

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
CONVENCIONAL E MOLECULAR POR
ARDRA E DGGE DA MICROBIOTA
ASSOCIADA AO CAFÉ DESPOLPADO
(*Coffea arabica* L.)**

DANIELLE MARQUES VILELA

2009

DANIELLE MARQUES VILELA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO CONVENCIONAL E
MOLECULAR POR ARDRA E DGGE DA MICROBIOTA
ASSOCIADA AO CAFÉ DESPOLPADO (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Strictu-Sensu em Ciência dos Alimentos, na área de concentração em Estudo dos processos fermentativos, rudimentares e industriais para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

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

Vilela, Danielle Marques.

Isolamento e caracterização convencional e molecular por
ARDRA e DGGE da microbiota associada ao café despulpado
(*Coffea arabica* L.) / Danielle Marques Vilela. – Lavras : UFLA,
2009.

71 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Café despulpado. 2. Microrganismos. 3. DGGE. 4.
ARDRA I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

DANIELLE MARQUES VILELA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO CONVENCIONAL E
MOLECULAR POR ARDRA E DGGE DA MICROBIOTA
ASSOCIADA AO CAFÉ DESPOLPADO (*Coffea arábica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Strictu-Sensu em Ciência dos Alimentos, na área de concentração em Estudo dos processos fermentativos, rudimentares e industriais para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 12 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias	UNILAVRAS
Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias	DBI-UFLA
Prof. Dr. Luís Roberto Batista	DCA-UFLA

Profª. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICO

Àquele ao qual devemos toda honra e toda glória
“Tudo posso Naquele que me fortalece”
(Fp 4,13)

OFEREÇO

Aos meus pais, Vera Lúcia e José Santana, pelos ensinamentos e pelo incentivo,
Ao meu marido Márcio Vilela, pelo amor e companheirismo,
Aos meus familiares, pela amizade e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar saúde, sabedoria e fé para concretização de meus objetivos.

Aos meus pais, José Santana e Vera, pelo incentivo, pela educação que me proporcionaram e pelos princípios que me ensinaram.

Ao meu marido, Márcio, meu companheiro há 12 anos, por estar sempre presente, paciente e por me impulsionar a sempre crescer, nunca desanimar e atingir meus objetivos.

Às minhas irmãs Patrícia, Cláudia, Raquel e Simone por fazerem parte da minha vida, cada uma do seu jeito, mas cada qual com a sua importância e contribuição.

Meus sobrinhos Gabi, Rafa, João Vítor, Vinícius, Ludmilla, Tales, Renan, Gabriela, Mariana, Otávio, Gabriel e Henrique pela alegria e carinho que me proporcionam. Meus sogros, cunhadas e cunhados pela ótima convivência.

À Prof. Rosane Freitas Schwan, por todos os ensinamentos, pelos puxões de orelha, pela palavra amiga, pelas conversas sobre Deus, enfim pelo aprendizado a cada dia.

À Dra. Cristina pela co-orientação, por toda experiência transmitida, os toques, enfim pela bela parceria. Foi muito bom trabalhar com você, Cris!

Aos alunos de Iniciação Científica e BicJúnior que auxiliaram na execução do experimento, Gilberto, Ana Luíza, Karol, Sílvio e Isabella.

Ao Prof. Luis Roberto Batista, pelo auxílio na identificação dos fungos filamentosos.

Ao Prof. Romildo Silva pela ótima convivência e pela experiência transmitida durante a monitoria.

Ao Prof. Disney Ribeiro Dias, pela parceria na graduação, a qual contribuiu muito para o meu desenvolvimento no mestrado.

À Universidade Federal de Lavras, por proporcionar a minha formação e pelo espaço físico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e pelo financiamento do projeto.

Aos amigos que conquistei Carla, Euziclei e Cláudia. Pessoas especiais que levarei por toda a vida!

Aos meus colegas de convívio diário no laboratório, Gabi, Lílian, Whasley, Cássia, Bia, Sarita, Mateus, Niltinho e Lorena, pelo companheirismo e momentos de descontração.

À Ivani, Magda e Cidinha pela paciência e bom humor em atender meus pedidos.

Aos meus primos e amigos Mirian e Alessandro, Roberta e Élcio pelo companheirismo e pelos momentos de diversão.

A todos que torcem por mim!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Cafeicultura brasileira.....	4
2.2 Composição química do café.....	5
2.3 Processamento do café.....	7
2.3.1 Processamento via seca.....	9
2.3.2 Processamento via úmida.....	10
2.4 Microbiota presente no processamento de café	13
2.4.1 Bactérias	13
2.4.2 Fungos leveduriformes	14
2.4.3 Fungos filamentosos	15
2.5 Estudo da diversidade microbiana através da Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA).....	17
2.6 Avaliação de comunidades microbianas por Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Amostras de café.....	20
3.2 Isolamento dos microrganismos.....	20
3.3 Identificação das espécies microbianas.....	21
3.3.1 Identificação de bactérias.....	21
3.3.1.1 Análise dos isolados bacterianos pela técnica ARDRA da região intergênica 16S- 23S do rDNA	22

SUMÁRIO

	Página
3.3.1.2 Sequenciamento da região intergênica 16S- 23S do rDNA para identificação dos isolados bacterianos	25
3.3.2 Identificação de leveduras.....	25
3.3.2.1 Análise dos isolados leveduriformes pela técnica ARDRA da região intergênica ITS1-5.8S do rDNA	26
3.3.2.2 Sequenciamento da região ITS1-5.8S rDNA para identificação dos isolados leveduriformes.....	27
3.3.3 Identificação de fungos filamentosos.....	27
3.3.3.1 Identificação de gêneros.....	27
3.3.3.2 Identificação das espécies.....	27
3.4 Avaliação dos microrganismos presentes nas amostras por DGGE.	29
3.4.1 Extração do DNA microbiano das amostras.....	29
3.4.2 Amplificação por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia).....	29
3.4.2.1 Bactérias	29
3.4.2.2 Fungos leveduriformes e filamentosos	30
3.4.3 Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	30
3.4.3.1 Bactérias	31
3.4.3.2 Fungos leveduriformes e filamentosos.....	31
3.4.3.3 Análise por sequenciamento das bandas de DGGE.....	32
3.5 Análises físico-químicas das amostras de café.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Contagem de microrganismos.....	33
4.2 Identificação das bactérias isoladas por análise de 16S- 23S rDNA - ARDRA e sequenciamento.....	35

SUMÁRIO

	Páginas
4.3 Identificação das leveduras isoladas por análise de ITS1-5.8S rDNA - ARDRA e sequenciamento.....	42
4.4 Identificação dos fungos filamentosos isolados.....	46
4.5 Espécies de bactérias detectadas por PCR-DGGE.....	50
4.6 Espécies de leveduras detectadas por PCR-DGGE.....	53
4.7 Análises físico-químicas e classificação da bebida.....	56
5 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

RESUMO

VILELA, D.M. **Identificação e caracterização convencional e molecular por ARDRA e DGGE da microbiota associada ao café despulpado (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 71 p. Dissertação (Mestrado Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG.

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são isolados durante praticamente todas as etapas de processamento do café. Treze amostras de *Coffea arabica* L. foram coletadas durante as diferentes etapas de processamento do café despulpado de uma fazenda no Sul de Minas Gerais. Os isolados bacterianos e leveduriformes foram identificados por Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) e análise de sequenciamento da região 16-23S do rDNA (bactérias) e ITS1-5.8S do rDNA (leveduras). Os fungos filamentosos foram identificados através de análises das características macro e microscópicas das colônias. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) do produto de PCR das regiões rRNA 18S e rRNA 16S foi realizada para analisar as comunidades de leveduras e bactérias. Contagens de bactérias, leveduras e fungos filamentosos foram na ordem de $4,7 \times 10^3$ a 1×10^7 UFC/g, $2,3 \times 10^3$ a $7,5 \times 10^6$ UFC/g, 1×10^2 a $5,5 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente. Através do ARDRA da região 16-23S do rDNA foram obtidos 16 padrões de fragmentos de restrição distintos correspondentes a 16 espécies distintas de bactérias. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae* foram as bactérias predominantes durante o processamento do café. *Lactococcus lactis*, *Serratia sp.*, *Acinetobacter spp* e *Bacillus megaterium* foram isoladas em meios de cultivo, mas não detectadas por análise de DGGE das mesmas amostras. Todas as espécies detectadas por DGGE foram também isoladas por cultivo, com exceção da bactéria não cultivável. Através do ARDRA da região ITS1-5.8S do rDNA foram obtidos 15 padrões de fragmentos de restrição distintos correspondentes a 14 espécies distintas de leveduras. *Pichia anomala* foi presente em todas as amostras, com contagens na ordem de 10^3 a 10^6 UFC/g. *Torulaspota delbrueckii* e *Rhodotorula mucilaginosa* também foram leveduras predominantes durante o processamento do café. Algumas espécies de leveduras como *Candida ernobii*, *C. fukuyamaensis*, *Pichia caribbica*, *C. membranifaciens*, *Saccharomyces bayanus* e *Arxula sp.* foram isoladas em meios de cultivo, mas não detectadas nas análises de DGGE das mesmas amostras. Todas as espécies de leveduras detectadas por DGGE foram também isoladas por cultivo. Dentre os fungos filamentosos identificados o gênero *Aspergillus* foi o de maior incidência, seguido pelos gêneros *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* e *Cladosporium*. Houve boa correlação entre as espécies encontradas por isolamento em meio de cultivo e sequenciamento e os perfis de DGGE obtidos, tanto para bactérias quanto para leveduras; no entanto as técnicas moleculares precisam estar associadas

às técnicas tradicionais a fim de se obter melhor caracterização da microbiota presente.

Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora) e Cristina Ferreira Silva (Co-orientadora) – UFLA

ABSTRACT

VILELA, D.M. **Molecular and conventional identification and characterization by ARDRA and DGGE of the microbiota associated to depulped coffee (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 71p. (Master's Dissertation in Food Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG

Bacteria, yeast and filamentous fungi are isolated during all the stages of coffee processing. Thirteen samples of *Coffea arabica* L. were collected during different processing stages of depulped coffee from a farm in the South of Minas Gerais. The isolated bacteria and yeasts were identified by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) and sequence analysis of the 16-23S of the rDNA (bacteria) and ITS1-5.8S of the rDNA (yeasts). The filamentous fungi were identified by analyses of macro and microscopic characteristics of the colonies. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the product of PCR of the rRNA 18S and rRNA 16S were carried out to analyze the yeast and bacteria communities. Bacteria, yeast and filamentous fungi counts were in the order of 4.7×10^3 to 1×10^7 CFU/g, 2.3×10^3 to 7.5×10^6 CFU/g, 1×10^2 to 5.5×10^3 CFU/g, respectively. Using the technique ARDRA of the 16-23S region of the rDNA, 16 distinct restriction fragment patterns, corresponding to 16 different bacterial species were obtained. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus* and *Klebsiella pneumoniae* were the predominant bacteria during the coffee processing. *Lactococcus lactis*, *Serratia sp.*, *Acinetobacter spp* and *Bacillus megaterium* were isolated in culture medium, but not detected by DGGE analysis of the same samples. All of the species detected by DGGE were also isolated for cultivation, except for the nonculturable bacteria. The method ARDRA of the ITS1-5.8S region of the rDNA allowed 15 distinct restriction fragment patterns corresponding to 14 different yeast species. *Pichia anomala* was present in all the samples, with counts to the order of 10^3 to 10^6 CFU/g. *Torulaspota delbrueckii* and *Rhodotorula mucilaginosa* were also predominant yeasts during the coffee processing. Some yeast species such as *Candida ernobii*, *C. fukuyamaensis*, *Pichia caribbica*, *C. membranefaciens*, *Saccharomyces bayanus* e *Arxula sp.* were isolated in culture media but not detected in the DGGE analyses of the same samples. All of the yeasts species detected by DGGE were also isolated in the culture media. Among the filamentous fungi identified, the genus *Aspergillus* was of higher incidence followed the genera *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* and *Cladosporium*. There was a good correlation among the species found by isolation in culture medium and sequencing and the DGGE profiles obtained, for bacteria, as well as yeasts, however the molecular techniques need to be associated to the traditional techniques in order to obtain better characterization of the microbiota present in coffee processing.

Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Adviser) and
Cristina Ferreira Silva (Co-adviser) – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O objetivo do processamento via úmida do café é a remoção da polpa, da mucilagem, do pergaminho e da película prateada que envolve os grãos de café com o intuito de facilitar a sua secagem (Masoud et al., 2004; Fowler et al., 1998). Os frutos de café podem ser processados pela via seca ou úmida. No processamento via seca o café é secado com todas as suas partes constituintes (exocarpo – casca; mesocarpo – mucilagem; endocarpo – pergaminho; perisperma – película prateada e endosperma – semente). Pelo processamento via úmida obtêm-se o café cereja descascado, o café despulpado e o café desmucilado, de acordo com a parte removida do fruto para a posterior secagem (Bártholo & Guimarães, 1997; Masoud et al., 2004).

A preparação dos cafés a partir de frutos maduros e com a eliminação rápida da fonte de fermentação, independentemente do tipo de processamento (via seca ou via úmida), se bem processada resulta em cafés de boa qualidade seja qual for a da região de produção. No geral, frutos de *Coffea arabica* produzidos no mundo ainda são processados pelo método via seca (Masoud & Jespersen, 2006). No Brasil, por exemplo, mais de 95% do café arábica produzido é processado via seca (Silva et al., 2008b; Masoud & Jespersen, 2006). Algumas regiões produtoras de café arábica, como Colômbia, América Central e Hawaii, no entanto, utilizam a via úmida como método de processamento (Silva et al., 2008b).

Durante o processamento do café, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos estão presentes durante os diferentes estádios (Silva et al., 2000; Masoud et al., 2004). Uma vez que os microrganismos estão presentes naturalmente em todas as etapas pré e pós-colheita do café, influenciando na bebida, seja pela degradação de compostos presentes nos grãos ou pela excreção de metabólitos, torna-se de

suma importância a caracterização dessa microbiota através do seu isolamento e identificação.

Tradicionalmente, a detecção e a identificação de microrganismos eram somente feitas de acordo com os principais meios de cultivo para seu desenvolvimento, além da observação direta com a utilização de microscópio. Todavia, essas metodologias forneciam informações limitadas, com necessidade de maior refinamento. Como alternativa para esses métodos foram desenvolvidas várias técnicas, destacando-se aquelas baseadas nos ácidos nucleicos (Reis Júnior et al., 2004; Wattiau., 2001), as quais incluem ARDRA, Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (Ouoba et al., 2004; Moreira, 2005; Wu et al., 2006), sequenciamento de rDNA 16S (Wu et al., 2006) e Polimorfismo do DNA amplificado randomicamente (RAPD-PCR) (Zhang et al., 2002; Isenegger et al., 2003).

Os microrganismos presentes no ambiente apresentam grande diversidade genética e desempenham funções cruciais nos mesmos. Apesar de sua grande importância, apenas uma pequena fração da diversidade microbiana é conhecida. Devido a este fato, os métodos dependentes de cultivo para estudos prévios de microrganismos devem ser combinados com métodos independentes de cultivo para dar uma visão mais completa da diversidade microbiana. Métodos independentes de cultivo, como DGGE, têm sido desenvolvidos para diferenciação de genes rRNA diretamente extraídos de comunidades microbianas complexas (Muyzer et al., 1993; Masoud et al., 2004).

Os objetivos do presente trabalho foram isolar e identificar a microbiota presente durante o processamento via úmida do café por métodos convencionais e moleculares. A identificação das bactérias e leveduras foi realizada utilizando-se agrupamento dos microrganismos por ARDRA, seguido da identificação por sequenciamento e dos fungos filamentosos utilizando a análise das características macro e microscópicas das colônias.

Foi também objetivo deste trabalho avaliar a diversidade microbiana presente pela técnica de DGGE.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cafeicultura brasileira

Tradicionalmente, o café é produzido no Brasil desde a época do império. Durante toda a sua história, tem absorvido grande quantidade de mão-de-obra, tornando-se uma importante fonte de renda para a economia do país e contribuindo significativamente como uma *commoditie* na formação do capital no setor agrícola brasileiro.

O gênero *Coffea* inclui pelo menos 105 espécies, das quais apenas duas são economicamente mais importantes: a *C. arábica* L., conhecida como café arábica, que responde por cerca de 3/4 da produção mundial, e a *C. canephora* Pierre, comumente descrita como café robusta, que contribui com o restante da produção mundial.

O café é uma das mais importantes fontes de divisas para o nosso país, principal produtor e exportador mundial. A previsão para a safra 2008/2009 do Brasil é de 45,54 milhões de sacas (60 kg), correspondentes a mais de 30% da produção mundial de acordo com levantamento da safra feito pela Conab. Do total, a produção de café arábica deverá ser de 34,7 milhões de sacas, e a de café robusta (conillon), de 10,84 milhões. Os três maiores países produtores são Brasil (45,54 milhões de sacas - arábica e robusta), Vietnã (17,5 milhões de sacas – robusta) e Colômbia (12,4 milhões de sacas – arábica (Informe Estatístico do Café, 2008; International Coffee Organization - ICO, 2008).

No Brasil, o café é produzido em 11 Estados e em 1.850 municípios. São 2,3 milhões de hectares plantados, e a produtividade média é de 21,63 sacas por hectare. O principais Estados produtores e a previsão de safra 2008/2009 são Minas Gerais (produção estimada em 22,9 milhões de sacas), Espírito Santo (produção estimada em 10,52 milhões de sacas, sendo o maior produtor nacional de café robusta), São Paulo (produção estimada em

4,72 milhões de sacas), Bahia (produção estimada em 2,26 milhões de sacas) e Paraná (produção estimada em 2,36 milhões de sacas).

2.2 Composição química do café

O fruto do cafeeiro é constituído de exocarpo (casca), mesocarpo (mucilagem), endocarpo (pergaminho), espermoderma (película prateada) e endosperma (semente), que constitui o grão propriamente dito (Figura 1) (Salazar et al., 1994).

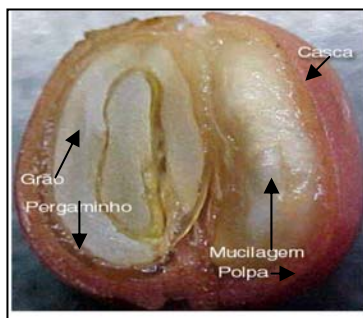


FIGURA 1 Corte longitudinal de um fruto de café no estágio cereja

A qualidade sensorial do café está relacionada diretamente com a composição química dos grãos (Tabela 1). O número de defeitos presentes nos grãos e a presença de grãos imaturos (verde, verde-cana) interferem na composição química que, por consequência, compromete a qualidade da bebida (Mazzafera & Guerreiro Filho, 1998).

De modo geral, o grão de café apresenta, em sua constituição química, inúmeros componentes voláteis e não-voláteis, tais como ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, trigonelina, compostos fenólicos e cafeína, bem como enzimas, que agem sobre estes próprios constituintes (Biosci, 1993; Menezes, 1994).

Tabela 1 Constituição química do grão de café seco

Constituição Química	%
carboidratos	60
óleos	13
proteínas	13
ácidos	8,2
caféina	1

Fonte: Menezes (1994)

A composição dos ácidos graxos depende de alguns fatores como espécies e variedades de café. As reações de hidrólise dos triacilgliceróis (TAG) com a liberação dos ácidos graxos (FA) formam oxidações “off-flavour” na constituição química do café. Esta constituição química poderá ser modificada durante os processos de pós-colheita, ou seja, dependerão muito das condições de processamento, secagem e armazenamento (Menezes, 1994).

As características físico-químicas da mucilagem são essenciais para um entendimento da fermentação do café. A mucilagem forma de 20-25%, base úmida, do café cereja e varia em espessura entre 0,5-2,0 mm dependendo da variedade, do estágio de amadurecimento e das condições ambientais de cultivo (Menchú & Rolz, 1973). A mucilagem é incolor, mas quando exposta ao ar, torna-se escura como resultado das reações enzimáticas oxidativas (Amorim e Amorim, 1977). Esta só é formada no estágio cereja quando o fruto está quase maduro; os frutos ainda verdes não a possuem. Nestes últimos, quando despolidos, a semente fica sem a proteção e a lubrificação fornecidas pela mucilagem, tornando-a passível de esmagamento ou corte, prejudicando o sabor da bebida (Arunga, 1982).

Os constituintes da parede celular, especialmente a lamela média e a parede primária, devem ser considerados de grande importância na quebra da mucilagem, sendo as substâncias pécticas e a hemicelulose os constituintes

de interesse particular (Amorim & Amorim, 1977). O ácido pécico é um polímero de ácido galacturônico associado a baixos níveis de arabinose, xilose e ramnose. A pectina é composta principalmente de unidades de ácido galacturônico unidas por ligações α 1,4 com pequenas quantidades de arabinanas e galactanas (Blanco, 1999). A pectina presente no café apresenta um grau de esterificação de 70% e o comprimento da cadeia varia de 140 unidades para variedades de *Coffea canephora* e 250 unidades para variedades de *Coffea arabica* (Castelein & Pilnik, 1976), porém não se sabe em até que ponto o comprimento destas cadeias têm influência sobre a qualidade.

De acordo com Wootton (1963), a lamela média das células da mucilagem do café é primariamente pectínica e a parede primária contém pectina e celulose. A fração insolúvel é constituída principalmente de substâncias pécticas em próxima associação com outras paredes celulares e materiais intercelulares, incluindo hemiceluloses e fosfo e galactolipídeos. A quebra deste material celular e sua separação do pergaminho são importantes processos bioquímicos na fermentação do café.

O fruto de café maduro contém, especialmente no mesocarpo mucilaginoso, açúcares simples, polissacarídeos, minerais, proteínas e lipídeos, entre outros compostos, constituindo um excelente meio de cultura para o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Amorim, 1968).

2.3 Processamento do café

O processamento do café visa, basicamente, separar os grãos das camadas externas (polpa exterior, pergaminho e película prateada), possibilitando a redução do seu conteúdo de água de 65% para um grau de umidade entre 10 e 12%. Para prevenir fermentações indesejáveis, o processamento deve ser feito imediatamente após a colheita. Os grãos processados podem ser armazenados durante muitos meses sem alteração

significativa do sabor e são chamados de cafés crus (Nascimento et al., 2008).

A demora no processamento do café permite a ocorrência de fermentações indesejáveis, provocando a produção de substâncias químicas, principalmente ácidos, (acético, láctico, butírico e propiônico) que se difundem da mucilagem para a semente, comprometendo sua qualidade (Chalfoun & Carvalho, 2000).

O processamento é uma etapa importante da pós-colheita, fazendo com que ocorra a maior homogeneidade possível dos frutos, evitando possíveis comprometimentos na qualidade da bebida. A escolha do método de processamento dependerá principalmente das condições de capitalização do produtor, da quantidade produzida e do padrão desejado de qualidade (Wintgens, 2004).

A prática comercial do café tem mais de dois séculos de existência e o modelo de processamento agroindustrial que é realizado imediatamente após sua colheita resume-se ainda em dois sistemas: via seca, que produz o café natural, e via úmida, que produz o café descascado, despulpado e desmucilado. No processamento via seca o café é seco com todas as suas partes constituintes (exocarpo – casca; mesocarpo – mucilagem; endocarpo – pergaminho; perisperma – película prateada e endosperma – semente). Já pelo processamento via úmida, i) cereja descascado, a casca e parte da mucilagem dos frutos são retirados mecanicamente e as sementes são secas com o restante da mucilagem e o pergaminho; ii) café despulpado, a casca e a mucilagem dos frutos são retiradas mecanicamente e as sementes são submetidas ao processo de fermentação para a retirada do restante da mucilagem que ficou aderida ao pergaminho; iii) café desmucilado, que é obtido com a retirada total da casca e da mucilagem através de máquinas conhecidas como desmuciladores (Pimenta, 2003).

O método de processamento via úmida surgiu não como uma alternativa para modificar a bebida do café, mas como uma grande necessidade prática à medida que o café arábica, originário de áreas de clima

subtropical não quentes, passou a ser plantado em áreas tropicais. Nestas áreas verificava-se um intenso processo fermentativo dos frutos cerejas imediatamente após a colheita, com reflexos negativos na qualidade do produto final. A maneira mais prática para evitar tais fermentações prejudiciais foi remover o mesocarpo, rico em açúcares, que facilita e promove a fermentação (Brando, 1999).

Atualmente vem crescendo, no Brasil, o número de produtores que estão empregando o processo por via úmida. Este processo favorece a secagem tendo em vista o menor volume processado, o menor tempo de secagem e a redução do consumo de energia (Borém, 2004).

2.3.1 Processamento via seca

O processamento por via seca, também conhecido como método natural, dá origem ao café denominado coco, de terreiro ou natural. É o método mais antigo, simples e requer pouco maquinário. Este método envolve o fruto inteiro e sofre variações dependendo do tamanho da plantação, das condições microclimáticas, das instalações disponíveis e da qualidade final desejada (Carvalho et al., 2000; Silva et al., 2000).

Após a colheita o café deve ser separado das impurezas (paus, pedras, folhas, etc.) e, posteriormente, os frutos são lavados e separados de acordo com sua maturação (cerejas, verdes e bóias), muita das vezes por um separador hidráulico (Carvalho et al., 2000; Silva et al., 2000). Após a separação e lavagem, os frutos passam por um processo de secagem, que pode ser feita ao sol em terreiros. O tempo de secagem pode chegar a quatro semanas para, então, os frutos atingirem aproximadamente 12% de umidade. Para acelerar o tempo de secagem dos grãos, podem ser usados secadores mecânicos após uma pré-secagem ao sol durante alguns dias.

2.3.2 Processamento via úmida

No método de processamento via úmida, os frutos de café cereja são despolidos para remover a casca (exocarpo) e a polpa (mesocarpo exterior) (Figura 1) (Avallone et al., 2002).

O processamento por via úmida inclui as seguintes etapas: i) colheita de grãos cereja (Figura 2A); ii) lavagem e seleção dos grãos flutuantes, que serão processados separadamente (Figura 2B); iii) despoldamento (Figura 2C); iv) fermentação ou uso de enzimas ou substâncias químicas para demucilação (Figura 2D); v) lavagem para remoção da mucilagem; e vi) secagem (Figura 2E).



FIGURA 2 Etapas do processamento do café via úmida
A- Colheita de frutos cerejas; B- Lavagem e seleção dos frutos para processamento; C- Despulpamento dos grãos; D- Tanque de fermentação para remoção da mucilagem; E- Terreiro para secagem dos grãos após a remoção da mucilagem.

O processamento adequado, por via úmida, preserva as qualidades intrínsecas dos grãos, resultando em um produto homogêneo e com poucos defeitos. Consequentemente, o café produzido por este método é considerado de qualidade superior, obtendo melhores preços no mercado. Uma desvantagem deste processamento consiste na utilização de grande quantidade de água, sendo necessários de 3000 a 4000 litros para processar 240 litros quilos de café (ICO, 2008).

O preparo do café por via úmida dá origem aos cafés descascados/lavados e despulpados. Países produtores de cafés de bebida suave, como a Colômbia, o México e o Quênia, são conhecidos produtores de cafés despulpados. O Brasil, embora seja conhecido como produtor de café obtido por via seca, apresenta regiões com boas condições para produção de cafés despulpados, principalmente nas regiões montanhosas, onde predomina o trabalho familiar e há abundância de água (Cortez, 1993).

A fermentação do café é o processo pelo qual o mesocarpo mucilaginoso, aderido ao pergaminho, é degradado por enzimas que ocorrem naturalmente no café cereja e/ou são elaboradas pela microbiota do produto natural. Posteriormente a mucilagem é lavada para ser separada do pergaminho, o qual é submetido à secagem até uma umidade de 10-11%. (Avallone et al., 2002). O tempo de fermentação varia de acordo com a temperatura e a espessura da mucilagem, entre outros fatores. De modo geral, varia entre 15 e 20 horas, podendo diminuir com adição de enzimas digestivas especiais, chegando a reduzir para até 7 horas (Pimenta, 2003). Os grãos obtidos da fermentação, pela perda da mucilagem, tornam-se ásperos ao tato e possuem, aproximadamente, 57% de umidade (Avallone et al., 2001; ICO, 2008).

O café despulpado é um tipo de café especial, apreciado em alguns países do primeiro mundo, que se certificam da qualidade do mesmo para o adquirirem, impondo limites de tolerância cada vez mais restritos. Assim, o café deve ser homogêneo, com características bem definidas de sabor, corpo,

doçura e acidez, entre outras, e principalmente deve ser seguro em relação ao seu consumo (Nascimento et al., 2008).

De acordo com Bártholo & Guimarães (1997), entre as vantagens do café despulpado podem ser citadas a diminuição da área necessária para a secagem, a redução do volume em 60% e a redução do tempo da secagem, não só por ser um café uniforme, mas também por apresentar um teor de umidade mais baixo, aproximadamente 50%. Entretanto, a exigência de um desmucilador na obtenção de cafés despulpados onera o processo e muitos produtores produzem cafés descascados, nos quais o grão, com a mucilagem, são levados para o terreiro para a secagem.

2.4 Microbiota presente no processamento de café

A biodiversidade microbiana presente nos frutos e grãos de café depende de fatores ambientais da região de cultivo como umidade, temperatura e população do solo, além da variedade do café cultivado e do tipo de processamento. O café despulpado e o café natural estão expostos a uma diversidade de microrganismos, tais como leveduras, fungos filamentosos e bactérias que, encontrando condições favoráveis para se desenvolver, infectam os frutos e os grãos de café (Silva et al., 2003). Alguns microrganismos são relatados como de importância na fermentação do café, como os gêneros *Bacillus*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Arunga, 1982).

2.4.1 Bactérias

A presença de bactérias na fermentação do café natural, principalmente bactérias lácticas do gênero *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, foi observada por Perderon & Breed (1946). Trabalhando com cafés naturais cereja no Brasil, Vaughan et al. (1958) isolaram bactérias coliformes de semelhantes espécies do gênero *Aerobacter* e *Escherichia*, visto que o número destes microrganismos aumentou significativamente durante a fermentação de uma população inicial de $10^2 - 10^3$ cel/g para 10^9 cel/g após

24 horas de fermentação. Espécies pectinolíticas do gênero *Bacillus* também foram isoladas durante a fermentação do café. Embora bactérias do gênero *Leuconostoc* e *Streptococcus* tenham sido isoladas do café natural fermentado, não foi demonstrada a capacidade desses microrganismos para degradar enzimas pécticas (Van Pee & Castelein, 1972).

Trabalhando com cafés processados por via seca nos quatro estádios de maturação, Silva et al. (2000) verificaram que dos 254 isolados bacterianos em estudo, 113 foram Gram negativos (44,5%), com maior incidência de *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, 23 são Gram positivos esporulados (9%) e 118, Gram positivos não esporulantes (46,5%). Espécies de *Bacillus* como *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. macerans*, *B. polymyxa* e *B. megaterium* corresponderam à maioria das espécies de bactérias isoladas durante a fermentação de cafés naturais (Silva et al., 2008b).

Avallone et al. (2001) isolaram espécies bacterianas durante a fermentação de café processado via úmida e verificaram a ocorrência de espécies como *Klebsiella ozaenae*, *Erwinia herbicola*, *Leuconostoc mesenterioides* e *Lactobacillus brevis*.

2.4.2 Fungos leveduriformes

Agate & Bhat (1966) isolaram leveduras produtoras de pectinases durante a fermentação de café processado via úmida e verificaram a presença de espécies como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* sp., *Saccharomyces marxianus* (*Kluyveromyces marxianus*), *S. bayanus*, *S. cerevisiae*. Eles atribuíram a ação das pectinases sobre a pectina da mucilagem do café à atividade microbiana leveduriforme.

Van Pee & Castelein (1972) identificaram leveduras do gênero *Candida*, sendo *C. guilliermondii* na superfície e mucilagem dos grãos; *C. parapsilopsis*, *S. cerevisiae*, *Torulopsis famata*, *S. marxianus*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *C. pelliculosa* na superfície dos grãos.

Silva et al. (2000) identificaram 24 espécies de leveduras epifíticas de frutos de café processados via seca. Os gêneros *Pichia*, *Candida* e *Arxula* foram os mais encontrados, com tendência a aparecer em frutos secos e fermentados. Silva et al. (2008b), em estudo sobre a sucessão de microrganismos durante a fermentação de cafés naturais, verificaram a ocorrência de diferentes espécies de leveduras, como *Candida saitoana*, *C. fermentati*, *Debaromyces polymorfus*, *P. guilliermondii*, *C. membranifaciens*, *D. hansenii*, *P. anomala*, *Arxula adenivorans* e *Saccharomyces cerevisiae*, entre outras.

Avallone et al. (2001) verificaram que as leveduras isoladas durante a fermentação do café foram variadas e consistiam em espécies conhecidas de plantas, como *Kloeckera apiculata*, *Candida guilliermondii* e *Cryptococcus albidus*. Masoud et al. (2004) verificaram, em isolamento de cafés processados via úmida, que a maior incidência de isolados leveduriformes foi das espécies *Pichia anomala*, *P. kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* durante o processo.

2.4.3 Fungos filamentosos

O grupo de microrganismos encontrado em café mais citado na literatura é o de fungos filamentosos. Os principais gêneros já relatados isolados de grãos de café nos diferentes estádios de maturação, processamento e beneficiamento são: *Alternaria* (Mislivec et al., 1983), *Apergillus* (Amorim & Mello, 1991; Silva et al., 2000, 2008b; Batista et al., 2003, 2008), *Cladosporium* (Bitancourt et al., 1957; Silva et al., 2000, 2008a; Batista et al., 2003, 2008), *Fusarium* (Amorim & Mello, 1991; Hernández et al., 1995; Silva et al., 2000, 2008b; Batista et al., 2003, 2008), *Penicillium* (Hernández et al., 1995; Silva et al., 2000, 2008a; Batista et al., 2003, 2008).

Bitancourt (1957), visando determinar os microrganismos que constituem a microbiota do café cereja em diferentes fases do preparo, no cafezal e no terreiro de secagem, isolou e observou que os fungos mais

abundantes foram *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* spp. Também foram identificados *Aspergillus niger* v. Tieghno no café seco em terreiro; *Cladosporium* sp., que se desenvolve ainda no pé e não no terreiro, durante a secagem, como normalmente ocorre com outros fungos; *Rhizopus nigricans* Ehr.; *Rhizopus* sp.; *Phomopsis* sp. e *Epicoccum* sp.

Enzimas fúngicas são conhecidas por acelerar a quebra da mucilagem. Espécies pectinolíticas *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* foram isoladas do café brasileiro despulpado (Vaughn et al., 1958).

Um estudo da microflora em 80 amostras de café beneficiado, proveniente de São Sebastião do Paraíso – MG, resultou em amostras classificadas como bebida mole e dura, apresentando índices de infecção pelos fungos *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus*, acentuadamente menores que nos cafés classificados como bebida rio e riada. Por outro lado, apresentaram índices igualmente elevados dos fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium* spp. O fungo do gênero *Cladosporium* predominou nos cafés classificados como de bebida mole e dura (Carvalho et al., 1989).

Fungos do gênero *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium* representaram três terços do total de isolados encontrados em isolamento de cafés naturais em todas as localidades estudadas e só 3% dos isolados pertenceram ao gênero *Aspergillus* (Silva et al., 2000). Silva et al. (2008a), estudando a incidência de fungos filamentosos em processamento de cafés naturais, verificou que o gênero *Aspergillus* foi o de maior incidência, seguido pelos gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*.

Alguns trabalhos visam a detecção de micotoxinas em grãos beneficiados de café e relataram as espécies de fungos filamentosos que provavelmente estão relacionadas com a produção de substâncias toxigênicas. Batista et al. (2008) observaram a ocorrência de espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A em cafés processados via seca e úmida, principalmente *A.ochraceus*.

2.5 Estudo da diversidade microbiana através da Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA)

A maioria dos estudos da microbiota de café encontrados na literatura foi realizada utilizando métodos de identificação convencional. Atualmente, para estudo de diversidade microbiana, várias técnicas moleculares têm sido empregadas para auxiliar na identificação de microrganismos com maior rapidez e segurança. A técnica conhecida como ARDRA explora o uso de oligonucleotídeos iniciadores universais para amplificar as seqüências dos rDNAs de microrganismos, seguida pela digestão com enzimas de corte freqüente para determinar a diversidade e para identificar/classificar os isolados até gênero e, algumas vezes, até a espécie. A técnica ARDRA utiliza as características do RNA ribossômico e tem como base padrões de restrição enzimática, valendo-se de enzimas selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do rRNA, que reflete padrões filogenéticos. O ARDRA é bastante útil para uma rápida análise da diversidade genética. No entanto, recomenda-se cuidado na escolha do fragmento de rDNA a ser amplificado e analisado por esse método. No caso da análise da microdiversidade, que apresenta grupos de indivíduos com elevada afinidade genética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico do rDNA 16S-23S. Essa região intergênica apresenta maior variabilidade não só na sua composição de bases, mas também no seu tamanho ao ser comparada às regiões gênicas 16S ou 23S. Quando o estudo em questão tratar da diversidade entre isolados distantes filogeneticamente, os fragmentos amplificados podem ser do rDNA 16S ou 23S. Esses genes geram padrões de bandejamento mais simples, dependendo das enzimas de restrição utilizadas (Reis Júnior et al., 2004).

A técnica de ARDRA vem sendo empregada em diversos trabalhos com diferentes propósitos, como para determinar alterações nas estruturas de comunidades de bactérias de solos contaminados com cobre (Smit, 1997) e para análise de bibliotecas de clones de rDNA para a estimativa da

diversidade. Além disso, essa técnica tem sido usada na caracterização de isolados de microrganismos, já que cada espécie apresenta um padrão de restrição típico. Jeyaram et al. (2008) utilizaram ARDRA com o intuito de agrupar filogeneticamente isolados bacterianos obtidos a partir de um alimento fermentado tradicional da Índia e Bockelmann et al. (2008) também utilizaram essa técnica para classificar espécies de leveduras do setor de laticínios. ARDRA também foi utilizada para caracterizar espécies de leveduras não-*Saccharomyces* originárias de vinho com o intuito de construir um protocolo de rápida identificação dessas espécies durante a fermentação do vinho (Capece et al., 2003).

2.6 Avaliação de comunidades microbianas por Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Estudos em comunidades microbianas originam questões sobre sua composição, estrutura e estabilidade e sobre a atividade e função de seus membros individuais. Técnicas microbiológicas tradicionais e microscopia convencional são meios insuficientes para responder a essas questões (Rosado et al., 1997). A maioria das bactérias presentes em amostras ambientais não pode ser detectada através de microscopia convencional, já que elas ficam aderidas a partículas de solo e sedimento. Experimentos fisiológicos têm sido usados com grande sucesso na caracterização de espécies isoladas; entretanto sabe-se, hoje, que apenas uma pequena fração de microrganismos presentes no ambiente pode ser isolada e caracterizada. Como alternativa às exaustivas estratégias de clonagem, podem-se utilizar experimentos de *fingerprinting* de comunidades microbianas através, por exemplo, do uso da técnica de DGGE de fragmentos amplificados por PCR (Rosado et al., 1997).

Nesta técnica, fragmentos de DNA de mesmo tamanho e seqüências nucleotídicas diferentes podem ser separados em géis de poliacrilamida por agentes desnaturantes como uréia e formamida. Essa separação se baseia no princípio físico de que a mobilidade eletroforética do DNA em um gel de

poliacrilamida é sensível à estrutura secundária da molécula com respeito à sua conformação (helicoidal e parcialmente desnaturada). As bandas do DNA podem ser visualizadas após coloração com brometo de etídio, com o corante Syber Green I ou pela prata (Rosado et al., 1997).

A princípio, a técnica de DGGE foi introduzida em ecologia microbiana molecular para determinar a diversidade genética de misturas complexas de comunidades microbianas. Entretanto, atualmente essa técnica pode ser usada com os mais variados propósitos, como, por exemplo, no estudo da estrutura de comunidades microbianas no ambiente, no monitoramento de mudanças ocorridas nessas comunidades em um intervalo de tempo após a introdução de um agente causador de estresse, como produtos químicos, pesticidas e poluentes, no estudo da diversidade de genes funcionais e na análise de comunidades de outros microrganismos (Muyzer et al., 1993; Ferris et al., 1997; Akkermans et al., 1995; Rosado et al., 1998).

Nos últimos anos, esta técnica vem sendo empregada para conhecer os microrganismos em diferentes comunidades, bem como para monitorar a dinâmica da população em uma comunidade. A primeira aplicação de PCR-DGGE em microbiologia de alimentos foi em 1999, quando Ampe et al. (1999) estudaram a distribuição de microrganismos em uma massa de milho mexicana fermentada. Desde então, a comunidade microbiana presente em outros alimentos ou produtos tem sido analisada por DGGE, incluindo queijos (Randazzo et al., 2002; Ercolini et al., 2003), salsichas italianas (Cocolin et al., 2001), fermentação de mandioca (Miambi et al., 2003), vinho (Lopez et al., 2003), fermentação de café via úmida (Masoud et al., 2004), salame (Aquilanti et al., 2007), carne (Ercolini et al., 2006) e fermentação de cacau (Nielsen et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de café

Foi coletado, em uma fazenda localizada no Sul de Minas Gerais, um lote de café arábica variedade Bourbon no estágio cereja de maturação, correspondente a uma saca de sessenta litros. Os grãos foram processados por via úmida para obtenção de cafés despulpados. As amostras foram coletadas de um lote de frutos cereja antes do processo de despulpamento, imediatamente após o despulpamento, durante a fermentação e durante a secagem em terreiro, colocadas assepticamente em sacos plásticos estéreis e transferidas em caixas térmicas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras para análises imediatas e cultivo de microrganismos. Para extração de DNA para análises de DGGE, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

3.2 Isolamento dos microrganismos

Os frutos pertencentes a cada amostra foram escolhidos aleatoriamente, em um número de vinte grãos, e então colocados assepticamente em sacos plásticos contendo 180 ml de água peptonada estéril (1% de peptona), nos quais foram agitados por 5 minutos a velocidade média em Stomacher®. A partir do extrato obtido foram realizadas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-4} .

Para a determinação da contagem total de bactérias totais presentes nas amostras, foi tomada uma alíquota de 0,1 ml de cada diluição, em triplicata, a qual foi plaqueada em meio Agar Nutriente (0,3% extrato de carne, 0,5% peptona, 1,5% ágar e 0,1% nistatina) pelo método de espalhamento em superfície, sendo o meio MRS (1% peptona, 1% extrato de carne, 0,5% extrato de levedura, 2% glicose, 0,1% tween 80, 0,2% fosfato de potássio dibásico, 0,5% acetato de sódio, 0,2% citrato de amônio, 0,005% sulfato de magnésio-7H₂O, 0,005% sulfato de manganês-7 H₂O, 1,5% ágar e

0,1% nistatina) foi utilizado para contagem de bactérias lácticas. Para avaliar o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, os meios utilizados foram DG18 (0,8% glicose, 0,4% peptona, 0,08% fosfato de potássio dibásico, 0,04% sulfato de magnésio-7 H₂O, 17,6% glicerol, 1,5% ágar e 0,01% cloranfenicol) e MEA (2% extrato de malte, 0,1% peptona, 2% glicose, 1,5% ágar e 0,01% cloranfenicol). As placas foram incubadas a 28°C e avaliadas após 24 e 48 hs para bactérias e leveduras e 7 dias para fungos filamentosos.

A partir da contagem total foi selecionada, para análise da morfologia de colônia, uma placa de cada meio e diluição cuja contagem estivesse entre 30 e 300 colônias. O número de isolados selecionados para identificação foi determinado pela raiz quadrada do número total de isolados contados, conforme mencionado em Bacteriological Manual for Foods (Food Drugs Administration - FDA, 1972). A análise de morfologia de colônia incluiu a observação dos seguintes atributos: tamanho da colônia (análise comparativa com outras colônias presentes naquele meio), forma, elevação, cor, textura e bordo.

A preservação dos isolados bacterianos e leveduriformes foi feita em criotubos contendo os meios de origem líquidos acrescidos de glicerol, para uma concentração final de 20%. A preservação dos isolados de fungos filamentosos foi feita nos meios SNA (1g de KH₂PO₄, 1g de KNO₃, 0,5g de MgSO₄.7H₂O, 0,5g de KCl, 0,5g de glicose, 0,5g de sacarose, 18g de ágar e 1000 mL de água destilada) ou MEA, dependendo do gênero do fungo.

3.3 Identificação das espécies microbianas

3.3.1 Identificação de bactérias

Os isolados bacterianos purificados foram transferidos para placas contendo meio AN ou MEA e incubados a 28°C por 24 h. Após a incubação, os isolados foram submetidos a testes de coloração diferencial de Gram a fim de separá-los nos dois grupos (Gram positivos e Gram negativos) e analisados em microscópio ótico quanto à forma e ao arranjo das células.

Os isolados de bactérias Gram positivas foram submetidos a um tratamento térmico (80°C por 10 minutos) a fim de avaliar a capacidade de produção de esporos dos isolados. Através da observação microscópica de lâminas dos isolados, os mesmos foram separados em bactérias formadoras e não formadoras de esporos. Os isolados também foram submetidos a testes de catalase, motilidade e esporulação, de acordo com as recomendações propostas em “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Holt et al., 1994).

Os isolados foram agrupados para realização de testes moleculares, de acordo com os resultados dos testes realizados.

3.3.1.1 Análise dos isolados bacterianos pela técnica ARDRA da região intergênica 16S- 23S do rDNA

A análise dos isolados bacterianos pela técnica ARDRA foi executada conforme descrito por Jeyaram et al. (2008) com algumas modificações. Colônias de bactérias foram retiradas da superfície de meio sólido (AN ou MRS) e o seu DNA, extraído de acordo com os mesmos autores, com algumas modificações.

Para amplificação do DNA foi utilizado um volume de 25 µl, contendo 5µl do tampão Master Mix 5X, 0,2 µl de Taq polimerase 5U.µl⁻¹, 0,25µl dNTP 10mM, 0,1µl de cada primer Set II 100pmol (Tabela 2) 0,3 µl MgCl₂ 25mM e 19,15 µl de água miliQ estéril. O termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) obedeceu ao seguinte programa: Desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 etapas de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos primers a 58°C por 1 minuto e extensão da fita de DNA a 72°C por 2 minutos; Extensão final a 72°C por 7 minutos e 4°C como temperatura de armazenamento. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1% (condições de corrida: 60V por 50 minutos) e visualizados utilizando Syber Green em Transluminador.

Para análise de restrição, um volume de 30 µl contendo 3 µl de tampão de incubação (MultiCore 10X Promega), 0,5 µl de cada enzima de

restrição $5U.\mu l^{-1}$, 15 μl do produto do PCR não purificado e 11 μl de água miliQ estéril foi incubado a 37°C por 16hs. As enzimas de restrição Hae III, e Hind III (Promega ou Fermentas) foram usadas de acordo com instrução do fabricante. Para análise dos padrões dos fragmentos de restrição foi utilizado gel de agarose a 2% (condições de corrida: 80V por 150 min). O tamanho molecular dos produtos de digestão foi determinado através da utilização do marcador GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (100-3000 bp, Fermentas).

TABELA 2 Primers utilizados nas metodologias moleculares para identificação da microbiota

Primer	Região de amplificação	Nome do primer	Sequência do primer	Referência
Set II	16S–23S rDNA spacer	16SF-R2	5'-CGCGGGATCCTTGTAC ACACCGCCCGTC-3'	Lechner (1998)
		16S rDNA gene 9-25	5'-GGCCGTCGACCCTTTC CCTCACGGTACTG-3'	
ITS	ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3'	Masoud et al. (2004)
		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'	
16S rRNA	16S rRNA gene V3 region	338F	5'-ACGGGGGGACTCCTACGG GAGGCAGCAG-3'	Ovreas et al. (1997)
18S rRNA	18S rRNA spacer	518E	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	Haruta et al. (2006)
		YM951r NS3	5'-TTGGCAAATGCTTTCGC-3' 5'- GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC- 3'	

3.3.1.2 Sequenciamento da região intergênica 16S- 23S do rDNA para identificação dos isolados bacterianos

A reação de PCR de 100 µl foi realizada contendo 20µl do tampão Master Mix 5X, 0,8 µl de Taq polimerase 5U.µl⁻¹, 1µl dNTP 10mM, 0,4µl de cada primer Set II 100pmol, 1,2 µl MgCl₂ 25mM e 76,2 µl de água miliQ estéril. O termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) seguiu o mesmo programa utilizado no item anterior. Os produtos de PCR não purificados foram sequenciados pela Macrogen (Seul Korea) e as sequências obtidas foram alinhadas com o banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST (National Centre for Biotechnology Information, Maryland, USA).

3.3.2 Identificação de leveduras

Os isolados de leveduras foram agrupados com base em testes bioquímicos propostos por Barnett et al. (2000) para posterior identificação das espécies.

As colônias de leveduras crescidas em meio DG18 ou MEA por 24 h a 28°C foram transferidas para tubos “eppendorf” contendo 2mL de água destilada estéril para que houvesse o esgotamento das reservas energéticas das células. Após 24 h, 300 µl destas suspensões foram transferidas para tubos de ensaio contendo um tubo de Durham invertido para serem realizados testes de fermentação em meios líquidos (0,75% peptona de soja, 0,5% extrato de levedura e 0,04% azul de bromotimol) contendo diferentes fontes de carbono (0,5M): glicose, galactose, sacarose, maltose, metilαD-glucoside, rafinose, melibiose, celobiose e xilose.

As leituras dos testes de fermentação de carboidratos foram realizadas após 12, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 7 dias, 14 dias e 21 dias de incubação. Avaliou-se, nos testes de fermentação de carboidratos, a produção de ácido e CO₂ (através do deslocamento do meio líquido nos tubos de Duhran).

3.3.2.1 Análise dos isolados leveduriformes pela técnica ARDRA da região intergênica ITS1-5.8S do rDNA

A análise dos isolados leveduriformes pela técnica ARDRA foi executada conforme descrito por Bockelmann et al. (2008) com algumas modificações. Colônias de leveduras foram retiradas da superfície de meio sólido (DG 18 ou MEA), suspensas em tampão de PCR e aquecidas a 85°C por 15 minutos em termociclador.

A suspensão obtida foi utilizada para a reação de PCR. Para amplificação do DNA foi utilizado um volume de 25 µl, contendo 5µl do tampão Master Mix 5X, 0,2 µl de Taq polimerase 5U.µl⁻¹, 1µl dNTP 10mM, 0,5µl de cada primer ITS 100pmol (Tabela 2) 0,5 µl MgCl₂ 25mM e 15,3 µl de água miliQ estéril. O termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) obedeceu ao seguinte programa: Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 30 etapas de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos primers a 52°C por 30 segundos e extensão da fita de DNA a 72°C por 1 minuto; Extensão final a 72°C por 10 minutos e 4°C como temperatura de armazenamento. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1% (condições de corrida: 60V por 50 minutos) e visualizados utilizando Syber Green em Transluminador.

Para análise de restrição, um volume de 30 µl contendo 13 µl de tampão de incubação, 0,5 µl de cada enzima de restrição e 15 µl do produto do PCR não purificado foi incubado a 37°C por 3h. Enzimas de restrição Hae III, HinfI, Hind III e MspI 5U.µl⁻¹ (Promega ou Fermentas) foram usadas de acordo com instrução do fabricante. Para análise dos padrões de fragmentos de restrição gel de agarose a 2% foi usado (condições de corrida: 90V por 150 min). O tamanho molecular dos produtos de digestão foi determinado através da utilização do marcador GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (100-3000 bp, Fermentas).

3.3.2.2 Sequenciamento da região ITS1-5.8S rDNA para identificação dos isolados leveduriformes

A reação de PCR de 100 µl foi realizada contendo 20µl do tampão Master Mix 5X, 0,8 µl de Taq polimerase 5U.µl⁻¹, 4µl dNTP 10mM, 2µl de cada primer ITS 100pmol, 2 µl MgCl₂ 25mM e 71,2 µl de água miliQ estéril. O termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) seguiu o mesmo programa utilizado no item anterior. Os produtos de PCR não purificados foram sequenciados pela Macrogen e as sequências obtidas foram alinhadas com o banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST (National Centre for Biotechnology Information, Maryland, USA).

3.3.3 Identificação de fungos filamentosos

Para a identificação dos fungos filamentosos foram analisadas características macro e microscópicas das colônias segundo Booth (1971), Nelson et al. (1983), Barnett & Hunter (1987), Klich (1993), Pitt & Hocking (1997), Pitt (2000) e Samson (2004).

3.3.3.1 Identificação de gêneros

Para a identificação dos gêneros foram feitas lâminas a fresco com o corante azul de metileno (20 mL de ácido láctico, 40mL de glicerina, 20 mL de água e 0,05g de azul de Trypan ou azul de metileno) e observadas as estruturas reprodutivas dos isolados em microscopia óptica. A partir da identificação dos respectivos gêneros procedeu-se a inoculação em meios de cultura e temperatura padronizados.

3.3.3.2 Identificação das espécies

A partir da identificação do gênero, cada isolado foi transferido para os seguintes meios de cultivo padronizados MEA; CYA (Czapek Yeast Agar- 1% de concentrado Czapek, 0,1% de solução metálica de Czapek, 1g de K₂HPO₄, 5g de extrato de levedura, 30g de sacarose, 20g de ágar e 1000 mL com água destilada; CSN (10 mL do concentrado CS, 10g de sacarose,

5g de creatina, 1g de KH₂PO₄, 0,05g de púrpura bromocresol, 15g de ágar e 990 mL de água destilada); OA (30g de cat flaker, 15g de ágar e 1000 mL de água destilada); SNA e incubado a 28°C por 7 a 10 dias, visando à identificação da espécie, como representa a Tabela 3.

TABELA 3 Meios de cultura e temperaturas de crescimento para identificação das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium*.

Gênero	Meios de cultura/Temperatura de incubação				Referências
<i>Aspergillus</i>	MEA/25°C	CYA/25°C	CYA/37°C		Klich (1993)
<i>Penicillium</i>	MEA/28°C	CYA/28°C	CYA/37°C	CSN/28°C	Pitt (2000)
<i>Cladosporium</i>	MEA/20°C				Samson (2004)
<i>Fusarium</i>	OA/28°C	SNA/28°C			Nelson et al. (1983)

Para a identificação das espécies dos isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* foram avaliadas algumas características macroscópicas, como cor da colônia, micélio, exsudato, cor do reverso, diâmetro, pigmentação solúvel e cleistotécio/escleródios e algumas características microscópicas, como tipo de ramificação, comprimento, largura e textura dos conidióforos, comprimento e textura da ramificação, das métalas e fiálides, diâmetro, forma e textura dos conídeos, diâmetro, forma e cor do cleistotécio/escleródios.

Para a identificação das espécies de *Fusarium* foram observadas formação de macro e microconídeos e presença de micélio aéreo, polifiálides ou monofiálides e esporodóquios. Todas as placas foram incubadas por 7 a 10 dias, a 28°C, e foi realizada a identificação das espécies, seguindo a chave de identificação para fungos filamentosos com base em suas características macro e microscópicas.

3.4 Avaliação dos microrganismos presentes nas amostras por DGGE

As amostras de café (frutos cereja, café despolpado, durante a fermentação e durante a secagem) foram submetidas à análise de DGGE com a finalidade de avaliar a diversidade microbiana presente nas mesmas.

3.4.1 Extração do DNA microbiano das amostras

A extração de DNA das amostras foi feita com base no método convencional de extração total direta segundo Ampe et al. (1999), com algumas modificações. As amostras foram centrifugadas (13000 rpm por 4 minutos) e o pellet, suspenso em TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8). As seguintes etapas foram seguidas: adição de 500 µl de tampão STES (0,2M Tris HCl pH 7,6; 0,5M NaCl; 0,1% SDS e 0,01M EDTA); lise física com esferas de vidro por agitação em aparelho vórtex das células presentes nas amostras; lise química adicionando-se 20 µl lisozima (20 µg/µl) e incubação a 37°C por 30 minutos; adição de 10 µl de proteinase K (10 mg/mL) e incubação a temperatura ambiente por 30 minutos; adição de 50 µl de acetato de sódio 3M, misturando suavemente por 5 minutos no gelo; purificação do extrato utilizando 500 µl de fenol:clorofórmio (1:1) no gelo; centrifugação 13000 rpm por 10 minutos; recolhimento da fase mais clara e precipitação do DNA adicionando-se o dobro do volume de etanol; deixou-se overnight a -20°C; centrifugou-se por 20 minutos a 13000 rpm; retirou-se o etanol e lavou-se o DNA com 50 µl de etanol 70% ; centrifugou-se por 10 minutos a 13000 rpm; deixou-se o DNA secar a temperatura ambiente e fez-se a sua ressuspensão em 30 µl de TE.

3.4.2 Amplificação por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)

3.4.2.1 Bactérias

As amostras, após serem purificadas, foram submetidas à reação de polimerase em cadeia e verificadas em gel de agarose 1%. As reações para amplificação da comunidade bacteriana utilizaram primers universais rRNA

16S seguindo o protocolo estabelecido por (Ovreas et al., 1997), como já descrito (Ampe et al., 1999).

A reação de PCR tinha um volume final de reação de 50 µl que continha: 34,3 µl de água MilliQ estéril, 10 µl de Tampão Master Mix 5X (Promega), 1 µl de dNTP's, 1 µl de cada primer rRNA 16S (Tabela 2), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,5 µl de MgCl₂ e 2 µl de DNA.

O termociclador obedeceu ao seguinte programa: Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 etapas de desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento dos primers a 55°C por 1 minuto e extensão da fita de DNA a 72°C por 1 minuto; Extensão final a 72°C por 7 minutos e 4°C como temperatura de armazenamento.

3.4.2.2 Fungos leveduriformes e filamentosos

As amostras, após serem purificadas, foram submetidas à reação de polimerase em cadeia e verificadas em gel de agarose 1%. As reações para amplificação da comunidade leveduriforme utilizaram primers da região rRNA 18 S seguindo o protocolo estabelecido por Masoud et al. (2004).

A reação de PCR continha: 34,3 µl de água MilliQ estéril, 10 µl de Tampão Master Mix 5X (Promega), 1 µl de dNTP's, 1 µl de cada primer 18S rRNA (Tabela 2), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,5 µl de MgCl₂ e 2 µl de DNA, totalizando 50 µl de volume final da reação.

O termociclador obedeceu ao seguinte programa: Desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 s, anelamento dos primers a 55°C por 60 s e a extensão da fita de DNA a 72°C por 60 s; Extensão final a 72°C por 7 min e 4°C como temperatura de armazenamento.

3.4.3 Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE baseia-se no decréscimo da mobilidade eletroforética de moléculas de DNA parcialmente desnaturadas em géis de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante (uma mistura de uréia e

formamida). São moléculas de diferentes sequências, por apresentarem comportamentos de desnaturação diferentes, e, portanto, interromperem sua migração no gel em diferentes posições, formando bandas (Muyzer & Smalla, 1999).

3.4.3.1 Bactérias

Os produtos do PCR foram analisados por DGGE, utilizando um sistema vertical DCode (Bio-Rad) seguindo os procedimentos já descritos por Muyzer et al. (1993). Os produtos de PCR foram aplicados na quantidade de 20 µl e a eles foram adicionados 20 µl de corante (2% de azul de bromofenol, 2% de xileno cianol, glicerol 100% e água MilliQ) em gel de poliacrilamida 8% (m/v) em tampão 0,5X TAE com gradiente de desnaturação variando de 15 a 55% (100% correspondeu a 7 M de uréia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em uma voltagem constante de 70 V por 4 h, com uma temperatura constante de 60°C. Após a eletroforese, os géis foram corados com SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000 (v/v)), Metanol (1:1) e Ácido acético (1:1). A imagem foi capturada, visualizada e fotografada em Transluminador.

3.4.3.2 Fungos leveduriformes e filamentosos

Os produtos do PCR foram, então, analisados por DGGE, utilizando um sistema vertical DCode (Bio-Rad) seguindo os procedimentos já descritos por Masoud et al. (2004) com algumas modificações. Os produtos de PCR foram aplicados na quantidade de 20 µl e a eles foram adicionados 20 µl de corante (2% de azul de bromofenol, 2% de xileno cianol, glicerol 100% e água MilliQ) em gel de poliacrilamida 8% (m/v) em tampão 0,5X TAE com gradiente de desnaturação variando de 40 a 60% (100% correspondeu a 7 M de uréia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em uma voltagem constante de 70 V por 16 h, com uma temperatura constante de 60°C. Após a eletroforese, os géis foram corados com SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000 (v/v)), Metanol (1:1) e

Ácido acético (1:1). A imagem foi capturada, visualizada e fotografada em Transluminador.

3.4.3.3 Análise por sequenciamento das bandas de DGGE

As bandas selecionadas foram excisadas dos géis de DGGE com uma lâmina estéril e o DNA foi eluído através do Kit de extração QIAEX III, segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. O DNA foi reamplificado usando a mesma reação de PCR descrita para a realização do DGGE das amostras. Os produtos de PCR não purificados foram sequenciados pela Macrogen e as sequências obtidas foram alinhadas com o banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST (National Centre for Biotechnology Information, Maryland, USA).

3.5 Análises físico-químicas das amostras de café

Uma amostra de café após 216 h de secagem (11% de umidade no terreiro) foi submetida às seguintes análises físico-químicas: Umidade (Instituto Adolpho Lutz, 1985); Acidez (Association of Official analytical chemists - AOAC, 1990); Polifenoloxidasas (Ponting & Josling, 1948); Compostos fenólicos (AOAC, 1990); Açúcares redutores e totais (AOAC, 1990); Sacarose (Southgate, 1991); Pectina solúvel, total e solubilização (Bitter & Muir, 1962) e FDA, Lignina e celulose (Van Soest, 1967 apud Silva, 1998). As análises foram realizadas no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem de microrganismos

Amostras de café processado via úmida foram coletadas em uma fazenda em Lavras, de um lote de frutos cereja antes do processo de despulpamento, imediatamente após o despulpamento, durante a fermentação e durante a secagem em terreiro. As populações microbianas nas diferentes amostras estão representadas na Tabela 4. Um total de 286 isolados de bactérias, 382 isolados de leveduras e 60 isolados de fungos filamentosos foi obtido das amostras coletadas.

TABELA 4 Bactérias, leveduras e fungos filamentosos isolados de amostras coletadas durante o processamento e secagem de café despulpado.

População de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (UFC/g)			
Estágios de processamento do café	Bactérias	Leveduras	Fungos Filamentosos
Frutos recém-colhidos	$4,2 \times 10^5$	$8,5 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$
Frutos lavados	$4,7 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$
Frutos despulpados	7×10^3	$2,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
Casca e polpa	$2,4 \times 10^5$	1×10^5	$5,5 \times 10^3$
24 h de fermentação/secagem	1×10^7	$3,3 \times 10^5$	1×10^2
48 h de fermentação/secagem	$4,7 \times 10^6$	8×10^5	5×10^2
72 h de fermentação/secagem	5×10^5	$5,5 \times 10^5$	5×10^2
96 h de fermentação/secagem	$1,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	5×10^2
120 h de fermentação/secagem	$4,5 \times 10^5$	6×10^6	— ¹
144 h de fermentação/secagem	$2,7 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	— ¹
168 h de fermentação/secagem	$1,8 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	— ¹
192 h de fermentação/secagem	7×10^5	$7,5 \times 10^6$	— ¹
216 h de fermentação/secagem	$1,5 \times 10^4$	7×10^6	— ¹

¹ Populações inferiores a 10 UFC/g

As contagens de bactérias variaram de $4,7 \times 10^3$ a 1×10^7 UFC/g, com aumento durante as primeiras 24 h de fermentação/secagem. A população de bactérias foi superior à de leveduras em quase todas as amostras. Maior frequência de bactérias durante os primeiros dias de fermentação em cafés naturais também foi observada por Silva et al. (2008b), sendo a atividade de água (superior a 0,8) um fator relacionado a essa alta frequência. As contagens de leveduras foram de $2,3 \times 10^3$ a $7,5 \times 10^6$ UFC/g, sendo as maiores populações detectadas com 120, 192 e 216 h da fermentação/secagem. Aumento da contagem de leveduras durante a fermentação/secagem de *Coffea arabica* também foi encontrado por Silva et al. (2000) no Brasil, em cafés processados via seca, e por Masoud et al. (2004) na Tanzânia, em cafés processados via úmida.

A população de fungos filamentosos foi de $5,5 \times 10^3$ a 1×10^2 UFC/g até 96 h e inferior a 10 UFC/g no final do processo. Esses resultados foram contrários aos obtidos em estudo sobre a incidência e distribuição de fungos filamentosos durante a fermentação, secagem e estocagem de café natural em Lavras-MG, onde se verificou aumento da população, no decorrer da secagem dos grãos, da ordem de 10^3 UFC/g a 10^5 UFC/g (Silva et al., 2008b). Esta diferença nos resultados relatados neste trabalho e por Silva et al. (2008b) foi devida ao tipo de processamento do café. Com isto, pode-se inferir que café processado por via úmida apresenta condições menos favoráveis para o desenvolvimento de fungos filamentosos quando comparado ao processamento natural. Entretanto, outros fatores como ambiente de secagem, tipo e tamanho do terreiro e quantidade de café para secagem podem interferir nas populações dos diferentes grupos de microrganismos.

4.2 Identificação das bactérias isoladas por análise de 16S- 23S rDNA - ARDRA e sequenciamento

Os 286 isolados bacterianos foram submetidos a testes de coloração diferencial de Gram, análise microscópica, testes de catalase, motilidade e

esporulação. De acordo com os resultados desses testes, os isolados foram agrupados para identificação das espécies por ARDRA e sequenciamento da região 16S- 23S rDNA (Tabela 5). Foram obtidos 16 padrões de fragmentos de restrição distintos (Figura 3) correspondentes a 16 espécies distintas.

TABELA 5 Agrupamento dos isolados bacterianos de acordo com testes preliminares realizados (Gram, arranjo e forma das células, catalase, motilidade e esporulação)

Características do grupo	Número de isolados
Gram negativo	72
Gram positivo, Bastonete, esporulação positiva	99
Gram positivo, Bastonete, esporulação negativa, catalase e motilidade positivas	45
Gram positivo, Bastonete, esporulação negativa, catalase e motilidade negativas	32
Gram positivo, Cocos, catalase positiva e motilidade negativa	28
Gram positivo, Cocos, catalase negativa e motilidade negativa	10
TOTAL	286

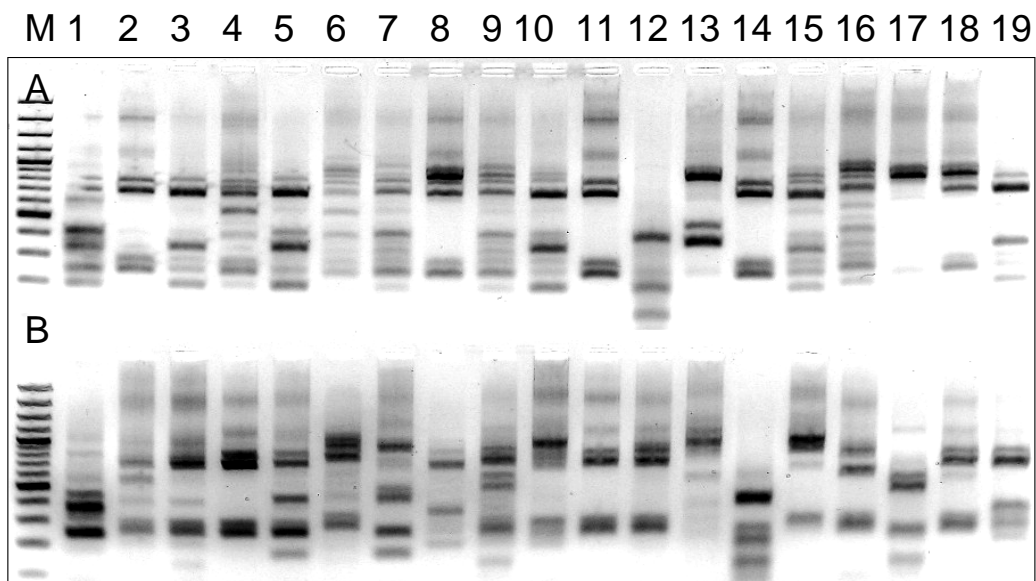


FIGURA 3 Agrupamento por ARDRA das bactérias isoladas de café despulpado através da amplificação da região 16S–23S rDNA usando dupla digestão com Hae III e Hind III. M- Marcador GeneRuller 100pb Plus DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas), com fragmentos de 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 e 100 pb. Perfil A (11A)- *Enterobacter agglomerans* AM184091; Perfil B (3A)- *Bacillus cereus* FJ573184; Perfil C (7A)- *Leuconostoc mesenteroides* AB02741; Perfil D (15A)- *Bacillus sp.*AB241586; Perfil E (6A)- *Lactococcus lactis* EU341312; Perfil F (12A)- *Klebsiella pneumoniae* CP000964; Perfil G (4A)- Bactéria não identificada; Perfil H (8A)- *Serratia sp.* FJ548993; Perfil I (10B)- *Bacillus subtilis* EU000054; Perfil J (1B)- *Erwinia herbicola* FJ013266; Perfil K (2B)- *Acinetobacter sp.* EU143353; Perfil L (8B)- *Escherichia coli* EU026432; Perfil M (9B)- *Bacillus megaterium* AB271139; Perfil N (17B)- *Bacillus macerans* AB281478 ; Perfil O (19B)- *Lactobacillus plantarum* AB300541; Perfil P (13A)- *Lactobacillus brevis* EU789399.

Enterobacter agglomerans, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Erwinia herbicola*, *Bacillus megaterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus macerans*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* foram bactérias predominantes durante todo o processo de fermentação/secagem. Uma espécie não identificada de *Bacillus* predominou nas amostras iniciais e durante as primeiras 48 h de fermentação/secagem, com contagens na ordem de 10^2 a 10^5 UFC/g. *Enterobacter agglomerans* e *Escherichia coli* foram espécies presentes com frequência durante o processamento do café, uma vez que essas bactérias são encontradas em solo, água, plantas e associadas a pequenos mamíferos e insetos e no próprio maquinário utilizado durante o processamento. *Erwinia herbicola* e *Klebsiella pneumoniae* são bactérias pectinolíticas e facilmente encontradas durante a fermentação do café (Avallone et al., 2002). *Lactobacillus brevis* tem atividade pectinolítica em condições compatíveis com as encontradas na fermentação do café (Avallone et al., 2002). Além disso, toda bactéria ácido láctica geralmente é resistente às condições ácidas, o que permite seu crescimento durante o processo de fermentação. A amostra coletada com 120 h de fermentação/secagem mostrou maior diversidade de espécies (12), sendo a menor diversidade encontrada na amostra coletada a partir dos frutos lavados (2) (Tabela 6).

TABELA 6 Espécies de bactérias isoladas de amostras coletadas durante o processamento e secagem de café despulpado em Lavras (...continua...)

Estágios de processamento do café	Número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) das espécies de bactérias						
	Frutos recém-colhidos	Frutos lavados	Frutos despulpados	Casca e polpa	24 h de secagem	48 h de secagem	72 h de secagem
<i>Enterobacter agglomerans</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	5 x 10 ⁶	5 x 10 ⁶	2 x 10 ⁵
<i>Bacillus cereus</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	2 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴
<i>Leuconostoc mesenterioides</i>	— ¹	— ¹	3 x 10 ²	4 x 10 ³	1 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	— ¹
<i>Bacillus sp.</i>	1 x 10 ⁴	8 x 10 ³	3 x 10 ³	4 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	5 x 10 ²	— ¹
<i>Lactococcus lactis</i>	1 x 10 ³	1 x 10 ³	2 x 10 ²	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	— ¹	— ¹	4 x 10 ²	— ¹	2 x 10 ⁶	5 x 10 ⁶	1 x 10 ⁵
<i>Bactéria não identificada</i>	1 x 10 ⁵	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	5 x 10 ⁵	— ¹
<i>Serratia sp.</i>	— ¹	— ¹	— ¹	2 x 10 ³	1 x 10 ³	— ¹	— ¹
<i>Bacillus subtilis</i>	— ¹	— ¹	1 x 10 ²	1 x 10 ⁴	8 x 10 ⁷	5 x 10 ⁶	3 x 10 ⁵
<i>Erwinia herbicola</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵
<i>Acinetobacter spp.</i>	— ¹	— ¹	— ¹	3 x 10 ³	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Escherichia coli</i>	— ¹	— ¹	3 x 10 ³	1 x 10 ²	4 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	2 x 10 ⁵
<i>Bacillus megaterium</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	8 x 10 ³
<i>Bacillus macerans</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Lactobacillus plantarum</i>	— ¹	— ¹	7 x 10 ²	4 x 10 ³	8 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴
<i>Lactobacillus brevis</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	8 x 10 ⁴	6 x 10 ⁴

¹ Populações inferiores a 10 UFC/g

TABELA 6 Espécies de bactérias isoladas de amostras coletadas durante o processamento e secagem de café despulpado em Lavras (..continuação)

Estágios de processamento do café	Número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) das espécies de bactérias					
	96 h de secagem	120 h de secagem	144 h de secagem	168 h de secagem	192 h de secagem	216 h de secagem
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3 x 10 ⁵	1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	2 x 10 ²	1 x 10 ²
<i>Bacillus cereus</i>	1 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	4 x 10 ⁴	8 x 10 ³	2 x 10 ³	3 x 10 ³
<i>Leuconostoc mesenterioides</i>	1 x 10 ²	3 x 10	1 x 10 ²	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Bacillus sp.</i>	— ¹	1 x 10 ⁴	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Lactococcus lactis</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	4 x 10 ³	— ¹	— ¹
<i>Bactéria não identificada</i>	— ¹	— ¹	1 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴	— ¹	— ¹
<i>Serratia sp.</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Bacillus subtilis</i>	3 x 10 ⁶	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶	4 x 10 ⁵	9 x 10 ⁴
<i>Erwinia herbicola</i>	4 x 10 ⁶	3 x 10 ⁵	5 x 10 ³	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Acinetobacter spp.</i>	— ¹	— ¹	1 x 10 ²	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Escherichia coli</i>	2 x 10 ⁶	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴	4 x 10 ⁵	8 x 10 ³	— ¹
<i>Bacillus megaterium</i>	1 x 10 ²	4 x 10 ²	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Bacillus macerans</i>	6 x 10 ³	1 x 10 ³	2 x 10 ⁴	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6 x 10 ⁴	4 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	7 x 10 ⁴	1 x 10 ³	— ¹
<i>Lactobacillus brevis</i>	4 x 10 ²	2 x 10 ⁴	6 x 10 ⁴	3 x 10 ³	— ¹	— ¹

¹ Populações inferiores a 10 ufc/g

Alguns resultados semelhantes a estes foram encontrados por Silva et al. (2008b) estudando a sucessão bacteriana durante a fermentação do café natural brasileiro. *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *Acinetobacter sp.* e *Enterobacter agglomerans* foram espécies encontradas tanto em cafés despolpados (presente trabalho) quanto em cafés naturais (Silva et al., 2008b). Bactérias do gênero *Bacillus* foram encontradas em todas as amostras analisadas, o que indica o processamento do café como sendo um meio favorável para o desenvolvimento de tais bactérias. Algumas espécies de *Bacillus* podem produzir uma série de enzimas extracelulares que degradam compostos complexos como a celulose e a pectina, sendo que esses dois polímeros são encontrados na casca, polpa e mucilagem dos frutos de café, tornando-se meio favorável à degradação por enzimas microbianas (Silva et al., 2008b). Além disso, como o gênero *Bacillus* é composto de bactérias que produzem esporos principalmente sob condições desfavoráveis, como é o caso do processo de secagem do café (diminuição da aw), justifica-se a presença de tais bactérias nesse até nesse estágio do processamento.

Erwinia herbicola, *Klebsiella pneumoniae*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus brevis* foram espécies também encontradas por Avallone et al. (2001) em cafés processados via úmida no México. *Erwinia herbicola* e *Klebsiella pneumoniae* são as bactérias pectinolíticas mais encontradas durante a fermentação do café, mesmo as condições ácidas da fermentação não sendo as mais favoráveis para a ação das enzimas produzidas por esses microrganismos (Avallone et al., 2002).

Enterobacter sp., *Serratia, sp.*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* e *Lactobacillus sp.* são bactérias encontradas neste trabalho e por Silva et al. (2000) em cafés naturais. Isso mostra que algumas espécies ocorrem no café independentemente do tipo de processamento, via úmida ou via seca (Silva et al., 2000). *Escherichia sp.*, *Erwinia sp.*, *Bacillus sp.*, *Leuconostoc sp.* e *Lactobacillus sp.* são gêneros já relatados em

trabalhos de isolamentos feitos em cafés natural e despulpado desde 1946 (Perderson & Breed, 1946; Vaughn et al., 1958; Frank et al., 1965).

4.3 Identificação das leveduras isoladas por análise de ITS1-5.8S rDNA - ARDRA e sequenciamento

Os 382 isolados de leveduras foram submetidos a testes bioquímicos de fermentação em meios líquidos contendo diferentes fontes de carbono. De acordo com os resultados desses testes, os isolados foram agrupados para identificação das espécies por ARDRA e sequenciamento da região ITS1-5.8S rDNA. Foram obtidos 15 padrões de fragmentos de restrição distintos (Figura 4), correspondentes a 14 espécies (97 a 100% homologia), sendo os perfis B e D correspondentes à mesma espécie, *Pichia anomala*. Isso possivelmente se deve ao fato de haver polimorfismo dentro das espécies, gerando padrões de fragmentos de restrição distintos. Jeyaram et al. (2008) também encontraram perfis diferentes correspondendo à mesma espécie.

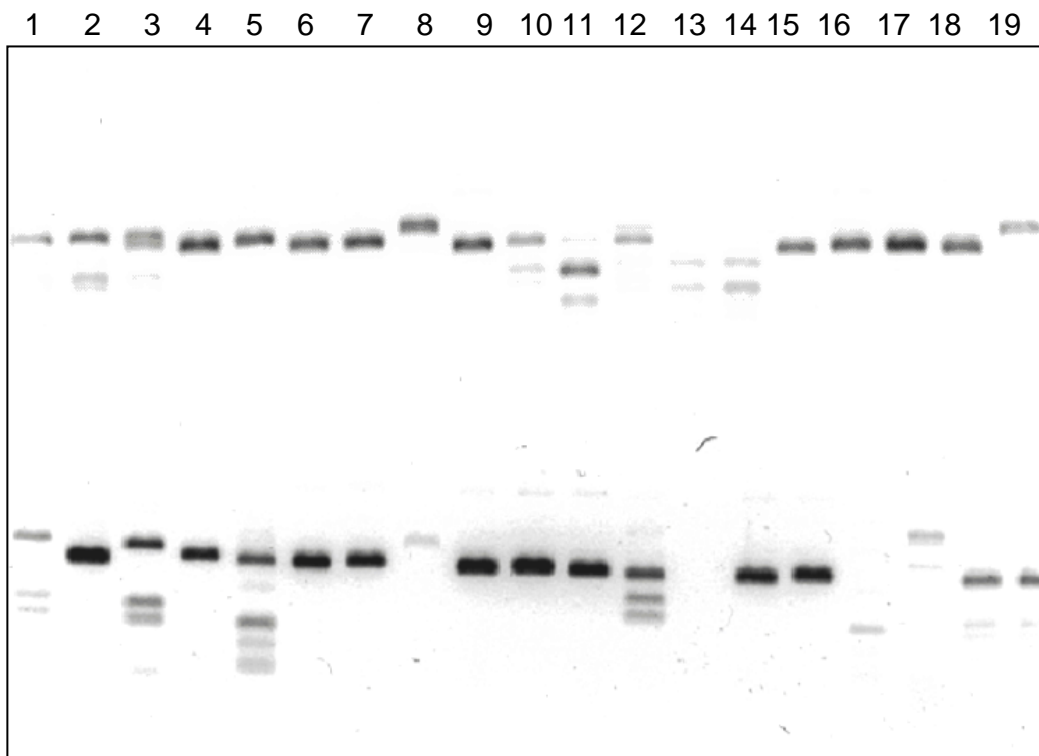


FIGURA 4 Agrupamento por ARDRA das leveduras isoladas de café despulpado através da amplificação da região ITS1-5.8S rDNA-ITS2 usando digestão com Hae III, Hinf I, Msp I e Hind III. As letras se referem aos diferentes perfis encontrados: M- Marcador GeneRuller 100pb Plus DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas), com fragmentos de 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 e 100 pb; Perfil A (1A)- *Torulaspota delbrueckii* AB469378; Perfil B (2A)- *Pichia anomala* EU330185; Perfil C (3A)- *Candida ernobii* EF090867; Perfil D (4A)- *Pichia anomala* AB469881; Perfil E (8A)- *Candida fukuyamaensis* AM158923; Perfil F (9A)- *Saccharomycete sp.* AY796128; Perfil G (10A)- *Pichia caribbica* AY939800; Perfil H (11A)- *Candida membranifaciens* EU343844; Perfil I (13A)- *Rhodotorula mucilaginosa* AF444541; Perfil J (2B)- *Saccharomyces bayanus* D89887 ; Perfil K (5B)- *Arxula sp.* AB000659 ; Perfil L (12B)- *Hanseniaspora uvarum* AM160628; Perfil M (16B)- *Kluyveromyces sp* AY305673; Perfil N (17B)- *Kloeckera sp.*FJ391977; Perfil O (18B)- *Candida xestobii* AM158922.

Pichia anomala foi a única espécie encontrada em todas as amostras, com contagens na ordem de 10^3 a 10^6 UFC/g (Tabela 7). *Torulaspota delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces bayanus*, *Hanseniaspora uvarum* e *Kloeckera sp* foram as demais leveduras predominantes durante todo o processo de fermentação/secagem. *P. anomala* e *Hanseniaspora uvarum* isoladas de café via úmida produzem poligacturonase (Masoud & Jespersen, 2006), indicando a possibilidade de também estarem envolvidas na utilização da pectina da polpa e mucilagem de café. *P. anomala* e *H.uvarum* são descritas como leveduras fermentativas e são encontradas em solo, frutas e árvores (Kurtzman & Fell, 1998; Smit, 1997). O gênero *Kloeckera* compreende espécies de leveduras geralmente encontradas na fermentação de vegetais, quando o teor de álcool é baixo, por isso são observadas na fermentação do café. Espécies de *Candida* foram verificadas com mais frequência no final do processo (96 h de fermentação/secagem ou mais). Isso se deve ao fato de essas leveduras serem mais facilmente adaptadas às condições de baixa atividade de água, o que é característico nesse período do processamento. A amostra coletada com 144 h de fermentação/secagem mostrou maior diversidade de espécies (10), sendo a menor diversidade encontrada na amostra coletada a partir dos frutos despolidos (1).

TABELA 7 Espécies de leveduras isoladas de amostras coletadas durante o processamento e secagem de café despulpado em Lavras (...continua...)

Estágios de processamento do café	Número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) das espécies de leveduras						
	Frutos recém-colhidos	Frutos lavados	Frutos despulpados	Casca e polpa	24 h de secagem	48 h de secagem	72 h de secagem
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	2 x 10 ⁵
<i>Pichia anomala</i>	2 x 10 ⁴	1 x 10 ³	4 x 10 ³	1 x 10 ⁵	4 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	4 x 10 ⁵
<i>Candida ernobii</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Candida fukuyamaensis</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Saccharomycete sp.</i>	1 x 10 ³	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	3 x 10 ⁴	7 x 10 ⁴
<i>Pichia caribbica</i>	— ¹	2 x 10 ³	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Candida membranifaciens</i>	3 x 10 ²	— ¹	— ¹	5 x 10 ⁴	— ¹	3 x 10 ⁵	— ¹
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	— ¹	— ¹	— ¹	8 x 10 ⁵	3 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵
<i>Saccharomyces bayanus</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	1 x 10 ⁵	6 x 10 ³	— ¹
<i>Arxula sp.</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	2 x 10 ²
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Kluyveromyces sp.</i>	— ¹	— ¹	— ¹	9 x 10 ⁴	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Kloeckera sp.</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	1 x 10 ⁵	3 x 10 ³
<i>Candida xestobii</i>	3 x 10 ²	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹

¹ Populações inferiores a 10 UFC/g

TABELA 7 Espécies de leveduras isoladas de amostras coletadas durante o processamento e secagem de café despulpado em Lavras (...Continuação)

Estágios de processamento do café	Número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) das espécies de leveduras					
	96 h de secagem	120 h de secagem	144 h de secagem	168 h de secagem	192 h de secagem	216 h de secagem
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	2 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	4 x 10 ⁵	4 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	7 x 10 ⁶
<i>Pichia anomala</i>	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	6 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶
<i>Candida ernobii</i>	— ¹	— ¹	7 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	1 x 10 ³	—
<i>Candida fukuyamaensis</i>	— ¹	— ¹	— ¹	4 x 10 ⁴	5 x 10 ⁶	4 x 10 ³
<i>Saccharomycete sp.</i>	7 x 10 ⁴	1 x 10 ²	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Pichia caribbica</i>	— ¹	2 x 10 ³	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Candida membranifaciens</i>	— ¹	— ¹	7 x 10 ³	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	1 x 10 ⁴	7 x 10 ⁴	— ¹
<i>Saccharomyces bayanus</i>	4 x 10 ³	3 x 10 ⁴	5 x 10 ³	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Arxula sp.</i>	— ¹	— ¹	1 x 10 ³	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	— ¹	— ¹	2 x 10 ⁴	2 x 10 ⁵	3 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶
<i>Kluyveromyces sp.</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Kloeckera sp.</i>	— ¹	— ¹	6 x 10 ³	1 x 10 ³	2 x 10 ⁴	1 x 10 ²
<i>Candida xestobii</i>	4 x 10 ²	5 x 10 ⁴	6 x 10 ³	3 x 10 ³	— ¹	— ¹

¹ Populações inferiores a 10 UFC/g

Pichia anomala foi a levedura de maior ocorrência durante o processamento do café despulpado. Essa espécie já estava presente nos frutos recém-colhidos e permaneceu até o final do processo, o que indicou a possibilidade de *P. anomala* ser uma levedura endofítica do café. Além disso, essa levedura é relatada como uma espécie importante na fermentação do café, já que apresenta atividade de pectina liase (Silva et al., 2008b). Essa espécie também foi verificada em outros trabalhos durante a fermentação de café processados tanto por via seca quanto úmida. *P. anomala* foi encontrada em alta população durante a secagem dos grãos de café previamente fermentados pela via úmida (Masoud et al., 2004). *Pichia spp.*, incluindo *P. anomala*, constituiu 39% dos 107 isolados leveduriformes encontrados por Silva et al. (2000) em cafés brasileiros processados via seca.

Hanseniaspora uvarum, *Kluyveromyces marxianus* e *Torulaspora delbrueckii* foram espécies também relatadas por Masoud et al. (2004) durante a fermentação de cafés processados via úmida. As espécies *Candida membranifaciens* e *Pichia anomala* e os gêneros *Arxula* e *Saccharomyces* também foram encontrados durante a fermentação de cafés naturais brasileiros (Silva et al., 2008b). Isso demonstra que algumas espécies ocorrem no café independentemente do tipo de processamento, via úmida ou via seca.

Os gêneros *Kloeckera* e *Candida* também foram isolados a partir da fermentação de café despulpado; tais leveduras consistem em espécies encontradas em plantas (Avallone et al., 2001). Em outro estudo, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces bayanus* também foram isoladas em café robusta fermentado na Índia, sendo estas caracterizadas como leveduras pectinolíticas (Agate & Bhat, 1966).

4.4 Identificação dos fungos filamentosos isolados

Para a identificação dos 61 isolados de fungos filamentosos, foram analisadas características macro e microscópicas das colônias. Foram identificadas 21 espécies de fungos filamentosos, compreendidas em 7

gêneros distintos. A contagem populacional foi variável entre as espécies e entre as diferentes amostras (Tabela 8).

TABELA 8 Espécies de fungos filamentosos isolados de amostras coletadas durante o processamento de café despulpado em Lavras

Estágios de processamento do café	Número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) das espécies de fungos filamentosos			
	Frutos recém-colhidos	Frutos lavados	Frutos despulpados	Casca e polpa
<i>Cladosporium sp.</i>	1 x 10 ²	1,7 x 10 ²	— ¹	— ¹
<i>C.cladosporioides</i>	— ¹	10	2 x 10 ²	— ¹
<i>C.macrocarpum</i>	1 x 10 ²	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Penicillium sp.</i>	35	70	50	50
<i>P.implicatum</i>	— ¹	— ¹	1 x 10 ²	— ¹
<i>P.commune</i>	— ¹	15	1 x 10 ²	— ¹
<i>P.roqueforti</i>	— ¹	— ¹	— ¹	1 x 10 ³
<i>Aspergillus sp.</i>	— ¹	5	1,5 x 10 ²	2,6 x 10 ³
<i>A. versicolor</i>	— ¹	— ¹	2,5 x 10 ²	— ¹
<i>A. tubingensis</i>	— ¹	1 x 10 ²	3,3 x 10 ²	— ¹
<i>A. ochraceus</i>	— ¹	25	— ¹	1 x 10 ³
<i>A. niger</i>	1 x 10 ²	5	— ¹	— ¹
<i>E.chevalieri</i>	— ¹	— ¹	— ¹	— ¹
<i>Fusarium sp</i>	55	10	1 x 10 ²	— ¹
<i>F. solani</i>	— ¹	10	— ¹	— ¹
<i>F. sporotrichioides</i>	5	5	— ¹	— ¹
<i>F. nivale</i>	— ¹	— ¹	— ¹	5 x 10 ²
<i>F. lateritium</i>	1 x 10 ²	45	— ¹	— ¹
<i>F. chlamydosporum</i>	— ¹	— ¹	— ¹	2 x 10 ²
<i>Fusariella sp.</i>	— ¹	5	— ¹	— ¹
<i>Cylindrocarpon sp.</i>	5	— ¹	— ¹	— ¹

¹ Populações inferiores a 5 UFC/g

Fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Cladosporium*, *Fusarium* e *Cylindrocarpum* não foram isolados durante a fermentação/secagem dos grãos de café, com populações de 10^2 UFC/g ou inferiores nas demais amostras. Somente as espécies identificadas como *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger* e *Eurotium chevalieri* foram isoladas durante a fermentação/secagem dos grãos de café, com populações de 1×10^2 a 5×10^2 UFC/g.

Na amostra coletada a partir dos frutos lavados ocorreu a maior diversidade de espécies de fungos filamentosos (13 espécies diferentes), seguida pelas amostras coletadas a partir dos frutos recém-colhidos, dos frutos despulpados e da casca e polpa (8, 8 e 7 espécies diferentes, respectivamente).

O gênero *Aspergillus* foi o de maior incidência (5×10^3 UFC/g), sendo a espécie *A. ochraceus* a de maior representatividade (1×10^3 UFC/g), seguido pelo gênero *Penicillium sp.* (2×10^3 UFC/g), sendo a espécie *P. roqueforti* (1×10^3 UFC/g) a de maior representatividade. O gênero *Fusarium* apareceu em seguida ($9,6 \times 10^2$ UFC/g), sendo a espécie *F. nivale* a mais representativa (5×10^2 UFC/g). O gênero *Cladosporium* ($4,8 \times 10^2$ UFC/g) teve a espécie *C. cladosporioides* como a mais representativa (2×10^2 UFC/g). Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo foram relatados por Silva et al. (2008a) em processamento de cafés naturais, em que o gênero *Aspergillus* foi o de maior incidência, seguido pelos gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*. A ocorrência desses fungos filamentosos em café é associada com a redução da qualidade da bebida, exceto para o gênero *Cladosporium*, que aparece em cafés de boa qualidade (Silva et al., 2000). Houve a ocorrência de apenas uma espécie de relevância para a segurança do produto (*Aspergillus ochraceus*), a qual está relacionada com a produção de micotoxinas (Batista et al., 2003; Masoud & Kaltoft, 2006; Batista et al., 2008), o que indica que este processamento via úmida minimizou o aparecimento de fungos toxigênicos. Estes resultados diferem

dos relatados da população de fungos em cafés processados via seca, nos quais várias espécies de fungos toxigênicos já foram descritas (Batista et al., 2003, Silva et al., 2008b). A espécie *A. tubingensis* não foi isolada de café em nenhum trabalho anterior, independentemente do tipo de processamento, sendo encontrada pela primeira vez no presente estudo.

4.5 Espécies de bactérias detectadas por PCR-DGGE

As análises das sequências obtidas das bandas excisadas (98 a 100% de homologia) demonstraram que nenhuma espécie esteve presente em todas as amostras examinadas por DGGE (Figura 5). *Leuconoctoc mesenterioides* e *Bacillus macerans* estiveram presentes somente nas amostras coletadas a partir dos frutos recém-colhidos, dos frutos lavados e dos frutos despolpados. As bandas J e O, embora distintas, corresponderam à mesma espécie (*Pantoea agglomerans*), sendo essa bactéria também conhecida como *Enterobacter agglomerans*. *Lactobacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Erwinia herbicola*, *Enterobacter sp* e Bactéria não cultivável estiveram presentes somente durante a fermentação/secagem. *Escherichia coli*, *Enterobacter cowanii*, *Lactobacillus plantarum*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, Bactéria endofítica e *Bacillus subtilis* estiveram presentes nas amostras coletadas a partir dos frutos despolpados, da casca e da polpa e durante toda a fermentação/secagem. As amostras em que as espécies *Bacillus cereus*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus subtilis* foram isoladas por cultivo corresponderam às amostras em que essas espécies foram detectadas por DGGE. Algumas espécies, como *Lactococcus lactis*, *Serratia sp.*, *Acinetobacter spp* e *Bacillus megaterium*, foram isoladas por cultivo, mas não detectadas por análise de DGGE das mesmas amostras. Porém, todas as espécies detectadas por DGGE foram também isoladas por cultivo, com exceção da bactéria não cultivável.

Algumas bactérias detectadas por DGGE neste trabalho são comumente encontradas durante o processamento do café, como *Lactobacillus brevis* (Avallone et al., 2002, em cafés processados via úmida; Avallone et al., 2001, em cafés processados via úmida), *Bacillus cereus* (Silva et al., 2008b, em cafés naturais; Silva et al., 2000, em cafés naturais), *Erwinia herbicola* (Avallone et al., 2001, 2002), outras Enterobacteriaceae (Silva et al., 2000, 2008b) *Klebsiella pneumoniae* (Avallone et al., 2001, 2002), *B. subtilis* (Silva et al., 2000, 2008b), *Leuconostoc mesenteroides* (Avallone et al., 2001) e *B. macerans* (Silva et al., 2008b).

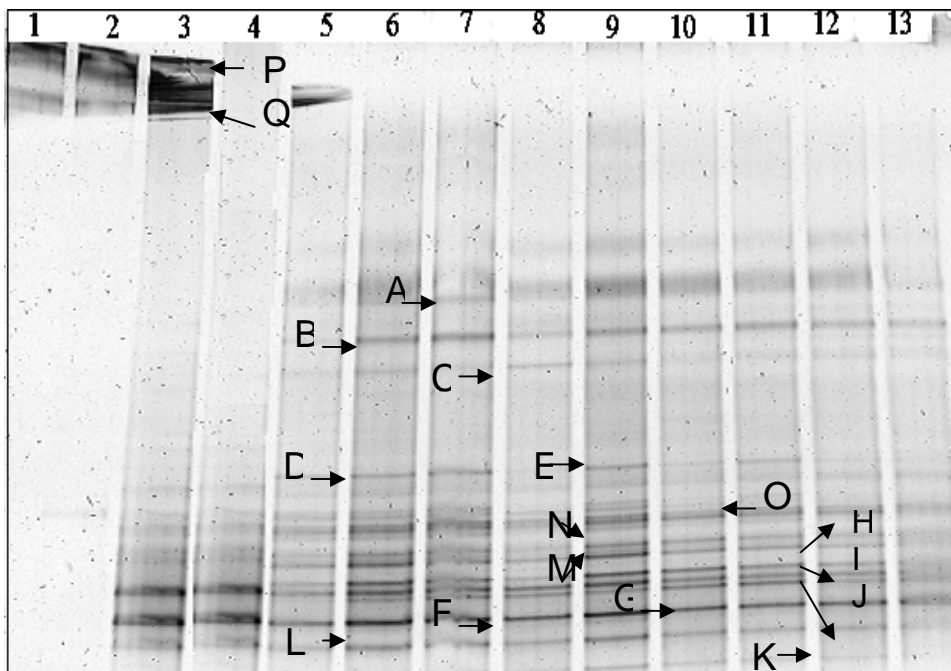


FIGURA 5 Perfis de DGGE de produtos de PCR dos fragmentos de gene 16S rRNA obtidos de amostras durante o processamento do café despulpado. Os números se referem às diferentes amostras de café coletadas: coluna 1, frutos recém-colhidos; coluna 2, frutos lavados; coluna 3, frutos despulpados; coluna 4, casca e polpa; coluna 5, 24hs de fermentação/secagem; coluna 6, 48hs de fermentação/secagem; coluna 7, 72hs de fermentação/secagem; coluna 8, 96 hs de fermentação/secagem; coluna 9, 120hs de fermentação/secagem; coluna 10, 144hs de fermentação/secagem; coluna 11, 168hs de fermentação/secagem; coluna 12, 192hs de fermentação/secagem; coluna 13, 216hs de fermentação/secagem. As letras correspondem às espécies correspondentes às diferentes bandas: A- *Lactobacillus brevis* EU477400 ; B- *Bacillus cereus* FJ573184; C- *Erwinia herbicola* FJ013267; D- *Enterobacter sp.* EU304794; E- *Enterobacter sp.* EU304794; F- *Escherichia coli* EU026432; G- *Escherichia coli* EU026432; H- *Enterobacter cowanii* FJ357832 ; I- *Lactobacillus plantarum* AB326301; J- *Pantoea agglomerans* DQ122371; K- Bactéria não cultivável AY512184; L- *Klebsiella pneumoniae* CP000964; M- Bactéria endofítica FJ205682; N- *Bacillus subtilis* EU000054; O- *Pantoea agglomerans* AM184091; P- *Leuconostoc mesenteroides* AB02741; Q- *Bacillus macerans* AB281478.

4.6 Espécies de fungos detectados por PCR-DGGE

Análises das sequências obtidas das bandas excisadas (98 a 100% de homologia) mostraram que somente fungos leveduriformes apareceram nas bandas do gel da técnica de DGGE. A ausência de bandas caracterizadas de fungos filamentosos deveu-se, provavelmente, à baixa população deste grupo, o que indica uma limitação da técnica. Entre as leveduras, *Pichia anomala* e *Rhodotorula sp.* estiveram presentes em todas as amostras examinadas pela técnica DGGE (Figura 6). Essas leveduras são fermentativas e estão associadas à produção de pectinases, encontrando as condições ideais para sua multiplicação durante o processamento do café (Smit, 1997; Masoud et al., 2004). Algumas espécies, como *Torulaspota delbrueckii*, *Candida xestobii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata* e *Kluyveromyces marxianus*, estiveram presentes somente durante a fermentação/secagem. *Saccharomyces cerevisiae* foi encontrada somente nas amostras coletadas a partir dos frutos recém-colhidos, e durante as primeiras 72 h de fermentação/secagem. Essa espécie não é tolerante a condições de baixa atividade de água e cresce abundantemente na presença de açúcares, condições não encontradas nas amostras em que essa espécie não foi detectada. As espécies *Pichia anomala*, *Torulaspota sp.*, *Hanseniaspora uvarum* e *Kloeckera sp.* foram isoladas por cultivo e pela técnica DGGE nas mesmas amostras.

Algumas espécies, como *Candida ernobii*, *C. fukuyamaensis*, *Pichia caribbica*, *C.membraniefaciens*, *Saccharomyces bayanus* e *Arxula sp.*, foram isoladas por cultivo, mas não detectadas por análise de DGGE das mesmas amostras. Isto pode ser devido a baixas incidências dessas espécies nas diferentes amostras ou por ineficiência no processo de extração do DNA total das amostras. Porém, todas as espécies detectadas por DGGE foram também isoladas por cultivo. Cocolin et al. (2001) verificaram que durante a fermentação do vinho a técnica de DGGE foi incapaz de detectar espécies que estavam em número menor que 1000 células. ml⁻¹.

Algumas leveduras detectadas por DGGE neste trabalho são comumente encontradas durante o processamento do café, como *Pichia anomala* (Silva et al., 2000, em cafés naturais; Masoud et al., 2004, em cafés processados via úmida; Masoud & Kaltoft, 2006, em cafés processados via úmida; Masoud & Jespersen, 2006, em cafés processados via úmida), *Pichia sp.* (Silva et al., 2000), *Torulaspota delbruecki* (Masoud et al., 2004), *Candida xestobii* (Masoud et al., 2004), *Hanseniaspora uvarum* (Masoud et al., 2004; Masoud & Kaltoft, 2006; Masoud & Jespersen, 2006), *Kloeckera apiculata* (Avallone et al., 2001, em cafés processados via úmida), *Saccharomyces cerevisiae* (Silva et al., 2000; Masoud et al., 2004) e *Kluyveromyces marxianus* (Masoud et al., 2004).

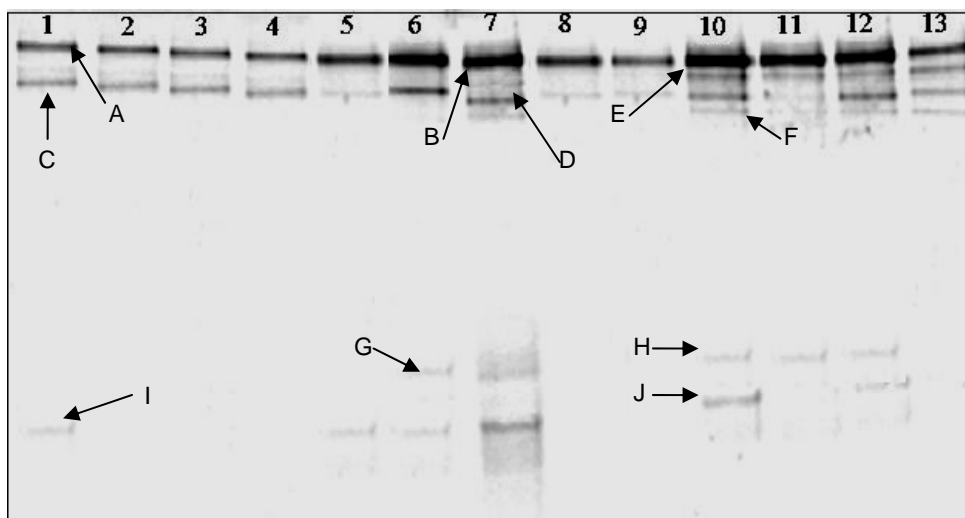


FIGURA 6 Perfis de DGGE de produtos de PCR da região ITS1-5.8S rDNA obtidos de amostras durante o processamento do café despulpado. Os números se referem às diferentes amostras de café coletadas: coluna 1, frutos recém-colhidos; coluna 2, frutos lavados; coluna 3, frutos despulpados; coluna 4, casca e polpa; coluna 5, 24hs de fermentação/secagem; coluna 6, 48hs de fermentação/secagem; coluna 7, 72hs de fermentação/secagem; coluna 8, 96 hs de fermentação/secagem; coluna 9, 120hs de fermentação/secagem; coluna 10, 144hs de fermentação/secagem; coluna 11, 168hs de fermentação/secagem; coluna 12, 192hs de fermentação/secagem; coluna 13, 216hs de fermentação/secagem. As letras correspondem às espécies correspondentes às diferentes bandas: A- *Pichia anomala* EU330185; B- *Pichia sp.* AM905031; C- *Rhodotorula sp.* AB474390; D- *Torulaspota delbrueckii* AB469378; E- *Candida xestobii* AM158922; F- *Hanseniaspora uvarum* AM160628; G- *Kloeckera apiculata* AB469379; H- *Kloeckera apiculata* AB469379; I- *Saccharomyces cerevisiae* GM981616; J- *Kluyveromyces marxianus* GM620595

4.7 Análises físico-químicas e classificação da bebida

Amostras de grãos de café após 216 h de secagem ou 11% de umidade foram submetidas a análises físico-químicas e classificação da bebida com o intuito de caracterizar melhor as condições finais do grão, bem como a influência de tais características para a presença de determinados microrganismos. De acordo com análises realizadas no Laboratório de Tecnologia em Qualidade do Café da Universidade Federal de Lavras, o café foi classificado como sendo de Bebida Dura, tipo 4 e de adstringência acentuada. O café, mesmo despulpado, levou 9 dias para a completa secagem (11% de umidade no terreiro) devido ao tempo nublado e às temperaturas baixas, criando condições climáticas desfavoráveis para secagem dos grãos.

TABELA 9 Parâmetros Físico-químicos analisados no café após 216 h de secagem (9 dias de fermentação /secagem e 11% de umidade no terreiro)

Parâmetros Físico-Químicos	Valores
Umidade (%)	10,52
Matéria-Seca (%)	89,48
Acidez Titulável	0,7
Açúcares Totais (%)	10,05
Açúcares Redutores (%)	0,6
Açúcares Não-Redutores (%) (Sacarose)	9,0
Pectina Total (mg/100g)	1254,25
Pectina Solúvel (mg/100g)	540,59
Solubilidade (%)	43,4
Fenólicos (Taninos)	7,66
FDA (%)	25,29
Lignina (%)	5,86
Celulose (%)	19,12
Polifenoloxidase (u/g/min)	61,52

Os valores encontrados para os parâmetros físico-químicos (Tabela 9) analisados neste estudo foram semelhantes a outros trabalhos, como os de Silva et al. (2008b), em cafés naturais brasileiros com 140 dias de estocagem; Mendonça et al. (2005), em análise de parâmetros bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café; e Siqueira & Abreu (2006), em análise da composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento (cereja natural, cereja despulpado e cereja descascado).

O sabor característico do café deve-se à presença e aos teores de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis, destacando-se os aldeídos, os ácidos, as cetonas, os açúcares, as proteínas, os aminoácidos, os ácidos graxos e os compostos fenólicos; muitos deles formados durante a torração (Vilas Boas et al., 2001). A composição química do café é determinada por fatores genéticos, ambientais e culturais e afeta diretamente a qualidade do café, assim como os métodos de colheita, processamento e armazenamento (Malta et al., 2003).

O valor de umidade de 10,52% encontrado na amostra analisada é considerado seguro para a estocagem dos grãos por não favorecer o desenvolvimento de microrganismos nos mesmos (Bytof et al., 2005).

A atividade de polifenoloxidase encontrada neste trabalho, se comparada à de outros trabalhos, é considerada média (Silva et al., 2008b). Os polifenóis exercem uma ação protetora e antioxidante dos aldeídos, ou seja, sob qualquer condição adversa aos grãos as polifenoloxidases agem sobre os polifenóis diminuindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos (Amorim, 1968; Farah et al., 2006). Os polifenóis são responsáveis pela adstringência dos frutos, no caso do café, e interferem fortemente no seu sabor e aroma. Existem indícios da ocorrência de maior concentração de polifenóis em cafés de pior qualidade, porém esses limites ainda não estão bem estabelecidos. Em grãos de frutos colhidos verdes, o teor desses compostos se mostra bem superior (alta adstringência) quando comparado a grãos de frutos colhidos maduros (baixa adstringência).

A acidez em grãos café tem sido apontada como um bom indicativo de qualidade do produto. Essa acidez pode variar de acordo com os níveis de fermentações ocorridas nos grãos e com os diferentes estádios de maturação dos mesmos (Pimenta, 2003). Neste trabalho encontrou-se um bom valor de acidez titulável. Carvalho et al. (1994) verificaram diferenças marcantes entre teores de acidez titulável em cafés de diferentes qualidades de bebida, e ainda ressaltaram a importância da utilização desse parâmetro junto à atividade de polifenoloxidase como suporte para maior eficiência da classificação da bebida.

Segundo Pereira et al. (2000), açúcares redutores e não-redutores estão associados à qualidade por originarem, juntamente com os aminoácidos, vários compostos responsáveis pela cor e pelo aroma do café.

O teor de açúcares não-redutores encontrados no presente estudo foi alto (9,0%). Os açúcares não-redutores são representados basicamente pela sacarose, cujo teor pode variar de 1,9 a 10% na matéria-seca (Pereira et al., 2000). A relação mais importante dos açúcares com a qualidade final do produto está na formação de compostos com coloração caramelizada escura (desejável) durante o processo de torração, através de sua reação com aminoácidos (reação de Maillard) que podem influenciar no aroma e no sabor do produto final.

5 CONCLUSÕES

- A população total de bactérias foi superior à de leveduras e fungos filamentosos durante o processamento de fermentação e secagem do café.

- Entre as bactérias, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Erwinia herbicola* foram as espécies predominantes durante o processamento do café.

- *Pichia anomala* foi a única espécie encontrada em todas as amostras coletadas, sendo que *Torulaspora delbrueckii* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram as demais espécies predominantes durante o processamento do café.

- As espécies *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium roqueforti*, *Fusarium nivale* e *Cladosporium cladosporioides* foram as espécies de maiores incidências.

- A técnica molecular ARDRA e o sequenciamento foram ferramentas úteis para a identificação de microrganismos, uma vez que geraram resultados precisos e reduziram o tempo de identificação das espécies. No entanto, essas técnicas devem estar associadas aos métodos tradicionais de identificação.

- O processamento por via úmida apresentou menor ocorrência de fungos filamentosos produtores de toxina.

- Análises das seqüências obtidas das bandas de DGGE de leveduras confirmaram a presença de *Pichia anomala* durante todo o processamento do café. Análises das seqüências obtidas das bandas de DGGE da comunidade bacteriana confirmaram que nenhuma espécie esteve presente durante todo o processamento do café. Algumas espécies, tanto de leveduras quanto de bactérias, foram isoladas por cultivo, mas não detectadas por análise de DGGE das mesmas amostras. Isto pode ser devido a baixas incidências dessas espécies nas diferentes amostras ou por ineficiência no processo de extração do DNA total das amostras.

- Foi possível detectar a presença de uma bactéria não cultivável pela técnica de DGGE.

- Houve uma boa correlação entre as espécies encontradas por isolamento em meio de cultivo e sequenciamento e os perfis de DGGE obtidos, tanto para bactérias quanto para leveduras. Todavia, as técnicas moleculares devem sempre estar associadas às técnicas tradicionais a fim de se obter uma melhor caracterização da microbiota presente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATE, A.D.; BHAT, J.V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of coffee robusta cherries. **Applied Microbiology**, New York, v. 14, n.1, p. 256-260, 1966.

AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUIJN, F.J. **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer, 1995.

AMORIM, H.V.; AMORIM, V.L. **Enzyme in food and beverage processing**. Washington: American Chemical Society, 1977, 86p.

AMORIM, H.V. Estado nutricional do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 43, n. 2, p. 93-102, 1968.

AMORIM, H.V.; MELLO, M. Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage, In: FOX, P. F. (Ed). **Food enzymology**. Amsterdam: Elsevier, v.2, p.189-209, 1991.

AMPE, F.; BEN OMAR, N.; MOIZAN, C.; WACHER, C.; GUYOT, J.P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 65, n. 3, p. 5464-5473, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses of the Association of Official analytical chemists**. 15.ed. Washington, 1990. 1117 p.

AQUILANTI, L.; SANTARELLI, S.; SILVESTRI, G.; OSIMANI, A.; PETRUZZELLI, A.; CLEMENTI, F. The microbial ecology of a typical salami during its natural fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v.120, n. 1, p. 136-145, 2007.

ARUNGA, R.O. Coffee. **Economic Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 259-279, 1982.

AVALLONE, S.; BRILLOUET, J-M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J-P. Involvement of pectinolytic microorganisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, San Francisco, v. 37, p. 191, 2002.

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, p. 252-256, 2001.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4.ed. New York: Library Macmillan Company, 1987. 218 p.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3.ed. EUA: Cambridge University, 2000. 1139 p.

BÁRTHOLO, G.F.; GUIMARÃES, P.T.G. Cuidados na colheita e preparo do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18. n. 187, p. 5-20, 1997.

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**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 85, n. 1, p. 293-300, 2003.

BATISTA, L.R.; CHALFOUN, S.M.; SILVA, C.F.; CIRILLO, M.; VARGA, E.A.; PRADO, G.; SCHWAN, R.F. Ocratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Kidlington Oxford, United Kingdom, DOI 10.1016, 2008.

BIOSCI, M. A. **Biotechnology Biochemical**. 1. ed. EUA: Cambridge University, 1993, 1043 p.

BITANCOURT, A.A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, p. 1179-1184, 1957.

BITTER, V.; MUIR, H.M. Modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 4, p. 330-334, 1962.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Netherlands, v. 45, n. 1, p. 1-9, 1999.

BOCKELMANN, W.; HELLER, M.; HELLE, K.J. Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **International Dairy Journal**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 18, n. 1, p. 1066-1071, 2008.

BOOTH, C. **The genus fusarium**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237 p.

BORÉM, F.M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2004. 127 p. Curso de Pós- Graduação “Latu Sensu”. Especialização a Distância: Cafeicultura Empresarial: Produtividade e Qualidade.

BRANDO, C.H.J. Cereja descascado, desmucilado, fermentado, despulpado ou lavado? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 3., 1999, Franca. **Anais...** Rio de Janeiro: MAA/PROCAFÈ, 1999. p. 342-346.

BYTOF, G.; KNOOP, S.E.; SCHIEBERTE, P.; TEUSTSCH, I.; SELMAR, D. Influence of processing on the generation of aminobutyric acid in Green coffee beans. **European Food Resource Technology**, New York, v. 220, n. 2, p. 245-250, 2005.

CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 84, n. 1, p. 33-39, 2003.

CARVALHO, V.D.; CHALFOUN, S.M.; CHAGAS, S.J.R. Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 15., 1989, Maringá-PR. **Anais...** Rio de Janeiro: MAA/PROCAFÈ, 1989. p. 42-46.

CASTELEIN, J.M.; PILNIK, W. Propriedades de la pectatoliasa producida por *Erwinia dissolvens*, um microorganismo de fermentacion del café. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, Suíza, v. 9, n. 2, p. 277-283, 1976.

CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.D. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 1, p. 21-26, 2000.

COCOLIN, L.; MANZANO, M.; AGGIO, D.; CANTONI, C.; COMI, G. A novel polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. **Meat Science**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 57, n. 2, p. 59-64, 2001.

CORTEZ, J.G. Controle das fermentações do café e a qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 19., 1993, Três Pontas. **Resumos...** Rio de Janeiro: MARA, 1993. p. 86.

ERCOLINI, D.; HILL, P.J.; DODD, C.E.R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 69, n. 2, p. 3540-3548, 2003.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; TORRIERI, E.; MASI, P.; VILLANI, F. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 72, n. 3, p. 4663-4671, 2006.

FARAH, A.; MONTEIRO, M.C.; CALADO, V.; FRANCA, A.S.; TRUGO, L.C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemical**, Kidlington Oxford, United Kingdom v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FERRIS, M.J.; MUYZER, G.; WARD, D.M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA- defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 62, n. 4, p. 340-346, 1997.

FOOD DRUGS ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. EUA, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). International, 1972. 187 p.

FOWLER, M.S.; LEHEUP, P.; CORDIER, J-L. Cocoa, coffee and tea. In: WOOD, B.J.B. **Microbiology of food fermented**. 2.ed. London: Blackie Academic and Professional, 1998. v. 1, p. 128-146.

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.

HARUTA, S.; UENO, S.; EGAWA, I.; HASHIGUCHI, K.; FUJII, A.; NAGANO, M.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 109, n. 4, p. 79-87, 2006.

HERNÁNDEZ, M.R.; GAIME PERRAUD, I.; FAVELA, E.; RAMAKRISHNA, M.; RAIMBAULT, M.; VIVIEGRA-GONZÁLEZ, G. Biotechnological management of coffee pulp – isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 42, n. 1, p. 756-762, 1995.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T.; **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams Wilkins, 1994. 787 p.

INFORME ESTATÍSTICO DO CAFÉ. **Dados Estatísticos**. 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Dados estatísticos**. 2008. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em 10 dez. 2008.

ISENEGGER, D.A.; TAYLOR, P.W.J.; MULLINS, K.; MCGREGOR, G.R.; BARLASS, M.; HUTCHINSON, J.F. Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilus* in symptom less potato plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 2, p. 814-820, 2003.

JEYARAM, K.; SINGH, W.M.; PREMARANI, T.; DEVI, A.R.; CHANU, K.S.; TALUKDAR, N.C.; SINGH, M.R. Molecular identification of dominant microflora associated with 'Hawaijar' – A tradicional fermented soybean (*Glycine max* (L.)) food of Manipur, India. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 122, n. 2, p. 259-268, 2008.

KLICH, M.A. Morphological Studies of *Aspergillus* Section *Versicolores* and related Species. **Mycologia**, New York, v. 85, n. 1, p. 100-107, 1993.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 87 p.

LECHNER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Canada, v. 48, n. 2, p. 1373-1382, 1998.

LOPEZ, I.; RUIZ-LARREA, F.; COCOLIN, L.; ORR, E.; PHISTER, T.; MARSHALL, M.; VANDERGHEYNST, J.; MILLS, D.A. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 69, n. 4, p. 6801-6807, 2003.

MALTA, M.R.; CHAGAS, S.J. de R.; OLIVEIRA, W.M. de. Composição físico-química e qualidade do café submetido a diferentes formas de pré-processamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 12, n. 6, p. 37-41, 2003.

MASOUD, W.; CESAR, L.B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by

genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, New York, v. 21, n. 1, p. 549-556, 2004.

MASOUD, W.; JESPERSEN, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 110, n. 1, p. 291-296, 2006.

MASOUD, W.; KALTOFT, C.H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 106, n. 1, p. 229-234, 2006.

MAZZAFERA, P.; GUERREIRO FILHO, O. Ultraviolet HPLC derived profiles as a tool in *Coffea* taxonomy. **Journal of Comparative Biology**, New Jersey, v. 3, n.2, p. 15-20, 1998.

MENCHÚ, J.F.; ROLZ, C. Coffee fermentation technology. **Cafe Cacao Tea**, França, v. 17, n. 1, p. 53-61, 1973.

MENDONÇA, L.M.V.L.; PEREIRA, R.G.F.A.; MENDES, A.N.G. Parâmetros bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café *Coffea Arabica* (L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 239-243, 2005.

MENEZES, H.C. The relationship between the state of maturity of raw coffee beans and the isomers of caffeoylquimic acid. **Food Chemistry**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 50, n. 3, p. 293-296, 1994.

MIAMBI, E.; GUYOT, J.P.; AMPE, F. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 82, n. 2, p. 111-120, 2003.

MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 1, p. 969-973, 1983.

MOREIRA, J.L.S. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S–23S rRNA restriction profiling. **MBC Microbiology**, New York, v. 5, n. 1, p. 15, 2005.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, New York,, v. 59, n. 1, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, New York, v. 73, n. 2, p. 127-141, 1999.

NASCIMENTO, L.C. do; LIMA, L.C. de O.; PICOLLI, R.H.; FIORINI, J.E.; DUARTE, S.M.; SILVA, J.M.S.F. da; OLIVEIRA, N. de M.; VEIGA, S.M. de O.M. Ozônio e ultra-som: processos alternativos para o tratamento do café despulpado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 282-294, 2008.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. **Fusarium species – an illustrated manual for identification**. EUA: Oxford, 1983. 193 p.

NIELSEN, D.S.; TENIOLA, O.D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T.S.; HOLZAPFEL, W.H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 114, n. 1, p. 168-186, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo, 1985. v. 1, 330 p.

OUOBA, L.I.I.; DIAWARA, B.; AMOA-AWUA, W.K.; TRAORE, A.S.; MOLLER, P.L. Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 90, n. 1, p. 197-205, 2004.

OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, n. 2, p. 367-335, 1997.

PERDERSON, C.S.; BREED, R.S. **Fermentation of coffee**. Oxford: Food Research, 1946. v. 11, 99 p.

PEREIRA, R.G.F.A.; BORÉM, F.F.; VILLELA, T.C.; BARROS, E.B. Avaliação da composição química de cafés (*Coffea arabica* L.) da região do alto do Rio Grande – Sul de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2000, Vitória. **Anais...** Vitória: IAC, 2000, p. 321-324.

PIMENTA, C.J. Qualidade de café. Lavras, MG: UFLA, 2003. 297 p.

PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 3.ed. Australia: North Ryde, 2000. 197 p.

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

PONTING, J.D.; JOSLING, M.A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. **Archives of Biochemistry**, New York, v. 19, n. 1, p. 47-63, 1948.

RANDAZZO, C.L.; TORRIANI, S.; AKKERMANS, A.D.L.; DE VOS, W.M.; VAUGHAN, E.E. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 68, n. 2, p. 1882-1892, 2002.

REIS, JÚNIOR, F.B. dos.; TEIXEIRA, K.R. dos S.; REIS, V.M. Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *brachiaria*. Distrito Federal, Embrapa Cerrados, 2004. 41 p.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Genetic diversity of nifH sequences in Paenibacillus azotofixans strains and soil samples analysed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 2770-2779, 1998.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 135-147, 1997.

SALAZAR, G.M.R.; RIAÑO, H.N.M.; ARCILA, P.J.; PONCED, C.A. Estudio morfológico, anatómico y ultraestructural del fruto de café *Coffea arabica* L. **Cenicafé**, Colômbia, v. 45, n. 3, p. 93-105, 1994.

SAMSON, R.A. **Introduction to food-and air borne fungi**. 7.ed. The Netherlands: CBS, 2004. 389 p.

SILVA, C.F.; BATISTA, L.R.; ABREU, L.M.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. Sucession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 60, n. 1, p. 251-260, 2000.

SILVA, C.F.; BATISTA, R.F.; SCHWAN, R.F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea Arabica*) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 521-526, 2008a.

SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Kidlington Oxford, United Kingdom, v. 25, n. 1, p. 951-957, 2008b.

SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbiota presente em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) despulpado e natural: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 1, p. 22-28, 2003.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998, 392 p.

SIQUEIRA, H.H. de; ABREU, C.M.P. de. Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 112-117, 2006.

SMIT, M.T. *Hanseniaspora zikes*. In: **The yeasts, a taxonomic study**. Elsevier Science: Amsterdam, 1997. p. 214-220,

SOUTHGATE, D.A.T. **Determination of foods carbohydrates**. London: Elsevier Applied Science, 1991. 232 p.

VAN PEE, W.; CASTELEIN, J.M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. **Journal of Food Science**, New York, v. 37, n. 1, p. 171-174, 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. 2, p. 12-57, 1958.

VILAS BOAS, B.M.; LICCIARDI, R.; MORAES, A.R. de; CARVALHO, D.D. de. Qualidade do café submetido a diferentes tipos de processamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 1169-1173, 2001.

WATTIAU, P. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of waste water treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 2, p. 816-819, 2001.

WINTGENS, J.N. **Coffee**: growing, processing, sustainable production. Weinheim: Oxford, 2004. 711 p.

WOOTON, A.E. The fermentation of coffee: part I. **Kenya Coffee**, Kenya, v. 28, n. 331, p. 239-249, 1963.

WU, X.; WALKER, M.J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. Development of a groupspecific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**, New York, v. 64, n. 1, p. 107-119, 2006.

ZHANG, Y.C.; RONIMUS, R.S.; TURNER, N.; ZHANG, Y.; MORGAN, H.W. Enumeration of thermophilic *Bacillus* species in composts and identification with a Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD). **Protocol Systematic Applied Microbiology**, Canada, v. 25, n. 1, p. 618-626, 2002.