



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**BACTÉRIAS E FUNGOS ASSOCIADOS AO
CAFÉ NATURAL E AO MATERIAL
ENVOLVIDO NA COLHEITA**

SILVIA ALTOÉ FALQUETO

2003

56305
048002

SILVIA ALTOÉ FALQUETO

**BACTÉRIAS E FUNGOS ASSOCIADOS AO CAFÉ NATURAL E AO
MATERIAL ENVOLVIDO NA COLHEITA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Profa. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS - BR
2003

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

Falqueto, Silvia Altoé

Bactérias e fungos associados a café natural e ao material envolvido na colheita / Silvia Altoé Falqueto. -- Lavras : UFLA, 2003.

57 p. : il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Fungo. 3. Bactéria. 4. Colheita. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD-576.163

-633.735

SILVIA ALTOÉ FALQUETO

**BACTÉRIAS E FUNGOS ASSOCIADOS AO CAFÉ NATURAL E AO
MATERIAL ENVOLVIDO NA COLHEITA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do Curso
de Mestrado em Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 25 DE Junho de 2003

Prof. Romildo da Silva

UFLA

Prof. Hilário Antônio de Castro

UFLA



Profa. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Sistemas de colheita.....	3
2.1.1 Colheita manual.....	3
2.1.2 Colheita mecanizada.....	4
2.2 Qualidade e classificação do café.....	5
2.2.1 Fatores que influenciam a qualidade da bebida.....	7
2.2.1.1 Espécie de cultivo.....	7
2.2.1.2 Composição química do fruto.....	8
2.2.1.3 Condições climáticas.....	11
2.2.1.4 Processamento do café.....	12
2.3 Fontes de contaminação microbiana e fermentações dos frutos.....	14
2.4 Microrganismos associados ao processamento.....	18
2.5 Pectinases microbianas na fermentação do café.....	24
2.6 Torração e moagem.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Colheita do café.....	28
3.2 Análises microbiológicas.....	29
3.3 Identificação de bactérias.....	30
3.3.1 Identificação de bactérias gram-negativas.....	30
3.3.2 Identificação de bactérias gram-positivas.....	31
3.4 Identificação de fungos filamentosos.....	32
3.5 Avaliação da produção de pectinases pelos isolados bacterianos.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Contaminação bacteriana.....	33
4.2 Produção de pectinases pelos isolados bacterianos.....	37
4.3 Fungos filamentosos.....	40
5 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	51

AGRADECIMENTOS

O Fernando não merece só agradecimentos, ele merece um prêmio! Cada dia deste mestrado (e da minha vida desde que a gente se conheceu) foi mais legal porque ele estava junto comigo pra tudo. Muitas vezes não foi fácil levantar o meu astral, mas ele é persistente e nunca me deixou desanimar... E ele me deu o Léo e o neném, que fazem a minha vida ser o máximo!!!

O Léo tem o enorme mérito de me desestressar todos os dias com o seu sorriso e com suas brincadeiras. Que sorte ter um filho tão fofo e que dá tão pouco trabalho...

A Letícia cuidou do Léo tão direitinho que sem ela teria sido difícil trabalhar tranqüila... Como agradecer a alguém quase tão apaixonada pelo Léo quanto eu e o Fer?

Minha família está presente no meu jeito de fazer as coisas, assim, agradeço aos meus pais por ter chegado até aqui e aos meus irmãos (especialmente a Elisa) por torcerem por mim lá de longe... Em especial, agradeço ao meu pai por tirar minhas dúvidas a respeito de cultura de café.

A Rosane foi um superexemplo pra mim e continuará sendo sempre. Agradeço a confiança, a orientação e o empenho em ajudar.

O Júlio, além de ter sido um bom co-orientador, também foi um grande fio-terra, além de ser sempre um bom amigo... O pessoal da Ecologia, principalmente a Teresa, a Jaqueline e a Andreíza, foi muito presente nestes dois anos, e espero que não se esqueçam de escrever quando a gente for embora.

No laboratório, todo mundo sempre foi muito jóia comigo, mas, em especial, Ara, Cidinha, Cris, Ivani, Alcimara, Luana, Cássia, Cláudia Labory, Paschoal, Marisa, Evânia e Raquel estavam sempre prontas para tirar uma dúvida, dar uma ajudinha, bater um papo, tomar um cafezinho...

Aliás, falando em bater papo e tomar cafezinho, Dona Hirô e Rosângela sempre estavam ali pra um papinho e são uma simpatia só... Obrigada pela torcida, viu?

Evânia e Marisa dividiram comigo a responsabilidade de ser a primeira turma do mestrado em micro... foi muito legal tê-las junto pra saber que eu não estava sozinha... E. enfim, chegamos ao final!!!

Agradeço à CAPES, pela bolsa de mestrado e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Esqueci de alguém? Com certeza... Mas espero que todo mundo que esteve presente na minha vida nestes dois anos se sinta-se lembrado, porque cada pessoa deixa sua marca nas coisas que a gente faz...

Dedico esta dissertação àqueles que fazem a sua parte para que o mundo seja um lugar mais legal e sincero.

RESUMO

FALQUETO, S.A. Bactérias e fungos associados a café natural e ao material envolvido na colheita. Lavras: UFLA, 2003. 62 p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia Agrícola)

Fungos filamentosos, leveduras e bactérias foram isolados a partir de amostras de café processado por via seca (café natural) e de material (peneiras, derrçadoras, recolhedoras, panos e mãos de operários) associado à colheita. A maior parte dos 195 isolados bacterianos (157 isolados) pertence ao gênero *Bacillus*, cuja espécie mais abundante foi *Bacillus licheniformis* (68 isolados). Do mesmo gênero, *B. firmus* foi a segunda espécie mais abundante, com 17 isolados, seguida por *B. coagulans* (16) e *B. polymyxa* e *B. cereus/thuringiensis* (13 isolados cada). *B. larvae* e *B. alvei* apareceram com 6 isolados cada, *B. subtilis* com 5, *B. sphaericus* e *B. lentimorbus/popilliae* com 4 cada, *B. pumilus* com 2 e *B. stearothermophilus*, *B. macerans* e *B. brevis* com um isolado cada. As outras bactérias incluíram bastonetes não esporulados (16 isolados) dos quais quatro são *Carnobacterium mobile*, e 18 que não se encaixaram em nenhum dos gêneros propostos nos manuais de identificação utilizados. Também foram obtidos 14 cocos gram-positivos e 4 bactérias gram-negativas (2 cocos e 2 bastões) que não se encaixaram em nenhum dos gêneros propostos nos manuais de identificação utilizados. Entre os 93 fungos isolados, 80 foram identificados até gênero. Os gêneros encontrados foram *Fusarium* (55 isolados), *Penicillium* (19 isolados), *Aspergillus* (4 isolados) e *Cladosporium* (2 isolados). As 198 leveduras não foram identificadas. As bactérias foram testadas quanto à capacidade de produção de poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL), duas enzimas do complexo pectinolítico. Nenhum isolado produziu PG, mas 17 isolados produziram PL. Dos 17 isolados produtores, 11 eram *B. licheniformis*. A maior parte das espécies de *Bacillus* isoladas pode ser encontrada no solo, podendo ser esta a via de contaminação do café por estes microrganismos. Alguns isolados de bactérias e de fungos foram obtidos de equipamentos, possivelmente trazidos pela poeira. O pequeno número de isolados produtores de PL pode estar atuando apenas restritamente no desprendimento da mucilagem. Os gêneros de fungos encontrados são muito comuns em frutos de café, sendo que *Fusarium* está associado a bebidas de pior qualidade, *Cladosporium* a bebidas de melhor qualidade e *Penicillium* e *Aspergillus* à produção de micotoxinas.

Comitê orientador: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora)
Dr. Júlio N. C. Louzada – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

FALQUETO, S.A. **Bacteria and filamentous fungi isolated from natural coffee and from materials associated with harvest.** Lavras: UFLA, 2003. 62 p. (Dissertation - Master's Program in Agricultural Microbiology)

Filamentous fungi, yeasts and bacteria were isolated from coffee samples processed by dry (natural) method and from harvest material (sieves, tissues, mechanical harvesters, worker hands). Bacterial isolates (195 isolates) are chiefly *Bacillus* species (157 isolates), among which the most abundant species was *B. licheniformis* (68 isolates). From the same genus, *B. firmus* was the second most abundant species, with 17 isolates, followed by *B. coagulans* (16), *B. polymyxa* and *B. cereus/thuringiensis* (13 isolates each one). *B. larvae* and *B. alvei* had 6 isolates each, *B. subtilis* had 5 isolates, *B. sphaericus* and *B. lentimorbus/popilliae* had 4, *B. pumilus* had 2 and *B. stearothermophilus*, *B. macerans* and *B. brevis* had 1 isolate each one. The other bacterial isolates included 4 *Carnobacterium mobile* and another 14 Gram-positive non sporulated rods not identifiable by available methodology. Fourteen Gram-positive cocci and 4 Gram-negative bacteria (2 cocci and 2 rods), not identifiable by available methodology have been also isolated. The 93 fungal isolates belong to the following genera: *Fusarium* (55 isolates), *Penicillium* (19 isolates), *Aspergillus* (4 isolates) and *Cladosporium* (2 isolates). Thirteen fungal isolates could not be identified because of the absence of spores nor reproductive structures. Yeasts were not identified. Bacterial isolates were tested for their capability of producing poligalacturonase (PG) and pectin liase (PL), two enzymes from the pectinolytic complex. None produced PG, but 17 isolates produced PL. Eleven of the isolates capable of producing PL were *B. licheniformis* isolates. The *Bacillus* species isolated are mainly found in soil and dust, probably the major sources of these microorganisms to coffee fruits. Some isolates were obtained from harvest equipment and worker hands, possibly on dust over them. The few bacteria producing PL can be working only restrictly on mucilage decomposition. The fungal genera found are common on coffee: *Cladosporium* is associated to good quality coffees; *Fusarium*, to bad ones and to micotoxin production, as are *Penicillium* and *Aspergillus*.

Guidance Committee: Dr. Rosane Freitas Schwan (UFLA)
Dr. Júlio N. C. Louzada (UFLA)

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café, produzindo quase um terço dos cerca de 104 milhões de sacas colhidas por ano no mundo. A cultura do café gera milhares de empregos diretos e indiretos no país, mas vem perdendo lucratividade devido aos baixos preços pagos pela saca de café brasileiro no mercado internacional.

A qualidade da bebida é influenciada por fatores como a espécie e variedade cultivada, manejo da cultura e cuidado nas operações agrícolas pós-colheita (como a secagem, armazenamento, torração, moagem e preparo da infusão). Durante o processamento dos grãos de café a atividade metabólica da microbiota natural e contaminante pode influenciar na qualidade final do produto. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos já foram isolados da polpa e semente dos frutos de *Coffea arabica* e *C. canephora* em vários países produtores. Maior ênfase tem sido dada aos fungos filamentosos pela capacidade de algumas espécies de produzirem micotoxinas que podem interferir na qualidade e segurança da bebida de café produzida.

No entanto, estudos recentes indicam que bactérias e leveduras podem estar interferindo na qualidade do café Arábica processado por via seca, pela produção de enzimas, ácidos orgânicos e alguns álcoois. A contaminação microbiana pode acontecer nos grãos ainda na árvore, durante a colheita e na secagem, beneficiamento e armazenamento dos grãos verdes. Durante a maturação, o fruto de café acumula açúcares e outros compostos que se tornam um rico substrato para o crescimento microbiano. Produtos da utilização destes compostos pelos microrganismos podem se difundir para o interior do grão, ajudando a compor o sabor da bebida.

A necessidade de conhecer os microrganismos que colonizam o grão de café e as formas de contaminação deste pelos microrganismos fica então patente,

já que a contaminação microbiana pode interferir nas características e qualidade do produto. Para tanto, este trabalho teve como objetivo identificar fungos e bactérias associados a grãos de café seco em terreiro e de material associado à colheita.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sistemas de colheita

A colheita do café é a etapa mais dispendiosa de todo o sistema produtivo da cultura. Também é, certamente, um das etapas que mais influenciam a qualidade e o custo do produto final. Dependendo do cuidado e dos equipamentos utilizados, a colheita pode demandar até 30% dos custos de produção e 40% da mão-de-obra do processo, influenciando assim o lucro do produtor. A forma como é realizada a colheita também tem influência na safra do ano seguinte, já que determinados métodos de colheita desfolham em demasia a árvore, exigindo que ela transloque nutrientes para a produção de folhas e ramos, em detrimento de flores e frutos (Carvalho Júnior, 2002).

O ideal é que só os grãos cereja sejam colhidos, já que grãos verdes ou sobremaduros conferem características indesejáveis à bebida. No entanto, a colheita a dedo, que é feita em países como a Colômbia, tem um custo elevado e requer planejamento e muita mão-de-obra, o que faz com que ela não seja adotada no Brasil (Carvalho Júnior, 2002).

2.1.1 Colheita manual

No Brasil, o período de colheita se inicia em abril ou maio e termina em agosto ou setembro, dependendo da região produtora, da quantidade de café existente na planta e da quantidade de frutos maduros. A decisão de quando iniciar a colheita é determinante na qualidade do produto final, já que todos os frutos da árvore são colhidos ao mesmo tempo e, devido à ocorrência de várias florações, a maturação não é uniforme. Quanto mais tempo o café permanecer na lavoura após a maturação, seja na árvore ou no chão, maior a ocorrência dos defeitos ardido e preto, tão prejudiciais ao sabor da bebida quanto os verdes.

Assim, a colheita inicia-se quando a maior parte dos frutos estiver madura (cerca de 90%) e antes que os frutos comecem a cair. Em anos de maturação muito desuniforme, podem-se encontrar teores de até 20% de verdes, com prejuízo na qualidade da bebida e, conseqüentemente, no preço pago ao produtor. Em média, o ponto ideal para a colheita ocorre sete meses após a primeira floração, que costuma ocorrer durante as primeiras chuvas de verão (meados de outubro e novembro do ano anterior).

As operações envolvidas na colheita manual são, em seqüência: limpeza da área ao redor e sob o cafeeiro (arruação), retirada do fruto da planta (derriça), ajuntamento do café caído no chão (varrição), recolhimento do café varrido, limpeza por meio de peneiramento para a separação de terra e folhas (abanação) e transporte para a área de processamento (Carvalho Júnior, 2002).

As operações da colheita podem ser realizadas manualmente (com exceção do transporte) ou com o uso de máquinas. Nesse caso, o sistema pode ser o semi-mecanizado ou o mecanizado.

No sistema manual, todo o trabalho é feito por força humana, sendo o sistema mais caro e demorado. Cerca de 70% do trabalho são gastos na derriça, que é feita puxando-se todos os frutos do galho, deixando-o completamente limpo. Os frutos caem sobre o chão ou, preferencialmente, sobre um pano, de onde são recolhidos e abanados antes de serem transportados ao local de processamento (Silva et al., 2000). A utilização do pano protege os frutos do contato com o solo, onde a contaminação dos frutos por microrganismos é maior, o que pode levar a fermentações indesejadas.

2.1.2 Colheita mecanizada

As derriçadoras costais motorizadas começaram a ser usadas na colheita por volta de 1998 e seu uso vem se expandindo como a única alternativa de mecanização para áreas íngremes como o sul de Minas Gerais e do Espírito

Santo. Este tipo de derriçadora funciona com um motor costal ou lateral que aciona hastes vibratórias na extremidade de um cabo manejado manualmente. A vibração das hastes balança os galhos, fazendo com que os frutos caiam. Esta derriçadora tende a deixar mais frutos verdes no pé do que a colheita manual, já que os frutos verdes são mais difíceis de ser arrancados. Assim, embora ainda não haja estudos a respeito, acredita-se que este tipo de colheita favoreça a qualidade do café, já que tende a ser seletiva para frutos cereja e secos. A varrição e o recolhimento do café derriçado desta forma podem ser manuais ou mecanizados. A derriçadora costal, no entanto, quebra mais galhos e tende a desfolhar mais a árvore do que o sistema manual, podendo prejudicar a colheita do ano seguinte (Carvalho Júnior, 2002).

Em se tratando do sistema mecanizado, existem as colhedoras conjugadas, no mercado desde o fim da década de 1970, que derriçam, recolhem, abanam e ensacam o café colhido numa única operação. Este tipo de máquina tem o formato de um pórtico com dois derriçadores laterais, trabalhando “a cavaleiro” sobre uma linha de plantas por vez (Carvalho Júnior, 2002). No entanto é inadequado para lavouras em regiões montanhosas, já que as linhas de cafeeiros se dispõem em curvas de nível sobre os morros.

2.2 Qualidade e classificação do café

A qualidade de produtos alimentícios está intimamente relacionada ao gosto do mercado consumidor, principalmente quanto ao sabor, aroma e aparência. Além disso, a qualidade também envolve o valor nutricional do produto e sua segurança, do ponto de vista toxicológico (Carvalho Júnior, 2002).

O café de boa qualidade apresenta bebida encorpada, com aroma agradável, acidez e suavidade. Os frutos devem ter poucos defeitos (como os defeitos verdes, verde-escuros, preto-verdes, ardidos e pretos) e apresentar cor e aspecto homogêneos (Carvalho Junior, 2002).

Oficialmente, os cafés podem ser classificados pela análise sensorial (prova de xícara) e também pelo seu tipo e peneira. A classificação por tipo é realizada segundo a Tabela Oficial Brasileira de Classificação do Instituto Brasileiro do Café (1977).

A classificação pela prova de xícara se baseia no sabor e aroma da bebida, avaliados por provadores treinados. Esta prova surgiu no Brasil no início do século XX e foi adotada pela Bolsa Oficial de Café e Mercadorias de Santos a partir de 1917. No entanto, até hoje ainda não há um consenso nos critérios usados por diferentes entidades avaliadoras para classificar as bebidas, o que tem tornado a prova de xícara alvo de críticas. Segundo Chagas (1994), a prova de xícara tende a considerar a bebida dura como valorização máxima do café.

Prete (1992) define a qualidade como sendo o resultado da somatória de atributos físicos do grão cru, como cor, tamanho, densidade, forma e uniformidade; dos atributos do grão torrado, destacando a homogeneidade na cor e cor da película prateada, e das características organolépticas da bebida, expressas pelo gosto e aroma. Na comercialização do café, a qualidade da bebida tem maior peso que os outros atributos, podendo haver uma diferença em torno de 30% no preço entre cafés finos (bebida mole) e os de pior qualidade (bebida rio).

Na procura por métodos mais objetivos para a avaliação da qualidade do café, surgiu a determinação da atividade da polifenoloxidase e da peroxidase (Amorim, 1977). A atividade da polifenoloxidase se correlaciona positivamente com a qualidade da bebida: quando o grão é injuriado (pelo ataque de insetos, ou durante a colheita, processamento ou beneficiamento) a enzima e seu substrato (que encontravam-se separados no grão) entram em contato, sendo que o produto da reação inibe a atividade da enzima (Amorim et al., 1977). No entanto, segundo Goulart (2002), os métodos de extração e análise da atividade da PFO, baseados em testes colorimétricos, são sujeitos a erros por permitirem a

oxidação de fenóis e escurecimento do extrato, mascarando, assim, a real atividade da enzima. Mesmo utilizando metodologia mais cuidadosa, que protegia os fenóis da oxidação e, posteriormente, os eliminava do extrato, a autora não conseguiu separar amostras de café entre as seis categorias existentes (estritamente mole, mole, apenas mole, duro, riado e rio) pela atividade da polifenoloxidase. A atividade da enzima foi maior em cafés de melhor qualidade, tendo sucesso apenas em separá-los dos de pior qualidade.

A peroxidase tem maior atividade em cafés de melhor qualidade. A baixa atividade da enzima em cafés de pior qualidade também evidencia manejo inadequado, que leva à ruptura das membranas celulares e ao contato da enzima com seu substrato, o peróxido de hidrogênio (Amorim & Amorim, 1977; Amorim & Melo, 1991).

2.2.1 Fatores que influenciam a qualidade da bebida

2.2.1.1 Espécie de cultivo

As principais espécies de café cultivadas comercialmente são *Coffea arabica* Linnaeus e *C. canephora* Pierre ex Froehner, conhecidas como café arábica e robusta, respectivamente. Existem poucas informações sobre a diferença de composição química entre as duas espécies, mas sabe-se, por exemplo, que os cafés robusta tem aproximadamente 2% de cafeína, o dobro do apresentado pelo café arábica (1%) (Sivetz, 1963; Raghavan & Ramalakshmi, 1998).

Rogers et al. (1999) encontraram níveis de glicose no início da maturação entre 8% a 12% (peso seco) em grãos de café arábica e de 2% a 4% (peso seco) em grãos de café robusta. No grão maduro, a sacarose tem maiores teores em cafés arábica (5% a 12% do peso seco) do que em cafés robusta (4% a 5% do peso seco). Rogers et al. (1999) encontraram teores de ácido quínico,

precursor dos ácidos clorogênicos, de 16% do peso seco de grãos de café robusta contra 6% do peso seco de grãos de café arábica. Segundo Raghavan & Ramalakshmi (1998), no grão processado, o café robusta possui de 7% a 10% de ácidos clorogênicos, contra 5,5 a 8% no café arábica. Segundo os mesmos autores, altos teores de ácidos clorogênicos, em geral, indicam qualidade pior.

As sementes de café arábica são ovais, mais compridas e maiores e produzem bebida mais aromática que as sementes de café robusta, que são redondas e menores (Raghavan & Ramalakshmi, 1998). Cafés arábica possuem um fino aroma e acidez desejável, enquanto cafés robusta apresentam baixa acidez e mais corpo na bebida (Jones & Jones, 1984; Sivetz & Desrosier, 1979 e Puerta-Quintero, 1998).

Söndahl e Corp (1995) afirmaram que o café arábica sempre resulta em boa bebida, ao passo que o robusta produz bebida de pior qualidade por não apresentar sabor muito agradável (Carvalho et al., 1997). Os estudos de Pereira (1962) corroboram esta afirmação: o autor encontrou maiores teores de ácido clorogênico em cafés robusta do que em arábica. Cafés robusta possuem um maior teor de sólidos solúveis, por isso são usados na indústria para a produção de café solúvel (Sivetz & Desrosier, 1979; Raghavan & Ramalakshmi, 1998). Segundo Oliveira et al. (1976), a atividade de polifenoloxidase (que, em grãos de café, correlaciona-se positivamente com a qualidade da bebida) é maior em *C. canephora* do que em *C. arabica*, embora seja consenso que a qualidade da bebida do primeiro seja pior que a do último.

2.2.1.2 Composição química do fruto

Durante o desenvolvimento do fruto de café, os açúcares nele presentes, principalmente a galactose, sofrem oxidação e são sendo convertidos em ácidos carboxílicos (ácidos galacturônicos). Estes, por desidratação, formam os anidridos, que se polimerizam até a formação de compostos de alto peso

molecular, as pectinas da mucilagem (Carvalho et al., 1997). Assim, estas substâncias são originadas e compostas principalmente de galactose, arabinose e outros açúcares. Juntamente com as substâncias pécticas e os açúcares, são sintetizadas na polpa várias enzimas pectinolíticas.

A mucilagem do café é formada no estágio cereja, quando o fruto está quase maduro e é composta de 85% de água ligada e 15% de sólidos na forma de um gel insolúvel e coloidal. A porção sólida deste gel é composta de 80% de substâncias pécticas e 20% de açúcares (Carvalho et al., 1997).

Rogers et al. (1999) acompanharam as mudanças na concentração de vários compostos durante a maturação de grãos de café arábica e robusta. Segundo eles, as mudanças na composição química ocorrem de forma bastante similar nas duas espécies. Duas tendências principais são observadas durante a maturação: uma diminuição em alguns componentes de um nível inicialmente maior e uma acumulação constante de outros a partir de um nível inicialmente baixo nos grãos jovens. Ainda no mesmo trabalho, até aproximadamente a metade da maturação, a glicose e a frutose são os açúcares livres em maior concentração no grão. A partir daí, até o final do desenvolvimento do grão, ambos os açúcares decrescem até níveis bastante baixos, enquanto a sacarose aumenta em concentração, até representar 100% dos açúcares livres do grão maduro. Estes mesmos autores observaram também que o teor de sacarose no endosperma de cafés arábica era aproximadamente o dobro do teor encontrado no café robusta.

Rogers et al. (1999) relataram que, em seu trabalho, o ácido cítrico foi o principal ácido em concentração no grão maduro, sendo acumulado constantemente durante a maturação. O ácido málico permaneceu em níveis constantes durante a maturação, sofrendo leve diminuição no final do processo. Os ácidos quínico, acético e oxálico decrescem durante a maturação, permanecendo em níveis muito baixos no grão maduro. Os autores comentam,

no entanto, que o ácido fosfórico, embora em níveis baixos no grão maduro (entre 0,7% a 1,1% do peso seco), pode contribuir mais para a acidez da bebida, apesar de sua baixa concentração, do que os ácidos orgânicos. Isso porque o ácido fosfórico, assim como o acético e o quínico, aumentam durante a torração e extração a alta temperatura, enquanto o ácido cítrico diminui e o málico permanece constante ou sofre ligeira redução (Rogers et al., 1999).

Ainda segundo Rogers et al. (1999), no início da maturação, o ácido quínico se encontra em teores bastante altos no perisperma, especialmente nos café robusta (16% do peso seco do tecido para estes contra 6% para os arábica testados). Durante a maturação, no entanto, sua concentração decresce a níveis bastante baixos no grão, menores nos cafés robusta do que nos arábica. Os autores acreditam que este tecido seja a fonte de ácido quínico esterificado para a síntese dos ácidos clorogênicos no endosperma ou, ainda, que haja importação do ácido quínico pronto a partir do perisperma.

O grão de café processado é especialmente caracterizado pelo seu conteúdo de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos (Raghavan & Ramalakshmi, 1998). O restante não é muito diferente do encontrado em outros vegetais: proteínas, carboidratos, lipídios (14% a 16% no café arábica) e minerais. Os carboidratos são representados principalmente por polissacarídeos (arabinogalactanas, galactomananas e celulose) e pelo dissacarídeo sacarose e têm um papel importante na formação da cor e do aroma do café durante a torração. A qualidade do café está diretamente ligada ao seu aroma, pelo qual são responsáveis os precursores existentes no grão. Estes precursores são principalmente os aminoácidos (liberados durante a degradação das proteínas na torração), os açúcares e os ácidos clorogênicos. Também participam da formação do aroma os terpenos, a trigonelina e os lipídeos (Raghavan & Ramalakshmi, 1998).



O tricloroanisol (TCA) foi encontrado em grãos processados e apontado por Liardon et al. (1989) como o responsável pelo gosto de mofo apresentado pelas bebidas de cafés rio. Nestes cafés, após a torração e moagem, o TCA se apresentou em níveis muitas vezes acima do perceptível pelo aroma e pelo gosto.

2.2.1.3 Condições climáticas

Fatores ambientais têm grande influência na qualidade da bebida de café. O clima da região determina a homogeneidade da florada e da maturação dos frutos e pode propiciar ou não boas condições de secagem, reduzindo a contaminação microbiana e as fermentações (Cortez, 1997). Sabe-se que há grandes diferenças entre cafés de diferentes regiões de cultivo; por exemplo, tem sido muito comentada a diferença entre cafés produzidos na Zona da Mata e no Sul de Minas Gerais (Carvalho et al., 1997). Tais diferenças nem sempre são devidas exclusivamente ao clima ou solo, mas muitas vezes se devem ao tipo de manejo de cada local. Ainda segundo Carvalho et al. (1997), cafés de regiões consideradas produtoras de bebidas “Rio”, que tiverem seus frutos despulpados e secos, tomando-se todos os cuidados necessários para um bom processamento, podem ter a qualidade final da bebida melhorada.

Em locais de clima quente e úmido no período de maturação e colheita, a alta umidade do ar proporciona condições para que as fermentações acética e láctica ocorram rapidamente, passando então para a fase propiônica e butírica, com a formação de sabores estranhos, como o “Rio” e, conseqüentemente, produzindo bebida de pior qualidade. Este processo ocorre, por exemplo, em cafés produzidos às margens da represa de Furnas (Sul de Minas Gerais) (Cortez, 1997).

O café do Cerrado Mineiro tem sido considerado de melhor qualidade, alcançando bons preços, o que, em parte, pode ser atribuído a fatores climáticos

[REDACTED]

(Chagas, 1994). Durante a florada, há chuva em abundância, enquanto no período da colheita, que dura em torno de quatro meses, a umidade relativa do ar é baixa, o que dificulta a contaminação microbiana. Aliadas ao manejo adequado dos frutos, estas condições diminuem a incidência de fermentações prolongadas, que deterioram a qualidade da bebida (Bitancourt, 1957).

2.2.1.4 Processamento do café

O processamento é considerado por alguns autores a fase mais crítica na obtenção de café de boa qualidade (Menon, 1989; Valencia, 1973). Durante o processamento podem ocorrer as infecções microbianas e conseqüentes fermentações que podem melhorar ou deteriorar o gosto da bebida. Existem dois tipos de processamento: por via seca (café natural) e por via úmida (café despulpado) (Van Pee & Castelein, 1972; Menchú & Rolz, 1973; Jones & Jones, 1984; Clarke & Macrae, 1987; Puerta Quintero, 1996, 1998; Chalfoun & Carvalho, 1997).

O processamento por via úmida dá origem aos cafés lavados ou despulpados, comuns na América Central, México, Colômbia, Quênia e África. Segundo Bártholo & Guimarães (1997), este tipo de café, quando bem preparado, origina invariavelmente bebidas suaves, moles ou estritamente moles, seja qual for a região de produção.

No processamento por via úmida, o café colhido é inicialmente lavado e despulpado. Durante a lavagem, o café é separado em duas frações, em função de sua densidade: a fração cereja, mais pesada, fica no fundo do lavador e a fração bóia, mais leve, flutua (Bártholo & Guimarães, 1997). Após separadas, estas frações devem ser processadas separadamente, pois apresentam tempos de secagem diferentes (Bártholo & Guimarães, 1997). Após a lavagem, os grãos são imersos em água para um período de fermentação que pode levar de 12 a até 72 horas, dependendo da altitude e variedade do café. Para café Arábica, em

baixas altitudes na Etiópia foi relatado por Woelore (1993) um tempo de fermentação de 48 horas, enquanto que para café robusta na Índia foi relatado um tempo de fermentação de 72 horas (Menon, 1989).

A fermentação é chamada pelos cafeicultores de demucilação ou degomagem, pois o objetivo desta fase do processamento é a dissolução da mucilagem que envolve os grãos. Segundo Jones & Jones (1984), a demucilação também pode ser feita com o uso de enzimas ou álcalis. Na demucilação há a possibilidade de sobrefermentações que podem produzir gostos estranhos. Por isso, Puerta Quintero (1998) considera esta a fase mais crítica do processamento por via úmida.

Após a demucilação, o café é lavado até que não restem vestígios da mucilagem e colocado para secar em terreiros ou em secadores mecânicos, da mesma forma que o café natural (Bártholo & Guimarães, 1997).

No processamento por via seca o fruto é colocado inteiro para fermentar/secar em terreiro ou em secador mecânico. É aconselhável que o café colhido seja lavado antes da fermentação/secagem para a separação das frações cereja e bóia, além da retirada de detritos que injuriam os grãos e podem reduzir a vida útil de equipamentos, como secadores e beneficiadores (Bártholo & Guimarães, 1997).

O processo de fermentação/secagem do café em terreiro é relativamente lento e consome mais espaço que o café despulpado. O café colhido é espalhado em camadas de 3 a 5 cm e revolvido por, pelo menos, 8 vezes ao dia. No final da tarde, o café é amontoado em leiras ou montes e coberto com lona para impedir que o orvalho o reumedça (Bártholo & Guimarães, 1997).

O café processado desta maneira leva entre 15 a 30 dias para chegar ao teor de umidade de 11%, dependendo das condições climáticas do local (Bártholo & Guimarães, 1997). A secagem do café em terreiro é difícil de

controlar, já que chuvas e temperaturas altas podem incidir sobre o café, criando condições para que as fermentações se prolonguem.

A fermentação/secagem do café também pode ser realizada num sistema misto, que se inicia no terreiro e se completa no secador, encurtando o tempo de secagem e proporcionando ao produtos um maior controle sobre as condições de secagem (Bártholo & Guimarães, 1997).

Após a secagem do café, é recomendável que o mesmo aguarde por alguns dias em tulhas antes do beneficiamento para que os grãos igualem seu teor de umidade (Bártholo & Guimarães, 1997). No beneficiamento, ocorre a separação do pergaminho da semente por fricção, seguida da separação das membranas e poeira por aspiração (Raghavan & Ramalakshmi, 1998). Após o beneficiamento, o café é acondicionado em sacos de juta de 60 kg. Na entressafra, estes sacos são armazenados em galpões arejados, secos e limpos, de acordo com sua origem (Carvalho et al., 1997). O teor de umidade dos grãos deve estar entre 11% e 12% (Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1969).

2.3 Fontes de contaminação microbiana e fermentações dos frutos

Os microrganismos podem contaminar o café desde a árvore (Krug, 1940a) até o armazenamento dos grãos, modificando suas características e interferindo no sabor e segurança da bebida (Mislivec et al., 1983). A contaminação microbiana pode ocorrer, no pé, por injúrias ao fruto causadas por insetos como a mosca-das-frutas (Krug, 1947; Bitancourt, 1957) e a broca do cafeeiro (Chalfoun et al., 1984) que podem levar microrganismos. Ao perfurar o fruto estes insetos abrem caminho para microrganismos que podem utilizar os açúcares da polpa e levar a uma seca rápida e queda do fruto. No caso da broca do cafeeiro, Chalfoun et al. (1984) observaram que a presença de *Fusarium* nos grãos está altamente correlacionada ao ataque de frutos pela broca do cafeeiro.

Ainda na árvore, os grãos estão sujeitos a condições climáticas adversas, como geadas e chuvas de granizo que podem provocar injúrias (Carvalho et al., 1997).

Durante a colheita, os grãos podem ser contaminados de diversas formas: a vibração das varetas das derriçadoras costais pode romper a casca dos frutos, abrindo portas de entrada para os microrganismos. O mesmo pode acontecer durante a colheita manual: ao derriçar os frutos, a pressão dos mesmos uns contra os outros ou contra o ramo pode abrir pequenos ferimentos que expõem a polpa do fruto, principalmente em frutos maduros e macios. Feita a injúria, o contato do grão com o solo, com mãos ou equipamentos ou mesmo com outros frutos já contaminados pode levar os microrganismos ao seu interior.

Ainda durante a colheita os grãos caídos no chão são pisados intensamente pelos trabalhadores, o que pode não só injuriá-los como contaminá-los, principalmente se a colheita não for feita sobre o pano. A lavagem também pode ser fonte de contaminação, dependendo da qualidade da água utilizada (Bártholo & Guimarães, 1997) e, durante a fermentação/secagem no terreiro, os constantes revolvimentos sofridos pelo café e o pisoteamento pelos trabalhadores também podem trazer microrganismos ao fruto.

A fermentação/secagem em terreiro tem a desvantagem de se processar lentamente; assim, os frutos ficam úmidos por mais tempo, aumentando o período durante o qual os microrganismos podem se desenvolver. Um outro fator que agrava essa situação é que, devido ao seu alto conteúdo de açúcares, as camadas do pericarpo dos frutos constituem um meio muito mais favorável ao desenvolvimento dos microrganismos do que o pergaminho dos grãos despolidos (Silva, 2000).

Segundo Bitancourt (1957), não é possível a produção de cafés finos sem impedir as contaminações, fermentações e podridões prejudiciais. Ainda segundo este autor, as fermentações podem ser evitadas ou minimizadas

evitando-se a umidade durante as operações de seca. Segundo Carvalho et al. (1997), o manejo adequado no pós-colheita diminui os ataques microbianos e fermentações indesejáveis, o que melhora a qualidade da bebida.

Embora tenha sido sugerido que as contaminações microbianas devam ser minimizadas, as fermentações microbianas são importantes, sendo responsáveis pela lise da mucilagem no processamento seco (Schwan & Wheals, 2003). Os produtos da fermentação difundem-se para a semente, levando a bebidas de gosto agradável ou ruim, dependendo da extensão da fermentação. Segundo Cortez (1997), há uma concordância entre processos fermentativos e a qualidade do café. Segundo ele, os trabalhos mostram que, sob qualquer condição climática ou local de cultivo, os processos fermentativos operam em quatro fases: acética, láctica, propiônica e butírica. Segundo o mesmo autor, as quatro fases podem ser realizadas tanto por fungos, leveduras ou bactérias, dependendo isto da composição da mucilagem, dos cuidados com a colheita, tipo de processamento, secagem e armazenamento dos grãos.

O café despulpado e o natural estão sujeitos ao ataque de uma diversidade de microrganismos que, durante seu crescimento, fermentam os açúcares da mucilagem produzindo álcool e, em seguida, desdobram o álcool em ácido acético, láctico, butírico e outros ácidos carboxílicos superiores (Carvalho et al., 1997). Calle (1957) relatou que a ordem das fermentações no processamento por via úmida é a seguinte: etanólica, acética, láctica e butírica. Segundo este autor, a lise da mucilagem ocorre principalmente durante a fermentação etanólica.

Durante a secagem do café natural, a pectina da mucilagem é digerida pelas enzimas pécticas do próprio fruto e de microrganismos, quebrando moléculas grandes em compostos de cadeias cada vez menores até chegar a ácidos monomoleculares e ésteres (Carvalho et al., 1997). As fermentações alcoólica, acética e láctica ocorrem naturalmente quando o grão passa de cereja

para passa, na árvore ou nos locais de secagem. Em locais de clima quente e úmido, durante a colheita e o processamento, a alta umidade do ar permite que as fermentações propiônica e butírica aconteçam (Cortez, 1997). Segundo Carvalho et al. (1997), ao se iniciar a produção de ácido butírico e propiônico começa a haver prejuízos na qualidade do café (Amorim e Amorim, 1977), devido ao sabor de cebola (Monaco, 1961).

Os ácidos butírico e propiônico são produzidos em condições de anaerobiose quando os grãos são amontoados. A produção de ácido butírico talvez esteja mais relacionada com bactérias e leveduras do que com fungos filamentosos que, em geral, são aeróbios (Bitancourt, 1957). Ácidos presentes no café, como málico e cítrico, proporcionam sabor ácido característico e desejável ao produto (Sivetz, 1963). Quando a fermentação é prolongada, a infecção por microrganismos torna-se acentuada e começa o processo de produção de compostos responsáveis pelos sabores indesejáveis (Cortez, 1997; Carvalho et al., 1997).

Segundo Liardon et al. (1989), o tricloroanisol pode se formar nos grãos durante a secagem pela conversão microbiana de triclorofenóis. Alta contaminação microbiana nas cerejas e secagem/fermentação prolongadas foram apontadas por estes autores como requisitos para a formação do gosto rio. No mesmo trabalho, os autores encontraram uma série de fungos em cafés rio que se mostraram capazes de fazer esta conversão: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Rhizopus oryzae* e *Fusarium sporotrichoides*. Bactérias do gênero *Pseudomonas*, que incluem alguns patógenos de plantas, também são capazes de produzir metabólitos clorados.

O defeito sobrefermentado, que leva a um cheiro de podre ou de silagem, também pode ser causado por microrganismos associados a mau processamento (Bade-Wegner et al., 1997). Segundo os autores, os etil-ésteres 2-MBEE (ácido 2-metilbutanóico etiléster), 3-MBEE (ácido 3-metilbutanóico

etiléster) e CHEE (ácido ciclohexanóico etiléster) são possíveis responsáveis pelo defeito e se encontram em maiores teores em cafés estragados. O CHEE não é um composto comum em plantas, podendo ser formado por ação microbiana (Bade-Wegner et al., 1997).

A ocorrência dos processos fermentativos indesejáveis se deve, em parte, às injúrias e contaminações descritas anteriormente. A prática de misturar ao café colhido o café de varrição também pode levar à sobrefermentação, à medida que o café de varrição traz consigo uma grande população fúngica (Krug, 1940a) que contamina os frutos recém-colhidos.

2.4 Microrganismos associados ao processamento

A microbiota associada ao grão de café é bastante variada (Silva et al., 2000) e sua atividade está diretamente relacionada a alguns sabores e aromas que alteram as características peculiares do produto (Bitancourt, 1957; Liardon et al., 1989; Bade-Wegner et al., 1997; Avallone et al., 2002).

Avallone et al. (2001) isolaram bactérias lácticas, leveduras, microrganismos anaeróbicos, aeróbicos e pectinolíticos em diversas fases da fermentação no processamento por via úmida, mas não deram importância aos fungos filamentosos. No processamento seco, Silva et al. (2000), isolaram e identificaram fungos, bactérias e leveduras de grãos de café na árvore e em diversas fases da fermentação/secagem em diversas fazendas do Sul de Minas Gerais, em duas estações de colheita. Em todas as fases do processo, as bactérias foram o grupo predominante, seguidas pelos fungos filamentosos e as leveduras.

O grupo de microrganismos mais estudado em café é o de fungos filamentosos, havendo ainda poucos trabalhos sobre fungos leveduriformes e bactérias. Bitancourt (1957), analisando cafés em diferentes fases do preparo, no cafezal e no terreiro de secagem, observou que os fungos mais abundantes foram *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *Colletotrichum coffeanum* (Zimm) Noack,

Fusarium sp. e bolores verdes (*Penicillium* spp.). Bitancourt (1957) também identificou *Aspergillus niger* v. Tiegh, no café seco no terreiro e *Cladosporium*, que foi encontrado até o estágio seco no pé e não no terreiro durante a secagem, como normalmente ocorre com outros fungos.

Silva et al. (2000) observaram que o gênero *Cladosporium* predominou entre os fungos (39,7% dos isolados fúngicos), seguido por *Fusarium* (34,2%), *Penicillium* (28,8%) e *Aspergillus* (2,7%). Também foram encontrados dois isolados do entomopatógeno *Beauveria bassiana*, um *Rhizoctonia* sp., um *Monilia* sp. e um *Arthrobotrys* sp..

Mislivec et al. (1983) isolaram *Aspergillus*, *Penicillium* e, mais raramente, *Alternaria* e *Fusarium* de grãos de café processados provenientes de 31 países produtores. Entre os *Aspergillus*, *A. flavus* e *A. tamarii* predominaram em grãos da América Central e América do Sul, enquanto em grãos africanos e asiáticos houve predominância de outras espécies do gênero. Batista et al. (2002) isolaram *Aspergillus* e *Penicillium* da superfície de grãos processados antes e após desinfecção externa. Os autores encontraram *Aspergillus* produtores de aflatoxinas e de ocratoxinas, mas nenhum grão contaminado com ocratoxina A (22% dos grãos) tinha contaminação superior ao nível permitido (5,0 ng/g).

Bitancourt (1957) observou que no café seco no terreiro, 55% dos frutos apresentaram leveduras. Agate e Bhat (1966) isolaram leveduras produtoras de pectinases durante a fermentação de café processado via úmida, tendo encontrado espécies dos gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. Os autores atribuíram a ação das pectinases na pectina da polpa do café à atividade microbiana leveduriforme. Van Pee e Castellein (1972) também estudaram a microbiota durante o amadurecimento e beneficiamento de café no Congo e encontraram uma microbiota diversa, com grande porcentagem de enterobacteriaceae e algumas leveduras. Arunga (1982) ressaltou a importância dos microrganismos na fermentação de café e citou que os principais gêneros de

microrganismos encontrados por outros pesquisadores foram *Bacillus*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Trabalhos feitos no Brasil por Carvalho et al. (1989) e Meirelles (1990) demonstraram contaminação microbiana elevada em cafés de pior qualidade (rio e riado). Nestes cafés, os autores encontraram teor de umidade superior a 10%, o que, segundo Moreau (1979), favorece o crescimento de *Aspergillus flavus* e *A. niger*, fungos produtores de aflatoxinas. A alta umidade pode ainda favorecer o desenvolvimento desses fungos durante o armazenamento.

Partindo-se da hipótese de serem os microrganismos responsáveis pela origem dos cafés duros, Krug (1940) comparou fungos filamentosos isolados de café cereja, seco no pé e seco no chão, mostrando 0% de fungos para o cereja, 15% para seco no pé e 21% para seco no chão. Krug (1940b) observou uma relação entre microrganismos e sabor da bebida e que os cafés que apresentam qualidade inferior de bebida tinham tido uma colonização microbiana mais intensa. Cafés classificados como mole apresentaram um total de 9,28% de microrganismos, sendo 3,38% de *Fusarium* sp; cafés apenas mole apresentaram um total de 23,40%, sendo 11,04% de *Fusarium* sp; café duro, 44,9%, sendo 23% de *Fusarium* sp e, para cafés rio, um total de 54,50% de microrganismos, sendo 34,5% de *Fusarium* sp.

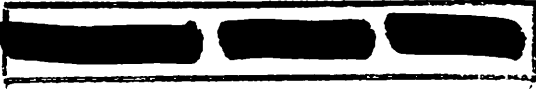
Carvalho et al. (1989), estudando a relação entre classificação do café pela prova de xícara e composição físico-química, química e microbiota presente no grão beneficiado, concluíram que as amostras de café classificadas como de bebida mole e dura apresentaram índices de contaminação de *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* acentuadamente menores que os cafés classificados como de bebida riada e rio. Por outro lado, apresentaram índices igualmente elevados dos fungos *Fusarium* sp e *Penicillium* sp. O gênero *Cladosporium* predominou nos cafés classificados como bebida mole e dura (Carvalho et al., 1989).

A biota bacteriana está presente nos grãos de café sem, no entanto, conhecermos sua ação fermentativa na qualidade da bebida de café. Rose (1982) e Agate e Bhat (1966) afirmaram que as bactérias predominantes no café são pectinolíticas, gram-negativas, não formadoras de esporos e fermentadoras de lactose.

Agate e Bhat (1966) isolaram bactérias identificadas como *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Proteus*, mas nenhum estudo com estes isolados foi realizado a fim de se conhecer sua capacidade pectinolítica. Vaughn et al. (1958) isolaram *Erwinia dissolvens* (reclassificada atualmente como *Enterobacter dissolvens* (Rosen), segundo The Prokaryotes (Balows et al., 1992)) e demonstraram que esta bactéria tem capacidade pectinolítica.

Em amostras de café da Colômbia e México processadas por via úmida, Pederson e Breed (1946) isolaram fungos filamentosos, leveduras e bactérias dos tipos cocos e bastonetes microaerofílicos, como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Streptococcus faecalis*, as quais estariam atuando na lise da mucilagem, porém não no seu desprendimento.

Avallone et al. (2001a) encontraram no processamento úmido bastonetes gram-negativos aeróbicos dos gêneros *Klebsiella* (73%) e *Erwinia* (28%), coliformes amplamente distribuídos no ambiente. Quando água era extensivamente utilizada no processo, a microbiota aeróbica se tornava mais heterogênea, sendo encontradas também *Pseudomonas cepaciae* e *Chrysonomas luteola*. Também foram encontradas *Leuconostoc mesenteroides dextranicum* (com atividade pectinolítica) no início da fermentação e *Lactobacillus brevis*, que consegue utilizar ácido galacturônico como única fonte de carbono, no final. Ambas as bactérias são heterofermentativas e produziram ácido lático e acético.



Klebsiella pneumoniae e *Erwinia herbicola* foram isoladas no meio contendo pectina, embora não sejam pectinolíticos fortes (Avallone et al., 2001a).

As bactérias foram o grupo mais abundante no trabalho de Silva et al. (2000) com café natural. Durante o ano chuvoso houve predominância de bactérias gram-negativas, pertencentes principalmente aos gêneros *Aeromonas*, comumente encontradas em matéria orgânica em decomposição; *Enterobacter*, encontrada em solo, água e esgotos e *Pseudomonas*, um patógeno de plantas amplamente encontrado em folhas e na rizosfera. Dos gêneros encontrados pelos autores, apenas *Citrobacter* possui espécies reportadas como pectinolíticas. A maioria das bactérias gram-negativas encontradas são associadas ao homem, como enterobacteriáceas e patógenos ou ao solo, vegetação e água. Os autores também encontraram sete espécies de *Bacillus*, um gênero produtor de diversas enzimas degradativas, como celulases, amilases e proteases, com espécies pectinolíticas reportadas. *Cellulomonas*, capaz de degradar celulose, foi a bactéria gram-positiva não esporulada mais freqüente; sendo encontrada em todos os estágios da fermentação. Além dela, *Arthrobacter*, *Microbacterium* e *Brochothrix* também foram encontradas, sendo que as duas últimas produzem ácido lático por fermentação.

Variações na microbiota e sua interferência na degradação e qualidade da bebida de café podem estar associadas à composição diferente do mesocarpo (mucilagem) dos grãos. As diferenças no tipo de pectinases produzidas pelos organismos podem afetar o grau de despolimerização dos componentes da pectina que poderiam, então, influenciar a seleção do grupo de microrganismos dominante (Jones e Jones, 1984).

A presença de leveduras durante o processamento por via úmida do café foi constatada por alguns autores (Van Pee e Castelein, 1971; Daivasikamani e

Kannan, 1986) em cafés robusta. Entretanto, poucos referem-se à contribuição destes microrganismos na qualidade do café.

Agate e Bhat (1966) isolaram, na Índia, leveduras pectinolíticas de cafés robusta e inferiram que estas podem ter ação na degradação da mucilagem devido à alta capacidade pectinolítica de *Saccharomyces marxianus* (*Kluyveromyces marxianus* (EC Hansen) van der Walt, 1971), *S. bayanus* e *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*.

Frank, Lum e Dela Cruz (1965) encontraram, em seus isolados, predomínio de bactérias e poucas leveduras não identificadas, que acreditaram não serem capazes de degradar a mucilagem dos grãos. Van Pee e Castelein (1971) identificaram leveduras do gênero *Candida*, sendo *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, na superfície e mucilagem dos grãos; *C. parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis famata* (*Candida famata* (Harrison) S.A. Meyer & Yarrow (Yarrow and Meyer 1978)), *Saccharomyces marxianus* (*Kluyveromyces marxianus* (EC Hansen) van der Walt, 1971), *Candida tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida pelliculosa* na superfície dos grãos. Daivasikamani e Kannan (1986) citaram a ocorrência de leveduras de coloração rosa em cafés robusta até o quinto dia de incubação.

Silva et al. (2000) obtiveram de café natural quatro isolados da levedura *Pichia lynferdii*, talvez o segundo registro desta rara levedura e 17 isolados de *Arxula adenivorans*, uma levedura relativamente rara encontrada anteriormente em solo e silagem, capaz de produzir pectinases, celobiase I e II, xilosidase, fosfatase ácida, RNases e algumas proteases. Algumas cepas são capazes de crescer a 45°C. Esta gama de capacidades torna esta levedura apropriada para fermentar café. Os mesmos autores obtiveram, em menor número, outras 23 espécies de leveduras conhecidas de solo, frutas, árvores e

fezes de insetos. A segunda levedura mais freqüente foi *Pichia ofunaensis*, com 16 isolados; as outras leveduras aparecem em número baixo.

Avallone et al. (2001a) encontraram em café processado via úmida leveduras comumente encontradas em plantas, pertencentes aos gêneros *Kloeckera*, *Candida* e *Criptococcus*, organismos com boa capacidade fermentativa e produção de álcool, porém sem capacidade pectinolítica.

2.5 Pectinases microbianas na fermentação do café

Em vários trabalhos admite-se que o papel dos microrganismos na fermentação do café, tanto no processamento natural como no despolpado, seja a lise da mucilagem que envolve o grão, através da produção de pectinases e, talvez, de celulasas (Silva et al., 2000; Arunga, 1982). Segundo Avallone et al. (2001a), existe ainda a hipótese de que a lise da mucilagem ocorre devido à ação de enzimas do próprio fruto. Controversamente, existe uma idéia bem estabelecida de que os polissacarídeos pécticos da parede celular do fruto sejam degradados durante a fermentação, embora alguns trabalhos mostrem que ainda restam substâncias pécticas nas paredes das células da mucilagem após o término do processo (Avallone et al., 1999).

A mucilagem (histologicamente o mesocarpo interno) é um tecido de estrutura celular aberta, composto por células longas com raras paredes celulares quebradas (Arunga, 1982). É um tecido altamente hidratado, rico em substâncias pécticas e celulose, que impede a secagem rápida do grão de café (Avallone et al., 2001b). Assim, a retirada desta camada é uma fase importante do processamento. As pectinas são substâncias heterogêneas quanto à estrutura química e peso molecular. Basicamente, as substâncias pécticas são α -D-galacturonas ou α -D-galacturonoglicanos em cadeias lineares de 1,4- α -D-galactopiranosilurônico. O polímero tem vários graus de esterificação com grupos carboxílicos e metoxílicos (Wong, 1995).

De acordo com o seu modo de ação, as pectinases são classificadas em poligalacturonases, que catalisam a quebra das ligações glicosídicas α -1,4; a pectinesterase, que catalisa a desmetoxilação do polímero; a pectato liase, que catalisa a clivagem de grupos desmetoxilados por β eliminação e a pectina liase, que catalisa a clivagem de unidades de galacturonato esterificadas (Wong, 1995).

Muitos trabalhos têm isolado microrganismos de grãos de café e testado seu potencial pectinolítico. Agate & Bhat (1966) isolaram leveduras pectinolíticas de grãos de café, embora a sua ação na degradação da mucilagem *in vitro* não tenha sido satisfatória. Avallone et al. (2001a) isolaram bactérias gram-negativas e leveduras não reportadas como pectinolíticas. Sakiyama et al. (2001) isolaram *Paenibacillus amylolyticus* do interior de grãos de café, tendo este isolado produzido uma pectinase extracelular com atividade máxima a 40°C em pH 7,9.

Segundo Avallone et al. (2001a), a atividade pectinolítica microbiana pode não ser tão importante quanto se relata na literatura. Utilizando o processamento via úmida, estes autores não encontraram um aumento nas contagens de microrganismos pectinolíticos durante a fermentação, como esperado. Avallone et al. (1999), por meio de estudos histológicos da mucilagem após a fermentação, notaram que esta ainda é um tecido organizado e que os principais microrganismos fermentadores de café (*Erwinia dissolvens*, *E. herbicola* e *Klebsiella pneumoniae*) apresentaram apenas atividade de pectato liase, incapaz de despolimerizar as pectinas altamente metiladas da mucilagem do café. Em outro trabalho, Avallone et al. (2002) afirmam que a inoculação com microrganismos pectinolíticos não acelera o processo e que o desprendimento da mucilagem parece mais relacionado à acidificação do meio do que à ação de enzimas pectolíticas.

Arunga (1982) sugere que a degradação da mucilagem possa envolver quebras em ligações das pectinas a lipídeos ou materiais hemicelulósicos, já que ácidos pécticos com quatro ou pouco mais resíduos de ácido galacturônico não são encontrados no líquido resultante da fermentação. Avallone et al. (2001a) encontraram uma diminuição significativa na quantidade de açúcares livres no grão durante a fermentação por via úmida, com concomitante produção de ácido láctico e acético, causando uma diminuição do pH de 6,3 para 4,1. Os autores sugerem que, durante a fermentação por via úmida, os microrganismos provavelmente utilizem os açúcares simples abundantes na mucilagem, em vez de produtos da pectólise. O desprendimento da mucilagem pode ocorrer devido a uma pectólise limitada aliada a mudanças físico-químicas, como a acidificação do meio devido à fermentação de açúcares (Avallone et al., 2001b).

2.6 Torração e moagem

A torração se processa com movimentação de ar aquecido a 260°C através dos grãos para que ocorra a transferência de calor do ar para o grão. No início do processo de torração, ocorre a perda da água livre do grão, enquanto a sua temperatura permanece em torno de 100° a 104°C. Quando toda a água livre (~10%) do grão é evaporada, sua temperatura eleva-se lentamente, enquanto a água ligada (1% a 2%) lentamente evapora-se (Carvalho et al., 1997).

Quando a temperatura do grão está em torno de 204°C, as reações de pirólise que estão ocorrendo em seu interior fazem com que sua temperatura aumente ainda mais. A pirólise é o nome dado ao complexo conjunto de reações de síntese e degradação que ocorre no interior do grão durante a torração. Este conjunto de reações é o responsável pela formação do sabor e do aroma do café a partir de precursores existentes no grão (Carvalho et al., 1997). Os produtos da pirólise são os açúcares caramelizados, carboidratos, ácido acético e seus homólogos, aldeídos, cetonas, furfural, ésteres, ácidos graxos, aminas, CO₂,

sulfetos (Carvalho et al., 1997), resultando em mais de 800 compostos responsáveis pelo aroma da bebida, talvez o maior número já encontrado em um alimento (Raghavan & Ramalakshmi, 1998).

Segundo Raghavan & Ramalakshmi (1998), durante a torração os polissacarídeos são degradados, originando uma série de ácidos orgânicos, como o málico, o cítrico e o láctico, responsáveis pela acidez desejável do café. A sacarose sofre caramelização, ajudando formar a cor e o aroma do café (Raghavan & Ramalakshmi, 1998; Carvalho et al., 1997). Os carboidratos também reagem com proteínas para a formação de melanoidinas, que também são responsáveis pela cor do grão torrado. As proteínas são desnaturadas e quebradas em aminoácidos, que podem tomar parte em uma série de reações da pirólise (Raghavan & Ramalakshmi, 1998).

O frescor do aroma (definido como cheiro suave e agradável de café recém-torrado) é um importante atributo na qualidade do café. Depois de torrado, em poucas horas após a moagem, o café pode desenvolver mudanças no aroma, que tornam-no “passado” (Raghavan & Ramalakshmi, 1998). Após a moagem, o café deve ser embalado em um sistema que possua barreiras contra oxigênio e odores, para a melhor preservação do seu aroma. Alguns compostos responsáveis pelo frescor do aroma são compostos sulfúricos de baixo peso molecular (Raghavan & Ramalakshmi, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Colheita do café

As amostras de café foram colhidas na Fazenda Rancho Fundo, município de Campos Gerais, no sul do estado de Minas Gerais. As amostragens em equipamentos foram feitas na mesma fazenda, no dia da colheita, antes que a mesma começasse. O café colhido foi proveniente de uma lavoura de *Coffea arabica* L. da cultivar Acaiaí Cerrado. A colheita foi realizada quando o café apresentava 80% de frutos maduros.

As máquinas amostradas utilizadas na derriça do café foram: derriçadora automotriz modelo K-3 e derriçadora portátil Stihl SP80. Para o recolhimento mecânico foi utilizada uma recolhedora MAQ 6000. O café colhido foi espalhado em terreiro para secagem por um período aproximado de vinte dias, até atingir um teor de umidade de 11% (b.u.).

Imediatamente após a colheita, amostras de café foram coletadas e colocadas em frascos esterilizados, dentro dos quais foram transportadas ao laboratório de Microbiologia Geral do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras – MG, sob refrigeração. Para a determinação da contaminação dos equipamentos e pessoal, antes da colheita foi feita uma amostragem com hastes de algodão esterilizadas (do tipo *swab*) das mãos dos operários e das partes dos equipamentos que entram em contato com o café durante a colheita. As hastes de algodão foram colocadas em 3 mL de água peptonada esterilizada (peptona de soja, 10g/l; NaCl, 5g/L, esterilizada a 121°C/15 min) e levadas ao laboratório sob refrigeração.

Amostras de café foram coletadas no terreiro durante a secagem e colocadas em frascos esterilizados, dentro dos quais foram levadas ao Laboratório de Microbiologia Geral do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, MG, sob refrigeração.

3.2 Análises microbiológicas

No laboratório, 30 grãos escolhidos aleatoriamente de cada amostra de café foram colocados sob agitação em 270 mL de água peptonada por 30 minutos em agitador orbital Tecnal - TE 140 a 80 rpm. A partir da suspensão obtida, foram feitas diluições decimais, das quais duas eram escolhidas e plaqueadas em triplicata nos meios WL (composição: Anexo A- Tabela 1A) para contagem de bactérias e leveduras; MRS, (composição: Anexo A- Tabela 2A) para contagem de bactérias lácticas e DG18 (Dichloran 18% glicerol ágar), (composição: Anexo A- Tabela 3A), para contagem de fungos filamentosos. Os tubos com água peptonada das amostragens de mãos e equipamentos também foram submetidos a diluições decimais, as quais foram plaqueadas em triplicata nos meios WL, MRS e DG18.

As placas com meio WL foram incubadas durante 48 horas e as placas com DG18 e MRS por 168 horas, após os quais foi efetuada a contagem de colônias e a determinação dos diferentes tipos de colônias presentes, de acordo com a sua morfologia. A morfologia da colônia foi determinada pelo seu tamanho (comparativamente a outras colônias presentes no meio), forma, elevação, cor e tipo de bordo.

A partir da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi escolhida para o isolamento uma placa de cada meio cuja contagem estivesse entre 30 e 300 colônias. O isolamento foi feito com base na separação das colônias por tipos, baseando-se em sua morfologia (cor, elevação, brilho, tipo de bordo) (FDA, ano). Foram isolados, para cada tipo de colônia, a raiz quadrada

do número de colônias daquele tipo na placa. As colônias de bactérias e leveduras foram isoladas estriando-as em meio YEPG sólido (composição: Anexo A- Tabela 4A). Por exame microscópico, as bactérias foram diferenciadas das leveduras. Os isolados de ambos os grupos foram conservados em microtubos com meio YEPG líquido com 20% de glicerol a -20°C . Os isolados puros de fungos foram conservados a -20°C em eppendorfs estéreis.

3.3 Identificação de bactérias

Os isolados bacterianos foram purificados por meio de estrias compostas em meio PCA (composição: Anexo A – Tabela 5A) triptona, 5g/L; extrato de levedura, 2,5g/L; glicose, 1g/L; ágar, 13g/L), sendo sua pureza verificada por exame microscópico de lâminas das culturas submetidas à coloração de gram. Depois de purificados, os isolados foram divididos em grupos (gram-positivos e gram-negativos) para realização de testes específicos para a identificação das espécies.

3.3.1 Identificação de bactérias gram-negativas

As bactérias gram-negativas foram identificadas por meio de Kits do Sistema Bac-Tray I, II e III (Difco). Inicialmente foi realizado o teste para detectar a presença da enzima oxidase utilizando teste comercial Bactident Oxidase - 1.13300 - (MERCK). O teste de oxidase consiste na confirmação da atividade da citocromo-oxidase nos microrganismos.

Os isolados gram e catalase negativos foram inoculados no sistema Bac-Tray I e II e os gram-negativos e oxidase positivos nos kits do sistema Bac-Tray III. Cada Kit Bac-Tray consiste de dez diferentes substratos contidos em um suporte de poliestireno descartável. As provas do sistema Bac-Tray I consistem de hidrólise da β galactosidase, dehidrolação da arginina, descarboxilação da lisina, descarboxilação da ornitina, produção de H_2S , presença de urease,

produção de acetoina (VP), desaminação da fenilalanina, produção de indol e utilização de citrato. As provas do sistema Bac Tray II são: utilização do malonato, utilização de ramnose, adonitol, arabinose, inositol e sorbitol, sacarose, manitol e rafinose com produção de ácido.

No sistema Bac Tray III as provas consistem de reações de tolerância à cetrimida, utilização de acetamida, elevação do pH por malonato citrato, utilização de maltose, hidrólise da esculina, controle de intensidade de cor para o teste de arginina, dehidrolação da arginina, hidrólise da uréia e metabolização do triptofano resultando em indol.

Para inoculação nas galerias do suporte foi preparada uma suspensão da cultura bacteriana com 24 horas de incubação, em 3 ml de água destilada esterilizada, tomando-se o cuidado de inocular pouco material para evitar turvação do meio. As galerias do Bac-Tray foram incubadas por 18 a 24 horas, a uma temperatura de 28°C. A identificação das espécies foi realizada pela soma dos resultados positivos, conforme o manual do fabricante (DIFCO). Tendo-se o código, determinou-se a espécie por meio de análise em software fornecido junto ao produto.

3.3.2 Identificação de bactérias gram-positivas

Os isolados de bactérias gram-positivas foram submetidos a um tratamento térmico (80°C/ 10 min ou 100°C/ 1minuto) para indução da esporulação. Foram então preparadas lâminas e, por exame microscópico, foram separadas as bactérias formadoras de esporos das não formadoras.

Bactérias gram-positivas esporuladas foram identificadas até gênero, segundo o “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Holt et al., 1994) e até espécie, segundo a chave dicotômica proposta no livro “The Prokaryotes” (Slepecky & Hemphill, in Ballows et al., 1992) para o gênero *Bacillus*.

Bastonetes gram-positivos não esporulados foram identificados até

gênero segundo o “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Holt et al., 1994) e, quando possível, até espécie segundo o mesmo manual. Cocos gram-positivos foram identificados também segundo o mesmo manual. Todos os isolados foram inoculados nos meios para identificação a partir de culturas com 24 horas de incubação.

3.4 Identificação de fungos filamentosos

Para identificação dos gêneros de fungos filamentosos foram comparadas características em microscopia e morfologia de colônias, segundo Pitt e Hocking (1997).

3.5 Avaliação da produção de pectinases pelos isolados bacterianos

A produção de pectinases pode ser uma das funções das bactérias encontradas durante a fermentação. A capacidade pectinolítica dos isolados bacterianos encontrados foi então determinada por dois métodos que detectam a produção de poligalacturonase e de pectina liase, duas enzimas do complexo pectinolítico. Estas enzimas foram testadas por serem de detecção fácil e rápida, ao contrário de outras enzimas pectinolíticas que requerem metodologias mais trabalhosas e demoradas. Para a detecção da produção de poligalacturonase, os isolados foram crescidos em placa com meio MP5 (composição: Anexo A, Tabela 6A) por 24 horas. Após o crescimento, as placas eram abertas e o meio coberto com solução de cetrimida (brometo de cetiltrimetilamônio) 1%. Após alguns minutos, a cetrimida precipitava o ácido poligalacturônico, o que permitia a visualização de halos em volta das colônias produtoras. A atividade da pectina liase foi determinada pelo crescimento dos isolados em meio MP7 (composição: Anexo A, Tabela 7A) por 24 horas, após as quais a cetrimida era adicionada ao meio (precipitando a pectina) e a formação de halos era detectada como descrito para a poligalacturonase.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido um total de 586 isolados, sendo 195 bactérias, 198 leveduras e 93 fungos filamentosos. Dos 195 isolados bacterianos, 4 eram gram-negativos (dois cocos e dois bastonetes), 14 eram cocos gram-positivos, 157 eram bastonetes gram-positivos esporulados e 18 eram bastonetes gram-positivos não esporulados. As leveduras não foram identificadas. As contagens não são apresentadas devido a problemas como infestações por ácaros e superpopulação microbiana nas placas. Estes problemas fizeram com que muitas placas não pudessem ser contadas e isoladas, motivo pelo qual este resultado não é apresentado aqui.

4.1 Contaminação bacteriana

A maioria (157 isolados) das bactérias gram-positivas esporuladas (gênero *Bacillus*) foi identificada até espécie pela chave utilizada (Slepecky & Hemphill, 1992). Dezesete isolados foram identificados apenas até gênero, dependendo a separação das espécies da presença de um cristal de toxina não visualizável pelas metodologias disponíveis. Das bactérias gram-positivas não esporuladas, apenas as quatro catalase-negativas puderam ser identificadas pelos testes utilizados. Estes isolados foram identificados como *Carnobacterium mobile*, de acordo com Holt et al. (1994). Os outros doze isolados não se encaixaram em nenhum dos gêneros propostos pelos manuais de identificação utilizados (Holt et al., 1994 e Ballows et al., 1992), assim como os catorze cocos Gram-positivos. As quatro bactérias gram-negativas também não foram identificadas.

Os 157 isolados gram-positivos esporulados identificados em catorze espécies encontram-se discriminados na Tabela 1.

A maioria dos isolados de *Bacillus* foi proveniente do plaqueamento em meio WL (total: 65 isolados), de frutos com dois dias de secagem (23 isolados), com quatro dias de secagem (18 isolados) ou do café recém colhido (14 isolados).

TABELA 1 Espécies do gênero *Bacillus* isoladas de frutos de café, equipamentos e pessoal.

Espécie	Número de isolados
<i>Bacillus licheniformis</i>	68
<i>Bacillus firmus</i>	17
<i>Bacillus coagulans</i>	16
<i>Bacillus polymyxa</i>	13
<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	13
<i>Bacillus larvae</i>	6
<i>Bacillus alvei</i>	6
<i>Bacillus subtilis</i>	5
<i>Bacillus sphaericus</i>	4
<i>Bacillus lentimorbus/popilliae</i>	4
<i>Bacillus pumilus</i>	2
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1
<i>Bacillus macerans</i>	1
<i>Bacillus brevis</i>	1
Total	157

A amostragem de peneiras forneceu 4 isolados, a amostragem da recolhedora forneceu 2 isolados, a amostragem das mãos dos trabalhadores forneceu 4 isolados, a derriçadora costal forneceu 9 isolados e a colhedora automotriz forneceu 2 isolados.

As bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de produzir aerobicamente endosporos refráteis que são mais resistentes do que as células vegetativas a condições adversas, como escassez de água ou nutrientes e altas temperaturas (Gordon et al., 1973). As espécies *Bacillus licheniformis*, a mais abundante dos isolados obtidos e *B. coagulans* são capazes de crescer a 50°C, o que significa que suportam as altas temperaturas que podem ocorrer durante a secagem em terreiro. O gênero *Bacillus* é tipicamente encontrado em solos (Slepecky & Hemphill, 1992; Silva et al., 2000). As bactérias deste gênero secretam uma grande variedade de enzimas, como celulases, amilases e proteases, que podem atuar no processo fermentativo. Já foram isoladas espécies de *Bacillus* produtoras de pectina e pectato liase (Soriano et al., 2000), enzimas que podem atuar no desprendimento da mucilagem.

A principal espécie de *Bacillus* encontrada, *Bacillus licheniformis*, é um microrganismo do solo capaz de reduzir nitrato (Slepecky & Hemphill, 1992). Sua ocorrência nos frutos de café, portanto, é esperada, já que este tem contato com o solo pelo pisoteio durante a colheita e a secagem/fermentação em terreiro. Na colheita sem uso de pano, os frutos também têm intenso contato com o solo, podendo ocorrer aí a contaminação. Os esporos dormentes das espécies de *Bacillus* em geral podem permanecer no ar em partículas de poeira, infectando equipamentos e vestuário.

Três isolados de *B. licheniformis* foram obtidos de mãos de trabalhadores antes do início da colheita. O transporte dos trabalhadores em caminhões abertos em estradas de chão pode trazer esporos às roupas, de onde teriam contato com as mãos dos operários e com o café. Esta contaminação, no

entanto, pode não ter sido significativa, já que os primeiros grãos colhidos provavelmente “esgotariam” o inóculo das mãos dos trabalhadores.

As outras espécies de *Bacillus* isoladas são, em sua maioria, características de solo e alimentos, exceto *B. coagulans*, encontrada em alimentos ácidos; *B. larvae* e *B. lentimorbus*, patógenos de larvas de abelha; *B. popilliae*, patógeno de besouros escarabeídeos e *B. macerans*, encontrada em alimentos e material vegetal (Slepecki & Hemphill, 1992). Os patógenos de insetos podem estar presentes nos frutos devido a visitas de insetos (como abelhas) ou pelo solo ou poeira.

O gênero *Carnobacterium*, que faz parte do grupo das bactérias lácticas (Stiles & Holzapfel, 1997), tem semelhanças fenotípicas e requerimentos nutricionais comparáveis ao gênero *Lactobacillus*, o que sugere que estes microrganismos compartilhem o mesmo tipo de habitat (Hammes et al., 1992). Segundo Avallone et al. (2001a), duas espécies desse gênero, *L. plantarum* e *L. brevis* figuram entre as bactérias lácticas mais frequentemente isoladas de café processado por via úmida. As bactérias do gênero *Carnobacterium* são organismos heterofermentativos, produzindo principalmente ácido láctico a partir de glicose (Holt et al., 1994). Esta capacidade torna estas bactérias desejáveis no processo fermentativo, já que a fermentação láctica provavelmente é benéfica ao sabor da bebida (Cortez, 1996), além de acidificar o meio, o que parece ajudar no desprendimento da mucilagem (Avallone et al., 2001a).

Três das quatro bactérias gram-positivas não esporuladas identificadas como *Carnobacterium mobile* foram isoladas do meio MRS e uma do meio WL. O meio MRS contém polissorbato, acetato, magnésio e manganês, que agem como fatores de crescimento especiais para lactobacilos (Merck Microbiology Manual, 2000). Além disso, o alto teor de glicose (20g/L) e a presença de peptona de caseína, extrato de carne e extrato de levedura formam uma base nutricionalmente rica.

O meio MRS, indicado para o isolamento de bactérias lácticas, é pouco seletivo, permitindo o crescimento de outras bactérias (Merck Microbiology Manual, 2000). De fato, os plaqueamentos feitos neste meio apresentavam-se com uma intensa colonização fúngica, com algumas colônias de leveduras e poucas, ou às vezes nenhuma, colônia bacteriana. A baixa seletividade apresentada torna o meio pouco recomendável para o isolamento de bactérias lácticas de sistemas com alta diversidade como o café.

A maioria dos isolados gram-positivos não esporulados (13 isolados) produz ácido a partir de glicose. Dos 13 isolados gram-positivos não esporulados, dois produziram gás. Oito cocos produzem ácido a partir de glicose, e duas das bactérias gram-negativas possuem esta capacidade. Dos isolados de *Bacillus*, 134 produzem ácido a partir de glicose. Como já dito, a produção de ácidos por estas bactérias pode ser um fator importante no desprendimento da mucilagem e na composição do sabor da bebida.

4.2 Produção de pectinases pelos isolados bacterianos

Dos 195 isolados bacterianos testados quanto à produção de pectinases, nenhum foi capaz de produzir poligalacturonase, e apenas dezessete isolados produziram pectina liase (Tabela 2).

TABELA 2 Isolados bacterianos produtores de pectina liase.

Isol.	Espécie	Meio	Procedência
16	<i>Bacillus firmus</i>	WL	frutos com 2 dias de secagem
70	<i>Bacillus licheniformis</i>	MRS	frutos com 2 dias de secagem
105	<i>Bacillus licheniformis</i>	WL	Derriçadora costal
122	<i>Bacillus licheniformis</i>	WL	frutos com 2 dias de secagem
131	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	MRS	frutos recém-colhidos
135	<i>Bacillus firmus</i>	WL	frutos com 4 dias de secagem
141	<i>Bacillus licheniformis</i>	WL	frutos com 4 dias de secagem
144	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	WL	Peneira
148 ^a	não identificado	WL	frutos com 2 dias de secagem
174	<i>Bacillus licheniformis</i>	WL	frutos com 4 dias de secagem
176	<i>Bacillus licheniformis</i>	MRS	frutos com 2 dias de secagem
207	<i>Bacillus licheniformis</i>	WL	frutos com 2 dias de secagem
421	<i>Bacillus licheniformis</i>	WL	frutos com 2 dias de secagem
422	<i>Bacillus licheniformis</i>	DG18	frutos com 2 dias de secagem
424	<i>Bacillus licheniformis</i>	DG18	frutos com 2 dias de secagem
427	<i>Bacillus licheniformis</i>	WL	frutos com 2 dias de secagem
441	<i>Bacillus pumilus</i>	WL	frutos com 2 dias de secagem

Apenas uma pequena parcela (menos de 10%) das bactérias se mostrou capaz de produzir pectina liase e, além disso, nenhuma bactéria gram-negativa foi capaz de produzir nem poligalacturonase nem pectina liase. Em geral, encontram-se bactérias gram-negativas capazes de produzir pectinases em café, como *Erwinia* spp. (Frank et al., 1965; Avallone et al., 2001a) e *Klebsiella*

pneumoniae (Avallone et al., 2001a). Segundo Arunga (1982), espécies pectinolíticas do gênero *Bacillus* já foram isoladas de café em fermentação via úmida.

O processo de desprendimento da mucilagem do café ainda é pouco entendido e talvez a função microbiana mais importante no processo seja a utilização de açúcares da polpa (produzindo ácidos) do que a produção de enzimas pectinolíticas (Avallone et al., 2000, 2001a e 2001b). As bactérias pectinolíticas encontradas podem ter ação limitada sobre as pectinas da mucilagem, podendo, assim como as outras bactérias, estar utilizando açúcares da polpa. A produção de ácidos acético e láctico a partir de açúcares da mucilagem durante a fermentação em café despulpado já foi relatada por Avallone et al. (2001a). No café natural, o fruto é colocado integralmente para secar, ficando sua polpa, ainda mais rica em açúcares que a mucilagem, sujeita ao ataque de microrganismos. Assim, é provável que o consumo dos açúcares da polpa seja preferido pelas bactérias do que o consumo de produtos da lise da pectina.

Estudos histológicos e bioquímicos dos grãos de café fermentados, assim como estudos mais aprofundados da capacidade pectinolítica das bactérias isoladas de café natural, seriam fundamentais para entender como ocorre o desprendimento da mucilagem. Estes estudos já existem para café despulpado (Avallone et al., 1999, 2001a, 2001b) e são importantes para entender melhor o processamento natural. Por exemplo, saber se estas pectinases são constitutivas ajudaria a entender por que uma bactéria as produziria num meio rico como a polpa de café. Este entendimento possibilitaria um maior controle da fermentação dos grãos, impedindo sobrefermentações e melhorando a qualidade da bebida.

4.3 Fungos filamentosos

Dos 93 isolados fúngicos obtidos, 80 foram identificados até gênero. Treze isolados não apresentaram esporulação nos meios de cultura utilizados, o que impossibilitou sua identificação. Os gêneros encontrados foram *Fusarium* com 55 isolados *Penicillium*, com 19 isolados; *Aspergillus*, com 4 isolados e *Cladosporium*, com 2 isolados. Todos os gêneros de fungos encontrados já haviam sido relatados em café em trabalhos anteriores (Krug, 1940a; Mislivec et al., 1983; Silva et al., 2000 Batista et al., 2002). Os quatro gêneros citados já foram reportados como produtores de todos os tipos de pectinases (Silva et al., 2000), embora os isolados deste trabalho não tenham sido testados quanto a essa capacidade.

Os isolados de *Fusarium* foram provenientes do café recém-colhido (24 isolados), com dois dias de secagem (25 isolados) e de café com quatro dias de secagem (quatro isolados). Dois isolados foram provenientes da derriçadora costal. Este gênero está associado a cafés de pior qualidade (Krug, 1940a; Alves & catro, 1998;). Segundo Liardon et al. (1989), *Fusarium sporotrichoides* se mostrou capaz de transformar triclorofenóis em tricloroanisóis, possíveis responsáveis pelo gosto de passado da bebida.

Mais da metade dos isolados de *Penicillium* foram provenientes de equipamentos (colhedora automotriz, 4 isolados; derriçadora costal, 1 isolado; pano, 4 isolados; recolhadora, 3 isolados); os outros oito isolados foram provenientes de café com dois (2 isolados) e quatro dias de secagem (6 isolados). Espécies de *Penicillium* podem também ser produtoras de ocratoxinas (Batista et al., 2002). Não há estudos sobre a produção destas toxinas durante a fermentação, mas Schwan & Wheals (2003) afirmam que a ocratoxina A parece estar associada a bateladas de cerejas que tenham sido mantidas em teores de

umidade altos durante períodos prolongados de tempo, facilitando o crescimento de microrganismos produtores da referida toxina.

Os dois isolados de *Cladosporium* foram provenientes de grãos com dois e quatro dias de secagem. O gênero *Cladosporium* tem sido associado a cafés de boa qualidade (Krug, 1940a; Bitancourt, 1957; Alves & Castro, 1998). No entanto, não há estudos que expliquem como os fungos deste gênero influenciam a qualidade da bebida.

Dois isolados de *Aspergillus* foram obtidos de café recém-colhido, enquanto um foi obtido da amostragem do pano e outro da automotriz. Liardon et al. (1989) encontraram espécies de *Aspergillus* isoladas de cafés rio capazes de converter tricolorofenóis em tricloroanisóis, que levam ao gosto de passado. As espécies de *Aspergillus* das seções *Circumdati* e *Nigri* são toxigênicas, sendo possivelmente responsáveis, junto com *Penicillium verrucosum*, pela produção de ocratoxina A já detectada em grãos de café (Batista et al., 2002).

5 CONCLUSÕES

A população microbiana associada ao sistema cafeeiro é alta e inclui os três grandes grupos de microrganismos.

O gênero *Bacillus* representou 80% dos isolados bacterianos. A espécie mais abundante foi *Bacillus licheniformis*, uma bactéria de solo, assim como a maior parte das espécies encontradas.


Somente uma pequena percentagem dos isolados bacterianos foi capaz de produzir pectinases (apenas a enzima pectina liase). Estes isolados podem estar auxiliando no desprendimento da mucilagem dos grãos.

Uma grande parte dos isolados bacterianos se mostrou capaz de produzir ácido a partir de glicose, o que pode influenciar no sabor da bebida e ajudar no desprendimento da mucilagem.

O gênero mais abundante entre os fungos foi *Fusarium* (59% dos isolados fúngicos), um gênero usualmente associado a cafés de pior qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. **Applied Microbiology**, New York, v. 14, n. 2, p. 256-260, Mar. 1966.
- ALVES, E.; CASTRO, H. A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 4-7, jan./mar. 1998.
- AMORIM, H. V.; AMORIM, V. L. Coffee enzymes and coffee quality. In: ORY, R. L.; ANGELO A. J. St. (Ed.). **Enzymes in food and beverage processing**. Washington: American Chemical Society, 1977. n. 47, p. 27-55.
- AMORIM, H. V.; MELLO, M. Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage. In: FOX, P. F. (Ed.). **Food enzymology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 2, p. 189-209.
- AMORIM, H. V.; TEIXEIRA, A. A.; MORALES, R. S.; REIS, A. J.; PIMENTEL GOMES, F.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro XXVII. Efeito da adubação N, P e K no teor de macro e micro nutrientes do fruto e na qualidade da bebida do café. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiróz"**, Piracicaba, v. 30, p. 323-333, dez. 1973.
- ARUNGA, R. O. Coffee. In: ROSE, A. H. (Ed.). **Fermented foods: economic microbiology**. Oxford: Academic Press, 1982. v. 7, p. 259-274.
- AVALLONE, S.; BRILLOUET, J. M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 191-198, Feb. 2002.
- AVALLONE, S.; GUIRAUD, J. P.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; BRILLOUET, J. M. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 5556-5559, Nov. 2001a.
- AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J. M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 4, p. 252-256, Apr. 2001ba.



AVALLONE, S.; GUYOT, B.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; GUIRAUD, J. P.; OLGUIN PALACIOS, E.; BRILLOUET, J. M. Cell wall polysaccharides of coffee bean mucilage. Histological characterization during fermentation. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 18., 1999, Helsinki. **Proceedings...** Helsinck: ASIC, 1999. p. 463-470.

BADE-WEGNER, H.; BENDIG, I.; HOLSCHER, W.; WOLLMANN, R. Volatile compounds associated with the over-fermented flavour defect. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 17., 1997, Nairobi. **Colloque...** Nairobi: ASIC, 1997. p. 176-182.

BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **The Prokaryotes - a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.** 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. v. 2, 2289 p.

BÁRTHOLO, G. F.; GUIMARÃES, P. T. G. Cuidados na colheita e preparo do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 33-42, 1997.

BÁRTHOLO, G. F.; MAGALHÃES FILHO, A. A. R. de; GUIMARÃES, P. T. G.; CHALFOUN, S. M. Cuidados na colheita, no preparo e no armazenamento do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 14, n. 162, p. 33-44, 1989.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, p. 1-8, 2002.

BITANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da superintendência dos serviços do café**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 7-14, jan. 1957.

BLORE, T. W. D. Some agronomic practices affecting the quality of Kenya Coffee. **Turrialba**, San José, v. 15, n. 2, p. 111-118, abr./jun. 1965.

CALLE, V. H. Activadores bioquímicos para la fermentación del café. In: **Seminarios. Cenicafé**, Chinchiná, v. 8, p. 94-101, mar. 1957.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; CHALFOUN, S. M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.

CARVALHO, V.D. de; CHAULFOUN, S.M.; CHAGAS, S.J.R. Relação entre a classificação do café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 15, 1989, Maringá. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro: IBC, [1989]. P. 25-26.

CARVALHO JUNIOR, C. **Efeito de sistemas de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica* L.)**. 2002. 140 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHAGAS, S. J. R. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios das regiões produtoras de Minas Gerais**. 1994. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

CHAULFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida de café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 21-26, 1997.

CHAULFOUN, S. M.; SOUZA, J. C. de; CARVALHO, V. D. de. Relação entre a incidência de broca, *Hypotenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera-Scolytidae) e microrganismos em grãos de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 11., 1984, Londrina. **[Resumos...]** Rio de Janeiro: IBC, [1984]. p. 149-150.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee – technology**. New York: Elsevier Applied Science, 1987. 321 p.

CORTEZ, J. G. Aptidão climática para a qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 27-31, 1997.

DAIVASIKAMANI, S.; KANNAN, N. Studies on post-harvest mycoflora of coffee cherry of robusta. Brief Note. **Journal of Coffee Research**, Balehonnur, v. 16, n. 3/4, p. 102-106, 1986.

FRANK, H. A.; LUM, N. A.; DELA CRUZ, A. S. Bacteria responsible for mucilage layer decomposition in Kona coffee cherries. **Applied Microbiology**, New York, v. 13, n. 2, p. 201-207, 1965.

- GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; PANG, C. H. N. **The Genus Bacillus**. Washington: Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture, 1973. p. 283.
- HAMMES, W. P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **The Prokaryotes - a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. 2289 p.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. , STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 787.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. **Cultura do café no Brasil: manual de recomendações**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1977. 36 p.
- INSTITUTO CAMPINEIRO DE ENSINO AGRÍCOLA. **Cultura do café**. Campinas, 1987. 84 p.
- JONES, K. L.; JONES, S. E. Fermentations involved in the production of cocoa, coffee and tea. **Progress in Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 19, p. 411-456, 1984.
- KRUG, H. P. Café duros II. Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. **Revista do Instituto de Café**, São Paulo, v. 36, p. 636-638, 1940a.
- KRUG, H. P. Cafés duros III. Relação entre a porcentagem de microrganismos e qualidade do café. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v. 27, n. 163, p. 1827-1831, set. 1940b.
- KRUG, H. P. Origem dos cafés duros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, v. 46, p. 397-406, 1947.
- LIARDON, R.; SPADONE, J. C.; BRAENDLIN, N.; DENTAN, E. Multidisciplinary study of rio flavour in brazilian green coffee. In: **ASIC, 13 Colloque**, Paipa, 1989. p. 117-126.
- MEIRELES, A. M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. 1990. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENCHÚ, J. F.; ROLZ, C. Coffee fermentation technology. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 17, n. 1, p. 53-61, jan./mar. 1973.

MENON, S. N. Quality improvement on the estate and processing technology in coffee. **Indian Coffee**, Bangalore, v. 53, n. 12, p. 15-20, Dec. 1989.

MERCK MICROBIOLOGY MANUAL, **Merck KgaA**, Darmstadt, Alemanha, 2000.

MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 46, n. 11, p. 969-973, Nov. 1983.

MONACO, L. C. Armazenamento do café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 36, n. 417, p. 15-16, nov. 1961.

MOREAU, C. **Moulds, toxins and food**. New York: John Wiley, 1979. 477 p.

OLIVEIRA, J. C.; AMORIM, H. V.; SILVA, D. M.; TEIXEIRA, A. A. Atividade enzimática da polifenoloxidase de grãos de quatro espécies de café durante o armazenamento. **Científica**, Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 114-119, 1976.

PEDERSON, C. S.; BREED, R. S. Fermentation of Coffee. **Food Research**. Oxford, v. 11, n. 2, p. 99, 1946.

PEREIRA, M. J. Demonstração da existência no grão de café de uma oxidase clorogênica: variação da actividade desta com a idade do grão. **Estudos agronômicos**, Lisboa, v. 3, n. 4, p. 151-156, out./dez. 1962.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food Spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

PRETE, C. E. C. **Condutividade elétrica do exudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida**. 1992. 125 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

PUERTA QUINTERO, G. I. Calidad en taza de las variedades de *Coffea arabica* cultivadas en Colombia. **Cenicafé**, Chinchiná, v. 49, n. 4, p. 265-278, oct./dic. 1998.

- PUERTA QUINTERO, G. I. Evaluación de la calidad del café colombiano processado por vá seca. *Cenicafé*, Chinchiná, v. 47, n. 2, p. 85-90, abr./jun. 1996.
- RAGHAVAN, B.; RAMALAKSHMI, K. Coffee: chemistry and technology of its processing. *Indian Coffee*, Bangalore, v. 62, n. 11, p. 3-11, Nov. 1998.
- ROGERS, W. J.; MICHAUX, S.; BASTIN, M.; BUCHELL, P. Changes in the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids, and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*Coffea arabica*) coffees. *Plant Science*, Clare, v. 149, n. 2, p. 115-123, Dec. 1999.
- ROSE, A. H. (Ed.). **Fermented foods: economic microbiology - coffee fermentations**. Oxford: Academic Press, 1982. p. 259-273.
- SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E. M.; PEREIRA, P. C.; BORGES, A. C. , SILVA, D. O. Characterization of a pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 33, p. 117-121, 2001.
- SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: BOEKHOUT, T.; ROBET, V. (ed.). **Yeast in foods**. Hamburg, Alemanha: Ed. Behr's Verlag, 2003. 429-449 p.
- SILVA, C. F. **Diversidade microbiana em grãos de café processados por via seca nas fases pré e pós-colheita**. 2000. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. W. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept. 2000.
- SILVA, F. M. et al. **Colheita do café mecanizada e semi-mecanizada**. Lavras: UFLA, 2001. p. 88. (Boletim de extensão).
- SILVA, F. M. et al. Desempenho operacional da colheita mecanizada com várias passadas da colhedora de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 26., 2000, Marília. **Resumos...** Rio de Janeiro: MAA/PROCAFÉ, 2000. p. 345-347.

SILVA, C.F. **Diversidade microbiana em grãos de café processados por via seca nas fases pré e pós-colheita.** Lavras: UFLA, 2000. 113p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)

SIVETZ, M. **Coffee processing technology.** Westport: Connecticut: AVIC, 1963. v. 2.

SIVETZ, M.; DESROSIER, N. W. **Coffee technology.** Westport: AVI Publishing Company, 1979. 716 p.

SLEPECKY, R. A.; HEMPHILL, H. E. The genus *Bacillus* – nonmedical. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **The Prokaryotes - a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.** 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. 2289 p.

SÖNDAHL, M. R.; CORP, F. **Produção de café: considerações sobre qualidade.** *Revista Illycaffé*, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 9, 1995.

SORIANO, M.; BLANCO, A.; DIAZ, P.; JAVIER PASTOR, F. I. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. With high activity on pectin: cloning and characterization. *Microbiology*, United Kingdom, v. 146, pt. 1, p. 89-95, Jan. 2000.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. M. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 1-29, Apr. 1997.

VALENCIA, A. G. Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida de café. *Cenicafé*, Chinchiná, v. 23, n. 1, nov. 1973.

VAN PEE, W.; CASTELEIN, J. M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 37, n. 2, p. 171-174, Mar./Apr. 1972.

VAUGHN, R. H.; CAMARGO, R. de; FALLANGE, H.; MELLO AYRES, G.; SERGEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. *Food Technology*, Chicago, v. 12, n. 5, p. 12-57, Apr. 1958. Supplement.

WOELORE, W. M. Optimum fermentation protocols for Arabica coffee under Ethiopian conditions. In: SCIENTIFIC SYMPOSIUM ON COFFEE, 1993, Association Scientifique Internationale du Café, 1993. p. 727-733.

WONG, D. W. S. Cellulolytic Enzymes. In: _____. Food enzymes – structure and mechanism. New York: Chapman & Hall, 1995. p. 85-114.

ANEXO A

	Página
TABELA 1A	Composição do meio de cultura WL 64
TABELA 2A	Composição do meio de cultura MRS..... 65
TABELA 3A	Composição do meio de cultura DG18..... 66
TABELA 4A	Composição do meio de cultura YEPG..... 66
TABELA 5A	Composição do meio de cultura PCA..... 67
TABELA 6A	Composição do meio de cultura MP5..... 68
TABELA 7A	Composição do meio de cultura MP7..... 69

TABELA 1A Composição do meio de cultura WL

Reagente	Concentração
Extrato de levedura	4 g/L
Casitona	5g/L
Glicose	50g/L
KH_2PO_4	0,55g/L
KCl	4,425g/L
CaCl_2	0,125 g/L
MgSO_4	0,125g/L
FeCl_3	0,0025g/L
Verde de bromocresol	0,022g/L
Agar	13g/L
pH 5,5	

TABELA 2A Composição do meio de cultura MRS

Reagente	Composição
Peptona	10 g/L
Extrato de carne	8 g/L
Extrato de levedura	4 g/L
Glicose	20 g/L
Monoleato de sorbitano (Tween 80)	1 g/L
K ₂ HPO ₄	2 g/L
Acetato de sódio	3 g/L
Citrato de amônia	2 g/L
Sulfato de magnésio	0,01 g/L
Sulfato de manganês	0,036 g/L
Agar	13 g/L
pH 6,2	

TABELA 3A Composição do meio de cultura DG18

Reagente	Concentração
Glicose	8 g/L
Peptona	4 g/L
KH ₂ PO ₄	0,8 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L
Glicerol 99%	176 mL/L
Dicloran	1 mg/L
Cloranfenicol	50 a 75 mg/L
Agar	13 g/L

TABELA 4A Composição do meio de cultura YEPG

Reagente	Concentração
Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Agar	15 g/L

TABELA 5A Composição do meio de cultura PCA

Reagente	Concentração
Triptona	5 g/L
Extrato de levedura	2,5 g/L
Glicose	1 g/L
Agar	13 g/L
pH 7,0	

TABELA 6A Composição do meio de cultura MP5

Reagente	Concentração
Glicose	5 g/L
Ácido poligalacturônico	4 g/L
Extrato de levedura	1 g/L
Na ₂ HPO ₄	6 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g/L
FeSO ₄	0,001 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L
CaCl ₂	0,001 g/L
H ₃ BO ₃	0,00001 g/L
MnSO ₄	0,00001 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,00007 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00005 g/L
MoO ₃	0,00001 g/L
pH 5,0	

TABELA 7A Composição do meio de cultura MP7

Reagente	Concentração
Glicose	5 g/L
Pectina	4 g/L
Extrato de levedura	1 g/L
Na ₂ HPO ₄	6 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g/L
FeSO ₄	0,001 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L
CaCl ₂	0,001 g/L
H ₃ BO ₃	0,00001 g/L
MnSO ₄	0,00001 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,00007 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00005 g/L
MoO ₃	0,00001 g/L
pH 7,0	