

VALDEIR VIANA FREITAS

**AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DO CAFÉ ARÁBICA COM USO DE  
CULTURAS STARTERS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F866a Freitas, Valdeir Viana, 1991-  
2018 Avaliação da fermentação do café arábica com uso de  
culturas *starters* / Valdeir Viana Freitas. – Viçosa, MG, 2018.  
vi, 46 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Monique Renon Eller.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 37-46.

1. Café. 2. Fermentação. 3. *Saccharomyces cerevisiae*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 663.13

VALDEIR VIANA FREITAS

**AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DO CAFÉ ÁRABICA COM USO DE  
CULTURAS STARTERS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de julho de 2018.

  
\_\_\_\_\_  
Wilton Soares Cardoso  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Mariane de Cássia Soares da Silva  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Lucas Louzada Pereira

  
\_\_\_\_\_  
Monique Renon Eller  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por me acompanhar neste longo caminho.

Agradeço a minha família por todas as orações, por estarem sempre ao meu lado me incentivando com a realização do meu sonho, em especial às minhas irmãs Nelina Freitas, Rosimere Silveira e Rosimeire Silveira (*in memoriam*).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento do projeto.

Ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Venda Nova do Imigrante por possibilitar minha pesquisa.

Ao Laboratório de Associações Micorrízicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio e auxílio à minha pesquisa, fornecendo os equipamentos e materiais necessários para o desenvolvimento da mesma.

Ao Laboratório de Química e Bíoquímica de Produtos Naturais da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio na realização das atividades e fornecimento de equipamentos.

À minha orientadora Monique Renon Eller, por todo apoio, paciência e conhecimento a mim concedido. Obrigada por cada palavra de apoio, por cada incentivo e por não me deixar desistir.

Ao coorientador Wilton Soares Cardoso, pela confiança e principalmente pelos ensinamentos e orientações que tornaram a pesquisa mais completa.

À coorientadora Marliane de Cássia Soares da Silva pelas orientações dadas, e principalmente pela disponibilidade de me ajudar sempre que precisei. De coração, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao coorientador Nélio José de Andrade pelos ensinamentos em sala de aula.

Aos bolsistas Matheus Aragão e Sandy Dias, por todas as vitórias e frustrações vividas juntos. Sem vocês eu não teria conseguido chegar tão longe. Obrigado de coração.

Ao pesquisador Jefferson Viktor de Paula Barros Baeta da Universidade Federal de Viçosa, pelo acompanhamento e conhecimento compartilhado.

A Lauane Nunes, grande amiga do mestrado, agradeço pela convivência e companheirismo, em especial, ao amigo e hoje considerado irmão, Leonardo Justino Carioca, companheiro de longas horas de conversas, ajudas e conselhos.

Aos meus amigos Patrick Scherzinger, Adassa Gama, Ludmylla Crepalde, Lídia Silveira, Mirian Pereira e Ana Lúcia por terem me acompanhado em toda caminhada, ofertando os melhores conselhos e principalmente por toda positividade que me passaram, amo vocês.

Aos integrantes e parceiros do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento do IFES- Campus Venda Nova do Imigrante, Alessandra Brioschi, Letícia Rolim, Lúzia Ferreira, Raíza Ester, Viviane Baptista e Weliton Barbosa, pela contribuição, convivência, aprendizado e amizade conquistada ao longo deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotécnicos e Fermentativos (LAPROBQI), Danilo Canettieri, Elizabeth Epalanga, Talita Amaral, Diene France e Jeniffer Martins pelo companheirismo e momentos de descontração.

**OBRIGADO.**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVO GERAL:</b> .....	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> .....	<b>2</b>
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
1.1. Origem e produção de café .....	3
1.2. Processamento e fermentação do café: bebida fina .....	4
1.3. Microrganismos presentes no café .....	8
1.4. Caracterização sensorial de cafés .....	11
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
2.1. Amostragem .....	12
2.2. Multiplicação e manutenção de leveduras .....	14
2.3. Multiplicação e manutenção de bactérias lácticas .....	14
2.4. Avaliação da dinâmica de microrganismos durante a fermentação .....	15
2.5. Avaliação das atividades enzimáticas aparentes no mosto durante a fermentação .....	15
2.6. Análise da variação de componentes no mosto e do café torrado e moído via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	17
2.7. Análise sensorial .....	17
2.8. Delineamento estatístico .....	18
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>19</b>
3.1. Sucessão de microrganismos durante a fermentação .....	19
3.2. Avaliação das enzimas hidrolíticas presentes no mosto durante a fermentação .....	24
3.3. Análise de compostos químicos nos mostos e no café torrado e moído .....	28
3.4. Teste afetivo de aceitação por escala hedônica .....	33
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>35</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>37</b>

## RESUMO

FREITAS, Valdeir Viana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Avaliação da fermentação do café arábica com uso de culturas *starters*.** Orientadora: Monique Renon Eller. Coorientadores: Marliane de Cássia Soares da Silva, Nélio José de Andrade e Wilton Soares Cardoso.

O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de leveduras e bactérias lácticas como culturas *starters* em processamento de café por via úmida. O café arábica foi colhido em duas propriedades rurais na cidade de Venda Nova do Imigrante no Estado do Espírito Santo, e foi inoculado com as seguintes culturas *starters*: *Saccharomyces cerevisiae* JP14 (FML) e *Pediococcus acidilactici* CCT 1622 (FBL). O controle (FN) não foi inoculado. A contagem da população microbiana, as atividades de enzimas hidrolíticas em espectrofotômetro e a avaliação dos ácidos orgânicos, etanol e glicose, quantificados por HPLC, foram realizadas para verificar as diferenças que ocorrem neste tipo de processamento. As análises sensoriais foram realizadas utilizando a Escala Hedônica de 9 pontos. No perfil dos microrganismos, as leveduras e mesófilos aeróbios estavam presentes durante toda a fermentação com contagens até  $10^4$  e  $10^7$  respectivamente, e houve predominância de leveduras em FML devido ao número de células inoculado. As atividades de enzimas amilolíticas, celulolíticas e pectinolíticas sofreram descréscimo no decorrer do período fermentativo. Etanol e os ácidos málico, propiônico e succínico não foram detectados em nenhum dos tratamentos, enquanto ácido cítrico e ácido láctico foram identificados em todos os tratamentos em ambas as propriedades, tanto nos mostos quanto nos grãos de cafés torrados e moídos. O café inoculado com *P. acidilactici* CCT 1622 (FBL) apresentou um sabor mais acentuado e agradável em relação a FN (controle) e FML, e obteve score entre gostei moderadamente a gostei muito, tal como avaliado pelos testes de aceitação utilizando provadores não treinados. O estudo evidenciou que o uso de culturas *starters* durante a fermentação do café contribuiu para a obtenção de uma bebida de qualidade com características sensoriais agradáveis.

## ABSTRACT

FREITAS, Valdeir Viana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018.  
**Evaluation of the fermentation of arabica coffee with starter cultures.**  
Advisor: Monique Renon Eller. Co-advisors: Marliane de Cássia Soares da Silva,  
Nélio José de Andrade and Wilton Soares Cardoso.

The objective of this study was to evaluate the use of yeasts and lactic acid bacteria as starter cultures in wet coffee processing. The Arabica coffee was harvested at two rural properties in the city of Venda Nova do Imigrante in the State of Espírito Santo and was inoculated with the following starter cultures: *Saccharomyces cerevisiae* JP14 (FML) and *Pediococcus acidilactici* CCT 1622 (FBL). The control (FN) was not inoculated. The plate count was used to evaluate the microbial population, the activity of hydrolytic enzymes in a spectrophotometer, and the organic acids, ethanol and glucose were quantified by HPLC. The sensorial analyzes were performed using the Hedonic Scale of 9 points. Aerobic yeasts and mesophiles were present throughout the fermentation with counts up to  $10^4$  and  $10^7$  respectively, and there was a predominance of yeasts in MLF due to the number of cells inoculated. The activities of amylolytic, cellulolytic and pectinolytic enzymes decreased during the fermentation period. Ethanol and malic, propionic and succinic acids were not detected in any of the treatments, whereas citric acid and lactic acid were identified in all treatments in both properties, both in the must and in the roasted and ground coffee beans. The coffee inoculated with *P. acidilactici* CCT 1622 (FBL) showed a more pronounced and pleasant flavor in relation to FN (control) and FML, and obtained a score between moderately liked and very liked, as assessed by acceptance tests using untrained tasters. The study evidenced that the use of starter cultures during the coffee fermentation contributed to obtain a quality drink with pleasurable sensorial characteristics.

## INTRODUÇÃO

O café é uma das mais populares e apreciadas bebidas não alcoólicas de consumo global. A produção total mundial de café foi estimada em 159.663 milhões de sacas em 2017, sendo o Brasil o maior produtor mundial e exportador de café (51.000 milhões de sacas), seguido pelo Vietnã, Colômbia, Indonésia, Honduras, Etiópia, Índia, Uganda e outros 56 países (OIC, 2018). Nosso país também se destaca por ser o segundo maior consumidor de café, precedido somente pelos Estados Unidos (COLTRO, et al., 2006). Duas espécies de café dominam o mercado mundial: *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora* (robusta/conilon) (LAHIS et al., 2018).

Ambas as espécies após a colheita são processadas e em seguida secas até atingirem 11-12% de umidade, período durante o qual podem ocorrer transformações na polpa e mucilagem, durante períodos de até 20 dias (ESQUIVEL E JIMÉNEZ, 2012). As características intrínsecas do grão, como umidade, defeitos, tamanho do grão e presença de compostos químicos, assim como a forma de processamento, definem a qualidade do café (ALVES et al., 2009; RUTH et al., 2013). A presença de microrganismos durante o processamento pode interferir com algumas destas características, pois eles transformam a polpa e a mucilagem, produzindo álcoois, ácidos e outros compostos metabólicos que interferem na qualidade final da bebida (LEROY et al., 2006).

Vários microrganismos já foram isolados durante o processo de fermentação do café, dentre os quais podemos destacar os gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* e *Weissella*, além das leveduras *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora* e *Kluyveromyces* (SILVA et al., 2008 e VILELA et al., 2010). Entretanto, a sucessão microbiana ao longo do processo de fermentação espontânea ainda não está elucidada, nem a microbiota que pode estar agregando ou desvalorizando a qualidade final da bebida, especialmente para os cafés cultivados na região serrana do Espírito Santo, assim como os processos de obtenção da bebida fermentada por microrganismos *starters*. A definição dos processos para produção de cafés fermentados agregaria valor ao produto e permitiria a padronização de sabor entre diferentes lotes.

Neste sentido, a finalidade desse trabalho é padronizar um processo biotecnológico utilizando culturas *starters* para a fermentação de grãos de café tipo arábica, com vista a padronizar a produção de cafés bebida fina e obter novos perfis de sabor.

### **OBJETIVO GERAL:**

Verificar o efeito do uso de culturas *starters* sobre as características do café tipo arábica.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Realizar a fermentação espontânea de café de duas propriedades da região serrana do Espírito Santo;
- Realizar a fermentação induzida com culturas *starters* em duas propriedades da região serrana do Espírito Santo;
- Analisar a sucessão enzimática e microbiológica predominante nas fermentações;
- Determinar a variação das concentrações de glicose, etanol e ácidos orgânicos nos mostos da fermentação e nos grãos torrados e moídos;
- Avaliar a qualidade sensorial dos cafés fermentados.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### CAFÉ

O café é uma planta perene de porte arbustivo, pertencente à família *Rubiaceae*, produtora de frutos tipo baga, contendo, normalmente, duas sementes. As sementes depois de processadas adequadamente, são consumidas na forma de infusão. Além de apresentar aromas e sabores característicos, a bebida do café é nutritiva e estimulante (BORÉM, 2008).

#### 1.1. Origem e produção de café

O café tem origem africana, tendo sido inicialmente encontrado na Etiópia, sendo cultivado no local até hoje. Porém, credita-se aos árabes do Yêmen a propagação da cultura do café para o restante do mundo. (PIMENTA, 2003). O processo de torramento do grão de café foi realizado pela 1ª vez no século XVI, na Pérsia, seguindo depois para a África e Europa. A chegada do café ao Brasil se deu em 1727 por Francisco Mello Palheta. Exportado da Guiana Francesa, o fruto se adequou com facilidade ao clima tropical e rapidamente ganhou importância na economia nacional (UKERS, 1922). As primeiras plantações foram realizadas no Estado do Pará, e logo depois no Maranhão. Em seguida o cultivo expandiu para demais localidades como Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais (FERRÃO, 2004; MATIELLO et al., 2008).

Devido ao consumo elevado e popularidade da bebida, atualmente o café é uma das culturas mais importantes do mundo. Duas espécies de café dominam o mercado mundial: *Coffea arabica* (arábica) e *C. canephora* (robusta)/conilon (CARVALHO et al., 1997). O Brasil é o maior produtor, com produção estimada em 51.000 milhões de sacas em 2017, seguido pelo Vietnã, Colômbia, Indonésia, Honduras, Etiópia, Índia, Uganda e outros 56 países (OIC, 2018). Os cafés arábica e robusta representam 76,4% e 23,6% da produção mundial, respectivamente (CONAB, 2018). O arábica é mais valorizado economicamente por seu aroma e sabor (ALVES et al., 2009). O robusta, apesar de menos valorizado, é utilizado no processo de fabricação de café solúvel, sendo este de

consumo elevado, especialmente no mercado norte-americano e europeu (ILLY et al., 1996).

O café arábica apresenta sabor suave e aromático, sendo uma espécie complexa geneticamente (CARRERA et al., 1988). Ele se destaca por ser uma planta delicada com desenvolvimento próspero em regiões com altitudes elevadas (acima de 800 m), com grãos de coloração esverdeada, além de fornecer um café de qualidade sensorial, apresentando aromas finos e requintados (ROSSETTI, 2007).

O café robusta apresenta um sabor amargo e adstringente, sendo destacado como café de sabor único e típico. O café robusta apresenta qualidade inferior frente ao café arábica, por possuir um nível maior de cafeína e sólidos solúveis. Caracteriza-se por apresentar uma baixa acidez, daí sua empregabilidade no uso para o preparo de café solúvel (BORÉM et al., 2006; RUBAYIZA et al., 2005).

## 1.2. Processamento e fermentação do café: bebida fina

O café é composto por carboidratos, óleos, proteínas e ácidos (FAN et al., 2003). A sua composição define a qualidade da bebida. Vários fatores podem influenciar essa composição, como as etapas de colheita e pós colheita, processamento, altitude, clima, umidade e variedade do café (CARVALHO et al., 1997). Para obtenção da bebida fina, a sua colheita deve ser realizada no estágio inicial de maturação, sendo seletiva para obtenção de cafés totalmente maduros, que asseguram homogeneidade na composição química e no teor de água (BORÉM, 2008, MATIELLO et al., 2010).

**Tabela 1.** Principais constituintes do grão do café arábica.

<b>Constituintes do grão</b>	<b>Teor presente no grão seco (%)</b>
<b>Carboidratos</b>	60
<b>Óleos</b>	13
<b>Proteínas</b>	13
<b>Ácidos</b>	8,2
<b>Cafeína</b>	1,0

Fonte: HOFFMANN, 2001.

Após a colheita, os grãos de café podem ser separados de acordo com o estágio de maturação, conferindo homogeneidade ao lote quanto à maturação dos grãos recém colhidos. A forma de processamento pós colheita dos grãos de café impacta nas características sensoriais da bebida, e normalmente no Brasil três métodos de processamento são utilizados para a produção do café: o processo seco, semi-seco e úmido (ESQUIVEL et al., 2012; PIMENTA, 2003).

No método de processamento seco, o fruto inteiro recém-colhido, após colheita e remoção das folhas, terra, gravetos é seco em plataformas, e então os grãos de café são submetidos a descascamento e polimento (remoção da camada de casca que cobre os grãos de café secos) (WEI et al., 2015). No método semi-seco, a casca de café, a polpa e uma parte ou toda a mucilagem são removidas mecanicamente e em sequência são conduzidos a secagem (BRANDO et al., 2014). A quantidade de mucilagem removida depende da característica da máquina utilizada. No método úmido, a casca e a polpa são removidas mecanicamente, deixando a mucilagem aderida aos grãos (WEI et al., 2015). Estes cafés são transferidos para tanques com água onde ocorrem transformações durante um período de tempo considerado ideal (0-48 h), dependendo da temperatura. Durante esse processo a mucilagem remanescente é transformada e solubilizada. Os grãos são então removidos dos tanques e secos (SILVA, 2014).

O processamento por via seca é relativamente simples e requer pouco maquinário, pois o despulpamento é natural (SILVA et al., 2000). Neste processo a retirada da mucilagem ocorre sem a utilização de tanques de fermentação, ou seja, ocorre diretamente sobre uma plataforma (VILELA et al., 2010), motivo pelo qual o café originado desse processo é denominado de plataforma (SILVA et al., 2000). O processo de secagem ao sol é realizado em aproximadamente quatro semanas, até que os grãos atinjam 12% de umidade (SCHWAN et al., 2003). Caso haja necessidade de realização da secagem em tempo menor, os grãos podem ser submetidos a secadores mecânicos após serem expostos ao sol (SILVA et al., 2000).

O estado de Minas Gerais produz cerca de 50% de todo o café no Brasil, dos quais 85% são processados por via seca. Na última década, os produtores de café das regiões sul e central de Minas Gerais passaram a processar o café via fermentação úmida (Sindcafé-Mg, 2014). O processamento via seca dá

origem a um café com uma composição e características sensoriais diferentes do café processado pelos métodos semi-seco ou úmido e consiste em uma alternativa utilizada pelo produtor para se adequar a diferentes mercados.

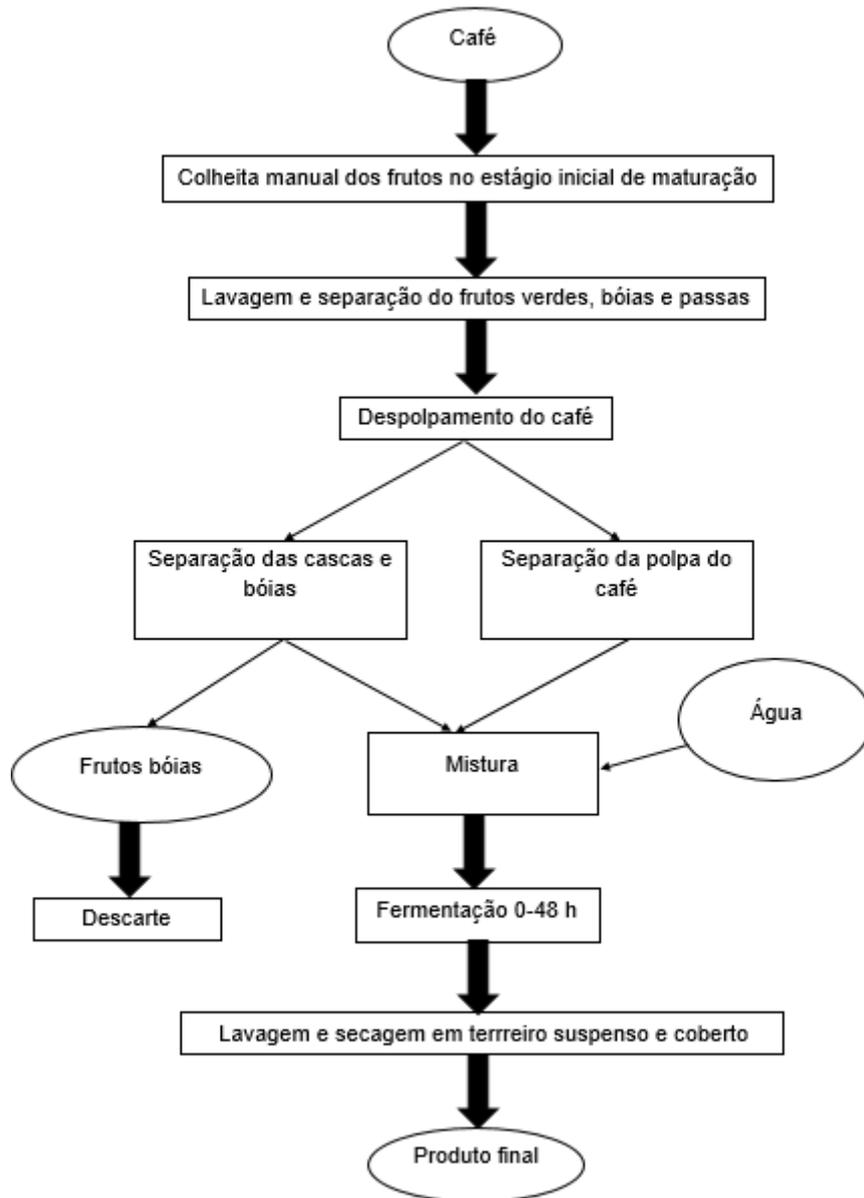
Já o processamento do café por via úmida (Figura 1), inclui as etapas de colheita dos grãos; lavagem e seleção dos grãos flutuantes, os quais serão processados separadamente; descascamento, despulpamento ou desmucilagem dos frutos; fermentação ou uso de enzimas comerciais ou substâncias químicas para retirada da mucilagem aderida ao grão; lavagem para remoção do restante da mucilagem e secagem e beneficiamento dos grãos (BORÉM et al., 2006). O processamento do café pela via úmida surgiu por uma necessidade prática, e não como alternativa para modificar a bebida do café. À medida que o café arábica, originário de clima subtropical, passou a ser plantado em áreas tropicais, verificou-se a ocorrência de um intenso processo fermentativo dos frutos cerejas imediatamente após a colheita, com reflexo negativo na qualidade do produto final. A fim de evitar a ocorrência desse tipo de fermentação, a remoção do mesocarpo, rico em açúcar, passou a ser realizada (BORÉM et al., 2006). Assim, a fermentação orientada do café nesse processo tem como objetivo original facilitar a remoção da camada de mucilagem da semente (BRANDO et al., 2014).

Vários contextos justificam a utilização do método de processamento por via úmida por resultarem numa melhoria da otimização dos grãos pós-colheita e na fermentação espontânea (BORÉM et al., 2006). Uma das justificativas para o emprego do processamento por via úmida na obtenção de cafés cereja descascado consiste na redução da área ocupada nas plataformas de cimento (terreiro). Isso otimiza o uso de secadores mecânicos devido à retirada da casca e à diminuição dos custos de processamento e de secagem (BORÉM et al., 2006).

O emprego do processamento por via úmida na maioria das vezes auxilia na otimização do espaço. Essa técnica, sem a fase de fermentação (apenas o processo de despulpamento), atua como medida preventiva, agilizando o processo de secagem com a retirada da casca ou como ação corretiva para reduzir falhas existentes na colheita ou na infraestrutura (SANTOS et al., 2009).

O processamento por via úmida proporciona melhor preservação das qualidades intrínsecas do café e a obtenção de lotes mais homogêneos e com menor número de defeitos. Além disso, o produto final preparado por via úmida

e semi-seca apresenta melhor qualidade em relação ao preparado via seca (ICO, 2008).



**Figura 1.** Esquema de processamento do café pelo processo úmido

(Borém, 2008; Nobre, 2009 Adaptado)

Os cafés da Colômbia, México e Quênia são processados por via úmida, o que, normalmente propicia a obtenção de bebida suave (CORTEZ, 1993). Além disto, o processamento via úmida tem por vantagens a redução da quantidade de produto a ser seco, do tempo de secagem e dos gastos enérgicos (BICUDO, 1962; BORÉM, 2004; BRANDO, 1999), proporciona maior uniformidade e redução na multiplicação de microrganismos, assim como proporciona maior controle na qualidade do grão de café (RIBEIRO et al., 2009).

O método empregado no processamento do café define as alterações dos componentes do grão, o que está estritamente relacionado à qualidade final da bebida (BORÉM et al., 2006).

### 1.3. Microrganismos presentes no café

Durante o processamento do café, diversos microrganismos naturalmente presentes no grão utilizam os compostos da polpa e mucilagem como nutrientes durante os estágios de fermentação. Ácidos orgânicos e outros metabólitos são secretados e podem interferir nos atributos sensoriais finais da bebida (SILVA, 2014). A microbiota presente nesse processo pode variar de acordo com vários fatores, tais como as características regionais, composição do fruto do café e o método de fermentação. Portanto, é de suma importância conhecer a microbiota presente durante o processamento do café, especialmente na seleção de culturas *starters* que podem ser utilizadas na produção de produtos finais diferenciados (MASOUD et al., 2006; MASSAWE, et al., 2010; RIBEIRO et al., 2018).

Considerando que os grãos de café fornecem uma grande variedade de substratos (açúcares, lípidos, cafeína, ácido clorogênicos e outros), é recorrente o desenvolvimento de uma microbiota diversa e complexa, incluindo fungos filamentosos, especialmente *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e também leveduras, bactérias lácticas e bactérias pectinolíticas (CARVALHO et al., 1997; SILVA et al., 2008; SCHWAN et al., 2003).

Em geral, nas etapas iniciais do processo fermentativo a população de bactérias é maior do que a de leveduras, independentemente do tipo de processo empregado. Os gêneros bacterianos mais comuns durante a fermentação do café são *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* e *Weissella* (ARUNGA 1982; MASOUD et al., 2004; SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010). O número de leveduras tende a aumentar durante a fermentação/secagem e pode atingir valores maiores do que a população bacteriana. *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora* e *Kluyveromyces* são os gêneros de leveduras mais comumente encontrados (AGATE et al., 1966; VAN PEE et al., 1972; e SILVA et al., 2000). Os fungos

filamentosos são geralmente encontrados em quantidades menores e são observados em maiores quantidades durante a secagem e armazenamento. Esta microbiota natural dos grãos de café vem sendo estudada e empregada como promissora na fermentação de café por culturas *starters* (RIBEIRO et al., 2018).

Silva et al. (2013) utilizaram cepas dos mesófilos aeróbios *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, bem como algumas cepas de leveduras *C. parapsilosis*, *P. guilliermondii* e *S. cerevisiae* isoladas do café arábica do processo úmido e semi-úmido para verificar o desempenho na fermentação induzida, e observaram que todos os inóculos estudados se destacaram promissores na desmucilagem de café, melhorando assim a qualidade da bebida.

As culturas *starters* têm se mostrado de grande importância para produção de fermentados objetivando-se a obtenção de produtos com qualidade sensorial diferenciada. Este processo consiste na seleção de microrganismos que são inoculados diretamente na matéria-prima e que possam predominar sobre a microbiota existente e promover alterações desejáveis no produto (CAPLICE et al., 1999).

Diversos microrganismos têm sido amplamente utilizados como culturas *starters*, principalmente as bactérias do ácido láctico pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*, na elaboração de alimentos fermentados (BUCKENHUSKES, 1993; SANDINE, 1996). Porém, recentemente o emprego de leveduras vem sendo difundido. A espécie mais utilizada é a *S. cerevisiae*, empregada na produção de várias bebidas devido à sua capacidade de produzir rapidamente compostos aromáticos durante o processo fermentativo (SANDINE, 1996).

A *S. cerevisiae* é um microrganismo aeróbio facultativo que se reproduz assexuadamente sendo a temperatura ótima de seu crescimento entre 20 e 30°C, com o pH entre 4,5 e 5,5 (DUJON et al., 2017). A *S. cerevisiae* é a espécie mais explorada comercialmente dentre as leveduras e apresenta grande emprego na indústria, para fabricação de vários produtos (RAI et al., 2019). As bactérias lácticas também são utilizadas para meios fermentativos, uma espécie é *P. acidilactici*, um microrganismo gram positivo, anaeróbico facultativo, homofermentativo, que pode crescer em uma ampla faixa de pH (pH ótimo 6,2), temperatura e pressão osmótica, podendo colonizar o trato digestivo. E estudos

recentes tem verificado o seu potencial uso como probiótico (TAKATA et al., 2011).

Para melhorar a qualidade do processo de fermentação e qualidade sensorial da bebida, culturas *starters* à base de leveduras que secretam enzimas pectinolíticas também têm sido aplicadas durante a fermentação do café (SCHWAN et al., 2003).

A presença de enzimas e microrganismos nos grãos leva a alterações bioquímicas dos seus componentes, as quais podem beneficiar ou depreciar a bebida. Várias enzimas estão presentes no café, principalmente polifenoloxidasas, proteases e lipases, as quais estão ligadas à oxidação dos grãos, processo este que, quando ocorre de forma controlada, favorece a qualidade da bebida (SAATH, 2010). Estas enzimas são constituintes do próprio grão ou de origem microbiana e aplicadas na degradação de diversas substâncias, principalmente na mucilagem de café (AMORIM et al., 1977; GUPTA et al., 2014). Outras enzimas envolvidas no processo fermentativo do café são as pectinolíticas e as celulolíticas (HIKICHI et al., 2017).

A utilização de culturas *starters* de microrganismos previamente selecionados e com produção de enzimas hidrolíticas em processos fermentativos pode melhorar a qualidade dos alimentos fermentados, proporcionando controle de fermentação e padronização do produto final (KWON, 2018; TAMANG, 2014).

A adição de enzimas no processamento de café, principalmente as pectinolíticas possuem a capacidade de acelerar o processo, porém é um tratamento caro, sendo importante o estudo de microrganismos que secretam essas enzimas em quantidades adequadas, para que possam ser adicionadas por aspersão acelerando o processo e trazendo outros benefícios (SCHWAN; WHEALS, 2003).

Dessa forma, o conhecimento sobre os microrganismos e enzimas atuantes na fermentação do café, bem como a seleção de culturas *starters* podem possibilitar a produção de uma bebida com características sensoriais diferenciadas.

#### 1.4. Caracterização sensorial de cafés

A classificação da bebida (Tabela 2 e 3) é realizada por provadores treinados, especialistas com Q-Grader Coffee Certificate, e requer alto grau de conhecimento, prática, paladar apurado e boa memória, com finalidade de ter a percepção de variações que ocorrem na qualidade do café (SCA, 2012).

**Tabela 2.** Classificação Brasileira de café pela bebida.

<b>Classificação</b>	<b>Características sensoriais</b>
Estritamente mole	Apresenta todos os requisitos da bebida mole, mas de forma mais acentuada.
Mole ou fina	Sabor e aroma suave adocicado
Apenas mole	Sabor levemente doce e suave, sem adstringência ou aspereza no paladar
Dura	Sabor adstringente e gosto aspéero
Riada	Leve sabor de iodofórmio
Rio	Cheiro e gosto acentuados de iodofórmio
Rio zona	Sabor e odor desagradáveis, bem mais acentuadas que as bebidas rio

Fonte: BRASIL, 2003.

**Tabela 3.** Classificação dos cafés de acordo com a pontuação SCA.

<b>Pontuação Total</b>	<b>Descrição Especial</b>	<b>Classificação</b>
90 – 100	Exemplar	SpecialtyRare (Especial Raro)
85 - 89,99 (Abaixo de 90)	Excelente	SpecialtyOrigin (Especial Original)
80 - 84,99 (Abaixo de 85)	Muito Bom	Premium
80 (Abaixo de 80)	Abaixo da Qualidade Specialty	Abaixo de Premium

Fonte: SCA (Special Coffee Association), 2012.

A análise sensorial é o método de determinação mais utilizada no processo de caracterização quantitativa do café, sendo o aroma, acidez, amargor, corpo, sabor, doçura e impressão global da bebida os principais atributos sensoriais a serem analisados, já que a qualidade do café é definida pela medida da intensidade e equilíbrio destes atributos (BICHO et al., 2013; TOLESSA et al., 2016). Porém, do ponto de vista do consumidor, o café é

considerado especial quando é percebido e valorizado segundo um conjunto de características únicas que o diferenciam de outros cafés convencionais (CBI, 2014; PONTE, 2002).

Desta forma, testes sensoriais são realizados para determinar diferentes características entre amostras, como descrever as notas de atributos e conseqüentemente determinarem a preferência entre produtos semelhantes. (BOUILLÉ et al., 2016; MAURICE, 2017; SANTOS et al., 2012).

Como descrito pela metodologia SCA (Special Coffee Association), para análise sensorial de café são utilizados provadores treinados com certificação q-grader (SCA, 2009; TED et al., 2017). Entretanto, quando se deseja medir as atitudes subjetivas do julgador no intuito de obter a opinião de um consumidor em relação ao café e outros produtos, são utilizados métodos afetivos (LELOUP et al., 2005; ROGERS, 2018).

Devido ao fato da análise sensorial do café ser uma classificação subjetiva, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de relacionar as características sensoriais da bebida com as análises microbiológicas, químicas e físico-químicas com o objetivo de auxiliar a análise sensorial (LEHOTAY et al., 2002). Da mesma forma, portanto, busca-se entender como as transformações ocorridas durante a fermentação do café afetam sua composição e, conseqüentemente, sua aceitação pelo consumidor.

Neste contexto, o objetivo principal do presente estudo foi realizar a fermentação espontânea e com culturas *starters* e entender as alterações ocorridas durante o processo, assim como sua influência na aceitação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostragem**

Os cafés da variedade Catuaí Vermelho foram colhidos no estágio inicial de maturação em duas propriedades rurais da região serrana do Espírito Santo: uma propriedade a 900 m, na cidade de Venda Nova do Imigrante (localização geográfica 20°25'21.3"S e 41°10'09.3"W), e outra a 1200 m, situada na cidade

de Afonso Cláudio (Pontões) (localização geográfica 20°11'12.2"S e 41°02'07.1"W). A coleta dos frutos foi realizada no período de julho a agosto de 2017. Houve uma seleção dos frutos na qual os cafés bóias e verdes foram descartados, não sendo considerados no processamento.

As matérias primas utilizadas na formulação dos mostos foram compostas por: polpa/casca de café, água e inóculos. Foram colhidos 20 kg de café por parcela experimental em ambos os experimentos. Após a colheita, os frutos foram processados por via úmida. Foram realizados os seguintes processos:

a) Fermentação espontânea (FN) (Controle): 2 kg de café cereja descascado, 2 kg de casca/polpa e 2 L de água, na proporção 1: 1: 1;

b) Fermentação malte (enzimas hidrolíticas) e levedura (FML): 500 mL de meio YEPG de cultura com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP14, previamente isolada de fontes apícolas, à aproximadamente  $10^7$  células/mL, 2 kg de grãos de café cereja descascado, 2 kg da casca/polpa e 1% m/v de malte previamente diluído em 2 L de água à temperatura de 40°C;

c) Fermentação bactéria láctica (FBL): 500 mL de meio MRS com a bactéria láctica *Pediococcus acidilactici* CCT 1622, à aproximadamente  $10^7$  células/mL, 2 kg de grãos de café cereja descascado, 2 kg da casca/polpa e 2 L de água;

As fermentações foram realizadas na parte externa do Laboratório de Qualidade do Café do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), campus Venda Nova do Imigrante, por 24 h.

Alíquotas das amostras foram retiradas nos tempos 0, 3, 6, 12 e 24 h e armazenadas a -18°C para o acompanhamento do perfil microbiológico (item 2.4); perfil enzimático (item 2.5); e presença de glicose, ácidos orgânicos e etanol (item 2.6).

Depois da fermentação os grãos foram secos em terreiros suspenso até a umidade padrão de 12% para estocagem segura para subsequente beneficiamento. Após o beneficiamento, os grãos secos foram torrados utilizando o torrador Laboratto TGP-2, com acompanhamento do conjunto de discos Agrtron-SCAA, e o ponto de torra destas amostras situou-se entre as cores determinadas pelos discos #65 e #55, para cafés especiais (SCA, 2012). Todas as amostras foram torradas entre 8-10 min e, após a torrefação e o resfriamento, as amostras permaneceram lacradas, conforme a metodologia de análise

sensorial estabelecida pela SCA. As amostras de cafés foram moídas com moedor elétrico Bunn G3, com granulometria média/grossa.

Foram retiradas 5 g do grão de café torrado e moído e também realizada a verificação análise do teor de glicose, ácidos orgânicos e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (item 2.6).

Separou-se uma parte das amostras para as análises sensoriais. No preparo para degustação foi adotada a concentração de 8,25 g de café moído em 150mL de água. O ponto de infusão de água foi realizado após a água atingir 92-94°C (item 2.7).

## **2.2. Multiplicação e manutenção de leveduras**

Alíquotas de 50 µL da levedura *S. cerevisiae* JP14 foram cultivadas em meio YEPG líquido (0,5% m/v de extrato de levedura, 1% m/v de peptona e 2% m/v de glicose). As leveduras foram concentradas por meio de centrifugação e ressuspensão em metade do volume inicial. A ressuspensão foi realizada em YEPG líquido adicionado de glicerol 15% (v/v) como crioconservante. Os estoques foram congelados a -80 °C para armazenamento em longo prazo, e a -20 °C para ativação de rotina.

Os isolados foram previamente ativados em meio YEPG 2% líquido a 25 °C por 12 h seguido de centrifugação a 2.236 xg por 10 min a 4 °C e ressuspensão no meio a ser testado, na concentração inicial de aproximadamente 10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>.

## **2.3. Multiplicação e manutenção de bactérias lácticas**

A bactéria láctica *P. acidilactici* CCT1622 foram cultivadas em meio MRS líquido (5,42% m/v de meio MRS (Sigma), 0,1% m/v de polissorbato 80% e 4% m/v de nistatina), e concentradas por meio de centrifugação e ressuspensão em metade do volume inicial. A ressuspensão foi realizada em MRS líquido adicionado de glicerol 25% (v/v) como crioconservante. Os estoques foram

congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para armazenamento em longo prazo, e a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para ativação de rotina.

Para cada teste, os isolados foram previamente ativados em meio MRS líquido a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 h seguido de centrifugação a  $2.236\text{ x.g}$  por 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e ressuspensão no meio a ser testado, na concentração inicial de aproximadamente  $10^7$  células/ $\text{mL}^{-1}$ .

#### **2.4. Avaliação da dinâmica de microrganismos durante a fermentação**

##### - Contagem de leveduras

Para a contagem e isolamento das leveduras, 5 mL de mosto foram diluídos em 45 mL de solução salina estéril (0,85% m/v NaCl). A partir da solução inicial ( $10^{-1}$ ) foram feitas diluições ( $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ ), as quais foram plaqueadas em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) contendo ácido tartárico a 10% (m/v). As placas foram incubadas a  $25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h.

##### - Contagem de mesófilos

Para determinação do número de mesófilos, 1 mL de cada diluição foi plaqueado em meio PCA (Peptona de caseína 5 g/L; Extrato de levedura 2,5 g/L; D glucose 1 g/L; agar-agar 14 g/L) por espalhamento. As placas foram incubadas a  $25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h (PICOLI et al., 2006).

#### **2.5. Avaliação das atividades enzimáticas aparentes no mosto durante a fermentação**

##### - Avaliação da atividade aparente de amilase no mosto

Foi realizada uma curva-padrão utilizando glicose entre 0,2 e 2  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor em 1 min sob as condições do teste (ALI et al., 2015).

A quantidade de amilases foi avaliada como descrito por Verma et al (2000) e Miller (1959) com modificações. Todas as amostras foram centrifugadas a  $10000\text{ x.g}$ . A quantidade de amilases em cada amostra foi estimada pela quantificação de açúcares redutores liberados a partir do amido solúvel. Uma mistura contendo 500  $\mu\text{L}$  de substrato (solução 1% de amido solúvel em tampão acetato 0,2 M em pH 5,0) e 20  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático (ou tampão, no caso do branco) foi incubada a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min. O branco foi realizado adicionando-se o tampão em substituição ao extrato. Em seguida foram adicionados 1 mL do reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e a mistura foi aquecida em banho-

maria a 100°C/5 min, seguido por resfriamento. A leitura da absorvância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

#### **- Avaliação da atividade aparente de celulase no mosto**

A atividade de celulase foi determinada pela quantificação da liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de carboximetilcelulose (GHOSE, 1987). Uma mistura de 500µL de solução de substrato 1% (m/v) preparado em tampão citrato 50 mM pH 4,8 e 20 µL do extrato enzimático (ou tampão, em caso de branco) foi incubada a 50 °C durante 10 min. O branco foi realizado adicionando-se o tampão em substituição ao extrato. Transcorrido este período, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado à mistura e esta deixada em 100° durante 5 min. Logo após, as amostras foram resfriadas por 5 min, e a absorvância medida a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por min sob as condições de ensaio.

#### **- Avaliação da atividade aparente de pectinase no mosto**

A atividade de pectinase da amostra foi analisada pelo método de Pitt (1988), modificado por Kashyap et al., (2000). A quantificação foi realizada a partir de 50 µL do extrato enzimático, o qual foi adicionado a 500 µL de solução de pectina cítrica 1% (v/v) preparada em tampão citrato 50 mM pH 4,8. O branco foi realizado adicionando-se o tampão em substituição ao extrato. As amostras foram incubadas a 40 °C, por 5 min. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à mistura e esta deixada em ebulição em banho-maria durante 5 min. A mistura foi aquecida em banho-maria a 100 °C por 30 min, sendo posteriormente resfriada à temperatura ambiente. A absorvância da solução foi lida a 540 nm e a atividade de pectinase (U) foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por min sob as condições de ensaio.

## **2.6. Análise da variação de componentes no mosto e do café torrado e moído via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Uma quantidade de 5 mL de mosto no período inicial e final da fermentação de café foram colhidas. As alíquotas foram filtradas diretamente através de papel filtro qualitativo de 14 µm utilizando bomba a vácuo. Em seguida, estas amostras foram novamente filtradas através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 µm e injetadas (20 µL) na coluna cromatográfica.

Uma quantidade de 5 g de cada amostra do pó de café foi diluída em 10 mL de água Milli-Q e os fluidos foram centrifugadas a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C (SILVA et al., 2008). As amostras foram filtradas através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 µm e injetadas (20 µL) na coluna cromatográfica.

Os compostos glicose, etanol, ácido cítrico, ácido láctico, ácido propiônico, ácido málico, ácido succínico, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia adaptada de Vitorino et al. (2001). A determinação desses compostos foi realizada em cromatógrafo da marca Shimadzu, com sistema de detecção por arranjo de diodos (modelo SPD-M10A), coluna cromatográfica Discovery C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), comprimento de onda de 272 nm. A fase móvel constituiu-se de metanol: água: ácido acético (20:80:1), com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Para a identificação e análise quantitativa, foi elaborada curva-padrão, utilizando-se padrões de etanol, glicose, ácido cítrico, ácido láctico, ácido propiônico, ácido málico e ácido succínico.

Os compostos foram identificados por comparação de seus tempos de retenção com os tempos de retenção dos padrões certificados. A quantificação dos álcoois, açúcares e ácidos foi realizada utilizando curvas de calibração obtidas a partir de substâncias de referência (DUARTE et al., 2009).

## **2.7. Análise sensorial**

O teste sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), nº 89966718.8.0000.5153 pela Universidade Federal de Viçosa - UFV.

Foi aplicado um formulário verificando o consumo diário por xícara de café entre os provadores (ABIC-Associação Brasileira da Indústria de Café, 2008; ARRUDA et al., 2009) (ANEXO 1).

A metodologia aplicada para avaliar as características sensoriais dos cafés foi realizada medindo a impressão global com base na escala hedônica.

O teste sensorial foi realizado em dois turnos diferentes e contou com a participação de dois grupos de provadores, onde metade realizou os testes no período matutino e outro vespertino, contendo 50 voluntários cada.

### **- Teste afetivo de aceitação por escala hedônica**

Foram utilizados 100 provadores voluntários não treinados (dentre homens e mulheres acima de 18 anos), os quais avaliaram quatro amostras de café cada um. O critério de inclusão dos indivíduos que participaram da pesquisa foi o hábito de consumir a bebida, e os critérios de exclusão foram a alegação de não ter o hábito de consumir café e/ou apresentar sintomas desagradáveis após a ingestão da bebida. Conforme escrito por Lúcia et al. (2013), as amostras foram servidas de forma monádica aos consumidores em cabines individuais e avaliadas utilizando a escala hedônica que variava de 1 a 9 pontos, na qual 1 corresponde a “desgostei extremamente” e 9 a “gostei extremamente” (ANEXO 2).

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), seguido de comparação entre médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) com o auxílio do programa ASSISTAT 7.7 PT (SILVA, 1996) visando determinar se os cafés apresentaram aceitação.

## **2.8. Delineamento estatístico**

Foi conduzido um experimento segundo o delineamento inteiramente casualizados (DIC), sendo os tratamentos dispostos em esquema fatorial 2 altitudes, 3 tipos de fermentação (total de 6 tratamentos) e 3 repetições a fim de comparar as médias da população entre os grupos microbianos em cada período de fermentação. Para a realização da sucessão das atividades enzimáticas foi aplicado o delineamento experimental utilizando o delineamento inteiramente

casualizado (DIC), sendo os resultados avaliados por meio de regressão linear (Atividade aparente versus horas de fermentação) para cada enzima.

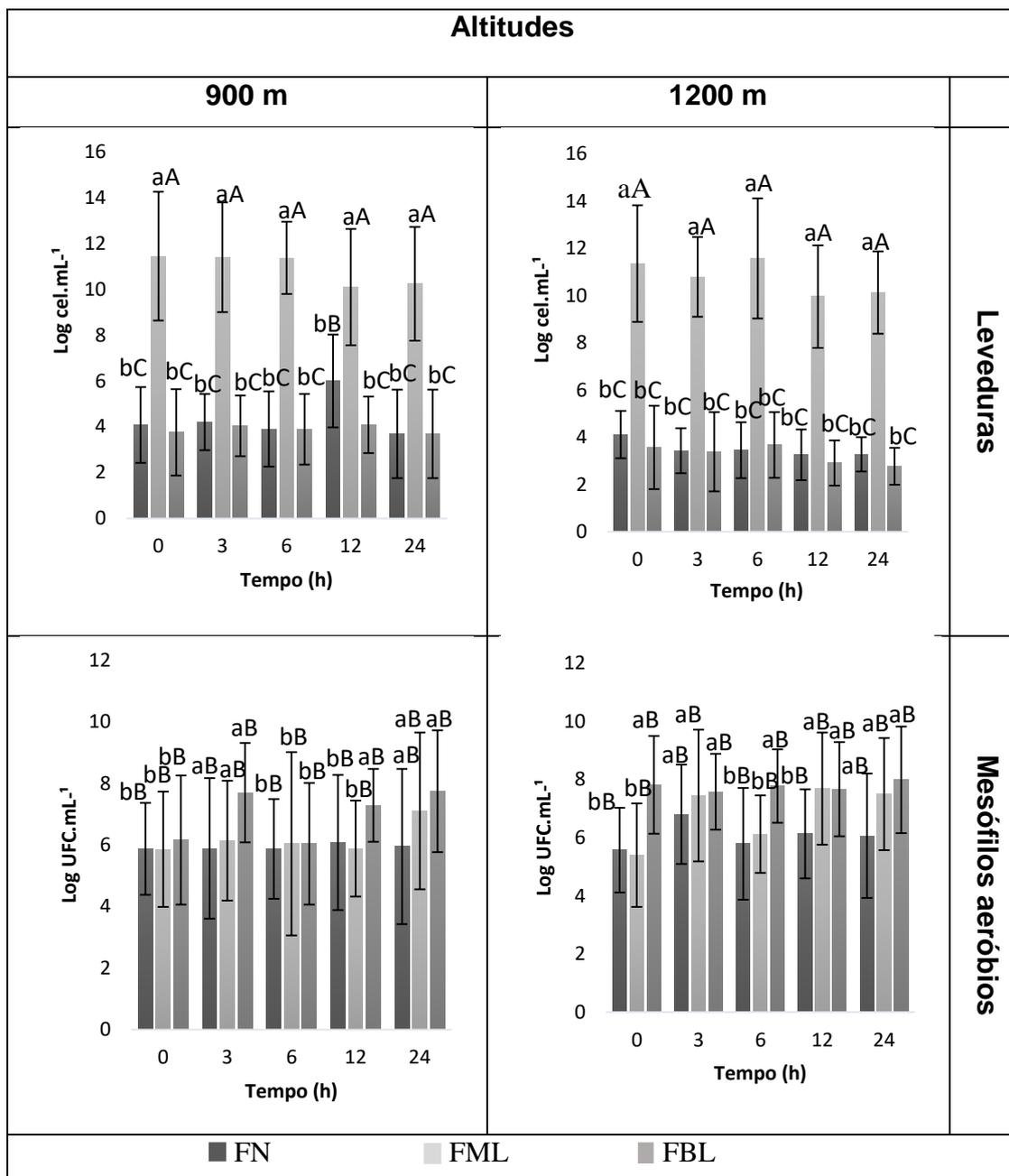
Para a análise sensorial o experimento foi montado em DIC (delineamento inteiramente casualizados), sendo constituído por esquema fatorial 2 altitudes, 3 tratamentos e 100 provadores. Todos os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparações entre as médias. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados considerando o nível de 5% de probabilidade.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Sucessão de microrganismos durante a fermentação**

As contagens de mesófilos aeróbios e de leveduras totais tiveram diferenças significativas entre os tratamentos e ao longo do processo de fermentação (FIGURA 2). Em ambas as altitudes a população de mesófilos aeróbios foi maior comparada à população de leveduras em todas as fermentações, exceto na fermentação que foi inoculado com *S. cerevisiae* (FML).

A *S. cerevisiae* possui grande potencial para uso como cultura *starter* no processamento via úmida do café, devido à possibilidade de ajudar a controlar e padronizar o processo de fermentação e produzir bebidas com características sensoriais diferenciados. Masoud et al. (2004) e Silva et al. (2008) relataram que as espécies de leveduras mais frequentes durante o processamento de café são *Pichia kluyveri*, *Pichia anomala*, *Hanseniaspora uvarum*, *S. cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* e *Torulaspota delbrueckii*, que são consideradas grandes produtoras de pectinas.



**Figura 2.** População total de leveduras e mesófilos aeróbios a partir da fermentação espontânea (FN), por *S. cerevisiae* JP14 acrescido de malte (FML), e por *P. acidilactici* CCT 1622 (FBL) de café arábica colhido em diferentes altitudes.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula para o mesmo tempo entre o mesmo grupo microbiano nas diferentes altitudes, e letras maiúsculas para o mesmo tempo em cada altitude para os diferentes grupos microbianos não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A população de leveduras foi maior nos tratamentos em que a levedura JP14 foi inoculada do que na fermentação espontânea (FN) e fermentação com

bactérias lácticas (FBL). Entretanto, mesmo nos tratamentos não inoculados com a levedura *S. cerevisiae*, a presença desse grupo microbiano foi de até 4 log cel/mL<sup>-1</sup>. Isso nos leva a deduzir que a cepa inoculada foi capaz de se adequar ao ambiente com os microrganismos já presentes nos grãos de café cereja e também de usar a polpa e a casca do café como substrato para sua manutenção. Também foi observado que a população de leveduras nas diferentes fermentações persistiu durante todo o processo fermentativo dos grãos de café (FIGURA 2).

Pereira et al. (2014) observaram uma população de leveduras de 2,7 log cel/mL<sup>-1</sup> durante o período inicial de fermentação espontânea de café. Com o decorrer da fermentação a população de leveduras atingiu uma população de 7,15 log cel/mL<sup>-1</sup> até o período de 40 h de fermentação. Esses mesmos autores realizaram processos fermentativos acrescidos das culturas *starters* *P. fermentans* YC5.2 e *Saccharomyces* sp. YC9.15 separadamente a uma concentração inicial de 6 log cel/mL<sup>-1</sup>. Contudo, o estudo de Pereira et al. (2014) demonstrou que as contagens de leveduras também decorreram da soma de leveduras selvagens já presentes com aquelas inoculadas, também permanecendo constante ao longo do período de fermentação (FIGURA 2).

Pereira et al. (2014) ainda relataram que após uma inoculação bem-sucedida de microrganismos durante a fermentação dos grãos de café, a capacidade das leveduras de se adaptarem e enfrentarem o ambiente inóspito e as condições estressantes no meio fermentativo é de grande importância para o desempenho da fermentação, tendo em vista a participação desse grupo microbiano na melhoria das características do café.

Já em 2004, Masoud et al., afirmavam que as informações quanto à comunidade de leveduras durante a fermentação do café cereja eram limitadas, principalmente no que tange às suas ações durante o período fermentativo quando em processamento. Infelizmente, após 15 anos as ações promovidas pelas leveduras no processo fermentativo não estão totalmente elucidadas.

Pereira et al. (2015) em seus estudos realizaram três ensaios de fermentações diferentes: o primeiro tratamento, denominado FN (Controle), não foi inoculado com cultura *starter*; o segundo tratamento foi adicionada uma concentração de 7 log cel/mL<sup>-1</sup> de *P. fermentans*; e o terceiro tratamento consistiu em *P. fermentans* suplementado com 2% (m/v) de sacarose. A

suplementação com sacarose foi realizada para determinar o efeito dessa fonte adicional de carbono no crescimento de microrganismos, principalmente de leveduras na fermentação do café. As fermentações foram realizadas utilizando o processamento por via úmida e apresentou resultados como uma contagem inicial de leveduras nas fermentações inoculadas de 2 log maior em relação ao processo natural (FN), e aumentou significativamente após 24h de fermentação (FIGURA 2).

Como visto, a utilização de culturas *starters* à base de leveduras é comumente empregada no processamento do café (VILELA et al, 2010). De acordo com Hajar et al. (2017) em processos fermentativos com uso de leveduras, a espécie *S. cerevisiae* é a mais utilizada em razão da promoção de maior eficiência no processo e em especial quando utilizada em substratos com estruturas complexas. A presença de algumas leveduras, proporcionam benefícios ao processamento do café devido ao seu importante papel na degradação da mucilagem rica em pectina (MASOUD e JESPERSEN 2006). Além da presença de leveduras durante a fermentação do café, diversos microrganismos estão presentes, dentre eles os mesófilos aeróbios, que também são responsáveis por produzirem enzimas e promoverem a degradação da mucilagem rica do café (DE BRUYN et al., 2017).

Assim como as leveduras, as bactérias também são produtoras de enzimas que durante o processamento do café hidrolizam a polpa pectinosa ao redor dos grãos e desencadeiam alterações bioquímicas que conferem sabor e cor aos grãos (LUDLOW et al., 2016).

Durante o processamento na fermentação do presente estudo (Figura 2) a população de mesófilos aeróbios, que têm sua taxa de crescimento máxima em temperaturas de 30 a 45°C, e que possuem diversas espécies presentes durante a fermentação do café, sendo as mais frequentes as do gênero *Bacillus* (EVANGELISTA et al., 2014; MASSAWE et al., 2010; MASOUD et al., 2006; QUINTERO et al., 2012; VELMOUROUGANE, 2013). A contagem de mesófilos aeróbios manteve-se constante durante toda a fermentação nos diferentes tratamentos com médias de população de 5 a 8 log UFC/mL. Foi observado que o grupo de mesófilos aeróbios se manteve presente durante todo o processamento em ambas as altitudes, e isto se mostra decorrente da adequação a temperatura ambiente que é considerada ideal para sua

manutenção e crescimento, tendo em consideração que o procedimento do processamento foi realizado do lado externo do laboratório a temperatura ambiente.

Dos cafés colhidos na propriedade de altitude de 1200 m, o tratamento inoculado com *P. acidilactici* (FBL) apresentou inicialmente maior população ( $p < 0,05$ ) à população de mesófilos aeróbios em relação ao café colhido em altitude de 900 m (FIGURA 2).

Nasanit et al. (2015) afirmaram que as bactérias, principalmente as mesófilas aeróbias, são os microrganismos mais abundantes encontrados ao longo do processo fermentativo do café, e que a carga de microrganismos do início da fermentação e seu crescimento máximo durante todo processo podem variar entre  $10^4$  a  $10^9$  UFC/mL<sup>-1</sup> para o total bactérias e  $10^2$  a  $10^7$  cel/mL<sup>-1</sup> para leveduras. Mello et al. (2015) ressaltam que os fatores que afetam essa carga inicial incluem a qualidade e integridade dos grãos de café cereja, a variedade vegetal, a higiene do tanque de fermentação, bem como a água e os utensílios utilizados no início do processo de fermentação. Mello et al. (2015) ainda constataram que os microrganismos crescem rapidamente na polpa de café à temperatura ambiente (25-30°C).

Ribeiro et al. (2018) coletaram café arábica das variedades Ouro amarelo (OA), Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho (CV) manualmente no estágio cereja de maturação em altitude de 970 a 1220 m acima do nível do mar, e processaram os grãos por via úmida. A população de mesófilos aeróbios no início da fermentação foi de 4,84; 4,69 e 4,10 log UFC/g<sup>-1</sup> para OA, MN, e CV, respectivamente, mas diminuiu durante o processo fermentativo, alcançando valores de 2,48; 2,78 e 2,70 log UFC/g<sup>-1</sup>. Esses resultados diferem aos obtidos no presente estudo, no qual houve uma manutenção da população de mesófilos do início ao final da fermentação.

Segundo Silva et al. (2008), normalmente, as bactérias e leveduras são predominantes nas fases iniciais de fermentação devido ao alto teor de água presente nos frutos. Contudo, as populações e o crescimento microbiano durante o processamento fermentativo dos grãos de café dependem de diversos fatores, dentre eles, a altitude (SILVA et al., 2008).

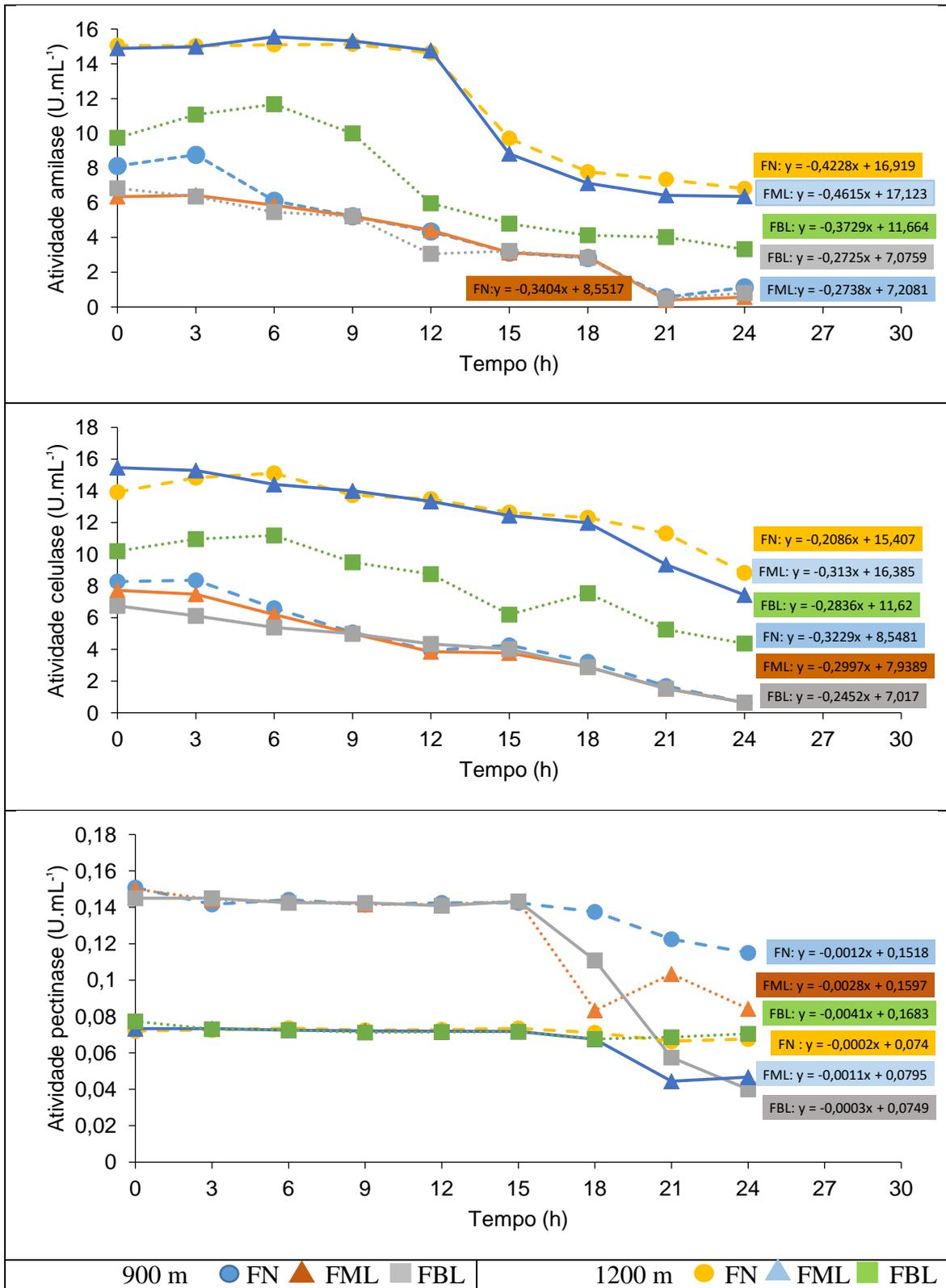
### **3.2. Avaliação das enzimas hidrolíticas presentes no mosto durante a fermentação**

Neste estudo foram testadas as atividades enzimáticas de amilase, celulase e pectinase nos mostos de café durante a fermentação.

As curvas de atividade das enzimas hidrolíticas foram significativas ao nível de 5% de probabilidade. As atividades enzimáticas, em geral, diminuíram ao longo do processo fermentativo (FIGURA 3). Os cafés colhidos a 900 m apresentaram em geral atividade pectinolítica que os cafés colhidos a 1200 m. Entretanto, a partir de 15 h de fermentação a atividade foi reduzida. Entretanto, as atividades de celulases e amilases foram menores. Isso foi evidencia as diferenças geradas pelos cultivos em diferentes altitudes. Na maioria das fermentações, bactérias e fungos filamentosos produzem mais enzimas pectinolíticas que às leveduras (BLANCO et al. 1999). No entanto, não foi observada produção dessa enzima em nenhum dos tratamentos (FIGURA 3).

As pectinases são responsáveis pela degradação das substâncias pécticas para fins nutricionais e são produzidas principalmente por bactérias, fungos e leveduras. Vale ressaltar, entretanto, que a atividade dessas enzimas ao final das 24 h de fermentação foi maior nos tratamentos não inoculados (FN), mas isso foi resultante da menor perda de atividade dessas enzimas ao longo do processo. Isso pode ser decorrente de maior atividade de outros componentes microbianos nos tratamentos FML e FBL (FIGURA 3).

A hidrólise da pectina constitui um ponto importante no aspecto de remoção da mucilagem do café, e é obtida pela ação sinérgica de algumas enzimas, incluindo a pectinametilesterase, a endopoligalacturonase e exopoligalacturonase, pectina esterase e pectina liase (OUMER et al., 2018).



**Figura 3.** Atividade de amilase, celulase e pectinase nos mostos de café de altitudes 900/1200 m.

Fermentação espontânea (FN); fermentação por malte e *S. cerevisiae* JP14 (FML); fermentação com *P. acidilactici* CCT 1622 (FBL) das médias de 3 repetições de 3 replicatas biológicas independentes e regressão linear das fermentações.

De acordo com Santi et al. (2014), a utilização de pectinases associadas a outras enzimas, como celulasas e hemicelulasas presentes em preparações comerciais, é responsável pela melhoria na extração de polpa de frutas. Estas enzimas podem ser utilizadas para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta e/ou vegetal, reduzindo o tempo de processamento e melhorando a extração de componentes.

Kashyap et al. (2001) e Silva et al. (2000), enfatizaram que o beneficiamento dos frutos de café utilizando enzimas comerciais já é usual, porém de alto custo, por isto são aplicadas e utilizadas enzimas péctinolíticas produzidas por microrganismos. Elas podem ser produzidas durante a fermentação do restante da mucilagem que fica aderida aos grãos após o processo de despulpamento. Essa atuação dos microrganismos na degradação de pectina durante o processo fermentativo já é relatada por diversos autores após a colheita, principalmente no beneficiamento e processamento dos frutos de café (TABELA 4).

**TABELA 4.** Microrganismos com atividade pectinolítica isolados do café.

<b>Microrganismos</b>	<b>Enzimas pécticas</b>	<b>Processamento ou fonte</b>	<b>Referências</b>
<i>Rhodototula sp.</i>	Poligalacturonase	Via seca	Vaughn et al. (1958).
<i>Bacillus sp., Leuconostoc e Streptococcus, Saccharomyces cerevisiae e Candida parapsilopsis</i>	Pectina liase e poligalacturonase	Via seca	Pee e Castelein (1972).
<i>Erwinia herbicola e Klebsiella pneumoniase</i>	Pectina liase	Frutos de café	Sakiyama et al (2001).
<i>Pichia anomala e P. kluyveri</i>	Poligalacturonase	Via úmida	Masoud e Jespersen (2006).

Microrganismos que apresentem maior atividade enzimática pectinolítica são importantes no processo de fermentação e fornecem grande potencial de

empregabilidade como culturas *starters* devido à melhoria no processo de fermentação dos frutos de café (SAKIYAMA et al. 2001).

Em geral, os cafés FN e FML a 1200 m apresentaram o mesmo perfil enzimático. Entretanto, nas fermentações com *P. acidilactici* CCT 1622 (FBL) foram observadas menores atividades de amilase e celulase durante todo o período de fermentação (FIGURA 3).

Segundo Couto et al. (2005), é necessária maior concentração de enzimas nas primeiras horas de fermentação devido à baixa disponibilidade de monômeros e da matéria-prima, necessários para o desenvolvimento da microbiota. Esta baixa disponibilidade estimula a expressão das enzimas hidrolíticas necessárias para a disponibilização desses monômeros. A extrapolação do nível do teor de água ideal promove inibição na excreção enzimática, reduzindo a atividade enzimática. Em virtude dos fatos, foi possível constatar que a altitude da região exerce influencia tanto no conteúdo da mucilagem quanto no seu teor de água. Em regiões mais altas os frutos possuem maior quantidade de mucilagem com menor quantidade de água (BÓREM, 2008).

Gusmão et al. (2014) inocularam culturas fúngicas de três linhagens de *Aspergillus spp.* em fermentação no estado sólido na casca de café e avaliaram a produção de amilase durante 21 dias de fermentação. As maiores atividades de amilase foram registradas até os 12 primeiros dias de fermentação para todos os isolados. Vale ressaltar que as amilases desempenham um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixa massa molecular (GUPTA et al., 2004).

Em relação a atividades celulolíticas, Cerda et al. (2017) verificaram a reprodutibilidade da produção de celulase e xilanase por um coquetel contendo a bactéria *Pseudoxanthomonas taiwanensis* e *Sphingobacterium composti* e as leveduras *Cyberlindnera jardinii* e *Barnettozyma californica* à partir da fermentação da casca de café e observaram que as atividades atingiram seu ponto máximo durante a fase mais ativa da fermentação, ou seja, no tempo 24 h, ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo, o qual apresentou queda da atividade (FIGURA 3).

A queda das atividades enzimáticas pode ser atribuída a vários fatores, dentre eles, a diminuição de substrato, a inibição do sistema enzimático devido

à formação de subprodutos da degradação por enzimas proteolíticas ou absorção não produtiva para hidrolisados de lignina no caso das celulases (BRIJWANI et al. 2011;GAO et al., 2014; SALGADO et al., 2015)

As celulases, juntamente com as hemicelulases e pectinases, são amplamente empregadas no processo de clarificação de extratos vegetais, bem como na redução da viscosidade de concentrados de café. Após o esmagamento de vegetais, estas enzimas são utilizadas para aumentar a liquefação por meio da degradação da fase sólida (BÉGUIM et al., 1994). A principal vantagem de se utilizar as celulases ocorre em decorrência de sua capacidade na modificação de fibras celulolíticas de forma controlada, resultando em um produto de melhor qualidade (KANG et al., 2004).

Vale observar que entre o período de 12 e 15 h durante os processos fermentativos ocorre uma mudança no perfil das enzimas presentes (FIGURA 3). Esse decréscimo na atividade enzimática pode ser atribuído ao fato de que na fermentação os extratos enzimáticos eram muito complexos, podendo conter nas amostras fermentadas compostos inibitórios à atividade enzimática de amilase, celulase e pectinase (MARQUES et al., 2008).

A presença do malte nos tratamentos FML não levou a um perfil enzimático distinto. Isso pode decorrer das falhas na extração dessas enzimas. Isso poderia ser otimizado realizando a pré-extração dessas enzimas.

### **3.3. Análise de compostos químicos nos mostos e no café torrado e moído**

Nas Tabelas 5 e 6 estão apresentados compostos presentes nos mostos e grãos de café torrados e moídos.

Para a avaliação da atividade metabólica geral que ocorreu em cada processo de fermentação, o consumo e/ou produção de açúcares, principalmente a glicose e a formação de ácidos orgânicos (ácido cítrico, lático, propanoico, succínico e málico) e etanol foram analisados (TABELAS 5 e 6).

**TABELA 5.** Concentração de ácidos orgânicos, glicose e etanol na fermentação espontânea (FN) (Controle), fermentação com malte e *S. cerevisiae* JP14 (FML) e fermentação com *P. acidilactici* CCT 1622 (FBL) nos mostos de cafés colhidos em duas altitudes diferentes e processados por via úmida.

Compostos	Glicose (g/L)		Ácido láctico(g/L)		Ácido cítrico(g/L)		Etanol, ácido málico, ácido propanoico e ácido succínico (g/L)
	Mosto inicial	Mosto final	Mosto Inicial	Mosto final	Mosto Inicial	Mosto final	
<b>Fermentações/altitudes</b>	<b>Mosto inicial</b>	<b>Mosto final</b>	<b>Mosto Inicial</b>	<b>Mosto final</b>	<b>Mosto Inicial</b>	<b>Mosto final</b>	<b>Mosto inicial e final</b>
<b>FN 900 m (Controle)</b>	2,42±0 Ab	5,57±0 aA	Nd	nd	5,42±1,2aB	10,32±2,4 aA	Nd
<b>FN 1200 m (Controle)</b>	0,30±0,04bA	0,13±0,05 bB	Nd	nd	0,41±0 bA	0,19±0,03 bB	Nd
<b>FML 900 m</b>	0,32±0,02bA	0,35±0,15 bA	0,02±0 aA	0,01±0bB	2,01±0,2 bA	1,05±0,64bA	Nd
<b>FML 1200 m</b>	0,18±0,11bA	0,28±0,07 bA	0,02±0,01 aB	0,04±0,02 abA	1,59±1,2 bA	2,87±1,6 bA	Nd
<b>FBL 900 m</b>	0,16±0,02bB	0,51±0,23 bA	0,02±0 aA	0,01±0 bB	0,89±0,32 bA	0,99±0,20 bA	Nd
<b>FBL 1200 m</b>	0,22±0,10bB	0,48±0,04 bA	0,03±0 aB	0,08±0,01 aA	2,16±0,4bA	2,61±1,76 bA	Nd

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna e letras maiúsculas em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).  
nd= não detectado

**TABELA 6.** Concentração de ácidos orgânicos, glicose e etanol na fermentação espontânea (FN) (Controle), fermentação com malte e *S. cerevisiae* JP14 (FML) e fermentação com *P. acidilactici* CCT 1622 (FBL) no café torrado e moído colhidos em duas altitudes diferentes e processados por via úmida.

<b>Compostos</b>	<b>Glicose (g/kg)</b>	<b>Ácido láctico(g/kg)</b>	<b>Ácido cítrico(g/kg)</b>	<b>Etanol, ácido málico, ácido propanoico e ácido succínico (g/kg)</b>
<b>Fermentações/altitudes</b>	<b>Café torrado e moído</b>			
<b>FN 900 m (Controle)</b>	1,81± 0a	0,07± 0a	5,38± 0,5a	Nd
<b>FN 1200 m (Controle)</b>	1,81± 0a	0,07± 0a	5,29± 0,6a	Nd
<b>FML 900 m</b>	0,99± 0,2b	0,04± 0a	3,09± 1,4a	Nd
<b>FML 1200 m</b>	1,82± 0,01a	0,07± 0a	5,86± 0,3a	Nd
<b>FBL 900 m</b>	1,81± 0,01a	0,05± 0a	4,83± 0,9a	Nd
<b>FBL 1200 m</b>	1,81± 0,02a	0,06± 0a	5,89± 0,8a	Nd

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).  
nd= não detectado

Os mostos dos cafés colhidos em altitude 900/1200 m no início da fermentação consistiam em aproximadamente 2,42, 0,32, 0,16 g/mL e 0,30, 0,18, 0,22 g/mL de glicose nos tratamentos FN, FML e FBL, respectivamente. Ao final do período de fermentação as concentrações de glicose aumentaram, exceto para o tratamento FML dos cafés colhidos em altitude 1200 m, o qual apresentou queda de 0,17 g/mL.

Já no tratamento FN dos cafés colhidos a 900 m foi possível verificar um aumento significativo (p< 0,05), apresentando 5,57 g/mL de glicose ao final do processo fermentativo (TABELA 5). A alta concentração de glicose no tratamento FN 900 m pode ser decorrente de alguma contaminação inicial, tendo em vista que todas as fermentações deveriam ter valores próximos de açúcares inicialmente.

O tratamento FML dos cafés colhidos em altitude 900 m apresentou concentração menor (0,09g/Kg) que as demais fermentações. Os teores médios de glicose nos demais tratamentos não apresentaram diferenças (p<0,05) e

foram detectados em quantidades de 1,81 a 1,82 g/Kg em ambas as propriedades e fermentações (TABELA 6).

A glicose é um dos açúcares mais simples presentes na mucilagem (AVALLONE et al. 2002) e pode ser utilizada como fonte de carbono pelos microrganismos durante a fermentação de café. De acordo com Jacklels et al. (2005), o padrão geral observado na concentração inicial de glicose nas fermentações situa-se na faixa de 0,2 a 0,6 g/L e diminuem à medida em que são consumidos pelos microrganismos durante o período fermentativo. No entanto, no presente estudo este caso não foi observado, pois o açúcar glicose apresentou acréscimo nos mostos ao final das fermentações (TABELAS 5).

Este aumento de glicose pode estar relacionado à ruptura da pectina que por sua vez libera glicose no meio. Segundo Garna et al. (2004), a hidrólise da pectina resulta na liberação de açúcares, como glicose, raminose e galactose. Wendler et al. (1990), também ressaltaram em seus estudos que o aumento na concentração de glicose pode ser resultado da ação de enzimas pectinolíticas e celulolíticas presentes nos grãos de café. Estas enzimas estão envolvidas na síntese de pectina e celulase, o que contribui para controlar a importação e mobilização de carboidratos.

Vale ressaltar que os grãos de café são ricos em polissacarídeos, como a celulose. Os polissacarídeos são hidrolisados durante o processo de fermentação, sendo as concentrações de glicose fortemente interligadas ao método de processamento empregado, bem como as concentrações e diferentes inóculos utilizados (KNOPP et al., 2006).

Como existe para frutas e vegetais uma relação entre açúcares totais e acidez, possivelmente deve-se existir uma relação entre glicose e ácidos mais favoráveis para obtenção da acidez e doçura adequada em uma bebida de café (SALVA, 2007).

De acordo com Kleinwachteet al. (2010), os processos metabólicos do início da secagem ocorrem em um período relativamente curto e este processo pode afetar diretamente os açúcares redutores como a glicose. Como os açúcares, outros compostos estão presentes durante a fermentação de café, dentre eles alguns ácidos, como o ácido cítrico.

O ácido cítrico foi um dos principais metabólitos presentes nos mostos desde o início ao final das fermentações dos cafés colhidos em ambas as

altitudes, quantificadas no HPLC (TABELA 5). No entanto, a concentração final de ácido cítrico da fermentação FN (controle) no mosto dos cafés colhidos a 900 m foi aproximadamente o dobro do período inicial da fermentação ( $p < 0,05$ ). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas com relação à detecção de ácido cítrico do período final em relação ao período inicial das fermentações dos mostos.

No presente estudo, o aumento da concentração de ácido cítrico no processo foi evidente, exceto para os tratamentos FN dos cafés colhidos a 1200 m e FML dos cafés colhidos a 900 m. O ácido cítrico foi um dos principais metabólitos presentes após o processo de torrefação dos grãos de café e apresentou concentrações entre 3,09 a 5,89 g/Kg nas fermentações dos cafés colhidos em ambas as altitudes, não apresentando diferenças de teores ( $p < 0,05$ ) entre as fermentações e altitudes testadas (TABELA 6).

O ácido cítrico em concentrações entre 1 e 4 mg mL<sup>-1</sup> conferem uma acidez desejável ao produto (JHAN et al., 2002; SIVETZ, 1963).

Em estudos promovidos por Evangelista et al. (2014) e Silva et al. (2014), utilizando a levedura *S. cerevisiae* como cultura *starter* no processamento de café Acaiá, a mesma teve a capacidade de favorecer a produção de alguns ácidos desejáveis, dentre eles o ácido cítrico. Os autores ainda ressaltaram que a presença desse ácido pode influenciar diretamente na qualidade final da bebida café, sugerindo, portanto, o seu potencial no uso como inoculante nas fermentações de cafés por diferentes vias de processamento.

Segundo Genard et al. (1999) e Rogers et al. (1999), nos grãos de café é decorrente o acúmulo de ácido cítrico e o decréscimo do málico e quínico à medida que os frutos de café se desenvolvem. E outros ácidos podem estar presentes durante a fermentação, dentre eles o ácido láctico.

O ácido láctico também foi detectado e esteve presente nos mostos de café em concentrações semelhantes do início ao final das fermentações FML e FBL, exceto na fermentação; no entanto, após 24 h de fermentação, o ácido láctico alcançou níveis maiores nos tratamentos FML e FBL dos cafés colhidos a 1200 m, apresentando diferenças entre os teores com as demais fermentações e mostos colhidos no período inicial de fermentação ( $p < 0,05$ ), (TABELA 5). Entre os ácidos que podem ser gerados na fermentação de café, o ácido láctico, juntamente com outros ácidos são responsáveis pela queda do pH, bem como

promoverem a diminuição do tempo do processo ocorrido (JACKLELS et al. 2005).

Nos grãos de café torrados e moídos não foram detectadas diferenças significativas na detecção de ácido láctico ( $p < 0,05$ ), nos tratamentos os teores médios apresentaram valores 0,04 a 0,07g/Kg em ambas as propriedades e fermentações. Este aumento pode estar relacionado ao tempo de fermentação, no qual as bactérias demoraram a se adaptar ao ambiente de fermentação e promoverem a ativação de suas vias metabólicas para a geração de metabólitos nos mostos (meio) da fermentação ocorrida durante o processamento (PUERTA-QUINTERO, 2013).

Vale ressaltar que a presença de ácido láctico no processamento pode estar relacionada à população de bactérias lácticas que estão naturalmente presentes no grãos de cafés (AVALLONE et al., 2002; EVANGELISTA et al., 2014).

Em relação à formação destes compostos durante o processo fermentativo do café, Quintero et al. (2012), enfatizam que as características dos cafés fermentados são oriundas das interações bioquímicas que ocorrem em detrimento das enzimas que são produzidas por leveduras e bactérias, sendo que as mesmas acabam degradando o açúcar, os lipídeos e proteínas, que estão presentes na mucilagem, transformando-as em compostos mais simples, como o etanol, o ácido láctico, ácido acético e butírico.

Contudo, é válido ressaltar que os ácidos orgânicos e açúcares são os principais responsáveis pela vivacidade da bebida final, e podem conferir brilho a bebida, além de proporcionarem aos cafés maior acidez, o que conseqüentemente acarreta um diferencial no preço de comercialização. (LINGLE, 2011).

### **3.4. Teste afetivo de aceitação por escala hedônica**

O consumo diário de café apresentou atitude positiva pelos provadores, pois 57% dos entrevistados alegaram realizar o consumo de 2 a 5 xícaras por dia, enquanto 29% responderam que consomem pouco café ( $\leq 1$  xícara/dia), além de 14% que consomem uma quantidade elevada (acima de 5 xícaras/dia).

O café fermentado com *P. acidilactici* CCT 1622 (FBL) obteve maior aceitabilidade obtendo escore de 7,97 e 7,86 (média entre gostei moderadamente a gostei muito) para as altitudes, respectivamente (TABELA 7).

**TABELA 7.** Aceitação dos cafés fermentados.

Tratamento/ Altitude	900 m	1200 m
<b>FN (Controle)</b>	6,84 ± 1,60 <sup>b</sup>	6,24 ± 1,62 <sup>b</sup>
<b>FML</b>	5,80 ± 1,70 <sup>c</sup>	6,28 ± 1,59 <sup>b</sup>
<b>FBL</b>	7,97 ± 1,52 <sup>a</sup>	7,86 ± 1,71 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Vários fatores influenciam na qualidade da bebida, desde processamento, altitude, microrganismos, modo de cultivo, dentre outros. Entretanto, a elevação da altitude está relacionada com o aumento da qualidade da bebida (VAAST et al., 2006). Em consideração a esta afirmativa, pudemos constatar que no presente estudo, as altitudes não influenciaram na qualidade final da bebida.

Já em estudos realizados por Serrano et al. (2002), que averiguaram a relação entre a altitude de 1450 m e 1650 m e a qualidade do café colhidos e processados na Colômbia, relataram uma melhoria significativa da bebida em altitudes mais elevadas. Em Honduras, Decazy et al. (2003), em seus estudos observaram uma melhoria na qualidade dos cafés colhidos em altitudes elevadas. Entretanto, resultados contraditórios foram encontrados nos trabalhos de Guyot et al. (1996) e Avelino (2005), que evidenciaram uma melhor qualidade sensorial nos cafés colhidos em altitudes menores. Embora o cultivo do café arábica na altitude seja conhecido por afetar favoravelmente a qualidade final da bebida, Joët (2010), afirma que os dados quantitativos que descrevem a influência das condições de processamento e altitudes sobre a composição química dos frutos ainda são escassos.

Neste contexto, o presente estudo indicou que a altitude dos cafés colhidos na região Serrana do Espírito Santo não foi um fator determinante na qualidade final da bebida. Porém, a utilização de culturas *starters* selecionadas foi essencial e indicou melhoria no processo fermentativo acentuando o sabor e afetando benéficamente a aceitação da bebida final, principalmente na fermentação induzida por bactérias lácticas que promoveu um papel complementar quando associadas à qualidade do café através da síntese,

produção e quantidade de constituintes específicos produzidos pelo inóculo a base de *P. acidilactici* com a microbiota nativa.

#### 4. CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível verificar que as cepas inoculadas *S. cerevisiae* JP14 e *P. acidilactici* CCT 1622 representaram potenciais culturas *starters* para a fermentação do café. Em geral, todas as fermentações apresentaram queda nas atividades de amilase, celulase e pectinase durante todo o processo fermentativo em todos os tratamentos e altitudes, mesmo assim demonstraram a capacidade de quebra de amido, celulase e pectina presentes nos grãos durante a fermentação com eficiência na utilização do substrato e produção de compostos que possivelmente incrementaram a qualidade final da bebida.

O estudo também indicou que a altitude dos cafés colhidos na região Serrana do Espírito Santo não foi um fator determinante na qualidade final da bebida, porém as fermentações dos cafés com as culturas *starters* promoveram melhoria na aceitação da bebida, especialmente quando utilizada a bactéria láctica *P. acidilactici* CCT 1622 como cultura *starter*.

Através dos experimentos realizados, o processamento por via úmida empregado de forma adequada foi suficiente para obtenção de uma bebida de qualidade, principalmente quando utilizados os inóculos, que produziram quantidades diferentes de compostos que possivelmente incrementaram a bebida.

No entanto, novos estudos visando o desempenho de novas culturas *starters* na fermentação dos frutos de café poderão ser realizados com a finalidade de descobrir novas cepas que possam contribuir na produção de compostos que irão incrementar a produção de cafés com novos e desejáveis perfis de sabor.

## ANEXOS

Anexo 1: Ficha disponibilizada aos provadores para quantificação de consumo de café

Nome:		Idade:	
Por favor, indique o seu consumo diário de café.			
Consumo	( )	( )	( )
Xícara	≤1	2 a 5	Acima de 5

Anexo 2: Ficha disponibilizada aos provadores para análise sensorial das amostras por meio de teste afetivo de aceitação por escala hedônica

Nome: _____ Data: _____	
Avalie a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou.	
<input type="checkbox"/> – gostei extremamente <input type="checkbox"/> – gostei muito <input type="checkbox"/> – gostei moderadamente <input type="checkbox"/> – gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> – indiferente <input type="checkbox"/> – desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> – desgostei moderadamente <input type="checkbox"/> – desgostei muito <input type="checkbox"/> – desgostei extremamente	Amostra: _____
Comentários: _____	

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. (2008). Disponível em <http://abic.com.br/estatisticas/desempenho-do-setor/>. Acesso em 05 jun. 2018.
- Agate, A. D., Bhat, J. V. (1966). Role of Pectinolytic Yeasts in the Degradation of Mucilage Layer of *Coffea robusta* Cherries. *Applied Microbiology*, 14(2), 256-260.
- Ali, I., Akbar, A., Anwar, M., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Punnapayak, H. (2015). Purification and characterization of a polyextremophilic  $\alpha$ -Amylase from an obligate halophilic *Aspergillus penicillioides* isolate and its potential for souse with detergents. *BioMed Research International*, 15, 2-3.
- Alves, R. C., Casal, S., Alves, M. R., Oliveira, M. B. (2009). Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. *Food Chemistry*, 114, 295-299.
- Amorim, H. V., Amorin, V. L. (1977). Coffee enzyme and coffee quality. In: Ory, R. L., Angelo, A. J. St (Ed). *Enzymes in food and beverage processing*. Washington: American Chemical Society, 27-56.
- Arruda, A. C., Minim, V. P. R., Ferreira, M. A. M., Minim, L. A., Silva, N. M., Soares, C. F. (2009). Justificativas e motivações do consumo e não consumo de café. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(4), 754-763.
- Arunga, R. O (1982). Coffee. *Economic Microbiology*, 7(2), 259-279.
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J. M., Olguim, E., Guiraud, J. P. (2002). Microbial and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, 42, 252-256.
- Avelino, J. (2005). Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa Maria de Dota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1869-1876.
- Béguin, P., Aubert, J. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Revist*, 13, 25-58.
- Beux, M. R., Soccol, C. R. (2005). Microbiota isolada durante as fases de pre e pos-coheita dos graos de cafe associada a qualidade e sanidade da bebida. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 22(1), 155-172.
- Bicho, N. C., Leitão, A. E., Ramalho, J. C., Alvarenga, N. B., Lidon, F. C. (2013). Impact of roasting time on the sensory profile of Arabica and Robusta coffee. *Ecology of Food and Nutrition*, 52(2), 163-177.
- Bicudo, L. P. (1962). Para fazer café fino não é indispensável gastar muito. *Lavoura e Criação*, 155, 17-20.

- Blanco, P., Siero, C., Villa, T. G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 45(1), 1-9.
- Brando, C. H. J. (1999). Cereja descascado, desmucilado, fermentado, despulpado ou lavado. *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 25, 342-346.
- Borém, F. M., Reinato, C. H. R. (2006). Qualidade do café despulpado submetidos a diferentes processos de secagem. *Revista Brasileira de Armazenamento*, 9, 26-31.
- Borém, F. M. (2008). Processamento do Café. In: Borém, Flavio Meira. Pós-colheita do Café, 127-158.
- Bournscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *Fems Microbiology Revist*, 26(1), 73-81.
- Bouillé, A. G., Beeren, C. J. M. (2016). The Stability and Shelf Life of Food. *Food Science, Technology and Nutrition*, 2, 199-228.
- Brando, C. H. J., Brando, M. F. (2014). Methods of coffee fermentation and drying. In: Schwan, R.F., Fleet, G.H. *Cocoa and Coffee Fermentation*, 367-398.
- BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (2003). Regulamento técnico de identidade e de qualidade para a classificação do café beneficiado e de café verde. Instrução Normativa n. 8 de 11/06/03. Brasília.
- Brijwani, K., Vadlani, P. V. (2011). Cellulolytic Enzymes Production via Solid-State Fermentation: Effect of Pretreatment Methods on Physicochemical Characteristics of Substrate. *Enzyme Research*, 1-10.
- Buckenhuskas, H. J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *Fems Microbiology*, 12, 253-272.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F. (1999). Food Fermentation: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Carrera, F., León-Camacho, M., Pablos, F., González, A. G. (1988). Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile. *Analytica Chimica Acta*, 3, 131-139.
- Carvalho, V. D., Chagas, S. J. R (1997). Duas espécies de café dominam o mercado mundial: *Coffea arabica* (arabica) e *C. canephora*. Fatores que afetam a qualidade do café. *Informe Agropecuário*, 18, 5-20.

CBI-Center for the Promotion of Imports. (2014). CBI tailored market intelligence: Trends and segments for specialty Ugandan coffee CBI. *Market Information Database*, 1, 1-5.

Cerda, A., Gea, T., Vargas-garcía, M. C., Sánchez, A. (2017). Science of the Total Environment Towards a competitive solid state fermentation Cellulases production from coffee husk by sequential batch operation and role of microbial diversity. *Science of the Total Environment*, 589, 56-65.

Coltro, L., Mourad, A., Oliveira, P., Baddini, J., Kletecke, R. (2006). Environmental profile of Brazilian coffee. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 11(1), 16-21.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. (2018). Disponível em: <https://www.conab.gov.br>. Acesso em 12 mai. 2018.

Couto, S. R., Sanromán, M. A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22, 211-219.

De Bruyn, F., Zhang, S. J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., De Vuyst, L. (2017). Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and Metabolite Profiles during Green Coffee Bean Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1), 02398-16.

Decazy, F., Avelino, J., Guyot, B., Perriot, J. J., Pineda, C., Cilas, C. (2003). Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. *Journal of Food Science*, 68(7), 2356-2361.

Duarte, W. F. et al. (2009). Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabiroba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(4), 557- 569.

Dujon, B. A., Louis, E. J. (2017). Genome Diversity and Evolution in the Budding Yeasts (*Saccharomycotina*). *Genetics*, 206(6), 717-750.

Esquivel, P., Jimenez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488-495.

Evangelista, S. R., Miguel, M. G., Cordeiro, C. S., Silva, C. F., Pinheiro, A. C., Schwan, R. F. (2014). Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food Microbiology*, 44(87), 95.

Fan, L., Soccol, A. T., Pandey, A., Soccol, C. R. (2003). Cultivation of Pleurotus mushrooms on Brazilian coffee husk and effects of caffeine and tannic acid. *Micology Applied International*, 15(1),15-21.

Ferrão, A. M. A. (2004). Arquitetura do café. *Editores da Unicamp*, 296, 47-74.

Gao, D., Haarmeyer, C., Balan, V., Whitehead, T. A., Dale, B. E. (2014). Lignin triggers irreversible cellulase loss during pretreated lignocellulosic biomass saccharification. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1-13.

Garna, H., Mabon, N., Wathelet, B., Paquot, M. (2004). New Method for a two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 52(15), 4652-4659.

Genard, M., Reich, M., Lobit, P., Besset, J. (1999). Correlations between sugar and acid content and peach growth. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74(1), 772-776.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 3-11.

Gupta, R. K., Gangoliya, S. S., Singh, N. K. (2015). Screening and characterization of wheat germplasms for phytic acid and iron content. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(3), 747-756.

Gupta, T. K., Gupta, N. G. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology Biotechnology*, 64(6), 81-763.

Gusmão, R. O., Ferraz, L. M., Rêgo, A. A. B., Assis, F. G. V., Leal, P. L. (2014). Produção de enzimas por *Aspergillus spp.* sob fermentação em estado sólido em casca de café. *Scientia Plena*, 10, 1-11.

Guyot, B. et al. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabica (1996). *Plantations Recherche Développement, Montpellier*, 3(4), 272-280.

Hajar, S., Azhar, M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Azlan, J., Azifa, A., Faik, M., Francis, K. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61.

Hikichi, S. E., Andrade, R. P., Dias, E. S., Duarte, W. F. (2017). Biotechnological applications of coffee processing by-products. *Handbook of Coffee Processing By-Products*, 8, 221-244.

Hoffmann, C.E. (2001). Resfriamento no processo de torra nas características de qualidade tecnológica e sensorial do café. *Universidade Federal de Pelotas*.

ICO- International coffee organization. Disponível em: <http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf>. Acesso em 20 set. 2018.

Illy, A., Viani, R. (1996). Espresso coffee: The chemistry of quality. 2 ed. San Diego: Academic. 253p.

Jackels, S., Jakels, C. (2005). Characterization of the Coffee Mucilage Fermentation Process Using Chemical Indicators: A Field Study in Nicaragua, *Food Chemistry and Toxicology*, 70(5), 321-325.

Jham, G. M., Fernandes, A. S., Garcia, C. F., Silva, A. A. (2002). Comparison of GC and HPLC for the Quantification of Organic Acids in Coffee. *Phytochem Anal*13, 99-104.

Joet, T. (2010). Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chemistry, Maryland Heights*, 118(3), 693701.

Kashyap, D. R., Chandra, S., Kaul, A. (2000). Production, purification and characterization of pectinase from *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(1), 277-282.

Kang, S. W., Park, Y. S., Lee, J. S., Hong, S. I., Kim, S. W. (2004). Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 91, 153-156.

Kleinwachter, M., Selmar, D. (2010). Influence of drying on the content of sugars in wet processed green Arabica coffees. *Food Chemistry*, 119, 500-504.

Knopp, S., Bytof, G., Selmar, D. (2006). Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. *European Food Research and Technology*, 223, 195-201.

Kwon, D. L. (2018). Scientific knowledge in traditional fermented foods. *Journal of Ethnic Foods*, 5(3), 153-154.

Lahis, D., Caldeira, M., José, A., Conti, D., Paula, M., Toledo, M. De. (2018). Steam pressure treatment of defective *Coffea canephora* beans improves the volatile profile and sensory acceptance of roasted coffee blends. *Food Research International*, 105, 393-402.

Lehotay, S., Hajslova, J. (2002). Application of gas chromatography in food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 21(9), 686-697.

Leloup, V., Gancel, C., Liardon, R., Rytz, A., Pithon, A. (2005). Impact and dry process on green coffee composition and sensory characteristics. *20 ème Colloque Scientifique International sur le Café*, 93-11.

Leroy, T., Ribeyre, F., Bertrand, B., Charmetant, P., Dufour, M., Montagnon, C. Pot, D. (2006). Genetics of coffee quality. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 229-242.

Lingle, T. R (2011). The Coffee Cupper's Handbook: Systematic Guide to the Sensory Evaluation of Coffee's Flavor. *Long Beach Californian*, 66.

Lucia, D. S. M., Minim, V. P. R, Silva, C. H. O, Minim, L. A., Cipriano, P. A (2013). Regression analysis of ordered probit of the effect of the brand on the acceptance of beer by consumers. *Food Science and Technology*, 33(3), 586-591.

Ludlow, C. L., Cromie, G. A., Garmendia-torres, C., Jeffery, E. W., Fay, J. C., Field, C. (2016). Independent origins of yeast associated with coffee and cacao fermentation report. *Current Biology*, 26(7), 965-971.

Marques, P. B. O., Yamanaka, H. (2008). Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Química Nova*, 31(7), 1791-1799.

Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct desnaturating gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21, 549-556.

Masoud, W., Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 291-296.

Massawe, G.A., Lifa, S.J. (2010). Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. *International Journal Postharvest Technology*, 2, 41-80.

Matiello, J. B., Santinato, R., Garcia, A. W. R., Almeida, S. R., Fernandes, D. R. (2005). Cultura do Café no Brasil. *Novo Manual de Recomendações*. Rio de Janeiro: Bom Pastor.

Matiello, J. B., Santinato, R. (2010). Colheita, Processamento e Qualidade do Café. *Cultura de Café no Brasil: Manual de Recomendações*, 7, 471-526.

Maurice G. O. (2017). Innovative Technologies for the Food and Beverage Industry. *Food Science, Technology and Nutrition*, 151-175.

Melo, V. De, Gilberto, P., Soccol, V. T., Brar, S. K., Neto, E., Soccol, C. R. (2015). Microbial Ecology and Starter Culture Technology in Coffee Processing. *Food Science and Nutrition*, 3(12), 1549-7852

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

Nasanit, R., Satyawut, K. (2015). Microbiological study during coffee fermentation of *Coffea arabica* var. *chiangmai* 80 in Thailand. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 49(1), 32-41.

Nobre, G. W. (2009). Processamento e qualidade de frutos verdes de café arábica. *Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras*, 85.

OIC - ORGANIZACION INTERNACIONAL DEL CAFÉ (2018). Disponível em: [www.oic.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf](http://www.oic.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf). Acesso em 21 jul. 2018.

Oumer, O. J., Abate, D. (2018). Screening and Molecular Identification of Pectinase Producing Microbes from Coffee Pulp. *BioMed Research International*, 2018, 2961767.

Pee, W. V., Castelein, J. M. (1972). Study of the pectinolytic microflora, particularly the enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, 37(1), 171-174.

Pereira, G. V. M., Soccol, V. T., Medeiros, A. B. P., Woiciechowski, A. L., Soccol, C. R. (2015). Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International*, 75, 348-356.

Pereira, G. V. M., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Andrade, J. M. R. L., Gollo, A. L., Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188(64), 60-66.

Picoli, S. U., Bessa, M. C., Castagna, S. M. F., Gottardi, C. P. J., Schmidt, V., Cardoso, M. (2006). Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1), 64-69.

Pimenta, C. J. Qualidade de café. Lavras: UFLA, 2003. 304p.

Pitt, O. (1988). Pectic lyase from *Rhoma medicabini* var. *pinodella*. *Methods in Enzymology*, 161, 350-365.

Ponte, S. (2002). The “Latte Revolution”? Regulation, Markets and Consumption in the Global Coffee Chain. *Elsevier Science*, 30(7), 1099-1122.

Puerta-Quintero, G. (2013). Cinética química de la fermentación del mucílago de café a temperatura ambiente. *Revista Cenicafé*, 64(1), 65-71.

Quintero, G. I. P., Mejía, J. M., Betancur, G. A. O. (2012). Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección. *Cenicafé*, 63(2), 5878.

Rai, A. K., Pandey, A., Sahoo, D. (2019). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 129-137.

Reis, S., Gabriela, M., Miguel, P., Souza, D., Ferreira, C., Carla, A., Freitas, R. (2014). Inoculation of *starter* cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food Microbiology*, 44, 87-95.

Ribeiro, F. C., Figueiredo, L. P., Giomo, G. S., Barbosa, F. D., Mantovani, S. M., Borém, F. M. (2009). Influência de métodos de degomagem biológica sobre a germinação e vigor de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) submetidos a diferentes métodos de degomagem biológica. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil.

Ribeiro, L. S., Evangelista, S. R., Cruz Pedrozo Miguel, M. G., van Mullem, J., Silva, C. F., Schwan, R. F. (2018). Microbiological and chemical-sensory

characteristics of three coffee varieties processed by wet fermentation. *Annals of Microbiology*, 68(10), 705-718.

Rogers, W. J., Michaux, S., Bastin, M., Bucheli, P. (1999). Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myoinositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Science*, 149, 115-123.

Rogers, L. (2018). Sensory Panel Management: A Practical Handbook for Recruitment, Training and Performance. *Food Science, Technology and Nutrition*, 1, 317-326.

Rossetti, R. P. (2007). Determinação de Fenóis Totais em Frutos do Café: Avaliações em Diferentes Fases de Maturação. *Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo*, 72.

Rubayiza, A. B., Meurens, M. (2005). Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by fourier transform raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4654-4659.

Ruth, L., Pellegrino, G., Giugno, G., Consonni, R. (2013). Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* in roasted and ground coffee blends. *Talanta*, 106, 169-173.

Saath, R. (2010). Qualidade do café natural e despulpado em diferentes condições de secagem e tempos de armazenamento. *Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Agrônomicas Campus de Botucatu*.

Sakiyama, C. C. H., Paula, E. M., Pereira, P. C., Borges, A. C., Silva, D. O. S. (2001). Characterization of pectin lyase produced by endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 117-121.

Salgado, J. M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., Domínguez, J. M., Belo, I. (2015). Enhancing the bioconversion of winery and olive mill waste mixtures into lignocellulolytic enzymes and animal feed by *Aspergillus uvarum* using a packed-bed bioreactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(42), 9306-9314.

Salva, T. J. G., Lima, V. B. (2007). Composição química do café e as características da bebida e do grão. *O Agrônomo*, 59(1), 57-59.

Sandine, W. E. (1996). Commercial production of dairy starter cultures. In: Cogan, T.M.; Accolas, J.P. *Dairy starters culture*, New York, J.P. 101-129.

Santos, K. M., Moura, M. F. V., Azevedo, F. G., Lima, K. M. G., Raimundo Jr., I. M., Pasquini, C. (2012). Classification of Brazilian Coffee Using Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Analytical Letters*, 45(7), 774-781.

Santos, M. A., Chalfoun, S. A., Pimenta, C.J. (2009). Influência do processamento por via úmida e tipos de secagem sobre a composição, físico

química e química do café (*coffea arábica* L). *Ciência agrotécnica*, 33(1), 213-218.

SCA– Special Coffee Association: Protocolos de colocação da Specialty Coffee Association, (2009). Disponível em: <http://www.scaa.org/?page=resources&d=cupping-protocols>. Acesso em 01 Jan. 2018.

SCA– Special Coffee Association, (2012). Disponível em: <http://www.scaa.org>. Acesso em 09 Fev. 2017.

Schwan, R. F., Wheals, A.E. (2003). Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: Boekhout, T.R.V. (Ed.). *Yeasts in Food, Behr's Verlag, Hamburg*, 426-459.

Silva, C. F. (2014). Microbial activity during coffee fermentation. In: Schwan, R.F., Fleet, G.H., *Cocoa and Coffee Fermentation*. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 398-423.

Silva, C. F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(1), 215-260.

Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., Schwan, R. F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25, 951–957.

Silva, F. A. S. (1996). ASSISTAT 7.7 PT. Universidade Federal de Campina Grande. Disponível em: <http://www.assistat.com/indexp.html>

Silva, C. F., Vilela, M. D., Cordeiro, S. C., Duarte, F. W., Dias, R. D., Schwan, R. F. (2013). Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *Word Journal of Microbiology and Biotechnanology*, 29, 235-247.

Sindcafé-MG – Sindicato da Indústria de Café do Estado de Minas Gerais, (2014). Disponível em: <http://sindicafe-mg.com.br/plus/modulos/conteudo/?tac=tipos-de-cafe>. Acesso em 16. Fev. 2017.

Sivetz, M. (1963). *Coffee processing technology*, vol 2. AVIC, Westport, Connecticut.

Takata, K., Kinoshita, M., Okuno, T., Moriya, M., Kohda, T., Honorat, J. A., Nakatsuji, Y. (2011). The Lactic Acid Bacterium *Pediococcus acidilactici* Suppresses Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing IL-10-Producing Regulatory T Cells. *Plos One*, 6(11), 2-8.

Tamang, J. P. (2014). Biochemical and modern identification techniques. Microfloras of Fermented Foods. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1, 250-258.

Ted R. L., Sunalini N. M. (2017). Cupping and Grading-Discovering Character and Quality. *The Craft and Science of Coffee*, 520(1), 181-203.

Tolessa, K., Rademaker, M., Baets, B. De, Boeckx, P. (2016). Prediction of specialty coffee cup quality based on near infrared spectra of green coffee beans. *Talanta*, 150, 367-374.

Ukers, W. H. (1922). All About Coffee. Inter-American Copyright Union. By Burr Pirnting House. *First Edition*.

Vaast, P., Bertrand, B., Perriot, J., Guyot, B., Génard, M. (2006). Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2), 197-204.

Van Pee, W., Castelein, J. M. (1972). Study of the pectinolytic microflora, particularly the *enterobacteriaceae*, from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, 37(1), 171-174.

Vaughn, R. H., De Camargo, R., Fallanghe, H., Mello-Ayres, G., Serzedello, A. (1958). Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. *Food Technology*, 12 (2), 12-57.

Velmourougane, K. (2013). Impact of Natural Fermentation on Physicochemical, Microbiological and Cup Quality Characteristics of Arabica and Robusta Coffee. *Proceedings of the National Academy of Science*, 83(2), 233-239.

Verma, G., Nigam, P., Singh, D., Chaudhary, K. (2000). Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amyolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae*. *BioresourceTechnology*, 72(3), 261-266.

Vilela, D. M., Pereira, G. V., Silva, C. F., Batista, L.R., Schwan, R.F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128-1135.

Vitorino, M. D., França, A. S., Oliveira, L. S., Borges, M. L. A. (2001). Metodologia de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis. *Revista Brasileira de Armazenamento*, 26(3), 17-24.

Wei, L., Wai, M., Curran, P., Yu, B., Quan, S. (2015). Coffee fermentation and flavor - An intricate and delicate relationship. *Food Chemistry*, 185, 182-191.

Wendler, R., Veith, R., Dancer, J., Stitt, M., Komor, L. (1990). Sucrose storage in cell suspension cultures of *Saccharum sp.* (sugarcane) in regulated by a cycle of synthesis and degradation. *Planta*, 183, 31-39.