



**DANIELLE MARQUES VILELA**

**SELEÇÃO IN VITRO DE CULTURAS  
INICIADORAS PARA FERMENTAÇÃO DE  
FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)  
PROCESSADOS VIA SECA E SEMI-SECA**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**DANIELLE MARQUES VILELA**

**SELEÇÃO IN VITRO DE CULTURAS INICIADORAS PARA  
FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)  
PROCESSADOS VIA SECA E SEMI-SECA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS - MG**

**2011**

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

Vilela, Danielle Marques.

Seleção in vitro de culturas iniciadoras para fermentação de  
frutos de café (*Coffea arabica* L.) processados via seca e semi-seca /  
Danielle Marques Vilela. – Lavras : UFLA, 2011.

80 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Leveduras. 2. Bactérias. 3. Pectnase. 4. Processamento do café.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.933

**DANIELLE MARQUES VILELA**

**SELEÇÃO IN VITRO DE CULTURAS INICIADORAS PARA  
FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)  
PROCESSADOS VIA SECA E SEMI-SECA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 31 de março de 2011.

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista	UFLA
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dra. Carla Luiza da Silva Ávila	UFLA
Dra. Lilian Pantoja	UFVJ
Dra. Larissa Lagoa Furtini	UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2011**

## **DEDICO**

*Àquele ao qual devemos toda honra e toda glória.*

*“Tudo posso Naquele que me fortalece”*

(Ep. 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 a 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 14 anos, por estar sempre presente, paciente e por me impulsionar a sempre crescer, nunca desanimar e atingir meus objetivos.

As 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, Vinicius, José Henrique, Ludmilla, Tales, Renan, Gabriela, Mariana, Otávio, Gabriel, Melissa, Lavínia, Ana Júlia 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, pela compreensão e confiança.

À Dra. Cristina Ferreira Silva e ao Dr. Disney Ribeiro Dias, pela orientação, por toda experiência transmitida e pela parceria.

Aos alunos de iniciação científica, Cecília de Souza Cordeiro, Lineker Alves e Lívia Teixeira e aos alunos de doutorado, Whasley Ferreira Duarte e Vanessa Mesquita, por auxiliaram na execução do experimento.

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 doutorado.

À Capes, pela bolsa de estudos concedida e ao CNPq, pelo financiamento do projeto.

Aos meus colegas de convívio diário no laboratório, pelo companheirismo e momentos de descontração.

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

A todos que torcem por mim!

## RESUMO GERAL

O café é uma *commoditie* de grande importância econômico-social para o setor agrícola brasileiro. No entanto, variações na qualidade desse produto fizeram com que o mesmo sofresse uma desvalorização no mercado internacional. As etapas pré e pós-colheita do café influenciam diretamente a qualidade final da bebida e o processamento dos frutos uma das etapas pós-colheita de grande importância para a obtenção de bebidas de qualidade. Durante o processamento do café, o grão é separado das demais partes constituintes do fruto, possibilitando a redução do seu conteúdo de água de 65% para um grau de umidade entre 10% e 12%. Existem três tipos de processamento: via seca, semiseca e úmida. A escolha do tipo de processamento a ser utilizado dependerá, principalmente, das condições de capitalização do produtor, da quantidade produzida e do tipo de bebida desejado. Durante os três tipos de processamento, os frutos estão expostos a uma diversidade de microrganismos, tais como leveduras, fungos filamentosos e bactérias, sendo alguns relatados como de importância na fermentação do café. Microrganismos que apresentem alta atividade de pectinases são de grande importância no processo de fermentação e representam potencial para serem utilizados como culturas iniciadoras para a padronização do processo de fermentação do café.

**Palavras-Chave:** Café, culturas iniciadoras, fermentação do café e pectinases.

## GENERAL ABSTRACT

Coffee is a commodity of great economic importance for the social-Brazilian agricultural sector; however, variations in the quality of the product might lead it to suffer devaluation in the international market. The pre-and post-harvesting directly influence the final quality of the coffee beverage. During processing, the coffee bean is separated from the other constituent parts of the fruit, allowing the reduction of water content from 65% to moisture content between 10 and 12%. There are three types of processing: dry, semi-dry and wet, and the choice of type of processing to be used depend mainly on the farmer conditions. Coffee beans are exposed to contamination of a diversity of microorganisms such as yeasts, filamentous fungi and bacteria, and some of them are reported as important during coffee fermentation. Pectinolytic microorganisms are of great importance in the fermentation process and represent potential to be used as starter cultures for the standardization of the fermentation process the coffee and consequently coffee quality.

**Keywords:** Coffee, fermentation of coffee, pectinases and starter cultures.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....</b>	12
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	14
<b>2.1</b>	<b>Café.....</b>	14
<b>2.1.1</b>	<b>Cafeicultura brasileira.....</b>	14
<b>2.1.2</b>	<b>Composição química do café.....</b>	16
<b>2.2</b>	<b>Processamento do café.....</b>	18
<b>2.2.1</b>	<b>Processamento via seca.....</b>	19
<b>2.2.2</b>	<b>Processamento via úmida.....</b>	20
<b>2.2.3</b>	<b>Processamento via semi-seca.....</b>	22
<b>2.3</b>	<b>Microbiota presente no processamento de café .....</b>	23
<b>2.3.1</b>	<b>Bactérias.....</b>	23
<b>2.3.2</b>	<b>Fungos leveduriformes .....</b>	24
<b>2.3.3</b>	<b>Fungos filamentosos.....</b>	25
<b>2.4</b>	<b>Qualidade do café.....</b>	27
<b>2.4.1</b>	<b>Fatores que afetam a qualidade do café.....</b>	28
<b>2.5</b>	<b>Enzimas pécticas.....</b>	29
<b>2.5.1</b>	<b>Classificação das pectinases.....</b>	30
<b>2.5.1.1</b>	<b>Desesterificantes.....</b>	30
<b>2.5.1.2</b>	<b>Despolimerizantes.....</b>	30
<b>2.5.2</b>	<b>Pectinases na fermentação do café.....</b>	32
<b>2.6</b>	<b>Uso de culturas iniciadoras em alimentos fermentados.....</b>	34
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	38
	<b>CAPÍTULO 2 - Seleção in vitro de culturas iniciadoras para a fermentação de frutos de café (Coffea arabica L.) processados via seca e semi-seca.....</b>	45

	<b>RESUMO.....</b>	46
	<b>ABSTRACT.....</b>	47
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	48
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	49
<b>2.1</b>	<b>Microrganismos.....</b>	49
<b>2.2</b>	<b>Seleção dos isolados pectinolíticos.....</b>	49
<b>2.3</b>	<b>Identificação molecular dos isolados pectinolíticos selecionados.....</b>	50
<b>2.4</b>	<b>Produção de pectinases em meio contendo pectina sintética (MPS).....</b>	51
<b>2.5</b>	<b>Produção de pectinases em meio contendo casca e polpa de café (MPS).....</b>	51
<b>2.5.1</b>	<b>Formulação do meio contendo casca e polpa de café (MCP)</b>	51
<b>2.6</b>	<b>Atividade de pectinases.....</b>	52
<b>2.6.1</b>	<b>Atividade de pectina liase.....</b>	53
<b>2.6.2</b>	<b>Atividade de poligalacturonase.....</b>	53
<b>2.6.3</b>	<b>Atividade de pectina metilesterase.....</b>	54
<b>2.6.4</b>	<b>Proteínas totais.....</b>	54
<b>2.7</b>	<b>Análise do perfil de fermentação em meio MCP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	54
<b>2.8</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	55
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	56
<b>3.1</b>	<b>Seleção dos isolados a partir dos testes semi-qualitativos.....</b>	56
<b>3.2</b>	<b>Caracterização físico-química da casca e polpa de café.....</b>	62
<b>3.3</b>	<b>Secreção de PL, PME e PG por bactérias e leveduras em meios MPS e MCP.....</b>	63
<b>3.4</b>	<b>Seleção de cultura iniciadora para a fermentação do café.....</b>	66
<b>3.5</b>	<b>Análise dos perfis de fermentação por CLAE.....</b>	70

<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

**CAPITULO 1**  
**Introdução Geral**

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém o título de maior produtor e exportador de café do mundo, tendo a safra de 2010/2011 se aproximado de 48 milhões de sacas, de acordo com dados da Organização Internacional de Café, a OIC (2011). Porém, as variações na qualidade do produto resultaram na baixa valorização e, conseqüentemente, na perda de espaço comercial nos mercados internacionais. O aumento no consumo de café, aliado à busca incessante pela qualidade, é um dos grandes desafios desse setor (BORÉM, 2008).

Dois espécies de café têm importância comercial: *Coffea arabica* e *Coffea canephora robusta*, conhecidas como arábica e robusta. Cerca de 2/3 da espécie *Coffea arabica* cresce principalmente na América do Sul, na América Central e no leste da África (origem deste café). Os outros 1/3 crescem principalmente na África e na Ásia. Alguns países exportam uma quantidade substancial das duas espécies, como, por exemplo, Brasil, Equador e Índia. A maioria dos cafés comercialmente disponível consiste de grãos pertencentes à variedade arábica, robusta ou à mistura destas duas. Os frutos de café podem ser processados de três diferentes maneiras: via seca, originando os cafés naturais; via semiseca, originando os cafés despolpados e via úmida, originando os cafés descascados, despolpados ou desmucilados, dependendo da parte do fruto removida (OIC, 2011).

A microbiota presente durante todas as etapas pré e pós-colheita do café é diversa, composta de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Esses microrganismos têm influência direta na qualidade da bebida de café, seja pela degradação de compostos presentes nos grãos ou pela excreção de metabólitos que difundem para o interior dos grãos. O conhecimento da microbiota do café, bem como o entendimento do seu papel no processo de fermentação dos frutos, é de grande importância para se obter o produto final de qualidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Café

#### 2.1.1 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 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. arabica* 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 (OIC, 2011).

Atualmente, o café é uma das mais importantes fontes de divisas para o nosso país, principal produtor e exportador mundial. A previsão para a safra 2010/2011 do Brasil é de 48 milhões de sacas (60 kg), correspondentes a mais de 30% da produção mundial, de acordo com levantamento da safra feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (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 (48 milhões de sacas, arábica e robusta), Vietnã (18 milhões de sacas, robusta) e Indonésia (9,5 milhões de sacas, arábica) (Figura 1) (BRASIL, 2011; OIC, 2011).

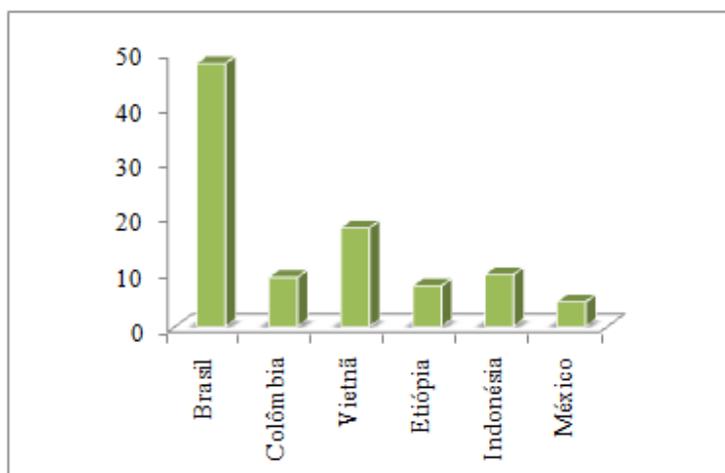


Figura 1 Produção de café pelos países maiores produtores (Safras 2010-2011)  
Fonte: Brasil (2011)

No Brasil, o café é produzido em 11 estados e em 1.850 municípios. Possui 2,3 milhões de hectares plantados e a produtividade média é de 21,63 sacas por hectare. Os principais estados produtores e a previsão de safra 2010/2011 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 (BRASIL, 2011; OIC, 2011).

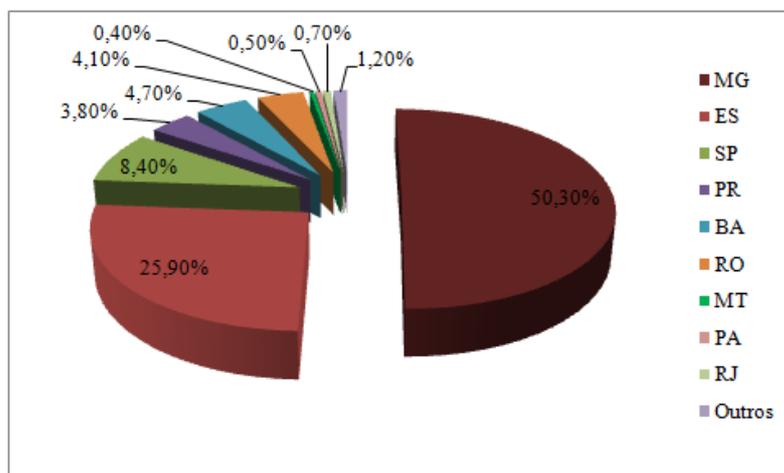


Figura 2 Previsão de produção de café na safra 2010-2011 pelos estados brasileiros

Fonte: Brasil (2011)

### 2.1.2 Composição química do café

O fruto de café é constituído de seis partes: casca (exocarpo), polpa (endocarpo), mucilagem (mesocarpo), pergaminho (espermoderma) e semente (endosperma), que constitui o grão propriamente dito (Figura 3) (SALAZAR et al., 1994; SCHWAN; WHEALS, 2003).

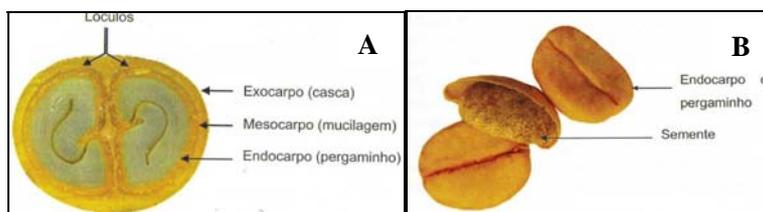


Figura 3 Cortes longitudinais de um fruto de café no estágio cereja (A) e do grão (B)

Fonte: Borém et al. (2008)

A polpa de café é o primeiro produto que se obtém do processamento do grão de café e representa, em base seca, cerca de 29% do peso do fruto integral. A polpa de café consiste de 76% de água, 10% de proteína, 2% de fibra, 8% de sais minerais e 4% de diferentes materiais solúveis e insolúveis, como pectina, taninos, açúcares redutores e não redutores, cafeína, ácidos clorogênico e cafeico, celulose, hemicelulose, lignina e aminoácidos (ELIAS, 1978).

A mucilagem está localizada entre a polpa e o grão de café. Representa cerca de 5% do peso seco do fruto (BRESSANI; JOAQUIN, 1972) 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 um sistema de hidrogel incolor, mas, quando exposta ao ar, torna-se escura, como resultado das reações enzimáticas oxidativas (AMORIM; AMORIM, 1977). Consiste de água, ácido pécico, conteúdos pequenos de arabinose, galactose, xilose, ramnose e ácidos orgânicos (ELIAS, 1978). A constituição polissacarídica da mucilagem é a seguinte: 30% de substâncias pécticas, 8% de celulose e 18% de polissacarídeos não-celulósicos (AVALLONE et al., 2001), constituindo um excelente meio de cultura para o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (AMORIM, 1968). As características físico-químicas da mucilagem são essenciais para um entendimento da fermentação do café.

De modo geral, a semente (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). A qualidade sensorial da bebida de café está relacionada diretamente com a composição química dos grãos (Tabela 1) (MAZZAFERA; GUERREIRO FILHO, 1998).

Tabela 1 Constituição química do grão de café seco

<b>Constituição química</b>	<b>%</b>
Carboidratos	60
Óleos	13
Proteínas	13
Ácidos	8,2
Cafeína	1

Fonte: Menezes (1994)

## **2.2 Processamento do café**

O processamento do café visa, basicamente, separar os grãos das camadas externas (casca, polpa, mucilagem e pergaminho), 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 má condução do 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). A fermentação do café é o processo pelo qual casca, polpa e/ou mucilagem são degradados por enzimas que ocorrem naturalmente no café e/ou são elaboradas pela sua microbiota natural. Posteriormente, o grão é submetido à secagem até uma umidade de 10%-11% (SCHWAN; WHEALS, 2003).

Existem três tipos de processamento: via seca, que produz o café natural, e vias semisseca que produz o café despulpado e via úmida, que produz os cafés descascado, despulpado e desmucilado. No processamento via seca, o café é seco com todas as suas partes constituintes. No processamento via úmida originam-se: i) cereja descascado - a casca e a 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 - é obtido com a retirada total da casca e da mucilagem por meio de máquinas conhecidas como desmuciladores (PIMENTA, 2003).

O método de processamento via semisseca, é uma variação do processamento via úmida. Neste tipo de processamento, os frutos são despulpados mecanicamente e o processo de fermentação ocorre diretamente no terreiro (VILELA et al., 2010).

### **2.2.1 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 (casca, polpa, mucilagem, pergaminho, película prateada e semente) e sofre variações dependendo do tamanho da plantação, das condições microclimáticas, das instalações disponíveis e da qualidade final desejada (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 boias), muita das vezes por um separador

hidráulico (SILVA et al., 2000). Após a separação e a 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 (Figura 4).

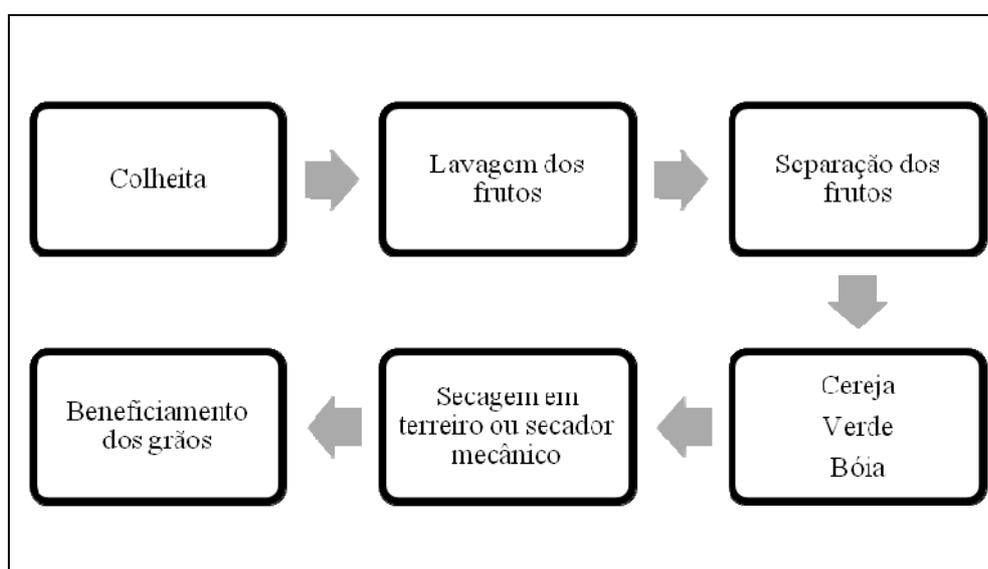


Figura 4 Fluxograma simplificado do processamento via seca do café. Adaptado de Borém (2008)

### 2.2.2 Processamento via úmida

Esse tipo de processamento surgiu não como 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 quente, 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).

O processamento por via úmida inclui as seguintes etapas: colheita de grãos no estágio cereja; lavagem e seleção dos grãos flutuantes, que serão processados separadamente; descascamento, despulpamento ou desmucilagem dos frutos; fermentação ou uso de enzimas comerciais ou substâncias químicas para retirada da mucilagem aderida ao grão; lavagem para remoção do restante da mucilagem, e secagem e beneficiamento dos grãos (Figura 5).

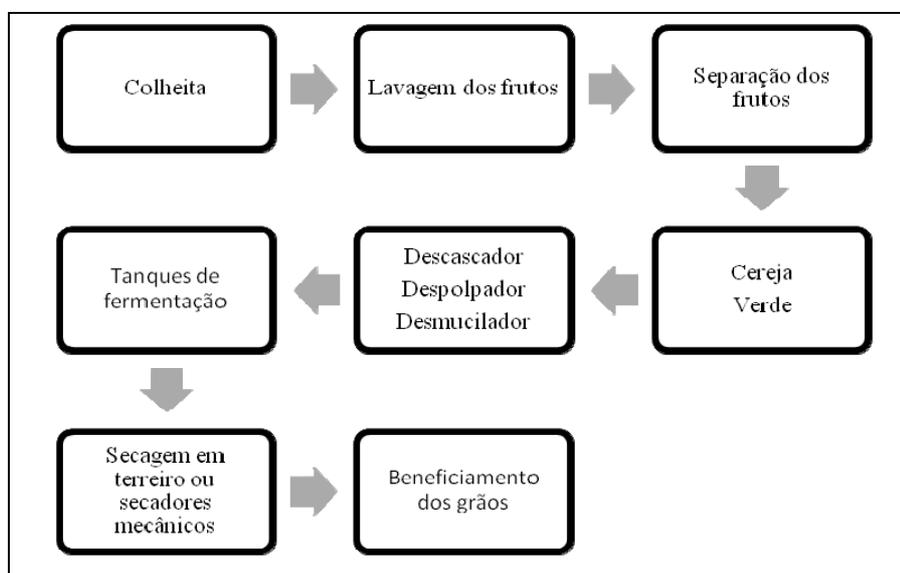


Figura 5 Fluxograma simplificado do processamento via úmida do café.  
Adaptado de Borém (2008)

De acordo com Bártholo e Guimarães (1997), entre as vantagens do café processado via úmida 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 maquinário específico (despolpador ou desmucilador) onera o processo e muitos produtores produzem cafés apenas descascados, nos quais o grão, com a polpa e a mucilagem, é levado para o terreiro para a secagem.

### 2.2.3 Processamento via semiseca

O processamento via semiseca é adotado por alguns produtores no Brasil e representa uma variação do processamento via úmida. Por meio dele, os frutos são despulpados e a fermentação da mucilagem ocorre diretamente no terreiro, sem a utilização de tanques de fermentação (VILELA et al., 2010) (Figura 6).

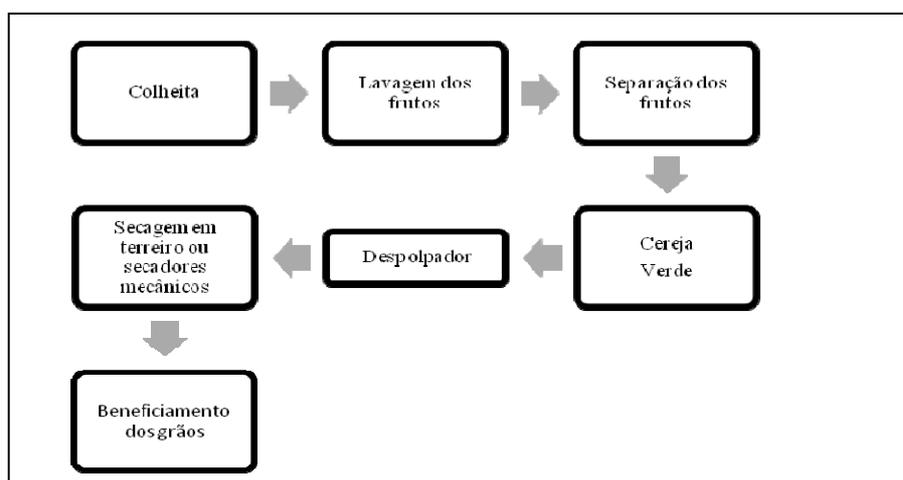


Figura 6 Fluxograma simplificado do processamento via semiseca do café (VILELA et al., 2011)

## 2.3 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 microbiana 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).

### 2.3.1 Bactérias

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

*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 cafês naturais (SILVA et al., 2008).

*Erwinia herbicola*, *Klebsiella pneumoniae* e *Lactobacillus brevis* são bactérias pectinolíticas e já isoladas durante a fermentação de café despolpado e processado via úmida (AVALLONE et al., 2001, 2002).

*Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. macerans* e *Lactobacillus plantarum* foram bactérias predominantes durante todo o processo de fermentação de cafês despolpados no Brasil (VILELA et al., 2010).

### 2.3.2 Fungos leveduriformes

Agate e 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* e *S. cerevisiae*. Eles atribuíram a ação das pectinases sobre a pectina da mucilagem do café à atividade microbiana leveduriforme.

Pee e Castelein (1972) identificaram leveduras do gênero *Candida*, sendo *C. guilliermondii* na superfície e mucilagem dos grãos, e *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. (2008), 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 polymorpus*, *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 de 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.

*Pichia anomala* é uma espécie frequentemente encontrada durante a fermentação de café processado tanto por via seca quanto úmida (MASOUD et al., 2004; SILVA et al., 2000, 2008; VILELA et al., 2010). Essa espécie é relatada como importante na fermentação do café, já que apresenta atividade de pectina liase e de poligalacturonase. *Hanseniaspora uvarum* também já foi isolada de café via úmida e apresenta atividade de poligalacturonase (MASOUD; JESPERSEN, 2006), indicando a possibilidade de também estar envolvida na utilização da pectina da polpa e mucilagem do café.

*Pichia anomala*, *Torulaspota delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces bayanus*, *Hanseniaspora uvarum* e *Kloeckera* sp. foram espécies de leveduras predominantes durante o processo de fermentação de cafés despulpados (VILELA et al., 2010).

### 2.3.3 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; BRUCE; GIBSON, 1983), *Aspergillus* (AMORIM; MELLO, 1991; BATISTA et al., 2003, 2008; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2000), *Cladosporium* (BATISTA et al., 2003, 2008; BITANCOURT et al., 1957; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2000), *Fusarium* (AMORIM; MELLO, 1991; BATISTA et al., 2003, 2008; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2000) e *Penicillium* (BATISTA et al., 2003, 2008; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2000).

Bitancourt et al. (1957), visando determinar os microrganismos que constituem a microbiota do café cereja em diferentes fases do preparo, no cafezal e no terreiro de secagem, isolaram e observaram 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 despolpado (VAUGHN et al., 1958).

Um estudo da microbiota em oitenta 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; CHALFOUN; CHAGAS, 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 pertenciam ao gênero *Aspergillus* (SILVA et al., 2000). Silva, Batista e Schwan (2008), estudando a incidência de fungos filamentosos em processamento de cafés naturais, verificaram que o gênero *Aspergillus* foi o de maior incidência, seguido pelos gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*.

Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de detectar micotoxinas em grãos beneficiados de café e há relatos de 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*.

*A. tubingensis*, *A. versicolor*, *C. cladosporioides*, *Aspergillus* sp. e *P. decumbens* foram os fungos filamentosos de maior ocorrência durante o processamento do café despulpado (VILELA et al., 2010). Neste mesmo trabalho, dentre as espécies micotoxigênicas já relatadas na literatura, somente *A. ochraceus* foi detectada, indicando que o processamento via semiseca minimizou a colonização de fungos toxigênicos no café.

## 2.4 Qualidade do café

A qualidade do café pode ser definida como um conjunto de atributos físicos, sensoriais e de segurança que atenda a diversos tipos de consumidores. A qualidade do café está diretamente relacionada aos diversos constituintes físicos e físico-químicos, que são responsáveis pela aparência do grão torrado, pelo

sabor e aroma característico das bebidas, destacando entre estes constituintes os compostos voláteis, fenólicos (ácido clorogênico), ácidos graxos, proteínas, açúcares, acidez, índice de coloração, degradação da parede celular dos grãos com consequentes alterações em seus constituintes e algumas enzimas, cuja presença, teores e atividade conferem ao café sabor e aroma peculiares (PIMENTA, 2003).

As transformações químicas que ocorrem no grão de café, proporcionando, com isso, qualidade de bebida superior ou inferior, são principalmente de natureza enzimática. Essas enzimas são constituintes do próprio grão ou provenientes do metabolismo de microrganismos naturalmente presentes no grão. A microbiota do café é bastante diversa e sua atuação está diretamente relacionada a alguns sabores e aromas que afetam a característica da bebida de café (LIMA et al., 2008).

O odor característico do café é proporcionado pela presença de compostos voláteis, principalmente aldeídos, cetonas e ésteres metílicos, que são formados durante a torração e ficam retidos na estrutura celular dos grãos torrados. As gorduras desempenham importante papel na retenção desses compostos, uma vez que, durante o processo de torração, elas migram para a superfície desses grãos, atuando como barreira na saída dos compostos acima mencionados e apresentando características voláteis (LIMA et al., 2008).

#### **2.4.1 Fatores que afetam a qualidade do café**

O sabor agradável que é característico do café é devido à presença de vários constituintes químicos voláteis e não-voláteis, como proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos e também à ação de enzimas sobre alguns desses constituintes, o que gera como produto de reações,

compostos que interferem no sabor e no odor (SANTOS; CHALFOUN; PIMENTA, 2009).

A qualidade do café está diretamente relacionada aos fatores da pré e pós-colheita, tais como espécies e variedades de café, local de cultivo, maturação dos grãos, incidência de microrganismos, efeito de adubações na qualidade da bebida, fermentação enzimática e microbiana, armazenamento do café beneficiado, misturas de café e torração do café. Os fatores que têm sido considerados os mais limitantes na produção de cafés de boa qualidade são o estágio de maturação dos frutos na ocasião da colheita e fatores que favorecem a ocorrência de fermentações indesejáveis (principalmente acética e butírica) (BORÉM, 2008).

## **2.5 Enzimas pécticas**

Pectinase é um nome genérico para uma família de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas em polímeros pécticos (REID; RICARD, 2000). Diversas aplicações industriais, principalmente em indústrias de alimentos, incluem as pectinases. Além da aplicação industrial, as pectinases formam a primeira classe de enzimas produzidas durante a infecção da planta por microrganismos, o que proporciona a rápida degradação da parede celular e a morte da célula vegetal (ALGHISI; FAVARON, 1995).

Em razão da grande diversidade de substâncias pécticas presentes em diferentes tecidos vegetais, existem várias enzimas capazes de degradar essas substâncias. As pectinases são um complexo de enzimas que degradam a pectina, um polissacarídeo constituinte da parede celular de plantas. Esse complexo enzimático inclui pectina liase, pectato liase, poligalacturonas e pectinesterase (WHITAKER, 1984). Na indústria de alimentos, as pectinases são usadas no processamento de frutas e vegetais, na produção de vinhos, na

extração de óleo de oliva e na fermentação de chá, café e cacau (PICCOLI-VALLE et al., 2001).

### **2.5.1 Classificação das pectinases**

Devido à grande diversidade de pectinas presentes nos tecidos de plantas, as pectinases possuem diferentes mecanismos de ação sobre a estrutura poligalacturônica da molécula do substrato, podendo, então, ser classificada em dois grandes grupos, segundo seu mecanismo de ação: enzimas desesterificantes e despolimerizantes (MALVESSI; SILVEIRA, 2004).

#### **2.5.1.1 Desesterificantes**

a) Pectina metilesterase (PME), pectina metoxilase ou pectina desmetoxilase, essa enzima desesterifica o grupo metoxil da pectina, formando ácido pectico e metanol. Ela desempenha importante papel na natureza, por variar as características da pectina, alterando o grau de esterificação, bem como degradando o polímero pectico. A enzima pectina metilesterase é de grande importância na primeira separação da cadeia de pectina, pois a pectina de baixa metoxilação liberada dessa reação pode ser hidrolisada pelas enzimas poligalacturonase e pectato liase (CELESTINO et al., 2006).

#### **2.5.1.2 Despolimerizantes**

Promovem a clivagem das ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) e são classificadas conforme: a especificidade da enzima pelo substrato (pectina ou ácido pectico), a posição de clivagem na cadeia principal das substâncias pecticas, a atuação ao acaso (endoenzima) ou a partir da extremidade não redutora do substrato

(exoenzima) e o mecanismo de reação de despolimerização (clivagem por  $\beta$ -eliminação ou hidrólise do substrato) (PARDO; LAPENA; GACTO, 1991; SAKAI; SAKAMOTO; HALLAERT, 1993).

a) Poligalacturonase (PG): são hidrolases que catalisam a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, atuando mais em pectato que em pectina e resultam em mono e dissacarídeos. De acordo com o mecanismo de ação sobre o substrato podem ser classificadas em:

a.1) endopoligalacturonase: promove a hidrólise ao acaso da cadeia de pectato. A hidrólise do pectato ou de porções não esterificadas da cadeia de poligalacturonatos pela endopoligalacturonase produz uma série de oligogalacturonatos;

a.2) exopoligalacturonase: hidrolisa a cadeia de pectato a partir da extremidade não redutora. Sua ação sobre a molécula de pectato provoca a rápida liberação de grupos redutores;

b) transeliminase ou liase: catalisa a quebra não hidrolítica de pectatos, atuando na clivagem de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) entre resíduos de ácido galacturônico adjacentes por  $\beta$ -eliminação e gerando duplas ligações entre os carbonos 4 e 5 do produto. As liases são classificadas em pectina liase ou pectato liase, de acordo com o substrato sobre o qual atuam;

b.1) pectina liase (PL): Atua na pectina catalisando a sua quebra por transeliminação, liberando ácido galacturônico insaturado. As liases são divididas em endopectina liase e exopectina liase;

b.2) pectato liase (PAL): libera galacturonato a partir de pectato e outros poligalacturonídeos;

c) protopectinase: solubiliza protopectina, formando pectina polimerizada altamente solúvel.

### **2.5.2 Pectinases na fermentação do café**

Pectinases são importantes na fermentação de café, pois aceleram o processo de fermentação, melhorando a qualidade do produto final. Enzimas pécticas são adicionadas para remover a camada de mucilagem do grão, constituída de três quartos de substâncias pécticas. Celulases, pectinases e hemicelulases, presentes em preparações comerciais, são aspergidas nos grãos, acelerando o processo de fermentação. Como o tratamento dos grãos de café em larga escala com enzimas comerciais é custoso e não econômico, são utilizadas enzimas pécticas microbianas obtidas da fermentação de resíduos da mucilagem (KASHYAP et al., 2001; SILVA et al., 2000).

Diversos microrganismos isolados de diferentes tipos de processamento do café são relatados como produtores de enzimas pécticas, podendo, portanto, atuar na degradação da pectina durante a fermentação dos frutos (Tabela 2).

Tabela 2 Microrganismos pectinolíticos isolados de café

<b>Microrganismos</b>	<b>Enzimas pectinolíticas produzidas</b>	<b>Fonte</b>	<b>Referências</b>
<i>Erwinia dissolvens</i>	Pectina liase	Frutos de café	Frank, Lum e Dela-Cruz (1965)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>Schizosaccharomyces</i> sp.	Pectina liase	Durante o processamento via úmida do café.	Aghate e Bhat (1966)
<i>Rhodotorula</i> sp.	Poligalacturonase	Durante o processamento via seca do café	Vaughn et al. (1958)
<i>Bacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> e <i>Streptococcus</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>C.parapsilopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Torulopsis famata</i> , <i>S. marxianus</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> e <i>C. pelliculosa</i>	Pectina liase e poligalacturonase	Durante o processamento via seca do café	Pee e Castelein (1972)
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Pectina liase	Frutos de café	Sakiyama et al. (2001)
<i>Erwinia herbicola</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pectato liase	Durante o processamento via úmida do café	Avallone et al. (2002)
<i>Pichia anomala</i> e <i>P. kluyveri</i>	Poligalacturonase	Durante o processamento via úmida do café	Masoud e Jespersen (2006)

A pectina presente na mucilagem do café TEM alto grau de esterificação de grupos metil (superior a 70%) (SCHWAN; WHEALS, 2003). Portanto, somente enzimas pectinolíticas que sejam capazes de utilizar, em conjunto ou isoladamente, esse substrato são de importância na degradação da mucilagem. Microrganismos que apresentem alta atividade de pectina liase ou alta atividade de poligalacturonase e pectina metilesterase simultaneamente são de grande importância no processo de fermentação e têm potencial para serem utilizados como culturas iniciadoras para a padronização do processo de fermentação do café.

Na maior parte dos estudos realizados com o objetivo de buscar microrganismos pectinolíticos em café foram encontrados isolados que apresentavam baixas atividades de pectina liase ou altas atividades de poligalacturonase, a qual, isoladamente, não é a responsável pela degradação da mucilagem durante a fermentação do café. A busca por microrganismos com alta atividade de pectina liase e que atuem na degradação da mucilagem do café é o grande desafio para a padronização do seu processo fermentativo e, conseqüentemente, a obtenção de um produto final de melhor qualidade.

## **2.6 Uso de culturas iniciadoras em alimentos fermentados**

A produção de alimentos fermentados de boa qualidade depende da presença, do crescimento e do metabolismo de microrganismos específicos. Os microrganismos conferem características organolépticas diferenciadas ao alimento através de produtos oriundos do seu metabolismo (HUTKINS, 2006). Existem, essencialmente, três maneiras de induzir ou iniciar uma fermentação de alimento. O método mais antigo simplesmente depende dos microrganismos indígenas presentes na matéria-prima. O leite cru e a carne, por exemplo, costumam abrigar as bactérias necessárias para auxiliar na conversão desses

materiais em queijo e linguiça fermentada (HAMMES; HERTEL, 1998). Uvas e equipamentos de esmagamento da uva também contêm as leveduras responsáveis pela fermentação dos açúcares em etanol e, conseqüentemente, a transformação do suco de uva em vinho (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2004).

Para que estas fermentações naturais sajam bem sucedidas, não é necessário somente que os microorganismos corretos estejam presentes, mas também que as condições adequadas para o seu crescimento estejam estabelecidas. Mesmo que estes requisitos sejam atendidos, não há garantia de que o produto vá atender às expectativas de qualidade, seja seguro para o consumo ou, mesmo, que seja produzido com sucesso. Ainda assim, muitos alimentos são produzidos por fermentação natural, incluindo algumas linguiças, vinhos e picles.

Outra maneira de iniciar a fermentação de alimento consiste em adicionar uma parte do produto fermentado naturalmente (mosto) na matéria-prima para iniciar uma nova fermentação. Este processo funciona para quase todos os alimentos fermentados e ainda é comumente utilizado para a cerveja, alguns queijos e produtos lácteos fermentados, pão de massa azeda e vinagre. Além disso, esses métodos ainda são utilizados atualmente em instalações de pequena escala de produção, bem como em países menos desenvolvidos e em produtos artesanais (CAPLICE; FTIZGERALD, 1999).

A terceira maneira de se produzir alimentos fermentados se baseia na utilização de culturas iniciadoras de importância para a elaboração do produto. Culturas iniciadoras consistem em microrganismos que são inoculados diretamente na matéria-prima para que possam predominar sobre a microbiota existente, provocando alterações desejáveis no produto final. Essas alterações podem incluir funcionalidade ao alimento, preservação do alimento, redução dos riscos quanto à segurança alimentar, melhoria do valor nutricional do alimento,

incremento da qualidade sensorial e aumento do valor econômico do alimento (CAPLICE; FTIZGERALD, 1999).

O mais importante grupo de bactérias utilizadas como culturas iniciadoras na elaboração de alimentos fermentados é o das bactérias do ácido lático (BAL), as quais são incluídas em quatro gêneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (BUCKENHUSKES, 1993; SANDINE, 1996). As leveduras são largamente utilizadas como culturas iniciadoras de alimentos fermentados. *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie selecionada para a produção de pães, em grande parte pela sua habilidade em produzir grandes quantidades de dióxido de carbono rapidamente. Vinho, cerveja, cachaças e outras bebidas não alcoólicas também utilizam leveduras como culturas iniciadoras, principalmente *S. cerevisiae* (COGAN, 1996). Apenas alguns produtos fermentados utilizam fungos filamentosos na sua elaboração. Diversos tipos de queijos (como, por exemplo, roquefort, camembert e gorgonzola) utilizam fungos filamentosos na sua produção. Alimentos fermentados derivados de soja (tempeh e misô) têm fungos filamentosos como cultura iniciadoras em seu processo de fabricação (ROSS et al., 2000) (Tabela 3).

Tabela 3 Alguns dos microrganismos mais utilizados como culturas iniciadoras na elaboração de alimentos fermentados

<b>Microrganismos</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Bactérias</b>	
<i>Lactococcus lactis</i>	Queijos e produtos lácteos fermentados
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	Queijo, iogurte
<i>Lactobacillus sakei</i>	Linguiças
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Linguiças e picles
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Queijo, iogurte
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Linguiça e picles
<i>Leuconocstoc lactis</i>	Queijo e produtos lácteos fermentados
<i>Leuconocstoc mesenterioides</i> subesp. <i>cremoris</i>	Queijos, produtos lácteos fermentados e picles
<i>Brevibacterium linens</i>	Pigmentação da superfície de queijos
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Queijos
<b>Leveduras</b>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pães
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cerveja
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vinhos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cachaça
<b>Fungos Filamentosos</b>	
<i>Penicillium camemberti</i>	Superfícies de queijos brancos
<i>Penicillium roqueforti</i>	Superfície de queijos azuis
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Linguiça
<i>Aspergillus oryzae</i>	Molho de soja, misô
<i>Rhizopus microsporus</i> subesp. <i>oligosporus</i>	Tempê

Fonte: Ross et al. (2000)

## REFERÊNCIAS

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.

ALGHISI, P.; FAVRON, F. Pectin-degrading enzymes and plant-parasite interactions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, n. 4, p. 365-375, Aug. 1995.

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

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

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

AVALLONE, S. et al. Involvement of pectinolytic microorganisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, Davis, v. 37, n. 2, p. 191-198, Feb. 2002.

\_\_\_\_\_. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 4, p. 252-256, Sept. 2001.

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. et al. Ocratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2008.

\_\_\_\_\_. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 1, p. 293-300, Jan. 2003.

BIOSCI, M. A. **Biotechnology biochemical**. Cambridge: 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, n. 32, p. 1179-1184, 1957.

BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2004. 127 p.

\_\_\_\_\_. Processamento do café. In: \_\_\_\_\_. **Pós-colheita do Café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 129-156.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Informe estatístico do café**: dados estatísticos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 22 mar. 2011.

BRESSANI, R. E.; JARQUÍN, E. R. Pulpa y pergamino de café. **Turrialba**, San José, v. 22, p. 299-304, 1972.

BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 12, n. 1/3, p. 253-272, Sept. 1993.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 131-149, Sept. 1999.

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 CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. **Anais...** Rio de Janeiro: MAA/PROCAFÉ, 1989. p. 42-46.

CELESTINO, S. M. C. et al. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physiochemical properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 33-42, Mar. 2006.

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.

COGAN, T. M. History and taxonomy of starter cultures. In: COGAN, T. M.; ACCOLAS, J. P. (Ed.). **Dairy starter cultures**. New York: VCH, 1996. p. 1-23.

ELÍAS, L. G. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. (Ed.). **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Panamá: INCAP, 1978. p. 19-29.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 237, n. 2, p. 261-266, Aug. 2004.

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

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Science**, Barking, v. 49, p. S125-S138, 1998. Supplement.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and technology of fermented foods**. Oxford: Blackwell, 2006. 473 p.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 215-227, June 2001.

LIMA, M. L. et al. Preparo do café despulpado, cereja descascado e natural na região Sudoeste da Bahia. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 14, n. 3, p. 128-129, jul. 2008.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702, 2004.

MASOUD, W. et al. 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, Jan. 2004.

MASOUD, W.; JESPERSEN, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 110, n. 1, p. 291-296, Jan. 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, Apr. 1998.

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

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

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, Feb. 1983.

NASCIMENTO, L. C. do et al. 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, mar./abr. 2008.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE CAFÉ. **Dados estatísticos**. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em: 22 mar. 2011.

PARDO, C.; LAPENA, M. A.; GACTO, M. Purification and characterization of an extracellular exopolysaccharuronase from *Geotrichum lactis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 12, p. 974-977, Dec. 1991.

PEE, W. van; 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.

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

PICCOLI-VALLE, R. H. et al. Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* grown in sugar cane juice in repeated batch cultures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, n. 5, p. 433-437, Sept. 2001.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café**. Lavras: UFLA, 2003. 297 p.

REID, I.; RICARD, M. Pectinase in paper making, solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 26, n. 1, p. 115-123, Feb. 2000.

ROSS, R. P. et al. Novel cultures for cheese improvement. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 96-104, Mar. 2000.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 39, n. 1, p. 213-294, Apr. 1993.

SAKIYAMA, C. C. H. et al. Characterization of pectin lyase produced by endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 117-121, Apr. 2001.

SALAZAR, G. M. R. et al. Estudio morfológico, anatómico y ultraestructural del fruto de café *Coffea arabica* L. **Cenicafé**, Bogotá, v. 45, n. 3, p. 93-105, 1994.

SANDINE, W. E. Commercial production of dairy starter cultures. In: COGAN, T. M.; ACCOLAS, J. P. (Ed.). **Dairy starter cultures**. New York: VCH, 1996. p. 191-206.

SANTOS, M. A.; CHALFOUN, S. M.; PIMENTA, C. J. Influência do processamento por via úmida e tipos de secagem sobre a composição, físico química e química do café (*Coffea arabica* L). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 213-218, jan./fev. 2009.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. (Ed.). **Yeasts in food**. Hamburg: Behr's Verlag, 2003. p. 426-459.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; 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, Jan./Feb. 2008.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 251-260, Jan. 2000.

\_\_\_\_\_. 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.

\_\_\_\_\_. Sucession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 951-957, Feb. 2008.

VAUGHN, R. H. et al. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. **Food Technology**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 12-57, 1958.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

WHITAKER, J. R. Pectin substances, pectin enzyme and haze formation in fruit juice. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 6, n. 8, p. 341-349, Aug. 1984.

## **CAPÍTULO 2**

### **SELEÇÃO *IN VITRO* DE CULTURAS INICIADORAS PARA A FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PROCESSADOS VIA SECA E SEMISSECA**

## RESUMO

A busca por culturas iniciadoras para a padronização de processos fermentativos de produtos agroindustriais tem sido uma tendência crescente. O uso de culturas iniciadoras na fermentação de café, além de padronizar o processo, possibilita a melhoria da qualidade final da bebida. Quinze isolados (9 leveduras e 6 bactérias) do processamento via seca do café foram selecionados por apresentarem potencial de atividade pectinolítica. Os isolados selecionados foram cultivados em dois meios contendo pectina sintética (MPS) e casca e polpa de café (MCP) para a produção de pectina liase (PL), poligalacturonase (PG) e pectina metilesterase (PME). Durante a fermentação em meio MCP, foi analisado o perfil de fermentação dos quinze isolados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As leveduras se destacaram quanto à produção de PL nos dois meios testados em relação às bactérias selecionadas. Em geral, as atividades pectinolíticas dos isolados foram superiores no meio MPS em relação ao meio MCP. Os isolados *Saccharomyces cerevisiae* UFLACN724 e 727, *Pichia guilliermondii* UFLACN731 e *Candida parapsilosis* UFLACN448 apresentaram as maiores atividades de PL em meio MCP. Dentre as bactérias, *Bacillus megaterium* UFLACN415 e *B. cereus* UFLACN446 apresentaram as maiores atividades de PL no meio MCP. A produção de PME no meio MCP foi superior para os isolados *B. subtilis* UFLACN406 e 452 e *S. cerevisiae* UFLACN724, no entanto, nenhum isolado apresentou atividade significativa de PG (inferior a 84 U.mL<sup>-1</sup>). Os isolados *S. cerevisiae* UFLACN724 e 727, *P. guilliermondii* UFLACN731 e *C. parapsilosis* UFLACN448, além de apresentarem altas atividades de PL, foram eficientes no consumo da glicose, não produzindo ácido acético ao final da fermentação e representam, portanto, potenciais culturas iniciadoras para a fermentação do café.

**Palavras-Chave:** Bactérias, culturas iniciadoras, fermentação do café, leveduras e pectinases.

## ABSTRACT

The search for starter cultures for the standardization of fermentation processes agro-industrial products has been a growing trend. The use of starter cultures in fermentation of coffee and standardize the process, allows to improve the quality of the final beverage. Fifteen isolates (9 yeasts and bacteria) from the dry processing of coffee were selected for their potential for pectinolytic activity. The selected isolates were cultured in media containing two synthetic pectin (MPS) and coffee pulp and peel (MCP) for the production of pectin lyase (PL), polygalacturonase (PG) and pectin methylesterase (PME). During the fermentation using MCP analyzed the profiles of fermentation of the fifteen isolated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Yeasts stood out for production of PL in both media tested for the bacteria selected. In general, the activities of pectinolytic isolates was higher among MPS in relation to the media MCP. The isolated *Saccharomyces cerevisiae* UFLACN724 and 727, *Pichia guilliermondii* UFLACN731 and *Candida parapsilosis* UFLACN448 showed the highest activity of PL in the media MCP. Among the bacteria *Bacillus megaterium* UFLACN415 and *B. cereus* UFLACN446 showed the highest activity of PL in the media MCP. The production of PME in the media MCP was higher for isolates *B. subtilis* UFLACN406 and 452 and *S.cerevisiae* UFLACN724, however, no isolate showed significant activity of PG (less than 84 U.mL<sup>-1</sup>). The strains *S. cerevisiae* UFLACN724 and 727, *P. guilliermondii* UFLACN731 and *C. parapsilosis* UFLACN448 also have high PL activities were effective in glucose uptake did not produce acetic acid at the end of fermentation and thus represent potential starter cultures for fermentation of coffee.

**Keywords:** bacteria, starter cultures, fermentation of coffee, pectinases and yeast.

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma das mais importantes *commodities* no mundo. Frutos maduros do cafeeiro podem ser processados por três métodos para a obtenção de grãos verdes. O processo mais simples e rústico é o processamento via seca, no qual o café é fermentado e seco ao sol em plataformas normalmente de cimento. No processamento via úmida, a polpa e ou a mucilagem são removidas mecanicamente e os grãos são fermentados em tanques com grande volume de água. O processamento semiseco é uma variação do processamento via úmida, pelo qual os frutos de café também são despulpados. No entanto, o processo de fermentação ocorre diretamente nas plataformas de secagem (VILELA et al., 2010). Os tempos gastos na fermentação dos frutos, nos três tipos de processamento, são diferentes e, durante este período, ocorrem mudanças físico-químicas na polpa e na mucilagem, como diminuição do conteúdo de água açúcares simples e formação de precursores de aroma e *flavor*. Estes precursores são oriundos do metabolismo vegetal e microbiano e interferem na qualidade final da bebida (VAAST et al., 2006).

Diversas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos já foram isoladas e caracterizadas fisiologicamente nos três processamentos, sendo as bactérias e as leveduras as responsáveis pela fermentação dos frutos (SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010). Estes microrganismos devem ser capazes de degradar a pectina, que é o principal polímero presente no fruto, a qual é altamente metilada (superior a 70%) e sua hidrólise ocorre na presença de pectinases, especialmente pectina liases (SCHWAN; WHEALS, 2003). Microrganismos isolados de café e pectinolíticos representam potenciais culturas iniciadoras para a fermentação dos frutos de café, independente do tipo de processamento a ser realizado.

O processo de fermentação que ocorre durante o processamento do café é empírico, ou seja, ocorre de maneira espontânea. A inoculação no início da fermentação do café com culturas iniciadoras apropriadas pode auxiliar na padronização do processo, o que favorece o processamento mais homogêneo de um volume maior de café. Portanto, este trabalho foi realizado com os objetivos de realizar a seleção de bactérias e leveduras pectinolíticas que possam ser utilizadas como culturas iniciadoras para a fermentação de frutos de café (*Coffea arabica*).

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Microrganismos**

Os microrganismos foram isolados de frutos e grãos de café durante os processamentos via seca e semisseca (SILVA et al., 2000, 2008; VILELA et al., 2010) e pertencem à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, Brasil. Os isolados estavam armazenados em *deep-freezer*, a -80°C e foram reativados em tubos contendo meio YEPG líquido (em g.L<sup>-1</sup>: glicose 20,0; extrato de levedura 10,0; peptona de soja 10,0; ágar 20,0) e incubados, a 28°C, por 48 horas.

### **2.2 Seleção dos isolados pectinolíticos**

Cento e vinte e sete isolados leveduriformes e 189 isolados bacterianos foram testados semiquantitativamente quanto à atividade da enzima pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) pela formação de halo de degradação ao redor da colônia em meio sólido, após revelação com solução de cetrimida 1% (HANKIN;

LACY, 1984). As bactérias e as leveduras foram inoculadas em meio YEPG e incubadas, a 28°C, por 24 horas, formando uma pré-cultura. Posteriormente, uma alíquota de 3µl foi inoculada em placas de Petri contendo meios MP7 para PL (em g.L<sup>-1</sup>: glicose 5,0; extrato de levedura 1,0; pectina 5,0; ágar 15,0 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,0; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2; MgSO<sub>4</sub> 0,2; CaCl<sub>2</sub> 0,001; em µg.L<sup>-1</sup>: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10,0; MnSO<sub>4</sub> 10,0; ZnSO<sub>4</sub>. 70,0; CuSO<sub>4</sub> 50,0 e MoO<sub>3</sub> 10,0) e MP5 para PG (em g.L<sup>-1</sup>: glicose 5,0; ácido poligalacturônico 5,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,0; extrato de levedura 1,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,0; ágar 15,0 e 1 ml das soluções FeSO<sub>4</sub> 0,001; MgSO<sub>4</sub> 0,2; CaCl<sub>2</sub> 0,001; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,002; MnSO<sub>4</sub> 0,002; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,014; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,01; MoO<sub>3</sub> 0,002) e incubadas a 28°C por 48h. A atividade de PL e PG foi confirmada pela formação de um halo claro ao redor da colônia após a precipitação do ácido poligalacturônico com 1% de brometo de cetil trimetil amônio (cetrimida) (HANKIN; LACY, 1984). Após os testes semiquantitativos, os isolados que apresentaram os maiores potenciais de produção da enzima (halos de degradação superiores a 30 mm) foram cultivados em meios contendo pectina sintética e casca e polpa de café para avaliação quantitativa das atividades de PL, PG e pectinametilesterase (PME).

### 2.3 Identificação molecular dos isolados pectinolíticos selecionados

Os isolados selecionados pelos testes semiquantitativos foram identificados por sequenciamento da região 16S-23S rDNA para bactérias (16SF-R2: 5'-CGCGGGATCCTTGTACACACCGCCCGTC-3'; 16S rDNA gene 9-25: 5'-GGCCGTCGACCCTTTCCCTCACGGTACTG-3') (LECHNER et al., 1998) e ITS1 -5.8S região intergênica do rDNA para leveduras (ITS1: 5'-CGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (MASOUD et al., 2004). Os produtos purificados de PCR foram sequenciados pela Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul), utilizando-se o ABI3730 XL

sequenciador de DNA automático e as sequências foram comparadas com aquelas disponíveis no GenBank, usando o algoritmo BLAST (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, Maryland, EUA ).

#### **2.4 Produção de pectinases em meio contendo pectina sintética (MPS)**

Os isolados que apresentaram melhores resultados de produção de pectinases pelo teste semiquantitativo foram selecionados para testes quantitativos. Os isolados foram reativados conforme o item 2.1 e 1 mL da suspensão foi inoculada em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio YEPG líquido (em g.L<sup>-1</sup>: glicose 20,0; extrato de levedura 10,0; peptona de soja 10,0; ágar 20,0) e incubados, a 28°C, por 48 horas. Após esse período, absorvância da suspensão a 495 nm foi mensurada e ajustada por meio de diluições para 0,4 de absorvância para inoculação em meio MPS (em g.L<sup>-1</sup>: 0,1 glicose; 10,0 pectina cítrica; 1,0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,0 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), por 96 horas, a 28°C, a 120 rpm, sendo coletadas amostras a cada 12 horas, para análises de produção das enzimas PL, PG e PME.

#### **2.5 Produção de pectinases em meio contendo casca e polpa de café**

##### **2.5.1 Formulação do meio contendo casca e polpa de café (MCP)**

Uma amostra da casca e da polpa de café (*Coffea arabica* L.) foi submetida às seguintes análises físico-químicas: umidade, acidez, açúcares totais, redutores e não-redutores (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 2000), pectina total e solubilidade (BITTER; MUIR, 1962), fibra em detergente ácido (FDA) (MAZZAFERA; ROBINSON, 2000), lignina e celulose (SOEST; WINE, 1968), com o objetivo de formular o meio de

cultivo ideal para a produção de pectinases pelos isolados. Os isolados foram reativados conforme o item 2.1 e 1 mL da suspensão foi inoculada em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio YEPG líquido (em g.L<sup>-1</sup>: glicose 20,0; extrato de levedura 10,0; peptona de soja 10,0; ágar 20,0) e incubada, a 28°C, por 48 horas. Após esse período, absorbância da suspensão a 495 nm foi mensurada e ajustada por meio de diluições no valor de 0,4 para inoculação em meio MCP. Foram realizados três testes preliminares com meios contendo 40 g.L<sup>-1</sup> de casca e polpa de café, acrescidos ou não de glicose ou minerais para avaliação da produção de pectinases. No meio contendo casca e polpa de café acrescido de glicose (5.0 g.L<sup>-1</sup>), a produção de pectinases foi superior, sendo, portanto, esta formulação utilizada para as etapas seguintes do experimento.

O cultivo foi realizado, por 96 horas, a 28°C, a 120 rpm, com os 15 isolados selecionados (item 2.2). A cada 12 horas de fermentação, amostras foram coletadas para quantificação de PL, PG e PME e aferição do pH. A cada 24 horas, foram coletadas amostras para análise da viabilidade celular por plaqueamento em superfície em meio YEPG (em g.L<sup>-1</sup>: 10,0 extrato de levedura; 10,0 peptona bacteriológica; 20,0 glicose; 15,0 ágar). Para análises cromatográficas (carboidratos, etanol e ácidos orgânicos), as amostras foram coletadas nos tempos de fermentação 0, 12 e 96 horas.

## **2.6 Atividade de pectinases**

A quantificação de PL, PG e PME foi realizada conforme descrito a seguir, nas amostras coletadas durante as fermentações nos meios MPS e MCP, nos cultivos de 15 isolados pré-selecionados. Após o cultivo, as amostras coletadas foram centrifugadas a 5.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, a fim de se obter os extratos enzimáticos para quantificação das atividades enzimáticas.

### **2.6.1 Atividade de pectina liase**

A atividade de PL das amostras foi analisada pelo método de Pitt (1988) modificado por Kashyap et al. (2000). A quantificação foi realizada a partir de um mL do extrato enzimático, o qual foi adicionado a 5,0 mL de solução de pectina cítrica Sigma (1% w v) preparada em tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8. As amostras foram incubadas a 40°C, por 2 horas. Após a incubação, foram adicionados 0,6 mL de sulfato de zinco (9% w v) e 0,6 mL de hidróxido de sódio (0,5 M). As amostras foram centrifugadas (6.000 g, 5 minutos) e 5,0 mL do sobrenadante foram coletados e adicionados a uma mistura de 3,0 mL de ácido tiobarbitúrico (0,04 M), 2,5 mL de HCl (0,1 M) e 0,5 mL de água destilada. A mistura foi aquecida em banho-maria, a 100°C/30 minutos, sendo, posteriormente, resfriada à temperatura ambiente. A absorvância da solução foi mensurada a 550 nm, em espectrofotômetro Shimadzu UV-PC e a atividade de PL (U/mL) foi expressa como a quantidade de enzima que alterou 0,01 da unidade de absorvância nas condições do experimento.

### **2.6.2 Atividade de poligalacturonase**

A atividade de PG foi avaliada por método colorimétrico proposto por Miller (1959), mensurando a quantidade de açúcares redutores liberados. A quantificação foi realizada a partir de um e meio mL do extrato enzimático, o qual foi adicionado a 1,0 mL de solução de sal sódico de ácido poligalacturônico 0,1% (m/v) preparada em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0. A mistura foi incubada em banho-maria, a 40 °C/1 horas. Após o período de incubação, a reação foi paralisada adicionando-se 1,5 mL de solução de DNS e imediatamente incubada em banho-maria, a 100°C/5 minutos. A mistura foi, então, resfriada em banho de

gelo. A absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro Shimadzu UV-PC, a 575 nm. A atividade (U) de PG foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de ácido galacturônico liberados/mL/minuto, nas condições experimentais.

### **2.6.3 Atividade de pectina metilesterase**

Para a quantificação de pectinametilesterase, seguiu-se o protocolo de Baracat et al. (1989). A quantificação foi realizada a partir de 3 mL da solução enzimática, aos quais foram adicionados a 20 mL de pectina cítrica Sigma 1% em solução de NaCl 0,1M, pH 7,5 e a mistura incubada por 30 minutos, mantendo-se o pH em 7,5 pela adição de NaOH 0,02M. A atividade de PME foi proporcional ao volume de NaOH gasto e foi expressa em microequivalentes de ácido pécico liberado/mL/hora.

### **2.6.4 Proteínas totais**

As concentrações de proteínas no sobrenadante dos extratos enzimáticos foram mensuradas espectrofotometricamente, a 595 nm, pelo método colorimétrico de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA, Merck, Germany) como padrão e o reagente de Bradford da Sigma-Aldrich.

## **2.7 Análise do perfil de fermentação em meio MCP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Etanol, glicerol, ácidos orgânicos (ácido acético, ácido málico, ácido succínico) e carboidratos (sacarose, glicose e frutose) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp, Japão), equipado com um sistema de dupla

detecção composto por um detector de UV e um detector de índice de refração (RID - 10A SPD-10Ai). A coluna Shimadzu de exclusão iônica (Shim-pack SCR-101H, 7,9 mm X 30 cm) foi operada à temperatura de 30°C, com 100 mM de ácido perclórico como o eluente, numa vazão de 0,6 mL<sup>-1</sup>. Açúcares, glicerol e etanol foram detectados por RID. Ácidos foram detectados por meio de absorvância UV (210 nm). Os compostos foram identificados por comparação de seus tempos de retenção com os tempos de retenção dos padrões certificados. A quantificação dos álcoois, açúcares e ácidos foi realizada utilizando-se curvas de calibração obtidas a partir de substâncias de referência. Todas as amostras foram analisadas em duplicata (DUARTE et al., 2009).

## **2.8 Análises estatísticas**

Os dados foram analisados por um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. Utilizou-se um arranjo fatorial 2 x 15, sendo 2 meios (MCP e MPS) e 15 isolados. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SISVAR®, Lavras, MG, Brasil.

A análise de componentes principais foi realizada para avaliar o perfil da fermentação usando o software XLSTAT 7.5.2 (Addinsoft, New York, NY, USA).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Seleção dos isolados a partir dos testes semiquantitativos**

Os isolados bacterianos e leveduriformes provenientes dos processamentos via seca e semisseca do café foram testados quanto ao potencial de produção das enzimas PL e PG. Do total de isolados testados que apresentaram potencial para atividade pectinolítica (40 isolados de leveduras e 76 isolados bacterianos), observou-se que 67% dos isolados leveduriformes e 97% dos isolados bacterianos pectinolíticos foram provenientes do processamento via seca do café. (Tabelas 4 e 5). Uma vez que, neste processamento, os frutos são fermentados integralmente com seus constituintes casca, polpa e mucilagem, apresentando, portanto, maiores teores de pectina, a predominância de espécies que utilizem esse substrato é favorecida (SILVA et al., 2008).

Tabela 4 Leveduras provenientes dos processamentos via seca e semisseca do café que apresentaram a formação de halo de degradação no teste semiquantitativo para pelo menos uma das duas enzimas testadas: PL e PG. Em negrito estão os isolados selecionados para a etapa de quantificação

Isolados	Halo de degradação (mm)	
	PL	PG
<b>Via semisseca</b>		
<i>Pichia anomala</i> UFLA CSS12	10	-
<i>Kluyveromyces</i> sp. UFLA CSS16	-	12
<i>Pichia anomala</i> UFLA CSS23	8	-
<i>Pichia anomala</i> UFLA CSS24	9	7
<i>Candida membranifaciens</i> UFLA CSS41	6	7
<i>Pichia anomala</i> UFLA CSS32	7	-
<i>Candida ernobii</i> UFLA CSS58	10	-
<i>Pichia anomala</i> UFLA CSS64	18	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UFLA CSS70	19	-
<i>Pichia anomala</i> UFLA CSS61	15	-
<i>Kloeckera</i> sp. UFLA CSS76	13	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i> UFLA CSS119	10	-
<b>Via seca</b>		
<b><i>Candida parapsilosis</i> UFLA CSS426</b>	<b>30</b>	-
<b><i>Candida parapsilosis</i> UFLA CSS431</b>	<b>30</b>	-
<b><i>Candida parapsilosis</i> UFLA CSS448</b>	<b>38</b>	-
<b><i>Candida parapsilosis</i> UFLA CSS449</b>	<b>30</b>	-
<b><i>Pichia caribbica</i> UFLA CSS706</b>	<b>31</b>	-
Não identificada UFLA CSS712	21	-
Não identificada UFLA CSS713	10	-
<i>Debaromyces hansenii</i> UFLA CSS714	23	-
<i>D. hansenii</i> UFLA CSS715	22	-
Não identificada UFLA CSS716	26	-
Não identificada UFLA CSS717	23	-
<i>D. hansenii</i> UFLA CSS718	24	-
Não idenificada. UFLA CSS719	24	-
<i>D. hansenii</i> UFLA CSS720	23	-
Não identificada UFLA CSS721	25	-
Não identificada UFLA CSS722	28	-
<i>D. hansenii</i> UFLA CSS723	9	-
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CSS724</b>	<b>33</b>	-
Não identificada UFLA CSS725	26	-
<i>S. smithiae</i> UFLA CSS726	21	-
<b><i>S. cerevisiae</i> UFLA CSS727</b>	<b>31</b>	-
Não identificada UFLA CSS728	20	-
<b><i>Candida parapsilosis</i> UFLA CSS730</b>	<b>32</b>	-
<b><i>P. guilliermondii</i> UFLA CSS731</b>	<b>32</b>	-
<i>Arxula adenivorans</i> UFLA CSS732	23	-
Não identificada UFLA CSS733	23	-
Não identificada UFLA CSS734	22	-
Não identificada UFLA CSS735	25	-

Tabela 5 Bactérias provenientes dos processamentos via seca e semisseca do café que apresentaram a formação de halo de degradação no teste semiquantitativo para pelo menos uma das duas enzimas testadas: PL e PG. Em negrito estão os isolados selecionados para a etapa de quantificação

Isolados	Halo de degradação (mm)	
	PL	PG
<b>Via semi-seca</b>		
<i>Bacillus sp.</i> UFLA CSS28.1	20	5
<i>Leuconostoc mesenterioides</i> UFLA CSS33.3	15	3
<b>Via seca</b>		
Não identificada UFLA CSS418	20	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS435	22	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS439	22	-
Não identificada UFLA CSS485	22	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS472	11	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS469	15	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS471	10	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS468	12	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS477	12	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS438	28	-
<i>B. cereus</i> UFLA CSS433	15	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS417	16	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS464	21	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS466	19	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS467	13	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS476	20	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS470	13	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS427	22	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS425	25	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS443	22	-
<b><i>B. subtilis</i> UFLA CSS463</b>	<b>33</b>	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS441	20	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS453	25	-
Não identificada UFLA CSS627	22	-
<i>B. cereus</i> UFLA CSS450	12	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS449	30	-
<i>B. cereus</i> UFLA CSS436	21	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS429	25	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS428	22	-
<i>Pseudomonas putrefaciens</i> UFLA CSS475	22	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS410	21	-
<i>B. cereus</i> UFLA CSS440	20	-
<i>B. cereus</i> UFLA CSS424	33	-
Não identificada UFLA CSS408	20	-
Não identificada UFLA CSS951	12	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS412	23	-

“Tabela 5, continua”

<i>B. subtilis</i> UFLA CSS426	30	-
<b><i>B. megaterium</i> UFLA CSS415</b>	<b>30</b>	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS407	22	-
<i>S. subtilis</i> UFLA CSS409	22	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS434	18	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS458	24	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS413	22	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS402	24	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS460	20	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS451	28	-
<b><i>B. subtilis</i> UFLA CSS452</b>	<b>30</b>	-
<b><i>B. cereus</i> UFLA CSS445</b>	<b>33</b>	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS461	20	-
<i>B. anthracis</i> UFLA CSS489	23	-
Não identificada UFLA CSS444	19	-
<b><i>B. cereus</i> UFLA CSS446</b>	<b>30</b>	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS448	28	-
Não identificada UFLA CSS474	12	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS479	12	-
<i>B. megaterium</i> UFLA CSS454	22	-
<i>B. cereus</i> UFLA CSS442	23	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS455	25	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS487	20	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS456	20	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS400	19	-
Não identificada UFLA CSS484	15	-
Não identificada UFLA CSS483	22	-
Não identificada UFLA CSS473	15	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS403	20	-
<i>Kurthia</i> sp. UFLA CSS405	7	-
<i>B. cereus</i> UFLA CSS401	10	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS416	21	-
<b><i>B. subtilis</i> UFLA CSS406</b>	<b>30</b>	-
<i>B. cereus</i> UFLA CSS437	20	-
<i>B. subtilis</i> UFLA CSS431	30	-
Não identificada UFLA CSS478	18	-
Não identificada UFLA CSS488	23	-
Não identificada UFLA CSS486	20	-

Dentre os isolados com potencial de produção de pectinases pelo teste semiquantitativo, 15 foram selecionados e sequenciados. Todos aqueles provenientes do processamento via seca do café (*Bacillus cereus* UFLACN445 e 446; *Bacillus megaterium* UFLACN415; *Bacillus subtilis* UFLACN406, 452 e 463; *Candida parapsilosis* UFLACN426, 431, 448, 449 e 730; *Pichia caribbica* UFLACN706; *Pichia guilliermondii* UFLACN731; *Saccharomyces cerevisiae* UFLACN724 e 727) (Tabela 6) foram cultivados nos meios MPS e MCP para a produção de pectinases.

Tabela 6 Isolados microbianos pectinolíticos selecionados a partir do teste semiquantitativo para testes qualitativos das enzimas PL e PG e seus respectivos halos de degradação. Número de acesso disponível no GenBank e % de similaridade

<b>Microrganismos isolados do processamento via seca</b>	<b>Halo de degradação PL (mm)</b>	<b>Número de acesso no GenBank</b>	<b>Similaridade (%)</b>
<b>Bactérias</b>			
<i>Bacillus cereus</i> UFLACN445	33	EU487785	99
<i>Bacillus cereus</i> UFLACN446	30	AB284820	99
<i>Bacillus megaterium</i> UFLACN415	30	DQ660362	99
<i>Bacillus subtilis</i> UFLACN406	30	AL009126	99
<i>Bacillus subtilis</i> UFLACN452	30	DQ373648.1	99
<i>Bacillus subtilis</i> UFLACN463	33	DQ373648.1	99
<b>Leveduras</b>			
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN426	30	FN652299.1	98
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN431	30	FN652300.1	98
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN448	38	FN652300.1	98
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN449	30	GU373657.1	99
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN730	32	FN652299.1	99
<i>Pichia caribbica</i> UFLACN706	31	FN428931.1	97
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLACN731	32	AB500694.1	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLACN724	33	FN393997.1	98
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLACN727	31	AM262830.1	99

A escolha de um microrganismo para a fermentação de frutos de café deve ser feita considerando-se a natureza do substrato para fermentação que, neste caso, é pectina altamente metilada (superior a 70%). Assim, o microrganismo selecionado deve apresentar maior produção de PL, em relação à

produção de PME (uma vez que a liberação de metanol prejudica o *flavor* da bebida, bem como a saúde do consumidor) (YADAV et al., 2009).

### 3.2 Caracterização físico-química da casca e polpa de café

A partir da caracterização físico-química da casca e polpa de café (Tabela 7), foi possível estabelecer a formulação do meio MCP. A quantidade de casca e polpa utilizada foi de 40,0 g.L<sup>-1</sup>, a fim de que a concentração de pectina solúvel no meio MCP fosse de, aproximadamente, 1%, a qual representa a mesma concentração de pectina do meio MPS.

Tabela 7 Características físico-químicas da casca e polpa de café (*Coffea arabica* L.) para a formulação do meio de cultivo MCP

<b>Parâmetros</b>	
Umidade	79,45%
Teor de matéria seca	20,25%
<b>Concentração (%) da matéria seca</b>	
Proteínas	15,45
Cinzas	7,85
Fibras totais	17,30
Fibras em detergente ácido	28,12
Gordura	2,77
Pectina solúvel	2,25
Pectina total	5,24
Lignina	11,95
Celulose	16,18
Açúcares totais	11,49
Açúcares não-redutores	10,69
Açúcares redutores	0,8

### **3.3 Secreção de PL, PME e PG por bactérias e leveduras em meios MPS e MCP**

As leveduras se destacaram quanto à produção de PL nos dois meios testados, tendo a produção no meio MPS sido semelhante ou superior à atividade em meio MCP (Tabela 8), com exceção da atividade enzimática secretada pelos isolados *Bacillus megaterium* UFLACN415, *Candida parapsilosis* UFLACN449 e 431. A casca e a polpa de café apresentam pectina ligada a resíduos de celulose, hemicelulose e lignina que dificulta o acesso dos microrganismos ao substrato. Além disso, contêm açúcares redutores e não redutores mais facilmente assimilados pelos microrganismos, refletindo em menor atividade enzimática no meio MCP (SCHWAN; WHEALS, 2003).

Tabela 8 Atividade de pectina liase (PL), pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG) para os diferentes microrganismos de café (*Coffea arabica* L.) em meio contendo pectina sintética (MPS) e polpa de café (MCP)

Microrganismos	Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )					
	PL		PME		PG	
	MCP	MPS	MCP	MPS	MCP	MPS
<b>Bactérias</b>						
<i>Bacillus cereus</i> UFLACN445	766.24±19.33 <sup>3</sup> bE	1582.32±103.75 <sup>1</sup> aF	789.33±12.37 <sup>8</sup> aE	830.83±20.31 <sup>4</sup> aF	nd	nd
<i>Bacillus cereus</i> UFLACN446	1405.25±55.81 <sup>4</sup> aC	1485.83±55.8 <sup>3</sup> aF	809.13±15.01 <sup>4</sup> bE	<b>2547.68±102.62<sup>8</sup> aA</b>	nd	nd
<i>Bacillus subtilis</i> UFLACN406	1313.38±60.96 <sup>6</sup> bD	1733.62±60.57 <sup>6</sup> aF	<b>2202.63±154.86<sup>6</sup> aA</b>	2284.06±29.65 <sup>6</sup> aB	84±0 <sup>6</sup> d	58±0 <sup>3</sup> d
<i>Bacillus megaterium</i> UFLACN415	1609.36±90.61 <sup>1</sup> aC	1322.27±23.48 <sup>6</sup> bG	1119.93±27.20 <sup>2</sup> bD	2147.04±25.55 <sup>4</sup> aB	51±0 <sup>1</sup> d	37±0 <sup>1</sup> d
<i>Bacillus subtilis</i> UFLACN452	1177.65±73.0 <sup>4</sup> aD	1221.53±46.31 <sup>1</sup> aG	<b>1940.07±19.98<sup>4</sup> aA</b>	2034.39±29.61 <sup>4</sup> aB	nd	nd
<i>Bacillus subtilis</i> UFLACN463	1088.67±22.79 <sup>4</sup> aD	1527.09±101.51 <sup>3</sup> aF	925.72±22.73 <sup>3</sup> bE	1193.35±38.01 <sup>1</sup> aE	nd	nd
<b>Leveduras</b>						
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN449	1242.9±28.70 <sup>8</sup> aD	762.6±11.25 <sup>3</sup> bH	1687.74±21.07 <sup>8</sup> aC	690.38±11.69 <sup>8</sup> bF	nd	nd
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN448	<b>2636.76±44.91<sup>6</sup> aA</b>	<b>2580.68±50.36<sup>3</sup> aD</b>	<b>1859.73±23.71<sup>7</sup> bB</b>	<b>2657.33±147.50<sup>7</sup> aA</b>	nd	nd
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN426	1161.48±16.57 <sup>2</sup> bD	<b>3481.70±215.43<sup>1</sup> aC</b>	1129.11±14.09 <sup>2</sup> bD	1739.93±40.72 <sup>3</sup> aC	nd	nd
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN730	2180.23±161.25 <sup>1</sup> aB	2177.07±71.74 <sup>1</sup> aE	1197.73±10.66 <sup>8</sup> aD	1129.11±14.09 <sup>2</sup> aE	nd	nd
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN431	1711.76±35.44 <sup>1</sup> aC	1399.47±12.52 <sup>3</sup> bG	1118.25±26.44 <sup>1</sup> bD	1755.68±22.31 <sup>1</sup> aC	nd	nd
<i>Pichia caribbica</i> UFLACN706	1919.65±20.74 <sup>1</sup> aB	1761.01±23.23 <sup>1</sup> aF	735.79±21.87 <sup>1</sup> bE	2524.32±76.0 <sup>1</sup> aA	34±0 <sup>1</sup> d	60±0 <sup>1</sup> d
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLACN731	<b>2344.86±51.23<sup>1</sup> aA</b>	<b>2809.45±147.29<sup>2</sup> aD</b>	1208.83±25.46 <sup>2</sup> bD	1508.54±22.62 <sup>2</sup> aD	nd	nd
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLACN727	<b>2637.00±143.17<sup>2</sup> aA</b>	<b>4961.07±175.30<sup>1</sup> aB</b>	1712.83±40.63 <sup>1</sup> bC	<b>2532.30±41.60<sup>1</sup> aA</b>	nd	nd
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLACN724	<b>2557.51±100.38<sup>1</sup> aA</b>	<b>5256.12±161.61<sup>1</sup> aA</b>	<b>2600.20±96.17<sup>1</sup> aA</b>	<b>2443.14±89.28<sup>1</sup> aA</b>	nd	nd

Número em negrito indicam as maiores atividades da enzima em cada meio testado.

Letras minúsculas indicam comparação das atividades enzimáticas (linhas). Letras maiúsculas indicam comparação das diferentes enzimas produzidas pelos isolados (colunas). nd - não detectado. Tempos de cultivo: <sup>1</sup>12h, <sup>2</sup>24h, <sup>3</sup>36h, <sup>4</sup>48h, <sup>5</sup>60h, <sup>6</sup>72h, <sup>7</sup>84h e <sup>8</sup>96h. Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de confiança de 95% pelo teste de Scott-Knott.

Os isolados *Saccharomyces cerevisiae* UFLACN724 e 727 apresentaram maiores atividades de PL nos meios MPS e MCP com 12 e 24 horas de fermentação (2557,51 a 5256,12 U.mL<sup>-1</sup>). *Saccharomyces cerevisiae* tem sido reportada como uma espécie produtora de pectina liase em vinhos (BLANCO et al., 1997; GAINVORS et al., 1994). Geralmente, bactérias e fungos filamentosos apresentam atividade de pectinases superior às leveduras, principalmente devido ao papel dessas enzimas no processo de infecção na planta por esses microrganismos (BLANCO; SIEIRO; VILLA, 1999). No entanto, neste trabalho, a produção de pectinases por leveduras foi superior às bactérias estudadas, demonstrando que estas secretaram pectinases para utilização da pectina como substrato para o seu crescimento.

*Bacillus megaterium* UFLACN415 e *B.cereus* UFLACN446 apresentaram as maiores atividades de pectina liase no meio MCP, com 12 horas (1.405,25 U.mL<sup>-1</sup>) e 48 horas (1.609,36 U.mL<sup>-1</sup>) de fermentação, respectivamente. *B. cereus* UFLACN446 também apresentou alta atividade de PL em meio contendo pectina sintética com 36 horas de fermentação (1.485,83 U.mL<sup>-1</sup>). Espécies do gênero *Bacillus* produtoras de pectinases isoladas de café já foram descritas em outros trabalhos (AVALLONE et al., 2001, 2002).

A produção de PME no meio MCP foi superior (17,25%) para os isolados *B. subtilis* UFLACN406, com 72 horas de fermentação (2.202,63U.mL<sup>-1</sup>); *B. subtilis* UFLACN452, 48 horas de fermentação (1.940,07 U.mL<sup>-1</sup>) e *S. cerevisiae* UFLACN724, com 12 horas de fermentação (2.600,20 U.mL<sup>-1</sup>), tendo os três isolados apresentado valores de atividades de PME no meio MPS similares, se comparados às suas atividades no meio MCP. Quanto à produção de PME em meio MPS, os isolados que se destacaram foram *Bacillus cereus* UFLACN446 (2.547,68 U.mL<sup>-1</sup>), *Candida parapsilosis* UFLACN448 (2.657,33 U.mL<sup>-1</sup>), após 96 horas de fermentação e os isolados *Saccharomyces cerevisiae*

UFLACN724 e 727 com 12 horas de fermentação (2.532,30 e 2.443,14 U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente) (Tabela 6).

A produção de PG foi detectada somente nos cultivos dos isolados *B. megaterium* UFLACN415, *B. subtilis* UFLACN406 e *Pichia caribbica* UFLACN706, nos dois meios testados e em valores inferiores a 84 U.mL<sup>-1</sup>. Uma vez que a pectina presente nos frutos de café é altamente metilada (superior a 70%) é comum que os microrganismos provenientes do café apresentem baixas atividades de PG, já que essa enzima atua em resíduos de ácido galacturônico não metilados.

### **3.4 Seleção de cultura iniciadora para a fermentação do café**

Os isolados que apresentaram maiores atividades de PL em meio MCP foram selecionados como potenciais culturas iniciadoras para a fermentação de café. A avaliação de viabilidade celular, produção de PL e os valores de pH dos quatro melhores produtores de PL no meio MCP são mostrados nas Figuras 7 a 10.

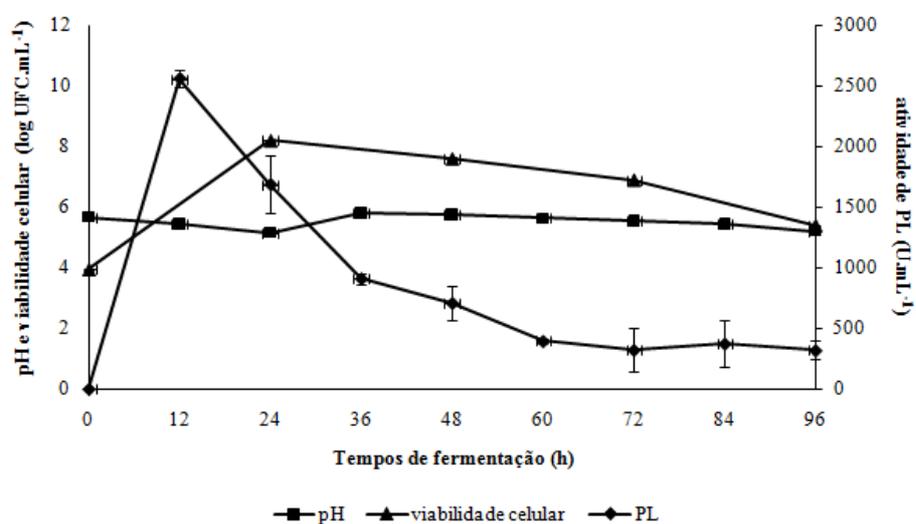


Figura 7 Atividade de pectina liase, viabilidade celular e pH durante a fermentação em meio MCP pelo isolado *Saccharomyces cerevisiae* UFLACN724. Barras indicam desvio padrão das médias

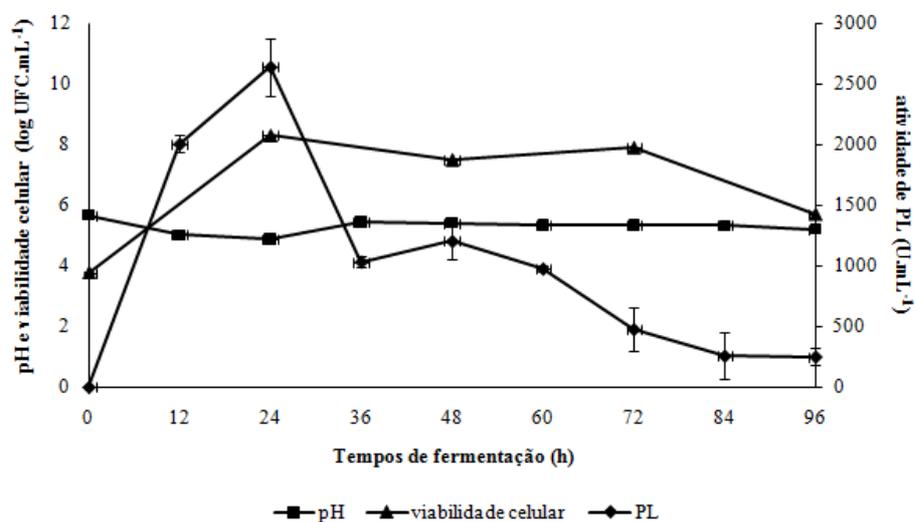


Figura 8 Atividade de pectina liase, viabilidade celular e pH durante a fermentação em meio MCP pelo isolado *Saccharomyces cerevisiae* UFLACN727. Barras indicam desvio padrão das médias

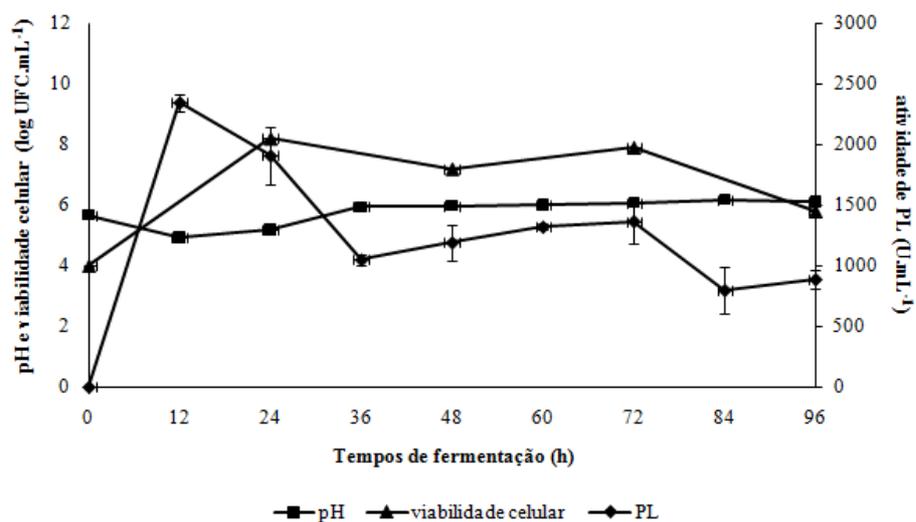


Figura 9 Atividade de pectina liase, viabilidade celular e pH durante a fermentação em meio MCP pelo isolado *Pichia guilliermondii* UFLACN731. Barras indicam desvio padrão das médias

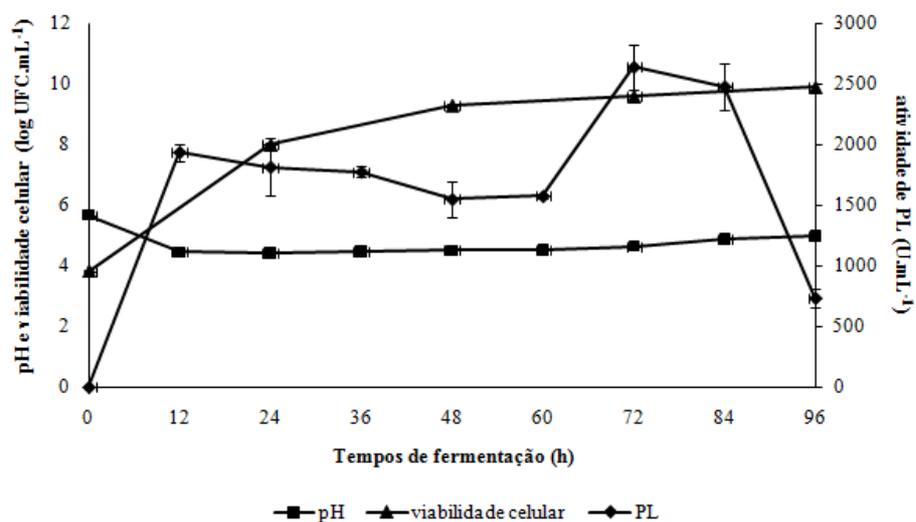


Figura 10 Atividade de pectina liase, viabilidade celular e pH durante a fermentação em meio MCP pelo isolado *Candida parapsilosis* UFLACN448. Barras indicam desvio padrão das médias

Observou-se que os isolados *P. guilliermondii* UFLACN731 e *S. cerevisiae* UFLACN724 e 727 tiveram picos de produção de PL com 12, 24 e 12 horas de fermentação (2344,86 U.ml<sup>-1</sup> e 2557,51 e 2637,00 U.ml<sup>-1</sup>, respectivamente), seguidos por queda de produção após este período. Tais picos coincidiram com os maiores valores de viabilidade celular desses microrganismos (Figuras 5, 6 e 7), considerando o tempo de fermentação com maior atividade enzimática. Esses isolados podem ser selecionados para a formulação de inóculo na fermentação de cafés processados via semiseca e via úmida, uma vez que, em tais processamentos, o tempo de fermentação é de 48 e 24 horas, respectivamente (MASOUD et al., 2004; MASOUD; JESPERSEN, 2006; VILELA et al., 2010). O decréscimo na atividade enzimática desses isolados pode ser atribuída ao fato de os extratos enzimáticos não terem sofrido nenhum processo de purificação, podendo conter nas amostras compostos inibitórios à atividade da enzima, uma vez que os valores de pH foram constantes durante todo o processo de fermentação.

O isolado *C. parapsilosis* UFLACN448 teve o seu pico de produção somente com 72 horas de fermentação (2636,76 U.ml<sup>-1</sup>) (Figura 8) e atividade expressiva durante todo o processo de fermentação, demonstrando maior estabilidade da enzima durante o tempo de fermentação. O pico de produção da enzima coincidiu com o maior valor de viabilidade celular desse microrganismo, podendo-se, assim, inferir que a utilização da pectina é requerida para o seu crescimento. Esse isolado tem potencial para ser inóculo na fermentação de café processado via seca, uma vez que ela é mais longa durante esse tipo de processamento, chegando até 15 dias de duração (SILVA et al., 2008). Além disso, a estabilização da atividade enzimática em pH ácido (na faixa de 4,5) sugere que este microrganismo seja inóculo potencial para a degradação da pectina durante o processamento do café.

### **3.5 Análise dos perfis de fermentação por CLAE**

Na Tabela 9 são apresentados os resultados para açúcares, ácidos e etanol identificados no meio MCP e no mesmo meio fermentado, após 96 horas da inoculação com os diferentes microrganismos avaliados neste trabalho.

Tabela 9 Níveis médios de compostos orgânicos obtidos após a fermentação em meio MCP dos quinze diferentes isolados selecionados

Microrganismos	Compostos (g.L <sup>-1</sup> )						
	Glicose	Frutose	Glicerol	Etanol	Ácido acético	Ácido málico	Ácido succínico
<b>Bactéria</b>							
<i>Bacillus cereus</i> UFLACN445	7,89	0,48	0,33	0,30	0,29	nd	0,65
<i>Bacillus cereus</i> UFLACN446	6,72	0,06	0,32	0,26	0,24	nd	0,64
<i>Bacillus subtilis</i> UFLACN406	1,24	0,11	0,27	1,30	0,05	nd	0,50
<i>Bacillus megaterium</i> UFLACN415	0,06	nd	0,20	1,55	0,05	nd	0,45
<i>Bacillus subtilis</i> UFLACN452	10,33	0,50	0,51	0,44	0,43	nd	0,95
<i>Bacillus subtilis</i> UFLACN463	7,53	0,64	0,38	0,32	0,24	nd	0,69
<b>Leveduras</b>							
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN449	0,04	nd	0,11	0,64	nd	nd	0,33
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN448	nd	nd	0,07	0,93	nd	nd	0,24
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN426	0,02	nd	0,10	0,69	nd	nd	0,36
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN730	nd	nd	nd	0,86	nd	nd	0,07
<i>Candida parapsilosis</i> UFLACN431	nd	nd	0,08	1,19	nd	nd	nd
<i>Pichia caribbica</i> UFLACN706	nd	nd	0,05	0,88	0,02	nd	0,34
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLACN731	0,06	0,02	0,05	1,06	nd	0,03	0,33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLACN727	0,05	0,03	0,08	0,72	nd	0,04	0,22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLACN724	0,05	0,05	0,07	0,90	nd	0,04	0,21
Controle	5,1	0,02	nd	nd	0,14	nd	0,18

nd- não detectado.

É possível notar que alguns isolados, como *B. cereus* UFLACN445, *B. cereus* UFLACN446, *B. subtilis* UFLACN452 e *B. subtilis* UFLACN463, não foram eficientes na fermentação do meio. O meio fermentado por estes isolados apresentou elevadas concentrações residuais de glicose (Tabela 9). O aumento dos teores de glicose no cultivo com estes e outros isolados pode estar correlacionado às enzimas produzidas por estes microrganismos (Tabela 8).

Garna et al. (2004) observaram que uma eficiente hidrólise da pectina resulta na liberação de açúcares, como glicose, ramnose e galactose. Os isolados de *S. cerevisiae* UFLACN724 e 727, *P. guilliermondii* UFLACN731 e *C. parapsilosis* UFLACN448 foram eficientes no consumo da glicose, não produzindo ácido acético ao final da fermentação (Tabela 9). Elevadas concentrações de ácido acético podem interferir na qualidade do café devido à acidificação do meio. Além da eficiência de consumo da glicose presente no meio, os isolados *S. cerevisiae* UFLACN724 e 727, *P. guilliermondii* UFLACN731 e *C. parapsilosis* UFLACN448 não produziram ácido acético.

Os dados apresentados na Tabela 9 foram submetidos à análise de componentes principais (PCA). O primeiro e o segundo componentes principais (PC1 e PC2) representaram 80,48% da variância total (Figura 11). Todas as leveduras foram agrupados na parte negativa do PC1 (62,90% da variância total). Com exceção dos isolados *B. subtilis* e *B. megaterium* UFLACN406 e 415, as bactérias foram isoladas na parte positiva do PC1, mostrando comportamentos, durante o perfil fermentativo, diferentes das leveduras analisadas. No quadrante superior esquerdo (Figura 11) do PCA, os isolados *S. cerevisiae* UFLACN724 e 727, *P. guilliermondii* UFLACN731, *C. parapsilosis* UFLACN426 e 448 e *P. caribbica* UFLACN706 foram correlacionados em relação à secreção de ácido málico. Isolados de *C. parapsilosis* UFLACN730 e 431 no quadrante inferior esquerdo foram caracterizados pela presença de etanol. *B. cereus* UFLACN445 e 446 e *B. subtilis* UFLACN452 e 463 foram

correlacionados em relação aos açúcares residuais (glicose e frutose), ácidos (succínico e acético) e glicerol.

Após a fermentação da casca e da polpa do café por esses isolados, não houve a presença de nenhum metabólito que possa deteriorar a qualidade final da bebida. Não foi detectada a presença de ácidos acético, butírico e propiônico após o processo de fermentação. Tais metabólitos em altas concentrações constituem fatores de deterioração do café e podem interferir de maneira depreciativa na qualidade final da bebida.

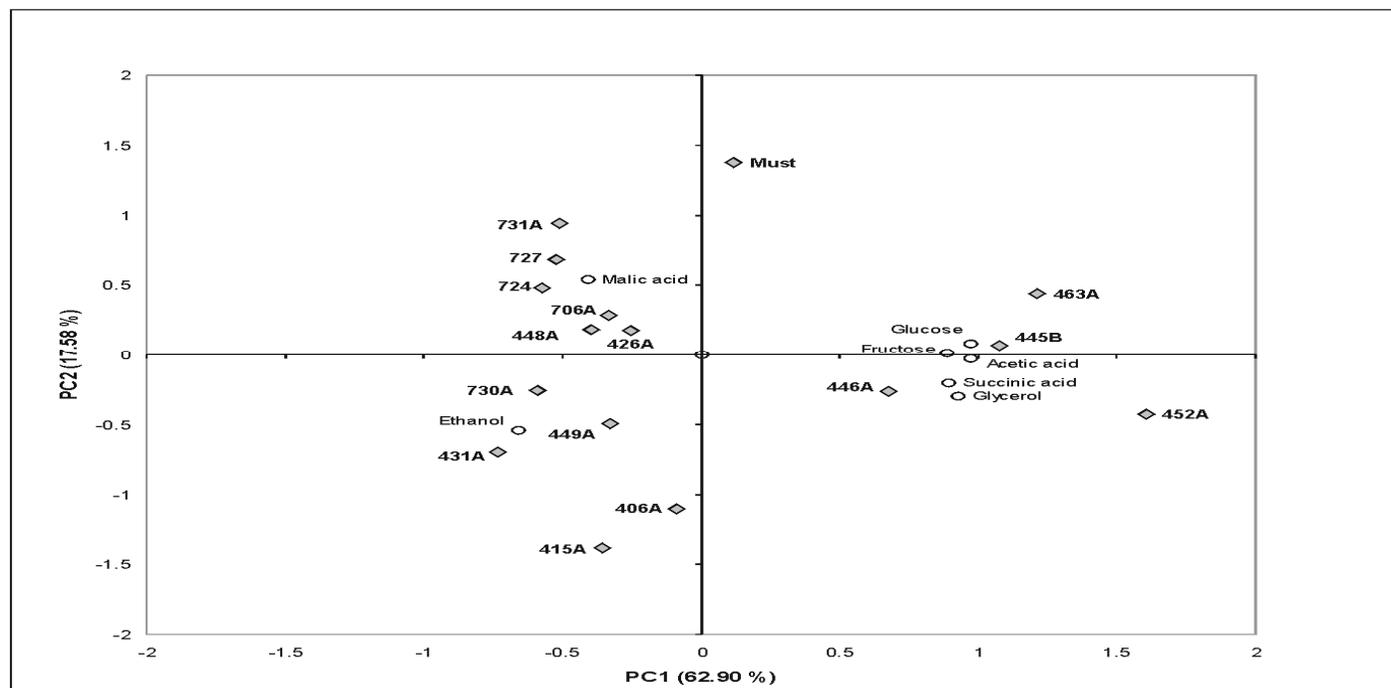


Figura 11 Análise de componentes principais de compostos orgânicos encontrados durante a fermentação em meio MCP pelos quinze isolados selecionados

445B - *Bacillus cereus* UFLACN445; 446A - *Bacillus cereus* UFLACN 446; 415A - *Bacillus megaterium* UFLACN415; 406A - *Bacillus subtilis* UFLACN406, 452A - *Bacillus subtilis* UFLACN 452; 463A - *Bacillus subtilis* UFLACN463; 426A - *Candida parapsilosis* UFLACN426, 431A - *Candida parapsilosis* UFLACN431, 448A - *Candida parapsilosis* UFLACN448, 449A - *Candida parapsilosis* UFLACN 449 e 730A - *Candida parapsilosis* UFLACN730; 706A - *Pichia caribbica* UFLACN706; 731A - *Pichia guilliermondii* UFLACN731; 724 - *Saccharomyces cerevisiae* UFLACN724 e 727 - *Saccharomyces cerevisiae* 727.

#### 4 CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível verificar que os isolados *S. cerevisiae* UFLACN724 e 727, *P. guilliermondii* UFLACN731 e *C. parapsilosis* UFLACN448 representam potenciais culturas iniciadoras para a fermentação do café. Esses isolados apresentaram altas atividades de PL em meio contendo casca e polpa de café, demonstrando sua capacidade de quebra da pectina presente no fruto com eficiência na utilização do substrato e produção de compostos orgânicos que incrementem a qualidade final da bebida.

Como o tempo de fermentação dos frutos de café é variável e depende do tipo de processamento utilizado, sugerem-se os isolados *P. guilliermondii* UFLACN731 e *S. cerevisiae* UFLACN724 e 727 como possíveis culturas iniciadoras para a fermentação de cafés processados vias semisseca ou úmida, sendo o isolado *C. parapsilosis* UFLACN448 mais indicado para a fermentação de cafés processados via seca.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de culturas iniciadoras selecionadas para a fermentação do café poderá atuar na redução do tempo de fermentação e, conseqüentemente, na diminuição do crescimento de microrganismos indesejáveis, bem como na produção de compostos que incrementem a qualidade sensorial. O decréscimo do tempo de permanência dos frutos no terreiro decorrente de uma degradação mais intensa da mucilagem pelos microrganismos permitirá o processamento de um maior volume de frutos no estágio cereja em menor tempo.

Novos estudos visando o desempenho dessas culturas iniciadoras na fermentação dos frutos e grãos deverão ser realizados, a fim de avaliar a capacidade de fermentação do café desses isolados *in vivo*.

**REFERÊNCIAS**

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses of the Association of Official Analytical Chemists**. Gaithersburg, 2000. 1117 p.

AVALLONE, S. et al. Involvement of pectinolytic microorganisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, Davis, v. 37, n. 2, p. 191-198, Feb. 2002.

\_\_\_\_\_. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 4, p. 252-256, Sept. 2001.

BARACAT, M. C. et al. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. **Biotechnology Letters**, London, v. 11, n. 12, p. 899-902, Dec. 1989.

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

BLANCO, P. et al. Genetic determination of polygalacturonase production in wild-type and laboratory strains *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, New York, v. 167, n. 5, p. 284-288, Dec. 1997.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye-binding. **Analysis Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-251, Oct. 1976.

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

GAINVORS, A. et al. Detection of polygalacturonase, pectin lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, Davis, v. 10, n. 1, p. 1311-1319, May 1994.

GARNA, H. et al. New method for a two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 15, p. 4652-4659, July 2004.

HANCKIN, L.; LACY, G. H. Pectinolytic microorganisms. In: SPECK, M. L. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 1984. p. 125-132.

KASHYAP, D. R. et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 277-282, Feb. 2000.

LECHNER, A. et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 48, n. 4, p. 1373-1382, Oct. 1998.

MASOUD, W. et al. 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, Feb. 2004.

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

MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S. P. Characterization of polyphenoloxidase in coffee. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 285-296, Oct. 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PITT, O. Pectic lyase from *Rhoma medicabini* var. pinodella. **Methods in Enzymology**, New York, v. 161, n. 1, p. 350-365, Nov. 1988.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. (Ed.). **Yeasts in food**. Hamburg: Behr's Verlag, 2003. p. 426-459.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 251-260, Jan. 2000.

\_\_\_\_\_. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 951-957, Jan. 2008.

SOEST, P. J. van; WINE, R. H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 51, p. 780-785, 1968.

VAAST, P. et al. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 86, n. 2, p. 197-204, Jan. 2006.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

YADAV, S. et al. Pectin lyase: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 44, n. 1, p. 1-10, Mar. 2009.