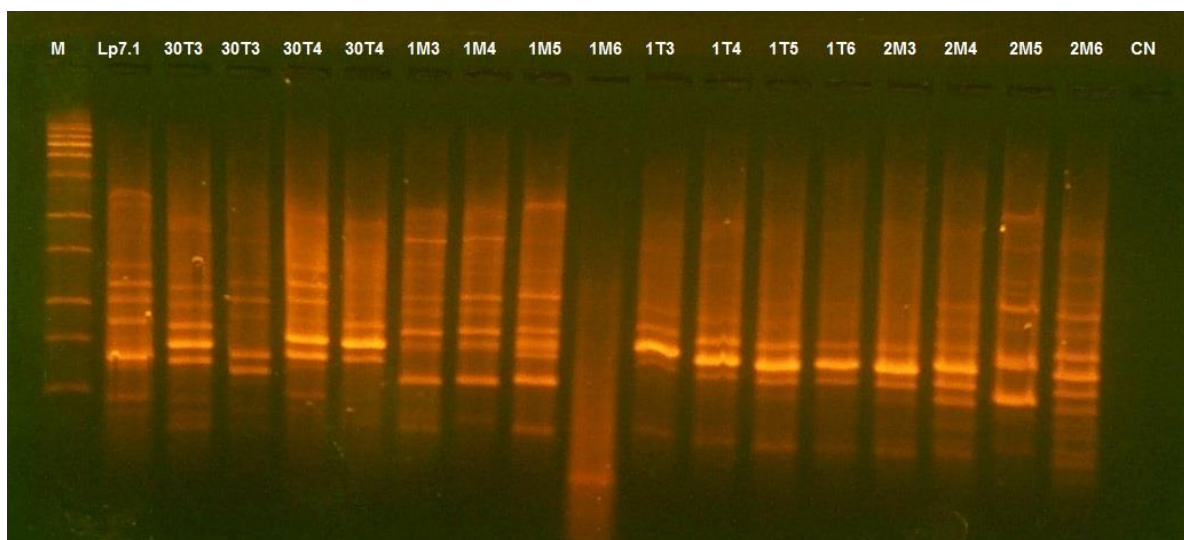
Nos dois géis não foram observados a presença do *L. plantarum* 7.1, apesar de ser observado muitas colônias com o mesmo aspecto, não foi identificado nenhuma amostra com o mesmo perfil genético. Uma das causas que pode explicar isso, já foi mencionado anteriormente, relacionado a baixa temperatura que pode afetar diretamente o lactobacilo sendo muito sensível a esse estresse térmico.

Figura 10: Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose 1,7 % dos isolados da fermentação no tempo de 48 a 96 horas, usando o primer (GTG)₅. Marcador de peso molecular: 1kb Ludwig Biotec



Fonte: ANDRADE (2019)

Figura 11: Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose 1,7 % dos isolados da fermentação no tempo de 108 a 144 horas, usando o primer (GTG)₅. Marcador de peso molecular: 1kb Ludwig Biotec.



. Fonte: ANDRADE (2019)

O gel 1 possui uma maior diversidade de microrganismos em comparação ao gel 2. No gel 2 é observado que da amostra 1T3 a 2M3 que corresponde aos tempos de 120 horas a 144 horas, os microrganismos são idênticos. Esses microrganismos visualizados no gel 2 podem refletir a uma possível relação de

resistência e sobreposição a outros microrganismos no mesmo tempo. Pelo fato de serem coletados no final da fermentação, pode ser que esses microrganismos sejam bactérias ácido acéticas ou até mesmo outras bactérias ácido lácticas (DE VUYST; WECKX, 2016; SOUMAHORO et al., 2019). A sua morfologia idêntica ao *Lactobacillus plantarum* 7.1 pode indicar que seja uma linhagem de *L. plantarum* ou mesmo de *L. fermentum*, tendo em vista trabalhos em que mostraram uma alta concentração dessas duas espécies de microrganismos em final de fermentação (PEREIRA et al., 2012).

A maior diversidade encontrada no gel 1, pode ser explicada pelo fato que nos primeiros tempos de fermentação há uma maior diversidade de microrganismos e depois com o passar do tempo do processo, há uma seleção entre os microrganismos que conseguem sobreviver as condições que estão no ambiente fermentativo (DE VUYST; WECKX, 2016;), e também com a interação entre eles, sendo que muitas substâncias acabam por inibir o crescimento da ampla maioria, fazendo com que haja uma diminuição da variedade de microrganismos (DE VUYST; WECKX, 2016). Apesar de não ter visto o *Lactobacillus plantarum* 7.1 ao longo da fermentação não diminui a qualidade do protocolo otimizado.

ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ÍNDICE DE FERMENTAÇÃO

Em relação ao índice de fermentação, foi observado que o cocho controle obteve 84%, enquanto o cocho inoculado obteve 92,3%. Em relação ao índice de amêndoas bem fermentadas o cocho controle obteve 65,5% e o cocho inoculado 73,3%. Analisando essas observações podemos perceber que o cocho inoculado obteve melhores resultados nos dois índices. De acordo com o comércio de amêndoas, para o mercado, amêndoas bem fermentadas acima de 70% são mais valorizadas, o que pode indicar uma vantagem do inóculo. Contudo ainda devem ser analisados outros parâmetros tais como geração de açúcares redutores e aminoácidos livres, como análise de aceitação de sabor para afirmar a eficácia do inóculo.

6. CONCLUSÃO

A amplificação diferenciada de fragmentos para linhagens *Lactobacillus plantarum* através do primer (GTG)₅ mostrou que o (GTG)₅ é eficaz na diferenciação das linhagens de lactobacilos sendo também eficaz para as amostras coletadas da fermentação, mostrando que é um marcador que utiliza uma metodologia altamente discriminante a nível de linhagem bacteriana.

A diferenciação genotípica do *Lactobacillus plantarum* 7.1 foi alcançada, a partir do protocolo otimizado realizado no trabalho, mostrando um protocolo eficiente, podendo ser usado seu padrão genético como controle positivo.

A influência do inóculo *Lactobacillus plantarum* 7.1 foi realizada através da avaliação dos parâmetros nas interferências físico-químicas durante o processo de fermentação do cacau, e foi observado que não houve diferença significativa entre a média da temperatura e pH das amostras inoculadas e controle, indicando que o inóculo não teve interferência na fermentação em relação a esses dois aspectos. E em relação a análise dos parâmetros de índice de fermentação, o cocho inoculado teve um resultado melhor comparado com o cocho controle.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. S. et al. Morphological and biochemical studies for the identification of *Lactobacillus plantarum* sp. nov., and *Lactobacillus fermentum* sp. nov., from municipal waste. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 5, p. 1421–1424, 2018.
- AIT OUALI, F. et al. Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 116–124, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011>>.
- ALMEIDA, M. H. G. Efeito da tecnologia pós-colheita na fracção volátil do flavour a cacau. Estudo de uma fermentação em São Tomé e Príncipe. **Anais**. Anais do Instituto Superior de Agronomia, p. 25-39, 2003.
- ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1–2, p. 87–99, 2003.
- AXELSSON, L. T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., WRIGHT, A., 3 EDIÇÃO (EDS.). **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 2004.
- BAREL, M. Délai d'écabossage: Influence sur les rendements et la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié. **Café Cacao Thé**. v. 31, n. 2, p. 141-150, 1987.
- BAROOS, M. R. et al. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp., isolados de aves. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.2 p.319-325, 2009.
- BAYER, C. et al. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid atpB and rbcL DNA sequences. **Bot J Linn Soc**. v.129, p. 267–303, 1999.
- BECKETT, S.T. **The Science of Chocolate**. Londres: Editora Royal Society of Chemistry Paperbacks, 2008. 2 ed.
- BEHERA, S. S. et al. *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. **BioMed Research International**. p. 1-18, 2018.

BERCOVICH, D. et al. Quantitative Ratio of Primer Pairs and Annealing Temperature Affecting PCR Products in Duplex Amplification. **BioTechniques**, v. 27, n.4, p.762–770,1999. doi:10.2144/99274st07

BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278–285, 2008.

BIEHL, B. ZIEGLEDER, G. Chemistry of Processing Production, Products, and Use. In: CABALLERO, B. et al. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Baltimore Maryland, p. 1436-1448, 2003.

BLANA, V. A. et al. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic Lactobacillus pentosus and Lactobacillus plantarum starter cultures isolated from industrially fermented olives. **Food Microbiology**, v. 38, p. 208–218, 2014.

BO, B. et al. Bacterial and fungal diversity in Laphet, traditional fermented tea leaves in Myanmar, analyzed by culturing, DNA amplicon-based sequencing, and PCR-DGGE methods. **International Journal of Food Microbiology**, 2020.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro**. 2005. Tese. (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

BOTTAZZI, V. An introduction to rod-shaped lactic-acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, p. 303-315, 1988.

BROLAZO, E. M. et al. Prevalência e caracterização de espécies de lactobacilos vaginais em mulheres em idade reprodutiva sem vulvovaginites. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 31, n. 4, p.189-95, 2009.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo Lactobacillus casei: Caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 373–380, 2007.

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. 1809–1824, 2007.

CARIONI, F. O. et al. USO DE CULTURAS INICIADORAS PARA A ELABORAÇÃO DE UM EMBUTIDO À BASE DE CARNE DE PATO (*Cairina moschata*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 334–338, 2001.

CARR, A. C.; MOORE, S. D. Robust quantification of polymerase chain reactions using global fitting. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2012.

CASCANTE, M. et al. Flora microbiana durante el proceso de fermentacion del cacao. In: 11th International Cocoa Research Conference, 1994. **Congresso**. Yamoussoukro, Ivory Coast, 1994. p. 911–922.

CHEN, Y. S.; YANAGIDA, F.; SHINOHARA, I. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 195–200, 2005.

CHOI, S. et al. Pan-genomics of *Lactobacillus plantarum* revealed group-specific genomic profiles without habitat associations. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 1352–1359, 2018.

CORNEJO, O. E. et al. Population genomic analyses of the chocolate tree, *Theobroma cacao* L., provide insights into its domestication process. **Communications Biology**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2018.

COSTA, G. N. et al. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “*in vitro*”. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, 2012.

COUNET, C. et al. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins **J Agric Food Chem**. v.52, n.20, p.6243-6249, 2004.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n. 34, p. 245 - 253, 2002.

DE CARVALHO, A. O. R.; VIEIRA, L. G. E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 4, p. 593–600, 2001.

DE VUYST, L. et al. Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 79–90, 2008.

DE VUYST, L.; WECKX, S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 5–17, 2016.

DJAAFAR, T. F. et al. Characteristic of Chocolate Candy Produced from Fermented Cocoa Bean with *Lactobacillus plantarum* HL-15 Starter Culture for Inhibition Growth of Mycotoxin -Producing Fungi. **Journal of Agricultural Science and Technology B**, v. 9, n. 2, p. 128–134, 2019.

DELIDOW, B. C. et al. Polymerase Chain Reaction. In: WHITE, B. A., **PCR Protocols: Current Methods and Applications**, Springer Science & Business Media, 1993. 386p.

DELLAGLIO, H., ROISSART, H., TORRIANI, S., CURK, M.C., JANSSENS, D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: ROISSART, H., LUQUET, F.M., eds. **Bactéries lactiques. aspects fondamentaux et technologiques**. Paris: Lorica, 1994. v.1, p.25-139.

DOS SANTOS, T. F. et al. Efficacy of oral administration of lactic acid bacteria isolated from cocoa in a fermented milk preparation: Reduction of colitis in an experimental ratmodel. **Genetics and Molecular Research**. v. 15, n. 3, p. 1-13, 2016.

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

ERYILMAZ, M. et al. Molecular Identification and Antimicrobial Activity of Vaginal *Lactobacillus* sp. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v.19, n.15, p. 1241-1247, 2018.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Norfolk, v. 8, p 44 - 61, 2007.

FERNANDES, L. D. S. et al. Mapping of a major QTL for ceratocystis wilt disease in an F1 population of theobroma cacao. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. February, p. 1–15, 2018.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. 3 ed.

FILANNINO, P. et al. How *Lactobacillus plantarum* shapes its transcriptome in response to contrasting habitats. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 3700–3716, 2018.

FIOCCO, D. et al. Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 4, p. 909–915, 2007.

FLORES, N. O et al. Análise microbilógica de mamadeiras em escolas de educação infantil: Identificação e estudo de técnicas de desinfecção. **Destaques Acadêmicos**, v. 11, n. 3, p. 119-130, 2019.

FOSCHINO, R. et al... Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions. **Journal of Dairy Research**. v.63, p. 295–303, 1996.

GÁLVEZ, S. L. et al. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 1, p. 124–130, 2007.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum**, v. 30, n. 1, p. 109–118, 2008.

GÄNZLE, M. G.; ZHENG, J. Lifestyles of sourdough lactobacilli – Do they matter for microbial ecology and bread quality? **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, n. August, p. 15–23, 2019.

GEVERS, D. et al. Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1270–1275, 2003.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 1, p. 31–36, 2001

GHEZIEL, C. et al. Evaluating the Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains from Algerian Infant Feces: Towards the Design of Probiotic Starter Cultures Tailored for Developing Countries. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 1, p. 113–123, 2019.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 480–487, 2010.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia de Alimentos**, São Paulo, n. 64, p. 12 - 22, 1999.

GOMES, S. O. et al. Determinação da temperatura de anelamento com marcadores ISSR em acessos de Pinhão-Manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. **Anais**. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.

HANMOUNGJAI, W. et al. Identification of acidotolerant acetic acid bacteria isolated from Thailand Sources. **Research Journal of Microbiology**. v. 2, n. 2, p. 194-197, 2007.

HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T. R. Novel paired starter culture system for sauerkraut, consisting of a nisin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* strain and a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1484–1489, 1992.

HASHEMI, S. M. B. et al. Fermentation of sarshir (kaymak) by lactic acid bacteria: antibacterial activity, antioxidant properties, lipid and protein oxidation and fatty acid profile. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2017.

HE, T. et al. *Lactobacillus johnsonii* L531 reduces pathogen load and helps maintain short-chain fatty acid levels in the intestines of pigs challenged with *Salmonella enterica* Infantis. **Veterinary Microbiology**, v. 230, p. 187–194, 2019.

ILLEGHEMS, K. et al. Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

ISO- International Organization for Standardization. Cocoa beans — Specification and quality requirements. 2017.

JEEWON, R. et al. Hidden mycota of pine needles: Molecular signatures from PCR-DGGE and Ribosomal DNA phylogenetic characterization of novel phenotypes. **Scientific Report**, V.8, n. 18.053, p.1-12, 2018.

JESSIE LAU, L. Y.; CHYE, F. Y. Antagonistic effects of *Lactobacillus plantarum* 0612 on the adhesion of selected foodborne enteropathogens in various colonic environments. **Food Control**, v. 91, p. 237–247, 2018.

KÄFER, A. et al. Identificação dos agentes causadores de mastite em uma propriedade familiar especializada em produção de leite. Anais. Anais do 10º Salão Internaonal de Ensino, Pesquisa e Extensão – SIEPE. Universidade Federal do Pampa Santana do Livramento, p.1-7, 2018.

KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. and HOLT, J.G. (eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol.2. Baltimore: Williams & Wilkins.1986. p. 1209-1234.

KAUR, J. et al. Molecular typing of *Lactobacillus brevis* isolates from Korean food using repetitive element-polymerase chain reaction. **Food Science and Technology International**, v. 24, n. 4, p. 341–350, 2018.

KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, p.103 - 125, 1998.

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. 788–798, 2008.

KORVIN, D. et al. Banding Profile of Rep-PCR Experiments Differs With Varying Extension Times and Annealing Temperatures. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)**, v. 18, n. 115759662, p. 146–149, 2014. Disponível em: <https://www.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal_ungrad/JEMI/18/25.pdf>.

KRAMER, M. F.; COEN, D. M. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. A.3F.1-A.3F.14, 2001.

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. 7708–7716, 2010.

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. 379–392, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.021>>.

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

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖRNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 413–425, 1993

LOPEZ, A. S. **The contribution of volatile compounds to the flavour of chocolate and their development during processing**. 1974. Tese. Faculty of Agriculture. The University of West Indies. St. Augustine.

LPSN, List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/lactobacillus.html>> Acesso em: 20/08/2019.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4525–4529, 1992.

MADIGAN, Michael T. et al. Metabolismo microbiano. In: **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: ArtMed, 2016. p. 73-106. 14 ed.

MAGALHAES, J. G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S. E. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 2, p. 106–115, 2007.

MCDONALD, I. J.; FRAZIER, W. C. Variation in morphology of colonies of lactobacilli. **J bacteriol.** v.61, n.5, p.627–637, 1951.

MCPHERSON, M.; MELLER, S. **PCR**. Nova York/Abingdon: Taylor & Francis, 2006. 278p. 2 ed.

MELO, T. A. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 1-2, 2016.

MIGUEL, M. G. da C. P. et al. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 362–369, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.076>>.

MISNAWI, M. et al. Improvement of Small Scale Cocoa Fermentation Using *Lactobacillus fermentum* as Starter Culture. **Pelita Perkebunan A Coffee and Cocoa Research Journal**, v.33, n.3, p.203-210, 2017.

MORAES, P. M. et al. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 109–112, 2013.

MOREIRA, B. S. et al. Marcadores moleculares para identificação e caracterização do potencial patogênico de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde e Biologia**, v.13, n.1, p.41-52, 2018.

NAJJARI, A. et al. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 342–351, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Glicólise, Gliconeogênese e a Via das Pentoses-Fosfato. In: **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 409-440. 6 ed.

NIELSEN, D. S. et al. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 271–284, 2005.

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. 168–186, 2007.

O'SULIVAN et al. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 50, p. 1- 9, 2009.

PAPALEXANDRATOU, Z. et al. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1326–1338, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>>.

PELT-VERKUIL, E. V.; BELKUM, A. V.; HAYS, J. P. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**. Springer Science & Business Media. v. 91, p. 399–404, 2008.

PEREIRA, G. V. de 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.

PESSOA, W. F. B. et al. *In Vitro* Activity of Lactobacilli with Probiotic Potential Isolated from Cocoa Fermentation against *Gardnerella vaginalis*. **BioMed Research International**, p. 1-10, 2017.

PLENGVIDHYA, V.; BREIDT, F.; FLEMING, H. P. Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, n. 3, p. 287–296, 2004.

POFFO, F.; SILVA, M. A. C. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. **Cienc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.31, n.2, p. 303-307, 2011.

PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, R. K. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. **Biomedical Journal**, v. 40, n. 5, p. 270–283, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.008>>.

QIN, X. W. et al. Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 10, p. 2261–2275, 2017.

QUIJADA, N. M. et al. Different Lactobacillus populations dominate in “Chorizo de León” manufacturing performed in different production plants. **Food Microbiology**, v. 70, p. 94–102, 2018.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9–17, 2002.

RIEDL, R. et al. Beer enemy number one: genetic diversity, physiology and biofilm formation of *Lactobacillus brevis*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 125, n. 2, p. 250–260, 2018.

ROCHA, I. S. et al. Prospecção tecnológica com o enfoque na produção e preparações de alimentos com aroma e sabor de café e cacau. **Revista GEINTEC**. v. 4, n. 4, p.1418-1425, 2014.

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

RYBERG, A. et al. Comparison of (GTG)₅-oligonucleotide and ribosomal intergenic transcribed spacer (ITS)-PCR for molecular typing of *Klebsiella* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 2, p. 183–188, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.019>>.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.

SAIKI, R. K. The design and optimization of the PCR. **PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification**, p. 7–16, 1989.

SAIK, R. K. et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v. 979, n. 239, p. 487-491, 1988.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350–1354, 1985.

SAITO, V. S. T. et al. Viability and Resistance of Lactobacilli Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, 2014.

SALES, L. A. T. Avaliação de *primers* universais bacteriano em PCR *in silico*. **Rev. Investig, Bioméd**, v.9, n.2, p.98-104, 2017.

SALIMATH, S. S. et al. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, v. 38, p. 757–763, 1995.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 2004. 633p. 3 ed.

SAMAH, A.O. et al. Fermentation Studies of Stored Cocoa Beans. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 9, p. 603-604, 1993.

SÁNCHEZ, J. et al. Predominance of *Lactobacillus plantarum* strains in peruvian amazonian fruits. **Polish Journal of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 127–139, 2019.

SANCHEZ, J.E. et al. A study of the yeast flora and the effect of pure culture seeding during the fermentation process of cocoa beans. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**. v.18, p. 69–75, 1985.

SANDHYA, M. V. S. et al. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *Food Science and Technology*. p. 1-35, 2015.

SARAVANAKUMAR, K. et al. Soil-microbial communities indexing from mangroves rhizosphere and barren sandy habitats. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 58–68, 2018.

SAWITZKI, M. C. et al. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Lactobacillus plantarum* ISOLADOS A PARTIR DA MICROBIOTA. p. 15–17, 2006.

SCHMIDT, F. L. et al. **Pré-processamento de frutas, hortaliças, café, cacau e cana-de-açúcar**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 153p.

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

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.

SERRA, J. L. Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. **Food Science and Technology**. v.106, p.229–239, 2019.

SIEZEN, R. J.; VAN HYLCKAMA VLIEG, J. E. T. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. SUPPL. 1, p. 1–13, 2011.

SILVA, D. et al. Colonização bacteriana de recém-nascidos prematuros. **GEPNEWS**, a.3, v.2, n.2, p.182-188, 2019.

SILVA-FILHO, E. A. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 88, p.13–23, 2005.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 591–610, 2005.

SO'AIB, M. S. et al. Phenolic content, antioxidant activity and biodiversity changes during spontaneous fermentation of carica papaya leaf. **Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)**. v.82, n.1, p.1–5, 2020.

SOUMAHORO, S. et al. Acetic acid bacteria (AAB) involved in cocoa fermentation from Ivory Coast: species diversity and performance in acetic acid production. **J Food Sci Technol**. p. 1-13, 2019.

SOUZA, M. H. L. et al. Diagnóstico e caracterização da mastite subclínica em duas propriedades leiteiras da região norte central do Paraná. **Rev. UNINGÁ Review**, v. 34, s.1, p. 11-11, 2019.

STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology**, v. 61, p. 33–49, 2017.

ŠVEC, P. et al. Identification of *Staphylococcus* spp. using (GTG)₅-PCR fingerprinting. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 451–456, 2010.

ŠVEC, P. et al. (GTG)₅-PCR fingerprinting of lactobacilli isolated from cervix of healthy women. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 1, p. 80–83, 2011.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In: DOYLE, P. M.; BEUCHAT, L. R. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, DC: ASM Press, 2007. p. 837-850. 3 ed.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic Fingerprint of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. **Meth. Mol. Cell Biol.** v. 5, p. 25-40, 1994.

VIEIRA, D. P. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. **Sites The Journal Of 20Th Century Contemporary French Studies**, p. 1–18, 1993.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry** 4th edition. River Street. Hoboken. 2011.

WANG, M. et al. Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.266, p.251–256, 2018.

WANG, Y.; CORRIEU, G.; BÉAL, C. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1, p. 21–29, 2005.

WILEY ONLINE LIBRARY. *Lactobacillus*. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm0060>> Acesso em: 20/08/2019.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing**. Boston: Kluwer, 1998. p.43-86.

YU, K.; PAULS, K. P. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.10, p. 2606–2606, 1992. doi:10.1093/nar/20.10.2606

ZANINI, S. F. et al. Identificação bioquímica e molecular de lactobacillus spp. isolados do íleo de frangos de corte tratados ou não com antimicrobianos. **Ciencia Rural**, v. 42, n. 9, p. 1648–1654, 2012.

ZHANG, T. et al. Determination of microbiological characteristics in the digestive tract of different ruminant species. **Microbiology Open**, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2019.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. v.20, n.2, p.176-183, 1994.