

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINE OLIVEIRA JUNQUEIRA

CONTRIBUIÇÕES PARA MELHORIA DE QUALIDADE DE GRÃOS DE CAFÉ
PRODUZIDOS NA COLÔMBIA: CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE
MICROBIANA DO PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA POR SEQUENCIAMENTO DE
NOVA GERAÇÃO

CURITIBA

2018

ANA CAROLINE OLIVEIRA JUNQUEIRA

CONTRIBUIÇÕES PARA MELHORIA DE QUALIDADE DE GRÃOS DE CAFÉ
PRODUZIDOS NA COLÔMBIA: CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE
MICROBIANA DO PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA POR SEQUENCIAMENTO DE
NOVA GERAÇÃO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Vinícius de Melo Pereira

CURITIBA

2018

J95

Junqueira, Ana Caroline de Oliveira

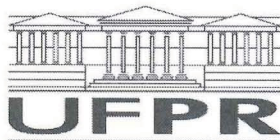
Contribuições para melhoria de qualidade de grãos de café produzidos na Colômbia: caracterização da diversidade microbiana do processamento pós-colheita por sequenciamento de nova geração [recurso eletrônico] / Ana Carolina de Oliveira Junqueira – Curitiba, 2018.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Vinícius de Melo Pereira

1. Café - Indústria. 2. Fermentação. I. Universidade Federal do Paraná. II. Pereira, Gilberto Vinícius de Melo. III. Título.

CDD 664.044



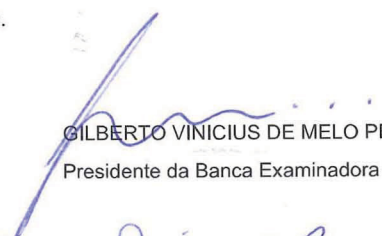
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

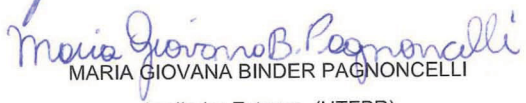
TERMO DE APROVAÇÃO

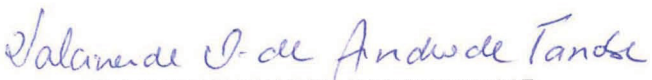
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA CAROLINE DE OLIVEIRA JUNQUEIRA** intitulada: **Contribuições para melhoria de qualidade de grãos de café produzidos na Colômbia: caracterização da diversidade microbiana do processamento pós-colheita por sequenciamento de nova geração**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.


A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 19 de Dezembro de 2018.


GILBERTO VINICIUS DE MELO PEREIRA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MARIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI
Avaliador Externo (UTFPR)


VALCINEIDE OLIVEIRA DE ANDRADE TANOBE
Avaliador Externo (UFPR)


JESUS DAVID CORAL MEDINA
Avaliador Externo (UMARIANA)

(Videoconferência)

Dedico este trabalho aos colegas de ofício, que apesar das condições adversas enfrentadas pela educação no Brasil, acreditam, assim como eu, que o desenvolvimento da biotecnologia pode ser convertido em benefícios à sociedade.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, representado por seu corpo docente, direção, técnicos de laboratório e administração pelo apoio e oportunidade recebidos.

À secretária do programa de Pós-graduação, Martha, por todo auxílio prestado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Vinícius de Melo Pereira, pela orientação, dedicação, advertências, ensinamentos e pela oportunidade. Sua orientação teve impacto fundamental no meu amadurecimento profissional e também pessoal. Obrigada!

À minha mãe, Walkiria, por sempre ter sido o melhor exemplo de dedicação aos estudos e ao trabalho. Pelo apoio incondicional durante a realização deste trabalho e na vida.

Ao meu pai e às minhas irmãs, Francisco, Paulinha e Gabi, pelo carinho e suporte.

Aos colegas que me auxiliaram na execução deste trabalho, Dão Pedro e Jéssica, pelo auxílio nos experimentos e nos conselhos para escrita. Marcela e Antônio, pelas opiniões críticas, conselhos e amizade.

Aos amigos que ingressaram nesta jornada comigo, Adonay, Anderson, Carol, Débora, Natânia, Matheus e Manuel, pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório.

À aluna de iniciação científica, Lana, que sempre esteve disposta a aprender e a auxiliar.

Aos amigos que me apoiaram durante estes dois anos, dentro e fora do laboratório, da pensão, do TDM e NAE, que seria difícil citar cada um. Obrigada!

“(...) o trabalho afasta de nós três grandes males: o tédio, o vício e a necessidade.”

Cândido ou O Otimismo - Voltaire (1759)

RESUMO

O café é uma das bebidas mais populares no mundo, com um consumo anual estimado em 500 bilhões de xícaras. Devido a este crescente mercado, a necessidade em se produzir grãos com características aromáticas distintas e sabores agradáveis fez com que as práticas associadas aos processos pós-colheita realizados nas fazendas cafeeiras recebam maior atenção. Previamente as etapas de comercialização e exportação, as cerejas de café passam pelo processo de remoção das camadas que envolvem os frutos para reduzir a umidade presente nos grãos. Para isto, três processos pós-colheita são utilizados, denominados como via úmida, via seca e via semiseca. Durante o processamento das cerejas de café, uma rica diversidade microbiana está associada as diferentes etapas do processamento, como por exemplo, são responsáveis pela fermentação da camada mucilaginosa na via úmida. Durante a fermentação, ocorre a geração de metabólitos microbianos que poderão impactar no sabor e aroma do café, na inibição de fungos filamentosos, bem como no auxílio da remoção da mucilagem pela quebra da pectina. Neste intuito, a primeira parte deste estudo avaliou as comunidades microbiana presentes em fermentações de café na Colômbia por sequenciamento de nova geração. A plataforma *Illumina* foi utilizada para investigar as comunidades de eucariotos e procariotos presentes durante a fermentação espontânea de grãos de café na Colômbia. Além disso, os compostos gerados pelo metabolismo microbiano foram avaliados por cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massa (GC-MS), e por cromatografia líquida de alta performance (CLAE). Destaca-se a elevada diversidade microbiana encontrada, sendo identificados mais de 160 gêneros bacterianos, na qual houve uma relevante dominância de bactérias ácido lácticas (BAL), representada pelos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. A diversidade de eucariotos apresentou ser mais homogênea, com *Pichia nakasei* sendo dominante durante todo o processo de fermentação. O ácido láctico e acetaldeído foram os principais metabólitos gerados por BAL e *Pichia*, respectivamente. Particularmente, 56 gêneros microbianos foram detectados pela primeira vez na fermentação do café, e podem ser associados ao solo local, água do mar, plantas, insetos e ao contato humano. Os compostos voláteis identificados compõem os grupos químicos de álcoois, ácidos orgânicos, aldeídos, ésteres, terpenos, fenóis e hidrocarbonetos. Este estudo é pioneiro na descrição da microbiota do café Colombiano, ademais, na utilização de técnicas de sequenciamento de nova geração em fermentação de café. Na segunda etapa, objetivou-se isolar e selecionar bactérias do ácido láctico em fermentação de café em laboratório e avaliar sua habilidade em fermentar a frutose. Para isto, a fermentação de café foi conduzida em biorreator durante 30 h, onde amostras da fração líquida foram retiradas, diluídas serialmente e plaqueadas em meio seletivo. Após purificação por plaqueamentos sucessivos, os isolados foram testados quanto a fermentação de frutose, avaliando o consumo por método colorimétrico. A identificação molecular foi realizada através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Ao total de 34 isolados, dos quais 11 foram identificados como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus* sp. e *Pediococcus pentosaceus*. Quanto à fermentação de frutose, os isolados apresentaram perfis fermentativos distintos. Com isto, sugerimos que estudos posteriores sejam executados para investigar se há ou não o perfil de bactéria frutofílica dentre os isolados.

Palavras-chave: processamento pós-colheita; culturas iniciadoras; fermentação de café; frutose; bactérias ácido lácticas; plataforma Illumina.

ABSTRACT

Coffee is one of the most popular beverages in the world with an estimated annual consumption of 500 billion cups. Due to this growing market, the need to produce beans with distinct aromatic characteristics and pleasant flavors made that practices associated with the post-harvest processes carried out on-farms receive more attention. Previously to commercialization and exportation, the coffee cherries must undergo the process of removing the outer layers that covers the coffee cherries to reduce the moisture content present in the coffee cherries. For this, three post-harvest processes are used, named wet, dry and semi-dry. During the processing of coffee cherries, a rich microbial diversity is associated with the different stages of processing, for example, they are responsible for the fermentation of the mucilaginous layer in the wet processing. During the fermentation, there is a generation of microbial metabolites, which may impact coffee flavor and aroma, inhibition of filamentous fungi, as well as aids on the mucilage removal by pectin metabolization. In that order, the first part of this study evaluated the microbial communities present in coffee fermentation in Colombia by next-generation sequencing. The Illumina platform was used to investigate the communities of eukaryotes and prokaryotes present during the spontaneous fermentation of coffee beans in Colombia. In addition, the compounds generated by microbial metabolic activity were evaluated by gas chromatography (GC), gas chromatography coupled to the mass spectrometer (GC-MS), and by high-performance liquid chromatography (HPLC). It is important to highlight that a high microbial diversity was found, with more than 160 bacterial genera, in which there was a significant dominance of lactic acid bacteria (LAB), represented by the genera *Leuconostoc* and *Lactobacillus*. The diversity of eukaryotes was more homogeneous, with *Pichia nakasei* as the dominant specie throughout the fermentation process. Lactic acid and acetaldehyde were the major metabolites generated by LAB and *Pichia*, respectively. In particular, 56 microbial genera were detected for the first time in coffee fermentation, and can be related to the local soil, sea water, plants, insects and human contact. The identified volatile compounds are from the chemical groups of alcohols, organic acids, aldehydes, esters, terpenes, phenols and hydrocarbons. This study is a pioneer in the description of the Colombian coffee microbiota, in addition, the use of next-generation sequencing techniques in coffee fermentation. In the second stage, the objective was to isolate and select lactic acid bacteria in coffee fermentation performed in laboratory and to evaluate their ability to ferment fructose. For this purpose, coffee fermentation was conducted in a bioreactor for 30 h, where samples of the liquid fraction were taken, then serially diluted and plated in a selective medium. After purification by successive plating, the isolates were tested for fructose fermentation, and evaluated the consumption of fructose by colorimetric method. Molecular identification was performed by sequencing the 16S rRNA gene. A total of 34 isolates were identified, of which 11 were identified as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus* sp. and *Pediococcus pentosaceus*. Regarding the fermentation of fructose, the isolates showed different fermentation profiles. Therefore, we suggest that further studies be carried out to investigate whether or not there is a profile of fructophilic bacteria among the isolates.

Keywords: post-harvest processing; starter cultures; coffee fermentation; fructose; lactic acid bacteria; Illumina platform.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I (REVISÃO DE LITERATURA) - MICROBIOMA ASSOCIADO AO PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA DE CAFÉ E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DOS GRÃOS.....	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 PRODUÇÃO E CONSUMO MUNDIAL DE CAFÉ	16
2.1 PRODUÇÃO DE CAFÉ NA COLÔMBIA	17
3 PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA.....	18
3.1 VIA ÚMIDA	18
3.2 VIA SECA	20
3.3 VIA SEMISSECA.....	21
4 DIVERSIDADE MICROBIANA NO PROCESSAMENTO DE CAFÉ.....	22
4.1 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DOS PROCESSAMENTOS DE CAFÉ	22
4.2 DIVERSIDADE MICROBIANA EM FERMENTAÇÕES DE CAFÉ.....	24
4.2.1 Bactérias.....	24
4.2.2 Fungos e Leveduras.....	25
4.3 AÇÃO DA MICROBIOTA NO PROCESSAMENTO DE CAFÉ	29
4.4 CULTURAS INICIADORAS.....	30
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II (RESULTADO DA PESQUISA) - PRIMEIRA DESCRIÇÃO DO MICROBIOMA PRESENTE NA FERMENTAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ EM BUESACO (COLÔMBIA) BASEADO NO SEQUENCIAMENTO ILLUMINA	39
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1 FERMENTAÇÃO.....	41
2.2 IDENTIFICAÇÃO DO MICROBIOMA PRESENTE NA FERMENTAÇÃO DE CAFÉ COLOMBIANO	42
2.2.1 Extração total de DNA	42
2.2.2 Sequenciamento em plataforma Illumina.....	42
2.3 ANÁLISES QUÍMICAS.....	43

2.3.1 Principais moléculas quantificadas por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e cromatografia gasosa (GC).....	43
2.3.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).....	44
2.3.3 Composição química dos grãos de café	45
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 DIVERSIDADE E SUCESSÃO DOS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À FERMENTAÇÃO DE CAFÉ COLOMBIANO	46
3.1.1 Procariotos	46
3.1.2 Eucariotos.....	50
3.2 ANÁLISES QUÍMICAS.....	52
3.2.1 Principais metabólitos encontrados na fração líquida da fermentação da polpa do café Colombiano	52
3.2.2 Metabólitos secundários encontrados na fração líquida da fermentação da polpa do café Colombiano	55
3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS DE CAFÉ.....	58
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	61

ANEXOS

ANEXO 1	68
ANEXO 2	69
ANEXO 3	75

CAPÍTULO III (RESULTADO DA PESQUISA) - ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS EM FERMENTAÇÃO DE CAFÉ.....83

1 INTRODUÇÃO	83
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 FERMENTAÇÃO DE CAFÉ EM BIORREATOR.....	85
2.2 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS	85
2.3 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE FRUTOSE	86
2.4 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS.....	87
2.4.1 Extração de DNA	87
2.4.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	87

2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	88
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1	CONTAGEM DE CÉLULAS.....	89
3.2	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS	90
3.3	FERMENTAÇÃO DE FRUTOSE.....	90
3.4	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	92
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
	REFERÊNCIAS	96

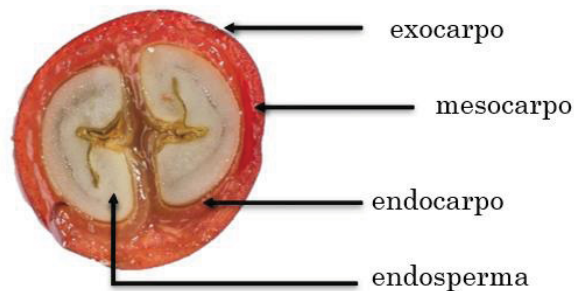
CAPÍTULO I – MICROBIOMA ASSOCIADO AO PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA DE CAFÉ E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DOS GRÃOS

1 INTRODUÇÃO

O café teve sua origem histórica nas terras altas da Etiópia, migrando para o Iêmen, sendo posteriormente difundido pela Europa. Os primeiros relatos de seu consumo são do final do século XV, desde a abertura da primeira cafeteria em Meca (TEKETAY, 1999). Atualmente, trata-se de uma das bebidas mais consumidas mundialmente. Os tópicos produção e o consumo mundial de café serão apresentados na segunda seção deste capítulo.

O arbusto que dá origem aos frutos de café pertence à família Rubiaceae, do gênero *Coffea* L., o qual comporta mais de 100 espécies (DAVIS et al., 2006). Atualmente, as espécies mais exploradas comercialmente são *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* L. (café robusta) (ICO, 2018). A FIGURA 1 apresenta a morfologia da cereja de café. A cereja é revestida pela casca (exocarpo) que indica o período de maturação e tempo de colheita através da variação de cores, indo do verde ao laranja-avermelhado quando madura. A polpa (mesocarpo) consiste em uma camada mucilaginosa composta por açúcares (ex: glicose, frutose e sacarose), pectina, proteínas, lipídios, minerais e cafeína. A mucilagem é aderida ao endosperma, que representa o grão de café propriamente dito. O endosperma é também revestido por uma camada de celulose e hemicelulose denominada pergaminho (endocarpo) (SAKIYAMA; FERRÃO, 2014)

FIGURA 1: MORFOLOGIA DA CEREJA DE CAFÉ



Fonte: Autora (2018)

Para a obtenção dos grãos de café, uma série de operações deverão ser executadas com a finalidade em remover a casca, a camada mucilaginosa e o pergaminho, para que posteriormente o café possa ser comercializado, torrado e moído. Os métodos de remoção da mucilagem serão apresentados na terceira seção deste capítulo.

A qualidade do café, a qual é avaliada pelo seu aroma e sabor, é influenciada por múltiplos fatores, pois depende de qualidades físico-químicas e da integridade dos grãos, como por exemplo, estágio de maturação, defeitos, tamanho, variedade da espécie, umidade local, o tipo de processamento ao qual foi submetido para remoção da mucilagem, o tempo e temperatura de torrefação, e, finalmente, o método de preparação da bebida (extração) (ILLY; VIANI, 2005). Portanto, ao se avaliar a qualidade da bebida final, deve-se levar em conta todos estes atributos. Neste trabalho, sugerimos a investigação sobre qual a influência dos métodos de remoção da mucilagem na composição de química do grão, ou seja, na concentração de açúcares, ácidos orgânicos, precursores de aromas, entre outros.

Alguns termos específicos serão utilizados ao longo do presente trabalho. O termo *off-flavors* é utilizado para classificar moléculas orgânicas, voláteis ou não-voláteis, que impactam negativamente no aroma de um produto, como vinhos e cervejas. Neste caso, a detecção de moléculas como 2-metoxi-3-isopropil-5-metilpirazina, 2-metoxi-3-isopropilpirazina, 2-metoxi-3-isobutilpirazina, 2,3-butanodiol, ácido butírico, 2-metil-isobutanol, 2,4,6-tricloroanisol, geosmina são responsáveis pela produção de *off-flavors* no café (DAHL; TAVARIA; MALCATA, 2000; GUEULE et al., 2015; QIN et al., 2006; TOLEDO et al., 2016). O termo *threshold* indica o limiar de detecção de moléculas avaliadas por técnicas de química analítica, podendo assim, uma molécula possuir “baixo” ou “elevado” *threshold*. Já o termo *Terroir* (sem tradução) é um conceito Francês geralmente utilizado na avaliação sensorial de vinhos. Em tradução livre, refere-se ao “gosto do lugar”, ou seja, quando uma área ou terra, geralmente pequena, cujo o microclima e o solo conferem qualidades singulares aos produtos alimentícios produzidos naquela região (BARHAM, 2003). Recentemente, o termo tem sido utilizado para caracterizar a produção de café de diferentes regiões produtoras, visto que o processamento pós-colheita realizado em fazenda fornece condições climáticas distintas de cada região (CARVALHO NETO et al., 2018).

A composição química dos grãos sofre transformações ao longo da cadeia de produção. Este fato pode ser resultado do processo de germinação dos grãos, da ação dos microrganismos presentes (fermentação), bem como das reações térmicas que caramelização, Maillard e Strecker que ocorrem na etapa de torrefação (PEREIRA et al., 2019). Portanto, a

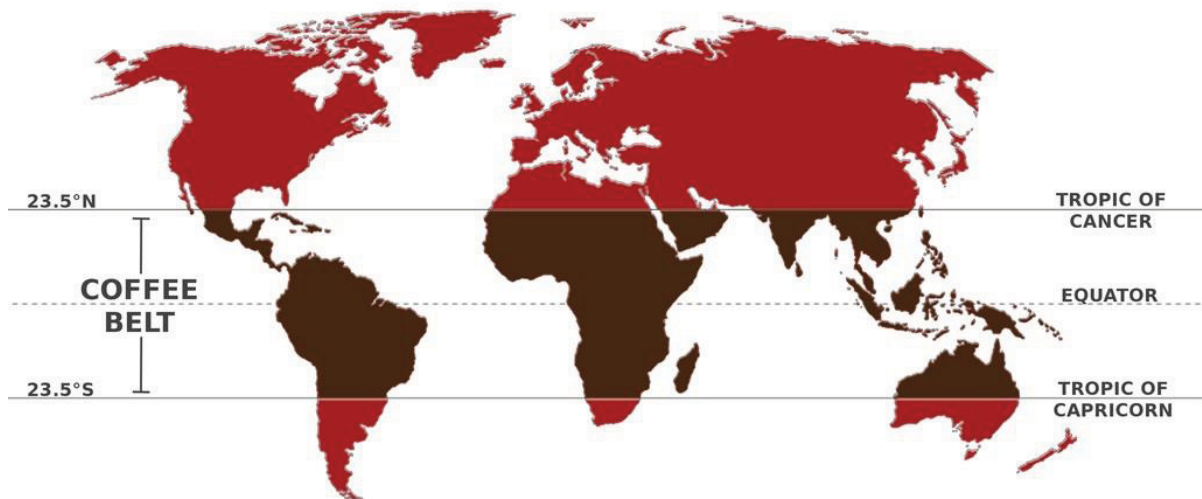
quarta e última seção deste capítulo irá descrever a diversidade microbiana presente na produção de café, e como sua atuação pode impactar em qualidade final.

Portanto, o objetivo deste primeiro capítulo mostrar a relevância do tema avaliando a produção e consumo de café, bem com revisar os tipos de processamento pós-colheita que são utilizados em fazenda, e finalmente, mostrar o potencial na rica diversidade microbiana associada às fermentações de café, e como a seleção de microrganismos destes ambientes poderão auxiliar na padronização de fermentações.

2 PRODUÇÃO E CONSUMO MUNDIAL DE CAFÉ

Atualmente, o café é um dos principais produtos agrícolas comercializados e consumidos mundialmente. Devido as características climáticas, os maiores produtores de café estão localizados na região equatorial denominada como “*The coffee belt*”, situada entre o trópico de Câncer e trópico de Capricórnio (FIGURA 2).

FIGURA 2: ZONA EQUATORIAL CONHECIDA COMO “THE COFFEE BELT”



Fonte: (“Coffee Basics - Mela Coffee Roasting Co.”, [s.d.]

Anualmente, a ICO, *International Coffee Organization*, prepara relatórios sobre a produção e importação mundial de sacas de café (60kg). O Brasil ainda é o maior produtor (52.7 mi), seguido de Vietnã (29.5 mi), Colômbia (14 mi), Indonésia (10.9 mi) e Etiópia (7.6 mi) (ICO, 2018). Dentre os maiores importadores estão os Estados Unidos, Alemanha, França, Itália e Japão. Devido as suas características estimulantes e organolépticas, o café tornou-se ao longo dos anos um hábito diário, sendo considerado uma das bebidas mais apreciadas no mundo, com um consumo de mais de 500 bilhões de xícaras anualmente. Os maiores consumidores de café são a Finlândia (9.6 kg/per capita), Alemanha (6.8kg/per capita), Brasil (6.1kg/per capita), Itália (5.6kg/per capita) e EUA (4.1kg/per capita).

2.1 PRODUÇÃO DE CAFÉ NA COLÔMBIA

A Colômbia é o terceiro maior produtor de café verde do mundo (ICO, 2018). A produção de café na Colômbia, o qual é 100% café arábica, está diretamente relacionada ao desenvolvimento econômico da Colômbia (EDWARDS, 1984). Em torno de 1 milhão de hectares do território Colombiano é destinado a produção de café. A condições locais, como solo vulcânico rico em minerais, as elevadas altitudes (800 – 2000 m) e clima impactam na qualidade do café Colombiano. Ademais, a elevada umidade local fez com que práticas locais fossem desenvolvidas ao longo dos anos, como é o caso do “café lavado” (ver seção 3.1). Estas características tornaram o café Colombiano reconhecido mundialmente por suas características de aroma e sabor.



Fonte: (“Sembrado Cafe Colombiano”, [s.d.]

3 PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA

As cerejas recém colhidas de café deverão ser submetidas a uma série de etapas a fim de remover as camadas que envolvem o fruto, bem como casca, polpa e mucilagem, para a obtenção dos grãos de café verde que serão destinados à exportação. O processamento pós-colheita tem como objetivo reduzir o percentual de umidade presente nos grãos de 60% para 12-13%, e deste modo, evitar contaminações, facilitar armazenamento e transporte (BRANDO; BRANDO, 2014; CLARKE, 1985). A remoção da mucilagem e secagem dos grãos deverá ter início, preferencialmente, após a colheita dos frutos, para reduzir as possíveis contaminações por mofos (BEE et al., 2005). Atualmente, existem três processamentos pós-colheita, conhecidos como via úmida, via seca e via semisseca. Estes processos diferem em complexidade das etapas e nas características organolépticas do café resultante.

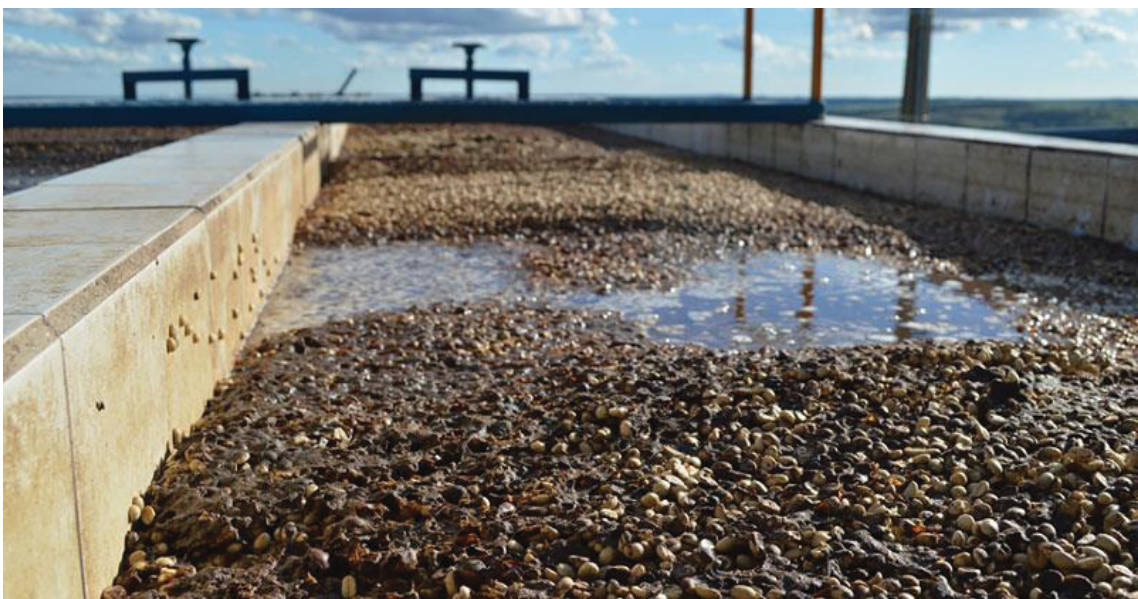
3.1 VIA ÚMIDA

O processamento pós-colheita por via úmida envolve a etapa diferencial de fermentação espontânea, na qual os frutos de café são fermentados em tanques de alvenaria gerando os grãos denominados de “café lavado” (CLARKE, 1985). O termo fermentação espontânea se caracteriza pela ação de microrganismos que ocorrem de forma natural na região produtora, podendo ser fornecidos pelo contanto humano durante o manuseio dos frutos, solo, ar, água, pelas ferramentas e tanques utilizados, bem como pela microbiota presente na superfície do fruto (CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2004). Além disso, o processo fermentativo desencadeia alterações químicas no interior dos grãos que poderão afetar a qualidade do produto final (GONZALEZ-RIOS et al., 2007).

A fermentação de café pode ser classificada como mista, sofrendo a ação de diferentes grupos microbianos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que consomem os açúcares e outros substratos fornecidos pela polpa do café (SCHWAN; WHEALS, 2003). Neste processo fermentativo, não existe um metabólito final de interesse, mas sim o processo de remoção da mucilagem em si. Os metabólitos como etanol, ácido acético, ácido lático e outros metabólitos são produzidos em proporções semelhantes.

Inicialmente, os frutos são selecionados pelo estágio de maturação e despulpados mecanicamente para a remoção da casca e remoção parcial da mucilagem. Ao remover a casca, a mucilagem, rica em açúcares, pectina e amino ácidos, estará exposta aos microrganismos presentes no ambiente. Os frutos são dispostos em tanques de alvenaria e cobertos por água para se estabelecer a condição de anaerobiose. A etapa de fermentação poderá ocorrer de 6-72h à depender da temperatura ambiente, podendo ser conduzida até a remoção final da mucilagem aderida aos grãos (BRANDO; BRANDO, 2014). Após o término da fermentação, os grãos serão encaminhados para a secagem (CLARKE, 1985).

Os cafés gerados pelo processamento via úmida possuem reconhecimento no mercado por apresentarem características aromáticas agradáveis, sendo referenciado como um café de notas frutais, florais, caramelizados e de acidez agradável (CLARKE, 1985; GONZALEZ-RIOS et al., 2007; SELMAR; KLEINWACHTER; BYTOF, 2014). Isso pode resultar do processo de germinação dos grãos quando submersos em água, bem como do metabolismo dos microrganismos envolvidos na etapa de fermentação, pois são responsáveis pela liberação de aromas, como ésteres e álcoois superiores, que poderão se difundir para o interior do grão (PEREIRA et al., 2014, 2019). Este método é utilizado em regiões que apresentam temperatura elevada e alta umidade, como Colômbia, América Central e Havai (SCHWAN; WHEALS, 2003).



Fonte: (VIOL, [s.d.]

3.2 VIA SECA

O processamento via seca resulta no denominado café “natural”, ou até mesmo café “não lavado”. Este método é o mais simples, rústico e menos dispendioso por se utilizar da energia solar em sua principal etapa, que é a secagem dos grãos. Neste processo, os frutos são colhidos e organizados pelo estágio de maturação e separados de impurezas, como pedras, folhas e pedaços de galhos. Então, os frutos são espalhados sobre o chão ou sobre plataformas em camada de 5-8 cm, sem a remoção prévia das camadas que envolvem os frutos, como a casca e polpa. Os frutos poderão ser revirados ao longo dos dias e cobertos durante a noite. Pela ação da luz solar, os frutos de café são secos de 14 a 30 dias até que se reduza a umidade inicial de 60% para 11-12% (DE BRUYN et al., 2017; EVANGELISTA et al., 2014a; SILVA et al., 2008). Apesar de simples, este método requer a disponibilidade de longos períodos de exposição solar, bem como apresenta a desvantagem da exposição ao ambiente, podendo sofrer a ação deteriorante de insetos. O café produzido pela via seca apresenta características classificadas como “*full body*” (SELMAR; KLEINWACHTER; BYTOF, 2014).



Fonte: “Coffee Production Process – The Coffee Attendant”, 2017

3.3 VIA SEMISSECA

O processamento via semisseca, também chamado de natural descascado, compartilha etapas dos métodos seco e úmido. Neste método, apenas as cerejas maduras são selecionadas, onde são submetidas ao despulpamento mecânico. O café despulpado é transferido e espalhado em plataformas de concreto, onde são expostos às condições ambientais e à temperatura local, como no processamento a seco (VILELA et al., 2010). Este método é adequado em regiões que apresentem baixa umidade, onde a camada mucilaginosa será seca rapidamente, evitando fermentações indesejáveis. Esse método origina o café denominado “natural descascado” (BEE et al., 2005), os quais apresentam um corpo intermediário entre os cafés lavados e natural.



Fonte: (JAROSLAV, [s.d.])

4 DIVERSIDADE MICROBIANA NO PROCESSAMENTO DE CAFÉ

A comunidade microbiana associada ao processamento de café tem sido estudada há mais de 100 anos, sendo esta composta por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Esta comunidade microbiana pode ser fornecida pelo ambiente, pela superfície dos frutos e pelo contato humano (AVALLONE et al., 2001a; SILVA, 2014). Além disso, pode variar de acordo com fatores como a variedade do café, do processamento pós-colheita, e de fatores ambientais, como umidade, temperatura e chuva. Os microrganismos associados ao processamento pós-colheita podem desempenhar funções importantes na qualidade e processamento do café, bem como (i) remoção da polpa e mucilagem, (ii) melhorar o sabor e aroma da bebida de café, (iii) impacto negativo no sabor e aroma, (iv) inibir fungos micotoxigênicos, e (v) biocontrole (SILVA, 2014). Dada estas funções faz-se de suma importância a caracterização desta comunidade microbiana.

4.1 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DOS PROCESSAMENTOS DE CAFÉ

Por muito tempo, pesquisadores utilizaram métodos que dependem do cultivo de microrganismos para desvendar a comunidade presente nos mais diversos ambientes. No entanto, a representatividade da comunidade microbiana através destes métodos é falha, uma vez que apenas uma fração dos microrganismos presentes no ambiente são cultiváveis devido à reprodutibilidade de condições favoráveis para o crescimento em laboratório. O uso de métodos independentes de cultivo permitiu a transposição desses fatores limitantes. Assim, abre-se um campo de possibilidades para a caracterização da fermentação de café.

Os métodos dependentes de cultivo requerem o isolamento e purificação da colônia, para que se possa realizar testes bioquímicos, coloração de Gram, formação de esporos e motilidades, como recomendado por manuais de caracterização (“BERGEY’S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (7th ed.)”, 1964). Através do perfil fermentativo de carboidratos, como glicose e xilose, realizados através de ensaios e/ou kits comerciais. A identificação também pode ser realizada pela avaliação das características morfológicas da colônia.

O desenvolvimento de técnicas moleculares possibilitou a detecção de novos grupos microbianos em fermentações ao contornar a limitação da necessidade do isolamento e cultivo para a detecção e identificação. Atualmente, a utilização de ferramentas moleculares na fermentação do café ainda é restrita a poucos estudos (CARVALHO NETO et al., 2018; DE BRUYN et al., 2017; EVANGELISTA et al., 2015; VILELA et al., 2010). Portanto, estudos ainda são necessários para desvendar a dinâmica e a sucessão microbiana, bem como o efeito de seu metabolismo na qualidade do produto final.

Quanto aos métodos independentes de cultivo, a identificação pode ser feita a nível molecular pela amplificação de genes pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e avaliação do padrão de bandas geradas, podendo ser pela análise de restrição de DNA ribossômico amplificado (ARDRA) (RODAS; FERRER; PARDO, 2003; VILELA et al., 2010), eletroforese em gel gradiente desnaturante (PCR-DGGE) (ERCOLINI, 2004; EVANGELISTA et al., 2015) e amplificação da região palindrômica extragênica (rep-PCR) (GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001).

O uso de sequenciamento de nova geração, como o *High-throughput sequencing* (HTS), permitiu superar as limitações dos métodos associados ao cultivo contribuindo para o avanço da compreensão da diversidade e sobre a composição de vários ecossistemas microbianos presente em alimentos (DALMASSO et al., 2016). A plataforma *Illumina* gera leituras mais curtas (250 pb) do que outros sistemas HTS, mas fornece uma taxa de transferência maior, fornecendo milhares de leituras de alta qualidade dos *amplicons* gerados e permitindo uma análise taxonômica superior. Os estudos inéditos conduzidos no Brasil e Equador através desta técnica, demonstrou a presença de mais de 80 famílias de bactérias em fermentações de café (CARVALHO NETO et al., 2018; DE BRUYN et al., 2017). Compreender as interações microbianas dentro dos processos fermentativos espontâneos é necessário para fornecer alternativas para a melhorias dos produtos, aumentando a segurança e propriedades de consumo desejáveis.

4.2 DIVERSIDADE MICROBIANA EM FERMENTAÇÕES DE CAFÉ

4.2.1 Bactérias

Dentre a grande diversidade de bactérias relatadas nos processamentos de café, o grupo das bactérias do ácido láctico (BAL) constituem o grupo dominante. Estudos realizados em diferentes regiões produtoras de café, como Brasil, Equador, Índia e Etiópia, relatam a dominância de BAL (CARVALHO NETO et al., 2018; DE BRUYN et al., 2017; DE BRUYNE et al., 2007; VELMOUROUGANE, 2013). Além disso, através destes estudos tem sido possível notar a alta prevalência dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Outros gêneros podem aparecer em menor concentração, como é o caso de *Weissella*, *Lactococcus* e *Enterococcus* (DJOSSOU et al., 2011; LEONG et al., 2014; SCHILLINGER et al., 2008; VILELA et al., 2010). As BAL estão presentes na superfície dos frutos de café frescos, o que pode indicar a origem deste grupo durante a fermentação espontânea (DE BRUYN et al., 2017; LEONG et al., 2014). O papel das BAL na fermentação de café ainda requer investigação, no entanto, sabe-se que são responsáveis pela diminuição significativa do pH devido à produção de ácido láctico (CARVALHO NETO et al., 2018; PEREIRA et al., 2016), podendo influenciar na inibição de fungos filamentosos (DJOSSOU et al., 2011; MASSAWE; LIFA, 2010).

A família Enterobacteriaceae são detectadas no início das fermentações de café, e que, pela dominância de BAL, a população de Enterobacteriaceae reduz ao longo do processo (CARVALHO NETO et al., 2018). As espécies mais relatadas da família Enterobacteriaceae são pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Erwinia* e *Enterobacter* (AVALLONE et al., 2001a; PEE; CASTELEIN, 1972; SILVA et al., 2008). A elevada população inicial de enterobactérias pode ser associada à superfície do fruto de café, solo, fonte de água e contato humano (AVALLONE et al., 2001a; FRANK; LUM; DELACRUZ, 1965; GRICE et al., 2008). A presença de bactérias desta família pode indicar a necessidade de uma melhor higienização do processo. Pouco se sabe sobre a atividade das enterobactérias na fermentação de café, porém, podem estar associadas à produção de enzimas pectinolíticas (FRANK; LUM; DELACRUZ, 1965).

Outras bactérias como *Tatumella ptyseos*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter spp.*, *Bacillus subtilis*, *B. macerans* *B. megaterium*,

Methylobacterium, *Rhodoplanes*, *Clostridium*, *Janthinobacterium* e *Cellulosimicrobium* podem aparecer em fermentações de café em um nível mais baixo, podendo estar ligadas ao *terroir* de cada região produtora (CARVALHO NETO et al., 2018; DE BRUYN et al., 2017; SILVA et al., 2013).

4.2.2 Fungos e Leveduras

A atividade metabólica das leveduras está correlacionada a fermentação alcoólica dos açúcares, e na produção de uma vasta gama de metabólitos secundários, tais como álcoois superiores, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos e cetonas (PEREIRA et al., 2012, 2014; SILVA, 2014). Esses metabólitos secundários possuem baixo *threshold*, visto que geralmente têm alto impacto no sabor e também podem ser difundidos para o interior dos grãos, embora estudos neste sentido sejam necessários (EVANGELISTA et al., 2014a, 2014b, PEREIRA et al., 2014, 2015). O metabolismo de leveduras também pode atuar de forma a inibir o crescimento de fungos micotoxigênicos, bem como produzir enzimas pectinolíticas, atuando assim, no impacto na qualidade do café.

Dentre as leveduras já detectadas no processamento de café estão *Saccharomyces cerevisiae*, *S. marxianus* (*Kluyveromyces marxianus*), *S. bayanus* e *Schizosaccharomyces* spp. (AGATE; BHAT, 1966). Além disso, em frutos frescos de café foi possível detectar a presença de *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. peliculosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Torulopsis fumata*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Kloeckera apis/apiculate* (AVALLONE et al., 2001a; PEE; CASTELEIN, 1972). Quanto ao tipo de processamento, os gêneros *Pichia*, *Starmerella* e *Candida* foram detectados nos processamentos via úmida e via seca (DE BRUYN et al., 2017). Já no processamento via semisseca, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces* sp. e *Torulasporea delbrueckii* foram detectadas (VILELA et al., 2010). No processamento via seca de café, estudos relatam a presença das espécies *Debaromyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *P. ofunaensis* e *Arxula adenivorans* (SILVA et al., 2000, 2008).

Quanto aos métodos de detecção, as leveduras *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudointermedia*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia ohmeri*, *Torulasporea delbrueckii*, *S. cerevisiae* e *Candida xestobii* foram identificadas por

PCR-DGGE, no entanto, apesar da identificação molecular, *S. cerevisiae* e *C. xestobii* não foram isoladas (MASOUD et al., 2004), reforçando a desvantagem e a subestimação da diversidade avaliada apenas pelo isolamento e contagem de células.

Por outro lado, os fungos filamentosos estão presentes em menor quantidade. Entretanto, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, foram relatados e isolados do processamento de café (BATISTA et al., 2003, 2009, SILVA et al., 2000, 2008; VILELA et al., 2010). Podem auxiliar na quebra na mucilagem devido a enzimas pectinolíticas. Entretanto, a presença de fungos filamentosos está associada a contaminações por micotoxinas, como por exemplo, a ocratoxina A (OTA) (BATISTA et al., 2009).

TABELA 1 – BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA DE CAFÉ

PAÍS	ESPÉCIES	REFERÊNCIAS
Brasil	<i>Arthrobacter</i> spp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. macerans</i> , <i>B. polymyxa</i> , Burkholderia, <i>Brevundimona</i> , <i>Brochothrix</i> spp., <i>Cellulomonas</i> spp., <i>Cedecea</i> sp., <i>Chromobacter violaceum</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Devosia</i> , <i>Dermabacter</i> spp. <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. gergo</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>Erwinia herbicola</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Fructobacillus</i> , <i>Flavobacterium odoratum</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Janthinobacterium</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>Kaistobacter</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Luteimonas</i> , <i>Microbacterium</i> spp., <i>Methylobacterium</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. vesicularis</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Pasteurella haemolytica</i> , <i>Planctomyces</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>S. enterica</i> var. <i>arizonae</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Tatumella pyyeseus</i> , <i>Yersinia</i> sp.	(CARVALHO NETO et al., 2018; SILVA et al., 2000, 2008; VILELA et al., 2010)
Equador	<i>Gluconobacter</i> spp., <i>Dyella kyungheensis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroide</i> , <i>Weissella</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Janthinobacterium lividum</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> , <i>K. pneumoniae</i>	(DE BRUYN et al., 2017)
Havai	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. vesicularis</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Cedecea</i> sp., <i>Chromobacter violaceum</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Fructobacterium odoratum</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>Pasteurella haemolytica</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>S. enterica</i> var. <i>arizonae</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Tatumella pyyeseus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>Cellulomonas</i> spp., <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Microbacterium</i> spp., <i>Brochothrix</i> spp., <i>Dermabacter</i> spp.	(FRANK; LUM; DELACRUZ, 1965)
Índia	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Erwinia dissolvens</i> , <i>Paracolobactrum aerogenoides</i> , <i>P. coliforme</i> , <i>P. intermedium</i> , <i>Escherichia intermedium</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	(VELMOURUGANE, 2013)
México	<i>Leuconostoc mesenteroides dextranicum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Enterobacter herbicola</i> , <i>Pseudomonas cepaciae</i> , <i>Chrysomonas luteola</i>	(AVALLONE et al., 2001a) Pedersen breed
Tanzânia	<i>Leuconostoc citreum</i> , <i>L. holzapfelii</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. pseudomesenteroides</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>W. soli</i>	(SCHILLINGER et al., 2008)
Taiwan	<i>Leuconostoc pseudomesenteroi</i> , <i>L. citreum</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>W.thailandensi</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Enterococcus faecalis</i>	(LEONG et al., 2014)

TABELA 2 – LEVEDURAS ASSOCIADAS AO PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA DE CAFÉ

PAÍS	ESPÉCIES	REFERÊNCIAS
Brasil	<i>Arxula adeninivorans</i> , <i>Arxula</i> sp., <i>Blastobotrys proliferans</i> , <i>Candida auringsophila</i> , <i>C. incommunis</i> , <i>C. paludigena</i> , <i>C. schatarii</i> , <i>C. vartiovaarae</i> , <i>C. saitoana</i> , <i>C. fermentati</i> , <i>C. membranifaciens</i> , <i>C. ernobii</i> , <i>C. fukuyamaensis</i> , <i>C. membranifaciens</i> , <i>C. carpophila</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. quercitrusa</i> , <i>Citeromyces matritensis</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>D. polymorphus</i> , <i>D. polymorphus</i> , <i>Geotrichum fermentans</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>Kloeckera</i> sp., <i>Kluyveromyces</i> sp., <i>Pichia ofunaensis</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. burtonii</i> , <i>P. subpelliculosa</i> , <i>P. anomala</i> , <i>P. acaciae</i> , <i>P. anomala</i> , <i>P. ciferii</i> , <i>P. jadimii</i> , <i>P. caribbica</i> , <i>P. lyferdii</i> , <i>P. sydowiorum</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces</i> sp., <i>S. bayanus</i> , <i>Saccharomycopsis fermentans</i> , <i>S. fibuligera</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Sporopachydermia cereana</i> , <i>Stephanosascus smithiae</i> , <i>Trichosporonoides oedocephales</i> , <i>Torulasporea delbrueckii</i> , <i>Williopsis saturnus</i> var. <i>sargentensis</i>	(PEREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2000, 2008; VILELA et al., 2010)
Equador	<i>Pichia kluyveri/fermentans</i> , <i>Pichia</i> , <i>Starmerella bacillaris</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	(DE BRUYN et al., 2017)
Índia	<i>Saccharomyces marxianus</i> (<i>Kluyveromyces marxianus</i>), <i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> spp.	(AGATE; BHAT, 1966; VELMOURUGANE, 2013)
México	<i>Candida guilliermondii</i> , <i>C. albidus</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Kloeckera apis apiculata</i>	(AVALLONE et al., 2001a)
Tanzânia	<i>Candida pseudointermedia</i> , <i>Candida xestobii</i> , <i>Pichia ohmeri</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Torulasporea delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(MASOUD et al., 2004)

4.3 AÇÃO DA MICROBIOTA NO PROCESSAMENTO DE CAFÉ

A hidrólise da pectina pode facilitar a remoção da mucilagem durante o processo de fermentação e é obtida pela ação sinérgica de pectinases, incluindo a pectinametilesterase, endo e exopoligalacturonase, pectato liase e pectina liase. A presença de microrganismos com ação pectinolítica, como por exemplo, *Erwinia dissolvens*, *Aerobacter* sp. e *Escherichia* sp. foram relatadas em fermentações de café (FRANK; LUM; DELACRUZ, 1965; VAUGHN et al., 1958). A acidificação do processo fermentativo também pode auxiliar na remoção da mucilagem pela hidrólise da pectina (AVALLONE et al., 2001b).

A qualidade de uma bebida de café está intimamente relacionada às suas propriedades sensoriais, como a percepção de aroma e sabor. Durante a fermentação da polpa do grão de café, a quebra da pectina e o consumo de carboidratos e aminoácidos pode levar à formação de precursores aromáticos que atuam no sabor da bebida final (PEREIRA et al., 2019). O perfil aromático do café é composto por ácidos orgânicos, aldeídos (hexanal, heptanal, acetaldeído), ésteres (acetato de etila, acetato de isoamila, hexanoato de etila), furanos, álcoois superior (álcool isoamílico, álcool isobutílico, 1-octen-3-ol, 1-pentanol), hidrocarbonetos (tolueno), cetonas (acetoína, 2-butanona, diacetil), fenóis (guaiacol), pirazinas, piridinas, pirroles, compostos de enxofre e terpenos (LEE et al., 2015). A formação de compostos orgânicos voláteis e a produção de precursores de aromas em fermentações de café estão associados principalmente ao metabolismo de leveduras. Porém, o perfil aromático dos grãos fermentados é alterado pela etapa de torrefação devido a exposição dos precursores à elevadas temperaturas. A presença de leveduras dos gêneros *Pichia*, *Saccharomyces* e *Candida* estão associadas a presença de compostos aromáticos que conferem notas frutais ao café, como o acetaldeído, acetato de hexila, acetato de isobutila, acetato de etila, acetato de isoamila, hexanal, 1-octanol, 2-metil-1-butanol, furfural, 2-feniletanol, 1,2-propanodiol, álcool furfurílico, guaiacol, 3-metilbutanol, linalol, 1,3-butanodiol e 1-pentanol (PEREIRA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2017; SILVA et al., 2013). O impacto das bactérias na formação de aroma ainda está sob avaliação. No entanto, cepas selecionadas de *L. plantarum* e *L. paracasei* spp. *paracasei* influenciou na concentração final de propionato de etila e acetato de etila encontrados nas fermentações de café. Entretanto, estas moléculas não foram detectadas após a torrefação dos grãos (PEREIRA et al., 2016).

4.4 CULTURAS INICIADORAS

As culturas iniciadoras são utilizadas para iniciar processos fermentativos a fim de aumentar a eficiência e/ou acelerar uma fermentação, tendo em vista a seleção de microrganismos para cada processo e objetivo específicos. Para isto, a cultura iniciadora se caracteriza como um inóculo inicial contendo um grande número de microrganismos selecionados (HOLZAPFEL, 1997). As culturas iniciadoras são amplamente empregadas na indústria alimentícia, utilizadas para garantir a segurança e padronização em fermentações alcoólicas (vinho, cerveja, tequila, cachaça, sake, *spirits*), fermentações lácteas (queijo, iogurte, pickles, *sauerkraut*, *kimchi*, salames), e em fermentações a base de soja na produção de missô e shoyu. Os microrganismos selecionados como culturas iniciadoras devem apresentar características como: adaptar-se à matéria-prima e ao processo fermentativo, melhorar a qualidade do produto, estender o tempo de prateleira, reduzir o tempo de processamento, inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. Finalmente, culturas iniciadoras devem apresentar estabilidade e segurança para sua aplicação na produção de alimentos (EVANGELISTA et al., 2014a; HOLZAPFEL, 1997; TALON et al., 2008).

Na indústria cafeeira, devido à crescente demanda em se produzir grãos de qualidade com características organolépticas únicas, o processo fermentativo tem se tornado uma prática cada vez mais presente. Neste intuito, a aplicação de culturas iniciadoras em fermentações de café tem sido desenvolvidas nos últimos anos como forma de padronizar o processo de fermentação e melhorar a qualidade da bebida de café (RIBEIRO et al., 2017; SILVA et al., 2013). Dentre os critérios de seleção de culturas iniciadoras para a produção de café incluem-se a capacidade de crescer e dominar dentre os microrganismos naturais, produzir enzimas pectinolíticas para facilitar o processo de remoção da mucilagem, produzir metabólitos que possam conferir notas sensoriais distintas, como ácidos orgânicos, ésteres, álcoois superiores, e/ou inibam o crescimento de microrganismos indesejáveis (DE VUYST; WECKX, 2016; PEREIRA et al., 2012, 2016, 2017).

Na literatura, a implementação de culturas iniciadoras em fermentações de café ainda é restrita e requer aprofundamento. A seleção de leveduras tem tido como foco aquelas que apresentam baixa produção de etanol e alta produção de compostos com alto teor aromático, como o acetaldeído, acetato de etila e acetato de isoamila (BRESSANI et al., 2018; PEREIRA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2017). Dentre a seleção de bactérias, o grupo das BAL mostram-

se promissoras tendo em vista a rápida produção de ácido láctico que é utilizado para acelerar o processo fermentativo (PEREIRA et al., 2016).

Os microrganismos utilizados no desenvolvimento de culturas iniciadoras são isolados no próprio processamento do café. No processamento via úmida, a levedura *Pichia fermentans* YC5.2 foi isolada e selecionada devido sua capacidade de crescer sob condições de estresse e pela detecção da produção de compostos voláteis (PEREIRA et al., 2014). Em estudo posterior, a cepa selecionada foi inoculada em no processamento pós-colheita de café conduzida em fazenda (Lavras), gerando uma bebida final com sabor distinto de elevada qualidade sensorial (PEREIRA et al., 2015). Em processamento via seca e semiseca, as cepas *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia guilliermondii* e *Candida parapsilosis* foram isoladas e apresentaram potencial na produção de enzimas, como a pectina liase, e na produção de compostos aromáticos (EVANGELISTA et al., 2014; SILVA et al., 2013).

Além disso, existem relatos do uso de culturas comerciais em fermentações de café. A cultura iniciadora de *Rhizopus oligosporus* é utilizada para a produção de tempê por apresentar uma vasta gama de enzimas extracelulares, como proteases, xilanase, poligalacturonase, celulase, arabinase, β -D-glicosidase e α -D-galactosidase. Estas enzimas podem alterar a composição dos precursores aromáticos presentes nos grãos de café, com isso, a inoculação de *R. oligosporus* resultou na degradação dos ácidos ferúlico e cafeico e em um aumento na concentração de fenóis totais. Além disso, a atividade proteolítica aumenta a concentração total de aminoácidos, que poderão ser utilizados como precursores na formação de compostos aromáticos durante a etapa de torrefação (LEE et al., 2016). Já a cultura iniciadora de *Yarrowia lipolytica*, conhecida por sua atividade proteolítica e lipolítica, selecionada para melhorar a textura de produtos lácteos, foi testada em fermentação de café verde para avaliar a geração de compostos aromáticos, onde foi relatada uma alteração nos precursores aromáticos, como um aumento na concentração de 2-feniletanol e redução no conteúdo de ácidos, alcanos e aldeídos (LEE et al., 2017).

Dentre as BAL, *Lactobacillus plantarum*, previamente isolada de frutos de café, apresentou expressiva produção de ácido láctico e de compostos aromáticos, o que resultou na promoção do domínio de BAL e reduziu o tempo de fermentação (PEREIRA et al., 2016). Já a espécie *L. rhamosus*, quando inoculada em fermentações de café, apresentou influência no perfil aromático ao produzir diacetil e acetoína (WANG et al., 2018).

REFERÊNCIAS

- AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. **Applied microbiology**, v. 14, n. 2, p. 256–60, mar. 1966.
- AVALLONE, S. et al. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 252–256, 2001a.
- AVALLONE, S. et al. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5556–9, nov. 2001b.
- BARHAM, E. Translating terroir: the global challenge of French AOC labeling. **Journal of Rural Studies**, v. 19, n. 1, p. 127–138, 1 jan. 2003.
- BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International journal of food microbiology**, v. 85, n. 3, p. 293–300, 25 ago. 2003.
- BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, n. 9, p. 784–790, 1 set. 2009.
- BEE, S. et al. The raw bean. In: ILLY, A.; VIANI, R. (Eds.). . **Espresso Coffee: The Science of Quality**. 2nd. ed. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 87–166.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (7th ed.). **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 54, n. 3, p. 544, 1964.
- BRANDO, C. H. J.; BRANDO, M. F. Methods of Coffee Fermentation and Drying. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Eds.). . **Cocoa and Coffee Fermentations**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 367–396.
- BRESSANI, A. P. P. et al. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, n. October 2017, p. 212–219, 2018.
- CARVALHO NETO, D. P. DE et al. High-Throughput rRNA Gene Sequencing Reveals High and Complex Bacterial Diversity Associated with Brazilian Coffee Bean Fermentation. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 90–95, mar. 2018.

CLARKE, R. J. Green Coffee Processing. In: **Coffee**. Boston, MA: Springer US, 1985. p. 230–250.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M. et al. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 149–155, 1 abr. 2004.

Coffee Basics - Mela Coffee Roasting Co. Disponível em: <https://melacoffee.com/pages/coffee-basics#Coffee_Belt>. Acesso em: 11 jan. 2019.

Coffee Production Process – The Coffee Attendant. Disponível em: <<http://coffeependant.com/2017/08/03/coffee-production-process/>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

DAHL, S.; TAVARIA, F. K.; MALCATA, F. X. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. **Int. Dairy J.**, v. 10, p. 255–262, 2000.

DALMASSO, A. et al. Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 490–496, 2016.

DAVIS, A. et al. An annotated checklist of the genus *Coffea* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p. 465–512, 2006.

DE BRUYN, F. et al. Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and Metabolite Profiles during Green Coffee Bean Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 1, p. e02398-16, 2017.

DE BRUYNE, K. et al. *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 57, n. 12, p. 2952–2959, 1 dez. 2007.

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

- DJOSSOU, O. et al. Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 267–272, dez. 2011.
- EDWARDS, S. Coffee, money and inflation in Colombia. **World Development**, v. 12, n. 11–12, p. 1107–1117, 1 nov. 1984.
- ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 297–314, 1 mar. 2004.
- EVANGELISTA, S. R. et al. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, v. 61, p. 183–195, 1 jul. 2014a.
- EVANGELISTA, S. R. et al. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. **Food Microbiology**, v. 44, p. 87–95, 1 dez. 2014b.
- EVANGELISTA, S. R. et al. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 102–112, 1 out. 2015.
- FRANK, H. A.; LUM, N. A.; DELACRUZ, A. S. Bacteria responsible for mucilage-layer decomposition in Kona coffee cherries. **Applied microbiology**, v. 13, p. 201–7, mar. 1965.
- GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 1, p. 31–36, 1 nov. 2001.
- GONZALEZ-RIOS, O. et al. Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 289–296, 2007.
- GRICE, E. A. et al. A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research**, v. 18, n. 7, p. 1043–1050, 1 jul. 2008.
- GUEULE, D. et al. *Pantoea coffeiphila* sp. nov., cause of the “potato taste” of Arabica coffee from the African Great Lakes region. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 65, n. Pt 1, p. 23–29, 1 jan. 2015.

HOLZAPFEL, W. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. **Food Control**, v. 8, n. 5–6, p. 241–258, 1 out. 1997.

ICO. **Report on coffee total production by all exporting countries in thousand 60Kg bags.**

ILLY, A.; VIANI, R. (EDS.). **Espresso Coffee: The Science of Quality**. 2nd. ed. Oxford: Elsevier, 2005.

JAROSLAV, T. **Honey Coffee Processing**. Disponível em: <<http://www.loslajonesestate.com/eng/processing/honey-coffee/>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

LEE, L. W. et al. Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. **Food Chemistry**, v. 185, p. 182–191, 15 out. 2015.

LEE, L. W. et al. Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: II. Effects of different roast levels. **Food Chemistry**, v. 211, p. 925–936, 15 nov. 2016.

LEE, L. W. et al. Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: II. Roasted coffee. **LWT**, v. 80, p. 32–42, 1 jul. 2017.

LEONG, K. et al. Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Fresh Coffee Cherries in Taiwan. **Current Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 440–447, 2014.

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**, v. 21, n. 7, p. 549–556, maio 2004.

MASSAWE, G. A.; LIFA, S. J. Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 41, 2010.

PEE, W.; CASTELEIN, J. M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the congo. **Journal of Food Science**, v. 37, n. 1, p. 171–174, 1 jan. 1972.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5395–405, 1 ago. 2012.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60–66, 2014.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. **Food Research International**, v. 75, p. 348–356, 1 set. 2015.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 7, p. 1689–1695, jul. 2016.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2775–2788, 2 set. 2017.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. **Food Chemistry**, v. 272, p. 441–452, 30 jan. 2019.

QIN, J. et al. Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella Pneumoniae* Using Glucose and Ammonium Phosphate. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 132–136, 1 fev. 2006.

RIBEIRO, L. S. et al. Controlled fermentation of semi-dry coffee (*Coffea arabica*) using starter cultures: A sensory perspective. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 32–38, 1 set. 2017.

RODAS, A. M.; FERRER, S.; PARDO, I. 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 412–422, 1 jan. 2003.

SAKIYAMA, N. S.; FERRÃO, M. A. G. Botany and Production of Coffee. In: SCHWAN, R.

F.; FLEET, G. H. (Eds.). . **Cocoa and Coffee Fermentations**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 341–365.

SCHILLINGER, U. et al. A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 286, n. 2, p. 222–226, set. 2008.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: BOEKHOUT, T.; ROBERTS, V. (Eds.). . **Yeasts in Food**. Hamburg: [s.n.]. p. 426–459.

SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M.; BYTOF, G. Metabolic responses of coffee beans during processing and their impact on coffee flavor. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Eds.). . **Cocoa and Coffee Fermentations**. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 367.

Sembrado Cafe Colombiano. Disponível em: <https://www.imagenesmi.com/imágenes/semrado-cafe-colombiano-ff.html>. Acesso em: 11 jan. 2019.

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**, v. 60, p. 251–260, 2000.

SILVA, C. F. et al. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 951–957, 1 dez. 2008.

SILVA, C. F. et al. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 235–247, 28 fev. 2013.

SILVA, C. F. Microbial activity during coffee fermentation. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Eds.). . **Cocoa and Coffee Fermentations**. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 431.

TALON, R. et al. Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 1–2, p. 227–234, 15 ago. 2008.

TEKETAY, D. **History, botany and ecological requirements of coffee**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284331870_History_botany_and_ecological_requirements_of_coffee>. Acesso em: 10 jan. 2019.

TOLEDO, P. R. A. B. et al. Relationship Between the Different Aspects Related to Coffee Quality and Their Volatile Compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 705–719, 1 jul. 2016.

VAUGHN, R. H. et al. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. **Food Technology**, v. 12, p. 57–60, 1958.

VELMOUROUGANE, K. Impact of Natural Fermentation on Physicochemical, Microbiological and Cup Quality Characteristics of Arabica and Robusta Coffee. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 83, n. 2, p. 233–239, 5 jun. 2013.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1128–1135, 1 dez. 2010.

VIOL, C. **Do grão para a mesa: afinal, como é produzido o Café? - HF Urbanismo**. Disponível em: <<https://www.hfurbanismo.com.br/gastronomia/cafe-do-grao-para-mesa-como-e-produzido/>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

WANG, C. et al. Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 3 ago. 2018.

CAPÍTULO II – PRIMEIRA DESCRIÇÃO DO MICROBIOMA PRESENTE NA FERMENTAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ EM BUESACO (COLÔMBIA) BASEADO NO SEQUENCIAMENTO ILLUMINA

1 INTRODUÇÃO

Embora o café seja nativo da África, especificamente nas terras altas da Etiópia, foi introduzido nas Américas no final do século XVIII (GRIGG, 2002; PEREIRA et al., 2015b). Atualmente, países da América Central e do Sul se destacam por suas exportações de café, incluindo o Brasil, Colômbia, Peru, Guatemala, Honduras e México. A Colômbia é o terceiro maior produtor de café do mundo, seguido por Brasil e Vietnã (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO), 2018). O café Colombiano é proveniente quase exclusivamente de cultivares arábica e é considerado um dos cafés de melhor qualidade do mundo. Isso se deve principalmente as características onde os cafeeiros são cultivados, como o solo vulcânico rico em minerais, chuvas anuais abundantes (200 mm em média por mês) e elevada altitude (1.800 a 2.000 m) (LARA-ESTRADA; VAAST, 2007).

No mercado internacional, o café é classificado em duas categorias principais de acordo com o método de processamento pós-colheita utilizado: “café natural”, produzido a partir de grãos de café processados na fazenda pelo método simples de secagem ao sol, conhecido como processamento via seca; e “café lavado”, produzido a partir de grãos de café que passam por uma série relativamente complexa de etapas, incluindo a remoção da polpa, fermentação e secagem ao sol, conhecido como processamento via úmida (BRANDO; BRANDO, 2014). A chuva abundante e as temperaturas quentes nas regiões da Colômbia, onde o café é cultivado, causam uma fermentação imediata e indesejável após a colheita dos frutos (PEREIRA et al., 2015b). A maneira mais prática de se evitar essa fermentação indesejada é o método de processamento via úmida, pelo qual a fermentação pode ser controlada em termos de tempo, temperatura, troca de água; o desenvolvimento espontâneo de microrganismos pode ser melhor gerenciado para minimizar quaisquer impactos adversos sobre a qualidade do café (BRANDO; BRANDO, 2014).

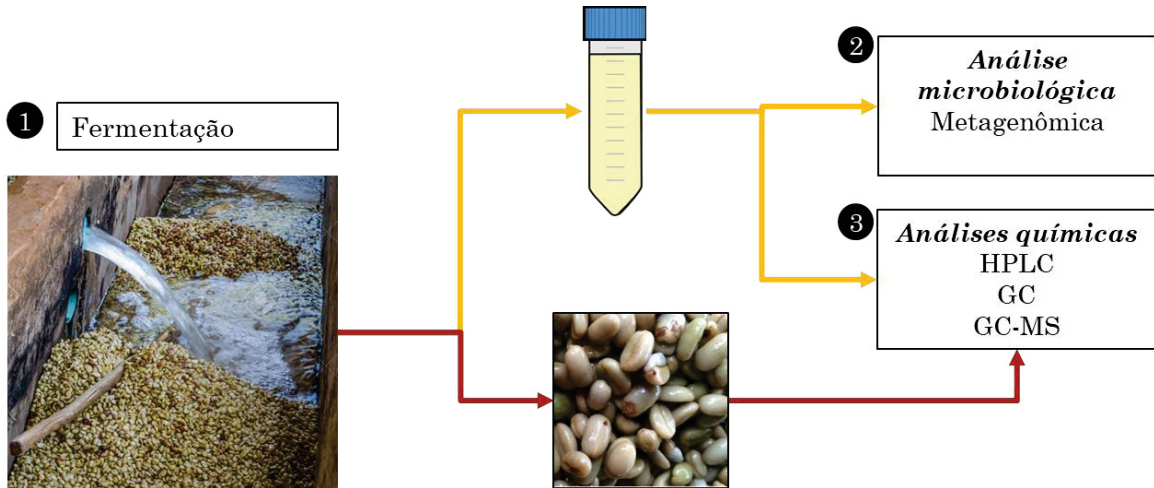
Devido à qualidade elevada do “café lavado” produzido na Colômbia, atualmente, este processo de fermentação tem ganhado interesse mundial (LEE et al., 2015; PEREIRA et al., 2019). Países como o Brasil, Guatemala, Honduras e Equador exportam anualmente toneladas de grãos de café classificados como "café lavado". Assim, estudos têm sido

dedicados a desvendar a diversidade microbiana e as mudanças químicas envolvidas durante a fermentação espontânea de café de diferentes regiões produtoras (AVALLONE et al., 2001; MASOUD et al., 2004; PEREIRA et al., 2014). Estudos recentes de metagenômica evidenciaram a rica diversidade microbiana, que compreende mais de 80 gêneros, em fermentações de café conduzidas no Brasil e no Equador (DE BRUYN et al., 2017; CARVALHO; PEREIRA; SOCCOL, 2018). A complexa atividade microbiana produz etanol, ácido láctico e uma série de compostos em menor quantidade, como ésteres, álcoois superiores, aldeídos e cetonas, que podem se difundir para dentro dos grãos e impactar a composição química final da bebida do café (EVANGELISTA et al., 2014; LEE et al., 2016, 2017; PEREIRA et al., 2015a; PEREIRA; SOCCOL; SOCCOL, 2016).

O objetivo do presente estudo é detectar a diversidade microbiana e a composição química dos grãos durante a fermentação espontânea de café realizada na Colômbia. Para isto, amostras foram retiradas durante a fermentação e submetidas as cromatografias gasosa e líquida, para avaliação da composição química, e a composição microbiana descrita pelo sequenciamento em plataforma *Illumina*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

FIGURA 1 – DELINEAMENTO METODOLÓGICO



2.1 FERMENTAÇÃO

As amostras da fermentação de grãos de café foram coletadas de uma fazenda de café localizada em Buesaco, Nariño, Colômbia (1°23'05"N, 77°09'23"W). A fazenda está a 1.959m de altitude e produz café pelo método de via úmida, de acordo com práticas tradicionais de fermentação na Colômbia. 10 kg de café recém colhidos (*Coffea arabica* L.) foram despulpados mecanicamente, colocados em tanques, e cobertos por aproximadamente 4 L de água. Amostras de 10 mL da fração líquida e dos grãos de café foram coletadas em triplicata nos tempos 0, 6, 12, 18, 24, 36 e 48 h. As amostras foram congeladas (-20°C) em tubos falcon esterilizados para análise posterior.

FIGURA 2 – CIDADE DE BUESACO



FONTE: (TRIP-SUGGEST, [s.d.])

2.2 IDENTIFICAÇÃO DO MICROBIOMA PRESENTE NA FERMENTAÇÃO DE CAFÉ COLOMBIANO

2.2.1 Extração total de DNA

Amostras de 1 mL da fração líquida da polpa fermentada de grãos de café a 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 h foram utilizadas para a extração total de DNA. As amostras foram centrifugadas (12.000×g, 1 min) e o sobrenadante removido. Os pellets foram suspensos em 500 µL de Tris-EDTA, homogeneizados com 10 µL de solução de lisozima (Sigma-Aldrich, Arklow, Irlanda) e incubados a 30°C durante 60 min. Em seguida, 50 µL de SDS 10% (p/v) e 10 µL de solução de proteinase K (Sigma-Aldrich) foram adicionados, seguido de homogeneização e incubação a 60°C por 60 min. Um volume de 150 µL de fenol/clorofórmio (25:24; Sigma-Aldrich) foi adicionado, homogeneizado por inversão e centrifugado (12.000×g, 5 min). Finalmente, o sobrenadante foi removido e o DNA precipitado com etanol absoluto (Sigma-Aldrich). Os pellets foram lavados com etanol a 80%, secos e ressuspensos em água ultrapura Mili-Q® (Merck, Darmstadt, Alemanha). A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose a 0.8% (p/v) e quantificada com o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

2.2.2 Sequenciamento em plataforma Illumina

20 ng do DNA extraído, contendo adaptadores complementares para a plataforma Illumina (CAPORASO et al., 2012), foram amplificados utilizando primers degenerados para a região hipervariável V4 (515F e 806R) de procariotos e a região ITS1 (1737F e 2043R) para eucariotos. As condições de PCR para a geração de amplicons marcados foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 3 min; seguido por 18 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 s; anelamento a 50°C; extensão a 68°C por 60 s, e uma fase de extensão final a 68°C por 10min. Os produtos de PCR foram quantificados utilizando o kit Qubit dsDNA HS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As sequências obtidas foram analisadas usando os parâmetros padrão do software QIIME (Quantitative Insights em Microbial Ecology), versão 1.9.0 (CAPORASO et

al., 2010). Leituras de baixa qualidade, sequências curtas (<100 pb) e sequências contendo mais de uma base ambígua (N) foram removidas. Em seguida, as leituras de alta qualidade obtidas foram alinhadas pelo método UCLUST (EDGAR, 2010), considerando uma similaridade acima de 97% entre as sequências com a mesma unidade taxonômica operacional (OUT) de acordo com o banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013).

2.3 ANÁLISES QUÍMICAS

2.3.1 Principais moléculas quantificadas por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e cromatografia gasosa (GC)

A cada 6 h, a concentração de açúcares (glicose e frutose), ácidos orgânicos (ácidos cítrico, láctico, acético e succínico) e etanol da fração líquida da fermentação foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo a metodologia de Carvalho Neto et al. (2017). Amostras de 1 mL do fermentado (fração líquida) foram centrifugadas a $6.000\times g$ (modelo A14; Jouan SA, Saint-Herblain, França). Em seguida, o sobrenadante foi diluído na proporção de 1:5 com água destilada e filtrado utilizando filtro com poro de 0.22 μm (Filtrilo, Colombo, Brasil). As amostras filtradas foram injetadas no sistema de cromatografia líquida equipado com uma coluna Hi-Plex H (300 \times 7.7 mm; Agilent, Santa Clara, EUA) e detector de índice de refração (RI) (modelo HPG1362A; Hewlett-Packard Company, São Paulo, Brasil). A coluna foi eluída em modo isocrático com fase móvel de 5 mM de H_2SO_4 a 60°C a taxa de vazão de 0.6 mL min^{-1} .

As amostras de 5 mL da polpa do café em fermentação (fração líquida) com adição de NaCl a 5% (p/v) foram dispostas em frascos vials de *headspace* (20 mL). Para atingir um equilíbrio de *headspace*, as amostras foram aquecidas (65°C) e agitadas (150 rpm) em agitador magnético (IKA®, Campinas, Brasil) por 10 min. Os voláteis presentes no *headspace* foram extraídos manualmente com uma seringa de 1.0 mL (Hamilton®, Reno, NV, EUA) e injetados em cromatógrafo a gasoso (GC) (Shimadzu modelo 17A, Tóquio, Japão) equipado com coluna HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm). As condições de trabalho no GC foram: temperatura entre 40 a 150°C (taxa de variação de 20°C/min), temperatura do injetor e detector a 250°C. O nitrogênio foi o gás carreador utilizado a uma vazão de 1.5 mL min^{-1} ,

pressão de coluna de 50kPa e razão de divisão de 1:5. Os compostos voláteis foram identificados comparando os tempos de retenção com os padrões. Para quantificação, soluções padrão de etanol foram preparadas em diferentes concentrações (1, 10, 20, 50, 100 e 1000 $\mu\text{mol/L}$) e utilizadas para construir uma curva de calibração. A quantificação de compostos voláteis foi expressa como equivalente a etanol.

2.3.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

Compostos presentes em menor concentração foram identificados em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrofotometria de massa. Os compostos voláteis presentes na fração líquida da polpa fermentada de café foram extraídos e concentrados por microextração por fase sólida, utilizando uma fibra de divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco Co., Bellefonte, PA, EUA) e injetados em cromatógrafo a gás acoplado a espectrofotometria de massa (GCMS2010 Plus, TQ8040, AO 5000; Shimadzu, Tóquio, Japão). 2 mL de amostra foram diluídos razão de 1:1 com água destilada, no qual foram adicionados 5% de NaCl (p/v) e dispostos em vials de *headspace* (20 mL). A fibra de SPME foi exposta ao *headspace* durante 30 min a 60°C para a adsorção dos voláteis. Os compostos foram dessorvidos termicamente no cromatógrafo gasoso a uma temperatura de 260°C. O GC foi equipado com uma coluna capilar (modelo SH-Rtx-5MS; 30 m \times 0.25mm \times 0.25 μm). A temperatura da coluna foi mantida a 60°C, injeção a 260°C e o detector a 250°C. O gás carreador utilizado foi o hélio, a uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹, a pressão da coluna em 57.4kPa e razão de divisão de 1:20. O intervalo de espectrofotometria de massa foi de 30 a 250 (m/z), e a temperatura de fonte iônica a 250°C. Os voláteis foram identificados comparando cada espectro de massa com os espectros de compostos autênticos ou com espectros em bibliotecas de referência padrão (NIST, 2018). A abundância relativa de cada composto volátil presente no *headspace* foi apresentada como a área do pico por 10⁵.

2.3.3 Composição química dos grãos de café

A composição dos grãos frescos e dos grãos fermentados foram avaliadas. Os grãos de café foram secos a 45 °C durante 72 h em estufa de secagem com troca de ar (Thoth, Piracicaba, Brasil) até atingir umidade relativa de 11%. Em seguida, os grãos foram moídos utilizando moedor de café elétrico. Os grãos de café moídos e secos foram analisados por CLAE e GC-MS de acordo com os procedimentos descritos nas seções 2.3.1 e 2.3.2. Para análise de CLAE, a extração a frio foi realizada previamente adicionando-se 0.2 g de grãos moídos em 1 mL de água destilada. As amostras foram agitadas em vortex, centrifugadas, filtradas utilizando filtro de poro de 0.22 µm (Filtrilo, Colombo, Brasil) e injetadas no sistema de CLAE.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística foi calculada utilizando o teste de Duncan. As análises foram realizadas no programa SAS, versão 7.0 (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA). O nível de significância foi estabelecido <0.05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DIVERSIDADE E SUCESSÃO DOS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À FERMENTAÇÃO DE CAFÉ COLOMBIANO

3.1.1 Procariotos

Após o sequenciamento das amostras, foram obtidos um total de 297.126 e 129.126 sequências de gene 16S e gene ITS do rRNA de bactérias e fungos, respectivamente, de tamanho médio de 300 pares de base (pb). As curvas de rarefação alfa de cada análise temporal sugerem que a maior parte da diversidade microbiana foi contemplada (ANEXO 1). As sequências corresponderam a 173 gêneros microbianos diferentes após busca no banco de dados SILVA. A lista completa de bactérias e fungos no nível de gênero está apresentada no material em ANEXO 2. Este resultado representa uma diversidade maior que a encontrada nas fermentações de café realizadas no Brasil e no Equador, utilizando a abordagem metagenômica baseada em Illumina (CARVALHO NETO et al., 2018b; DE BRUYN et al., 2017). Quanto maior a diversidade de microrganismos que participarem de uma comunidade, mais complexas serão as interações entre eles. Assim, sugere-se que interações complexas ocorrem durante o processo de fermentação do café Colombiano. Como em outros modelos de fermentação já descritos, as interações microbianas podem ocorrer entre leveduras-bactérias, bactérias-bactérias e leveduras-leveduras, e também interações de fungos filamentosos com outras espécies (FLEET, 2003; VILJOEN, [s.d.]).

Neste estudo, o gênero *Leuconostoc* (procariotos) e a espécie *Pichia nakasei* (eucariotos), foram detectados como dominantes durante o processo de fermentação (FIGURAS 3 e 4). As sequências menos encontradas são comumente associadas a grupos microbianos provenientes do solo (*Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Streptomyces*, *Planctomyces* e *Phenylobacterium*), da fonte de água utilizada na fermentação (*Acinetobacter* e *Polaromonas*), do ar que envolve o tanque de fermentação (*Pedobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas* e *Microbacterium*), aves e animais domésticos (*Enterobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Turicibacter*, *Corynebacterium* e *Brevibacterium*), insetos (*Acetobacter*,

Gluconobacter, *Gluconacetobacter*, *Luteimonas* e *Alcaligenaceae*) e do contato humano (*Sphingobium*, *Corynebacterium*, *Malassezia*, *Candida*, *Tremellaceae*, *Enterococcus*, *Paracoccus* e *Caulobacteraceae*) (MALCATA, 2000; QIN et al., 2006; LIU et al., 2009; ANDERSON et al., 2012; FINDLEY et al., 2013; DAHL; TAVARIA; DOUGLAS, 2015; GUEULE et al., 2015; LAKSHMANAN; SELVARAJ; BAIS, 2014; KREISINGER et al., 2015; BROWN; WERNEGREN, 2016; RENGANATH RAO et al., 2017), dos quais 54 gêneros foram relatados pela primeira vez no processo de fermentação do café (ANEXO 2). Estes grupos microbianos apresentam uma notável diversidade fenotípica que inclui a produção de compostos aromáticos, enzimas e ácidos orgânicos (LIU et al., 2009; RENGANATH RAO et al., 2017). Embora estejam presentes em baixas proporções, essa ampla diversidade indica uma atividade microbiana específica da região geográfica, e pode participar na formação dos aromas que podem contribuir para o melhor entendimento do *terroir* do café Colombiano. Além disso, esse ecossistema complexo pode ser utilizado como fonte de diversidade microbiana para a descoberta de bioprodutos de interesse biotecnológico, como de antibióticos, pigmentos e aminoácidos. Possuem também potencial para biorremediação de locais contaminados por corantes e hidrocarbonetos e acúmulo de nanopartículas de prata (ANEXO 3). A distribuição dos grupos bacterianos que apresentam relativa abundância maior que 0.1% nas amostras temporais são apresentadas na FIGURA 3A.

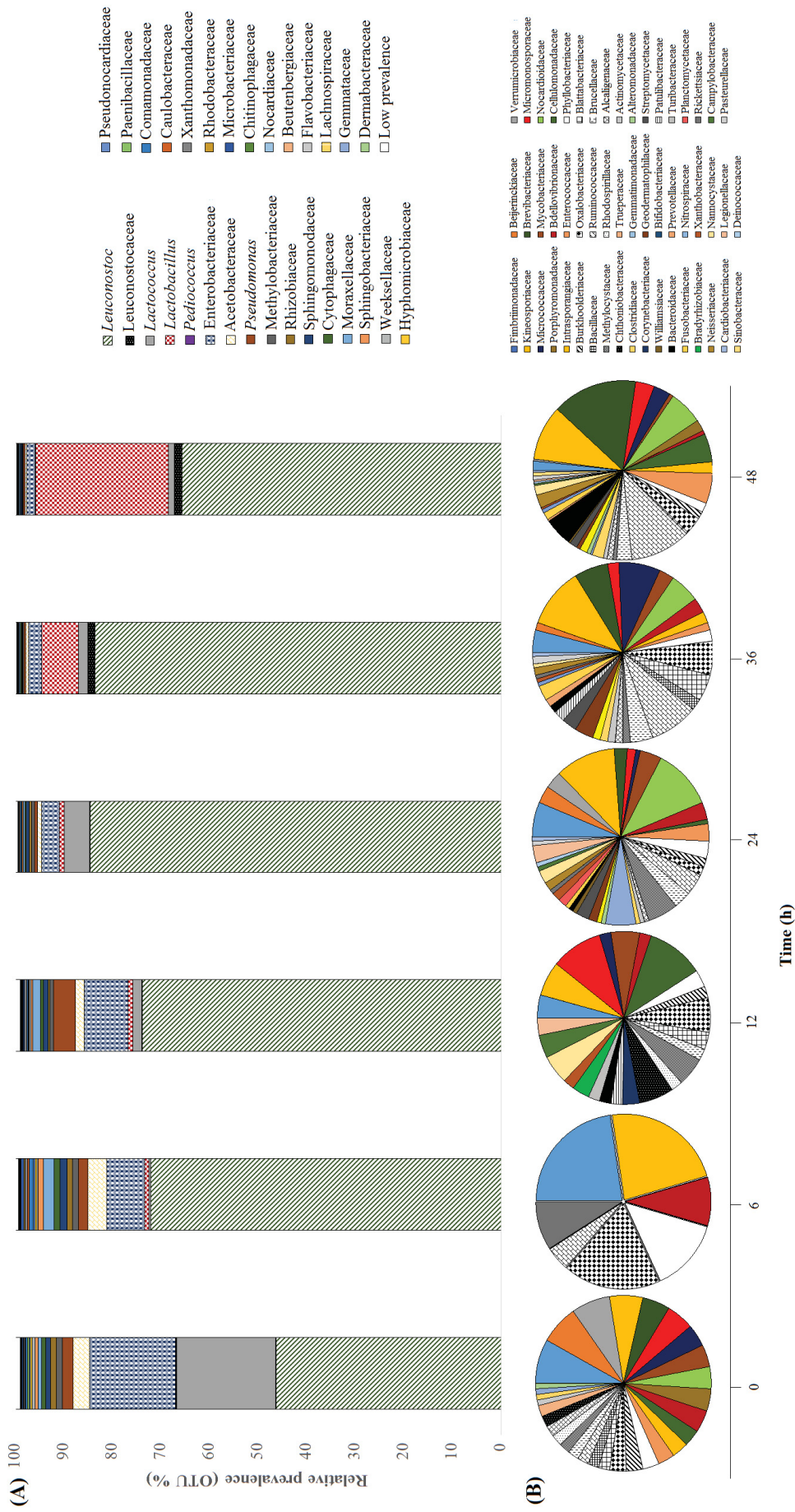
O início do processo de fermentação foi caracterizado pela alta prevalência de bactérias do ácido lático (BAL) e bactérias pertencentes às famílias Enterobacteraceae e Acetobacteraceae. A família Enterobacteriaceae foi representada pelos gêneros *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, enquanto os gêneros *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Roseomonas* e *Roseococcus* representaram a família Acetobacteraceae (ANEXO 2). A família Enterobacteraceae está principalmente associada ao contato humano e à formação de metabólitos que conferem *off-flavors*, como 3-isopropil-2-metoxi-5-metilpirazina, 2,3-butanodiol e ácido butírico (DAHL; TAVARIA; MALCATA, 2000; QIN et al., 2006; GUEULE et al., 2015). As bactérias da família Acetobacteraceae são comumente descritas em relação comensal e simbiótica com insetos que consomem grandes concentrações de açúcar, como abelhas, mosca de fruta e formigas (BROWN; WERNEGREN, 2016). Como a polpa do grão de café apresenta alto teor de açúcar, as Acetobacteraceae podem surgir em locais de fermentação utilizando os insetos como vetores de dispersão (DOUGLAS, 2015). O principal metabólito produzido pelos membros da família Acetobacteraceae é o ácido acético, um ácido orgânico volátil que pode

diminuir significativamente a qualidade da bebida do café quando encontrado em concentrações superiores a 1 g/L (PEREIRA et al., 2016a). No entanto, os membros das famílias Acetobacteraceae e Enterobacteraceae diminuíram drasticamente após 12 h de fermentação, sendo sobrepostos por BAL (FIGURA 3A).

Dentro do grupo de BAL, *Leuconostoc* mostrou-se dominante durante todo o processo, atingindo um pico de prevalência de 84% observado em 24 h (FIGURA 3A). *Leuconostoc* também foi o gênero dominante nas fermentações de café no Brasil, México, Equador, Taiwan e Índia (AVALLONE et al., 2001; CARVALHO NETO et al., 2018b; DE BRUYN et al., 2017; LEONG et al., 2014; VELMOUROUGANE, 2013). Isto sugere que *Leuconostoc* é um grupo fundamental e bem adaptada à fermentação de grãos de café em todo o mundo. Além disso, BAL pertencentes às famílias Streptococcaceae (*Lactococcus*) e Lactobacillaceae (*Lactobacillus* e *Pediococcus*) foram detectadas durante as fases de fermentação inicial e final, respectivamente (FIGURA 3A). A presença e dominância de BAL indica que esses microrganismos estão adaptados às condições ambientais e aos fatores de estresse que a fermentação do café estabelece, como baixo pH, disponibilidade de açúcares e competição com outros microrganismos (PEREIRA et al., 2016a). Essas bactérias produtoras de ácido láctico contribuem para o processo de remoção da mucilagem do café e na inibição do crescimento de patógenos, microrganismos deteriorantes e fungos produtores de toxinas (AVALLONE et al., 2002; DJOSSOU et al., 2011; LEONG et al., 2014; PEREIRA et al., 2016a).

Outros membros de BAL encontrados em baixas proporções neste estudo, como *Weissella* e *Fructobacillus*, foram relatados com presença significativa nas fermentações de café do Brasil e do México (AVALLONE et al., 2001; CARVALHO NETO et al., 2018a). Estes gêneros de LAB possuem metabolismo específico, como melhor consumo de frutose e produção de polissacarídeos extracelulares, o que pode induzir em alterações no processo de fermentação Colombiano (ENDO; DICKS, 2014; NDAGANO et al., 2011). Estudos posteriores são necessários para a comparação da diversidade e atividade microbiana presente em diferentes regiões produtoras de café.

FIGURA 3 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DE BACTÉRIAS DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ COLOMBIANO. **A.** BACTÉRIAS QUE APRESENTARAM RELATIVA ABUNDÂNCIA $\geq 0.1\%$. **B.** BACTÉRIAS COM RELATIVA ABUNDÂNCIA $< 0.1\%$. A IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO NO NÍVEL DO GÊNERO ESTÃO APRESENTADAS NO MATERIAL EM ANEXO (ANEXO 2).

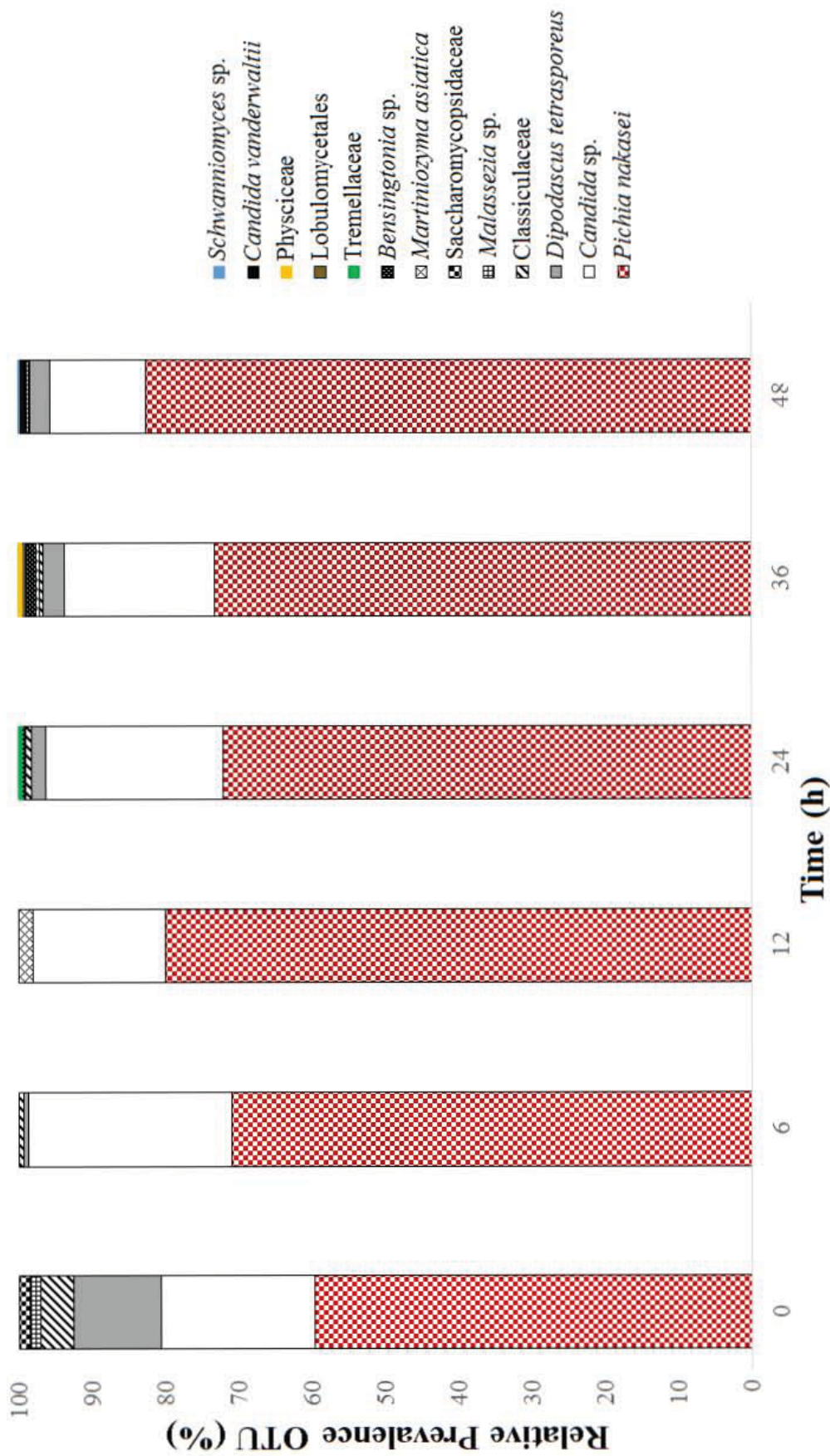


3.1.2 Eucariotos

Dentre os eucariotos, *Pichia nakasei* foi a levedura dominante, seguido de *Candida* sp., *Dipodascus tetrasporeus* e *Malassezia* sp. (FIGURA 4). *Pichia* tem sido reportada como uma levedura dominante em fermentações de café conduzidas no Brasil, Tanzânia e China (FENG et al., 2016; MASOUD et al., 2004; PEREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2008), entretanto, este é o primeiro estudo a relatar a dominância da espécie *P. nakasei*. Esta espécie foi isolada de frutas ou de produtos de frutas e é classificada no mesmo clade que *P. kluyveri* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Outros grupos foram encontrados em momentos específicos do processo de fermentação, incluindo *Schwanniomyces*, *Bensingtonia*, *Candida vanderwaltii*, *Martiniozyma asiatica*, Phyciaceae, Tremellaceae e *Lobulomycetales* (FIGURA 4). Como a fermentação do café ocorreu em tanque aberto, o processo está suscetível a contaminações por contato humano, ar, insetos e folhas de plantas (GUÉHO et al., 1998; TAKASHIMA; SUH; NAKASE, 1995). Além disso, algumas leveduras extremófilas, como *Dipodascus tetrasporeus* e *Lobulomycetales*, foram relatadas pela primeira vez no processo de fermentação de café. Essas espécies de levedura são geralmente associadas aos sedimentos do Oceano Pacífico e sedimentos sub glaciais das Montanhas Andinas (FREEMAN et al., 2009; NAGAHAMA et al., 2008; SIMMONS et al., 2009). A fazenda de café onde ocorreu a fermentação deste estudo está localizada a 161 km da região costeira colombiana, o que pode facilitar a migração dessas espécies para o ambiente de fermentação.

FIGURA 4 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DE FUNGOS DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE GRÃOS DE CAFÉ COLOMBIANOS.



3.2 ANÁLISES QUÍMICAS

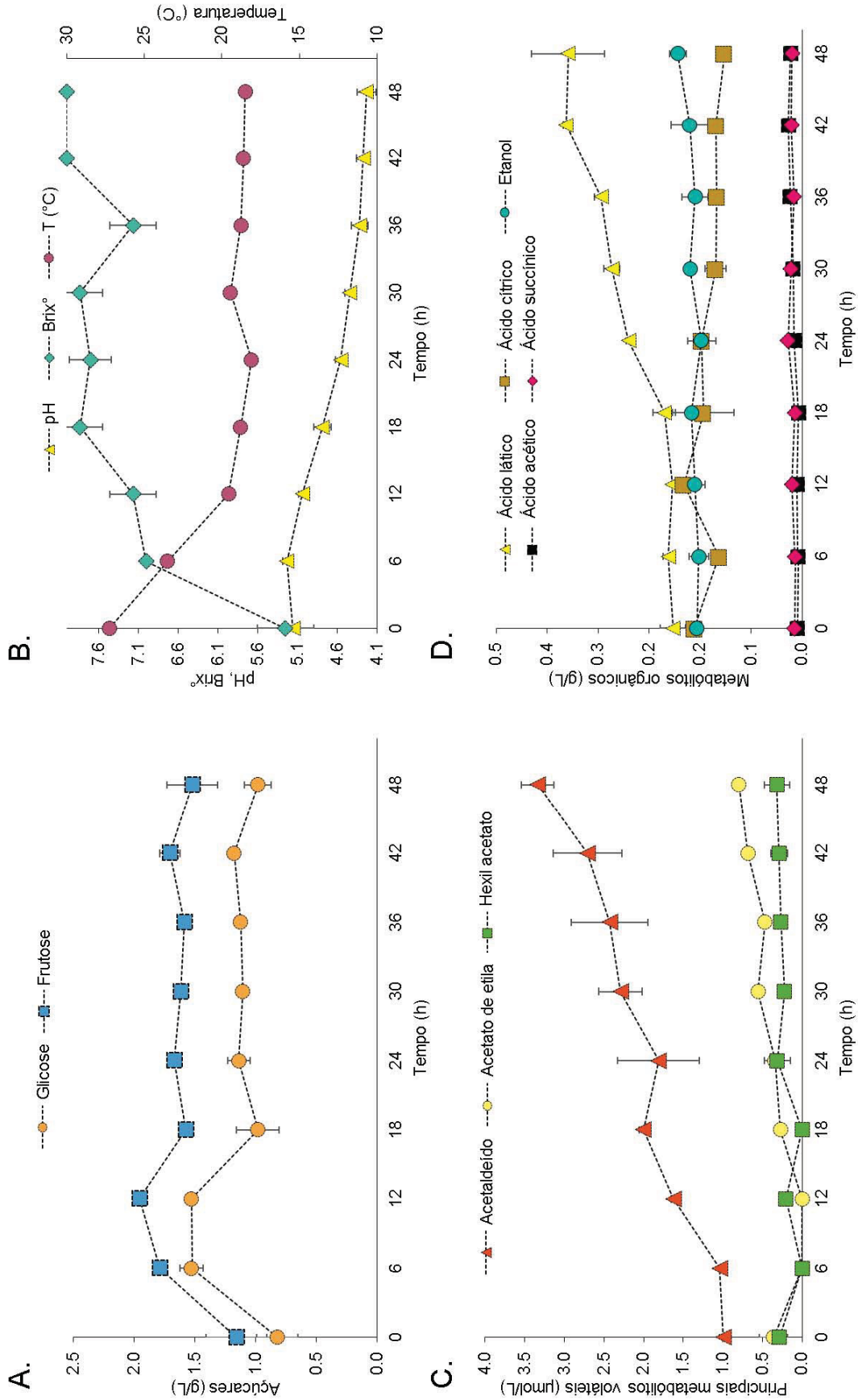
3.2.1 Principais metabólitos encontrados na fração líquida da fermentação da polpa do café Colombiano

As alterações nos principais metabólitos foram quantificadas no decorrer do tempo de fermentação (FIGURA 5). A composição inicial da polpa de café colombiana foi de 0.82 g/L de glicose, 1.16 g/L de frutose, 0.20 g/L de ácido láctico, pH 5.2 e 5.3° Brix. Tanto a concentração de açúcares quanto grau Brix apresentaram um aumento durante as primeiras 12 h de fermentação (FIGURA 5A e B). Esta variação pode ser resultado da ação de enzimas hidrolíticas produzidas pelo metabolismo microbiano, a qual promove a quebra da pectina, celulose, sacarose e outros carboidratos complexos presentes na polpa de café, liberando monômeros de glicose e frutose (AVALLONE et al., 2001; MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2011). Após este aumento, tanto a glicose quanto a frutose foram parcialmente consumidas até 18 h, seguidas de uma estabilização da concentração até o final do processo fermentativo. Um teor residual de 0.98 e 1.52 g/L de glicose e frutose foi observado, respectivamente. A presença de açúcares residuais é uma característica comum em fermentações espontâneas de café, como observado anteriormente no Brasil, Equador, Índia e México (AVALLONE et al., 2001; CARVALHO NETO et al., 2017; DE BRUYN et al., 2017; VELMOUROUGANE et al., 2008).

Não foram observadas alterações significativas nas concentrações de etanol, ácido cítrico, ácido acético e ácido succínico (FIGURA 5D). Por outro lado, o ácido láctico mostrou um aumento significativo, atingindo a concentração máxima de 0.37 g/L ao final da fermentação, influenciando a diminuição do pH de 5.2 para 4.2 (FIGURA 5B). O aumento gradual na concentração de ácido láctico está correlacionado com o crescimento de BAL reportadas pela metagenômica, que geralmente têm o ácido láctico como o principal metabólito gerado (ENDO; DICKS, 2014). O ácido láctico é um metabólito importante associado à fermentação de café, pois auxilia no processo de acidificação da polpa do café sem interferir na qualidade do produto final (AVALLONE et al., 2002; CARVALHO NETO et al., 2018a; KUHL et al., 2017; PEREIRA et al., 2016b; WANG et al., 2018)

Os principais voláteis quantificados por GC foram o acetaldeído, acetato de etila e acetato de hexila (FIGURA 5C). Dentre estes, o acetaldeído apresentou maior variação durante a fermentação, variando de 0.99 a 3.33 $\mu\text{mol/L}$, representando um aumento relativo de 3.36x o valor inicial. O acetaldeído é produzido majoritariamente por leveduras do gênero *Pichia*, que possuem baixa atividade da enzima álcool desidrogenase, responsável pela conversão do acetaldeído em etanol (CIANI; FERRARO; FATICHENTI, 2000). Este composto é reconhecido por contribuir para notas sensoriais frutadas em bebidas alcoólicas (MORENO et al., 2005). Entretanto, a relação entre o acetaldeído e a qualidade final do café ainda não é estabelecida. É possível especular que a difusão deste composto durante a fermentação possa ter uma função complementar no desenvolvimento de notas frutadas de cafés Colombianos. Estudos aprofundados sobre esta relação são necessários.

FIGURA 5 – CONSUMO DE AÇÚCAR, FORMAÇÃO DE METABÓLITOS, PH, TEMPERATURA E BRUX DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ COLOMBIANOS.



3.2.2 Metabólitos secundários encontrados na fração líquida da fermentação da polpa do café Colombiano

Foram detectados 20 metabólitos voláteis por GC-MS, incluindo 5 ácidos orgânicos, 3 álcoois, 1 aldeído, 4 ésteres, 2 éteres, 1 furano, 2 hidrocarbonetos, 1 fenol e 2 terpenos (TABELA 1). Os principais metabólitos encontrados no início do processo fermentativo foram o ácido 1,2-benzenodicarboxílico, o ácido 9,12-octadecadienóico e o 1-pentadecanal. No entanto, a concentração desses compostos foi reduzida significativamente ao longo da fermentação, possivelmente devido à evaporação ou utilizado como precursores nas vias de metabolismo microbiano (PEREIRA et al., 2019). Por outro lado, o conteúdo de 1-hexanol, 2-heptanol, nonanal, acetato de isoamila, ácido 2,2,6-trimetiloctano, 2-hidroxi-benzóico, linalol e limoneno, que podem ter sido gerados a partir da atividade microbiana, aumentaram gradualmente ao decorrer do processo fermentativo. Neste sentido, as BAL e leveduras têm influência fundamental na geração de diferentes moléculas que influenciam o aroma através do metabolismo de carbono e nitrogênio (PEREIRA et al., 2019). Alguns grupos microbianos relatados neste estudo, incluindo *Pichia nakasei*, *Candida* sp., *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus*, são caracterizados frequentemente como agentes fermentadores importantes na produção de vinho, queijo, iogurte, sourdough e cerveja devido à produção de compostos de baixa massa molecular que contribuem para a complexidade de sabor e aroma (ANNAN et al., 2003; BASSO; ALCARDE; PORTUGAL, 2016; KIERONCZYK et al., 2003; ROUTRAY; MISHRA, 2011; SWIEGERS et al., 2005; VALLET et al., 2008). No entanto, mais estudos são necessários para avaliar o impacto direto destes compostos na qualidade final de café.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS (ÁREA×10⁵) FORMADOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE GRÃOS DE CAFÉ COLOMBIANOS.

Compostos	Tempo de fermentação (h)								
	0	6	12	18	24	30	36	42	48
<i>Ácidos</i>									
Ácido 1,2-Benzenodicarboxílico	5.51 ± 0.77 ^a	2.85 ± 0.23 ^b	2.77 ± 0.37 ^b	2.47 ± 0.49 ^b	5.11 ± 0.01 ^a	5.11 ± 0.49 ^a	5.93 ± 1.50 ^a	2.47 ± 0.36 ^b	1.86 ± 0.46 ^c
Ácido 2-Hidroxi-benzoico	ND	4.18 ± 0.93 ^a	3.88 ± 0.19 ^a	2.89 ± 1.28 ^a	2.67 ± 0.96 ^a	2.46 ± 0.65 ^a	2.61 ± 1.30 ^a	2.27 ± 0.60 ^a	2.69 ± 0.40 ^a
Ácido Hexadecanóico	6.77 ± 2.95 ^a	8.24 ± 0.60 ^a	8.32 ± 2.83 ^a	6.50 ± 1.79 ^a	6.44 ± 1.52 ^a	7.45 ± 2.89 ^a	5.20 ± 0.75 ^a	5.38 ± 1.03 ^a	6.99 ± 1.10 ^a
Ácido 9,12-Octadecadienóico	11.9 ± 5.67 ^{ab}	11.4 ± 0.91 ^{ab}	15.0 ± 8.07 ^a	5.02 ± 2.20 ^b	7.39 ± 3.14 ^{ab}	6.27 ± 1.32 ^{ab}	3.09 ± 0.89 ^b	8.03 ± 4.82 ^{ab}	2.22 ± 0.21 ^b
Ácido 9,12,15-Octadecatrienóico	6.88 ± 3.53 ^{ab}	6.65 ± 0.56 ^{ab}	7.13 ± 3.92 ^a	3.10 ± 1.36 ^{abc}	3.31 ± 0.98 ^{abc}	3.33 ± 0.85 ^{abc}	2.26 ± 0.71 ^{bc}	2.78 ± 0.55 ^{abc}	1.41 ± 0.44 ^c
<i>Álcoois</i>									
1-Hexanol	ND	ND	ND	3.61 ± 0.57 ^a	4.80 ± 0.22 ^b	4.26 ± 0.78 ^{ab}	5.06 ± 0.14 ^b	2.59 ± 0.43 ^c	4.77 ± 0.35 ^c
2-Heptanol	ND	ND	ND	1.93 ± 0.21 ^a	3.38 ± 0.92 ^b	3.76 ± 0.25 ^b	3.30 ± 1.52 ^b	2.70 ± 0.29 ^b	2.46 ± 1.90 ^b
2-Etil-1-hexanol	3.76 ± 0.09 ^{ab}	2.24 ± 0.18 ^c	3.44 ± 0.38 ^b	3.34 ± 0.19 ^b	3.62 ± 0.11 ^{ab}	3.65 ± 0.47 ^{ab}	4.32 ± 0.67 ^a	3.61 ± 0.22 ^{ab}	3.85 ± 0.40 ^{ab}
<i>Aldeído</i>									
Nonanal	ND	ND	ND	5.54 ± 1.54 ^{ab}	4.51 ± 1.47 ^{abc}	5.99 ± 1.45 ^b	5.51 ± 0.84 ^{ab}	3.25 ± 0.06 ^c	3.72 ± 0.22 ^{ac}
<i>Ester</i>									
Acetato de isoamila	ND	ND	ND	0.60 ± 0.14 ^a	0.99 ± 0.28 ^{bc}	0.86 ± 0.15 ^{bc}	1.00 ± 0.01 ^c	0.71 ± 0.10 ^{ab}	0.58 ± 0.00 ^a
1-Pentadecanal	13.0 ± 9.64 ^a	2.12 ± 0.46 ^b	1.35 ± 0.54 ^b	3.9 ± 2.51 ^{bc}	13.1 ± 3.93 ^a	11.6 ± 3.78 ^{ac}	13.0 ± 3.40 ^a	1.33 ± 0.63 ^b	1.94 ± 0.22 ^b
Palmitato de isopropila	ND	4.47 ± 3.58 ^a	2.01 ± 0.10 ^a	ND	1.85 ± 0.99 ^a	1.43 ± 0.02 ^a	2.89 ± 0.34 ^a	5.23 ± 4.32 ^a	1.78 ± 0.76 ^a
<i>Éter</i>									
Éter octil	5.23 ± 5.83 ^a	29.9 ± 28.3 ^b	8.59 ± 2.84 ^{ab}	2.02 ± 1.87 ^a	5.15 ± 1.04 ^a	4.39 ± 0.16 ^a	6.25 ± 0.15 ^a	7.36 ± 6.33 ^{ab}	6.93 ± 3.91 ^{ab}
9,12-Octadecadien-1-ol	4.31 ± 1.92 ^{ab}	7.11 ± 1.55 ^a	6.52 ± 2.01 ^{ab}	3.21 ± 1.88 ^b	5.05 ± 2.06 ^{ab}	4.01 ± 0.26 ^{ab}	ND	3.78 ± 1.28 ^{ab}	ND
<i>Furano</i>									
2-Furanometanol	2.28 ± 0.37 ^{ab}	1.48 ± 0.09 ^a	1.52 ± 0.16 ^a	2.22 ± 0.36 ^{ab}	2.71 ± 0.84 ^b	1.90 ± 0.15 ^{ab}	2.08 ± 0.83 ^{ab}	2.02 ± 0.18 ^{ab}	1.74 ± 0.21 ^{ab}

Continua

Conclusão

Compostos	Tempo de fermentação (h)									
	0	6	12	18	24	30	36	42	48	
<i>GC-MS (area × 10⁵)</i>										
<i>Hydrocarbonetos</i>										
2,2,6-Trimetil-Octano	ND	ND	1.80 ± 0.45 ^a	2.18 ± 0.18 ^b	2.24 ± 0.05 ^c	1.41 ± 0.03 ^c	1.23 ± 0.02 ^a	1.07 ± 0.08 ^a	ND	ND
2,3,6-Trimetil-Octano	2.84 ± 0.96 ^{ac}	1.63 ± 0.41 ^b	1.87 ± 0.16 ^{bc}	3.18 ± 0.02 ^a	4.64 ± 0.31 ^d	4.21 ± 0.15 ^d	4.31 ± 0.12 ^d	2.69 ± 0.24 ^{ac}	2.99 ± 0.49 ^a	2.99 ± 0.49 ^a
5-Isobutil-nonano	6.68 ± 1.04 ^a	1.54 ± 1.30 ^b	0.95 ± 0.69 ^b	7.82 ± 0.24 ^a	8.22 ± 2.08 ^a	7.90 ± 1.52 ^a	6.56 ± 2.19 ^a	ND	ND	ND
<i>Fenol</i>										
2,4-Di-terte-butilfenol	3.72 ± 2.38 ^a	3.55 ± 0.70 ^a	2.67 ± 0.12 ^{ab}	2.76 ± 0.52 ^{ab}	2.19 ± 1.07 ^{ab}	1.17 ± 0.18 ^b	ND	2.60 ± 0.37 ^{ab}	3.25 ± 0.47 ^{ab}	3.25 ± 0.47 ^{ab}
<i>Terpenos</i>										
D-Limoneno	1.51 ± 0.41 ^a	2.57 ± 0.13 ^b	2.73 ± 0.35 ^b	1.23 ± 0.10 ^a	1.31 ± 0.27 ^a	1.42 ± 0.18 ^a	1.38 ± 0.01 ^a	3.20 ± 0.10 ^b	2.45 ± 0.83 ^b	2.45 ± 0.83 ^b
Linalol	5.08 ± 1.35 ^a	6.73 ± 0.56 ^{ab}	5.43 ± 0.84 ^a	8.05 ± 0.14 ^{abc}	10.8 ± 0.23 ^{bc}	9.28 ± 2.24 ^{bc}	11.5 ± 3.5 ^c	8.87 ± 0.76 ^{abc}	7.61 ± 0.99 ^{ab}	7.61 ± 0.99 ^{ab}

As médias de cada linha que apresentam a mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0.05$) um do outro, utilizando o teste de Duncan.

3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS DE CAFÉ

A composição química dos grãos de café frescos (não fermentados) e dos grãos fermentados foi analisada por CLAE e GC-MS (TABELA 2). A constituição dos grãos de café Colombianos apresentou concentrações de 7.28 g/L de glicose, 5.26 g/L de frutose, 0.18 g/L de etanol e 2.76 g/L de ácidos orgânicos. A composição dos grãos de café permaneceu inalterada após o processo de fermentação e secagem. Isto sugere que a atividade microbiana e o processo de secagem não interferem na composição dos principais compostos presentes nos grãos de café. A concentração dos principais ácidos orgânicos e açúcares nos grãos de café fermentados são semelhantes às concentrações encontradas no Brasil e no Equador (CARVALHO NETO et al., 2018a; DE BRUYN et al., 2017) e são considerados precursores chave de moléculas que impactam a composição do café durante a torrefação (LEE et al., 2015).

Um total de 15 voláteis foram detectados por GC-MS em grãos de café frescos (não fermentados) e fermentados, incluindo ácidos orgânicos, álcoois, aldeídos, alcanos, terpenos e aromáticos (TABELA 2). O ácido 3-metilbutanóico, benzaldeído, benzenoacetaldeído, 5-isobutilnonano e 4,6-dimetildodecano foram os compostos encontrados em altas concentrações em grãos de café frescos e fermentados. A maioria destes compostos aumentou significativamente após o processo de fermentação. Em particular, o aumento de aldeídos (como por exemplo, acetaldeído, benzaldeído, benzeneacetaldeído, nonanal, octanal) e 1-octen-3-ol pode ser atribuído à dominância de *P. nakasei*, *Candida* sp., *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*. Como os compostos voláteis apresentam baixo *threshold*, sua incorporação na composição química dos grãos pode atribuir notas sensoriais florais, frutadas e cítricas desejáveis à bebida final. Por outro lado, alguns compostos, como o estireno e o limoneno, podem ter se originado devido à germinação das sementes durante a fermentação (PEREIRA et al., 2019; WATERS; ARENDT; MORONI, 2017).

TABELA 2 – ANÁLISE DE CLAE E GC-MS DOS GRÃOS DE CAFÉ FRESCOS (NÃO FERMENTADOS) E FERMENTADOS (48 h).

CLAE (g L ⁻¹)	Referência sensorial ^a		Café fermentado
	Compostos (tempo de retenção)	Café fresco	
Glicose	Adocicado	7.28 ± 1.36 ^a	6.80 ± 0.41 ^a
Frutose	Adocicado	5.26 ± 1.09 ^a	5.09 ± 0.22 ^a
Etanol	Alcólico	0.18 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.01 ^a
Ácido Cítrico	Azedo	2.54 ± 0.62 ^a	2.26 ± 0.18 ^a
Ácido Láctico	Azedo	0.16 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.06 ^a
Ácido Acético	Vinagre	0.03 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^b
Ácido Succínico	Amargo	0.03 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a
GC-MS (Área *10⁵)			
Ácidos			
3-Metil-butanoico (4.0)	Ácido	16.85 ± 1.9 ^a	20.70 ± 4.5 ^a
2-Metil-butanoico (4.2)	Ácido	4.99 ± 1.6 ^a	5.21 ± 0.9 ^a
Álcoois			
1-Octen-3-ol (9.7)	Oleoso, vegetal	2.27 ± 1.1 ^a	6.94 ± 2.14 ^a
Aldeídos			
Acetaldeído (1.8)	Frutado	0.06 ± 0.02 ^a	0.55 ± 0.04 ^b
2-Heptenal (8.3)	Oleoso, vegetal	1.3 ± 1.0 ^a	6.7 ± 2.31 ^b
Benzaldeído (8.5)	Frutado, cereja	15.08 ± 1.64 ^a	37.95 ± 5.19 ^b
n-Capril-aldeído (11.3)	Frutado	1.91 ± 0.0 ^a	2.71 ± 0.6 ^a
Benzoacetaldéide (13.6)	Doce, floral	33.45 ± 5.74 ^a	72.13 ± 16.82 ^b
Nonanal (16.9)	Cítrico	3.75 ± 0.4 ^a	5.29 ± 0.4 ^b
Alcanos			
3,3,5-Trimetilheptano (12.4)	NE	1.53 ± 0.51 ^a	1.95 ± 0.38 ^a
5-Isobutylnonano (14.5)	NE	10.73 ± 0.48 ^a	13.08 ± 4.16 ^a
Tetradecano (21.1)	Ceroso	2.53 ± 0.37 ^a	2.98 ± 0.72 ^a
3-Metil-5-propilnonano (22.4)	NE	2.07 ± 0.95 ^a	2.59 ± 1.92 ^a
4,6-Dimetildodecano (23.3)	Floral	11.60 ± 5.49 ^a	13.43 ± 9.63 ^a
Henicosano (24.3)	Ceroso	2.01 ± 1.27 ^a	2.30 ± 1.70 ^a
Terpenos			
D-Limoneno (12.7)	Doce, cítrico	2.96 ± 1.32 ^a	2.48 ± 0.54 ^a
Aromáticos			
Estireno (5.5)	Doce, floral	4.78 ± 0.83 ^a	10.00 ± 5.27 ^a

CLAE.: Cromatografia líquida de alta performance; GC-MS.: Cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas; NE.: Não encontrado

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de fermentação espontânea dos grãos de café Colombiano foi caracterizado pela dominância de *Leuconostoc* e *Pichia nakasei*. A atividade metabólica destes grupos microbianos resultou principalmente na produção de ácido láctico e acetaldeído. Além disso, outros 170 grupos microbianos foram detectados, contribuindo para a formação de uma série de metabólitos. Neste estudo, 56 gêneros de fungos e bactérias foram relatados pela primeira vez em fermentações de café. Estes microrganismos estão associados principalmente ao ambiente e à migração de biomas próximos, indicando uma composição específica de nicho e associada ao metabolismo microbiano presente no processo de fermentação do café Colombiano. Os dados apresentados contribuem para uma melhor compreensão da composição microbiana e das perspectivas sobre sua aplicação no aprimoramento do processo de fermentação do café, como a produção de grãos de café de alta qualidade, seleção de grupos microbianos específicos para modulação de sabor e potenciais candidatos a marcadores biológicos do café Colombiano.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, K. E. et al. Highly similar microbial communities are shared among related and trophically similar ant species. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 9, p. 2282–2296, maio 2012.
- ANNAN, N. T. et al. Influence of starter culture combinations of *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* on aroma in Ghanaian maize dough fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 216, n. 5, p. 377–384, 29 maio 2003.
- AVALLONE, S. et al. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 252–256, 2001.
- AVALLONE, S. et al. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 191–198, 2002.
- BASSO, R. F.; ALCARDE, A. R.; PORTUGAL, C. B. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, p. 112–120, 1 ago. 2016.
- BRANDO, C. H. J.; BRANDO, M. F. Methods of Coffee Fermentation and Drying. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Eds.). . **Cocoa and Coffee Fermentations**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 367–396.
- BROWN, B. P.; WERNEGREN, J. J. Deep divergence and rapid evolutionary rates in gut-associated *Acetobacteraceae* of ants. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 140, 2016.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 11 maio 2010.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 8 ago. 2012.
- CARVALHO NETO, D. P. et al. Yeast Diversity and Physicochemical Characteristics Associated with Coffee Bean Fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro Region. **Fermentation**, v. 3, n. 1, p. 11, 2017.

CARVALHO NETO, D. P. et al. Efficient coffee beans mucilage layer removal using lactic acid fermentation in a stirred-tank bioreactor: Kinetic, metabolic and sensorial studies. **Food Bioscience**, v. 26, p. 80–87, 1 dez. 2018a.

CARVALHO NETO, D. P. DE et al. High-Throughput rRNA Gene Sequencing Reveals High and Complex Bacterial Diversity Associated with Brazilian Coffee Bean Fermentation. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 90–95, mar. 2018b.

CIANI, M.; FERRARO, L.; FATICHENTI, F. Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 698–703, 2000.

DAHL, S.; TAVARIA, F. K.; MALCATA, F. X. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. **Int. Dairy J.**, v. 10, p. 255–262, 2000.

DE BRUYN, F. et al. Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and Metabolite Profiles during Green Coffee Bean Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 1, p. e02398-16, 2017.

DJOSSOU, O. et al. Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 267–272, dez. 2011.

DOUGLAS, A. E. Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 17–34, 7 jan. 2015.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

ENDO, A.; DICKS, L. M. T. Physiology of the LAB. In: HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. (Eds.). **Lactic Acid Bacteria: biodiversity and taxonomy**. [s.l.: s.n.]. p. 13–30.

EVANGELISTA, S. R. et al. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, v. 61, p. 183–195, 1 jul. 2014.

FENG, X. et al. Culture-Dependent and -Independent Methods to Investigate the Predominant Microorganisms Associated with Wet Processed Coffee. **Current**

Microbiology, v. 73, n. 2, p. 190–195, 25 ago. 2016.

FINDLEY, K. et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. **Nature**, v. 498, n. 7454, p. 367–370, 22 jun. 2013.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1–2, p. 11–22, 1 set. 2003.

FREEMAN, K. R. et al. Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soils. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 43, p. 18315–18320, 2009.

GRIGG, D. The worlds of tea and coffee: Patterns of consumption. **GeoJournal**, v. 57, n. 4, p. 283–294, 2002.

GUÉHO, E. et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Medical Mycology**, v. 36, p. 220–229, 1998.

GUEULE, D. et al. *Pantoea coffeiphila* sp. nov., cause of the ‘potato taste’ of Arabica coffee from the African great lakes region. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 23–29, 2015.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Report on coffee total production by all exporting countries in thousand 60Kg bags.**

KIERONCZYK, A. et al. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 2, p. 734–9, fev. 2003.

KREISINGER, J. et al. Cloacal Microbiome Structure in a Long-Distance Migratory Bird Assessed Using Deep 16sRNA Pyrosequencing. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0137401, 11 set. 2015.

KUHL, G. C. et al. Selection of Lactic Acid Bacteria for the Optimized Production of Sheep’s Milk Yogurt with a High Conjugated Linoleic Acid Content. **Journal of Food Research**, v. 6, n. 4, p. 44, 14 jun. 2017.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (EDS.). **The yeasts - A taxonomic study**. 5th. ed. London: Elsevier, 2011.

LAKSHMANAN, V.; SELVARAJ, G.; BAIS, H. P. Functional Soil Microbiome: Belowground Solutions to an Aboveground Problem. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 689–700, 1 out. 2014.

LARA-ESTRADA, L.; VAAST, P. **Effects of altitude, shade, yield and fertilization on coffee quality (Coffea arabica L. var. Caturra) produced in agroforestry systems of the Northern Central Zones of Nicaragua.** 2nd International Symposium on Multi-Strata Agroforestry Systems with Perennial Crops: **Anais...Turrialba, Costa Rica: 2007**

LEE, L. W. et al. Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. **Food Chemistry**, v. 185, p. 182–191, 15 out. 2015.

LEE, L. W. et al. Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: II. Effects of different roast levels. **Food Chemistry**, v. 211, p. 925–936, 15 nov. 2016.

LEE, L. W. et al. Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: II. Roasted coffee. **LWT**, v. 80, p. 32–42, 1 jul. 2017.

LEONG, K. et al. Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Fresh Coffee Cherries in Taiwan. **Current Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 440–447, 2014.

LIU, M. et al. *Kineococcus xinjiangensis* sp. nov., isolated from desert sand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1090–1093, 1 maio 2009.

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**, v. 21, n. 7, p. 549–556, maio 2004.

MORENO, J. A. et al. Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. **Food Control**, v. 16, n. 4, p. 333–338, 1 abr. 2005.

MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIDU, M. Improvement of Robusta Coffee Fermentation with Microbial Enzymes. **European Journal of Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 130–139, 2011.

NAGAHAMA, T. et al. *Dipodascus tetrasporus* sp. nov., an ascosporegenous yeast

isolated from deep-sea sediments in the Japan Trench. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1040–1046, 2008.

NDAGANO, D. et al. Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the *Weissella* Genus Isolated from Food. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, 2011.

NIST. **Mass Spectrometry Data Center**. Disponível em: <<https://chemdata.nist.gov/>>. Acesso em: 6 dez. 2018.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60–66, 2014.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. **Food Research International**, v. 75, p. 348–356, 1 set. 2015a.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2775–2788, 2 set. 2015b.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 7, p. 1689–1695, jul. 2016a.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 7, p. 1689–1695, jul. 2016b.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. **Food Chemistry**, v. 272, p. 441–452, 30 jan. 2019.

PEREIRA, G. V. DE M.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 50–57, 2016.

QIN, J. et al. Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella Pneumoniae* Using Glucose and Ammonium Phosphate. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 132–136, 1 fev. 2006.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D590-6, jan. 2013.

RENGANATH RAO, R. et al. Alkaline Protease Production from *Brevibacterium luteolum* (MTCC 5982) Under Solid-State Fermentation and Its Application for Sulfide-Free Unhairing of Cowhides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 2, p. 511–528, 2017.

ROUTRAY, W.; MISHRA, H. N. Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 208–220, 1 jul. 2011.

SILVA, C. F. et al. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 951–957, 1 dez. 2008.

SIMMONS, D. R. et al. Lobulomycetales, a new order in the Chytridiomycota. **Mycological Research**, v. 113, n. 4, p. 450–460, 2009.

SWIEGERS, J. H. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 139–173, 1 jul. 2005.

TAKASHIMA, M.; SUH, S.-O.; NAKASE, T. *Bensingtonia musae* sp. nov. isolated from a dead leaf of *Musa paradisiaca* and its phylogenetic relationship among basidiomycetous yeasts. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 41, p. 143–151, 1995.

TRIP-SUGGEST. **Buesaco Destination Guide**. Disponível em: <<http://trip-suggest.com/colombia/narino/buesaco/>>. Acesso em: 27 dez. 2018.

VALLET, A. et al. Pathways that produce volatile sulphur compounds from methionine in *Oenococcus oeni*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1833–1840, jun. 2008.

VELMOUROUGANE, K. et al. Use of starter culture in coffee fermentation - effect on demucilisation and cup quality. **Indian Coffee**, v. 72, p. 31–34, 2008.

VELMOUROUGANE, K. Impact of Natural Fermentation on Physicochemical, Microbiological and Cup Quality Characteristics of Arabica and Robusta Coffee.

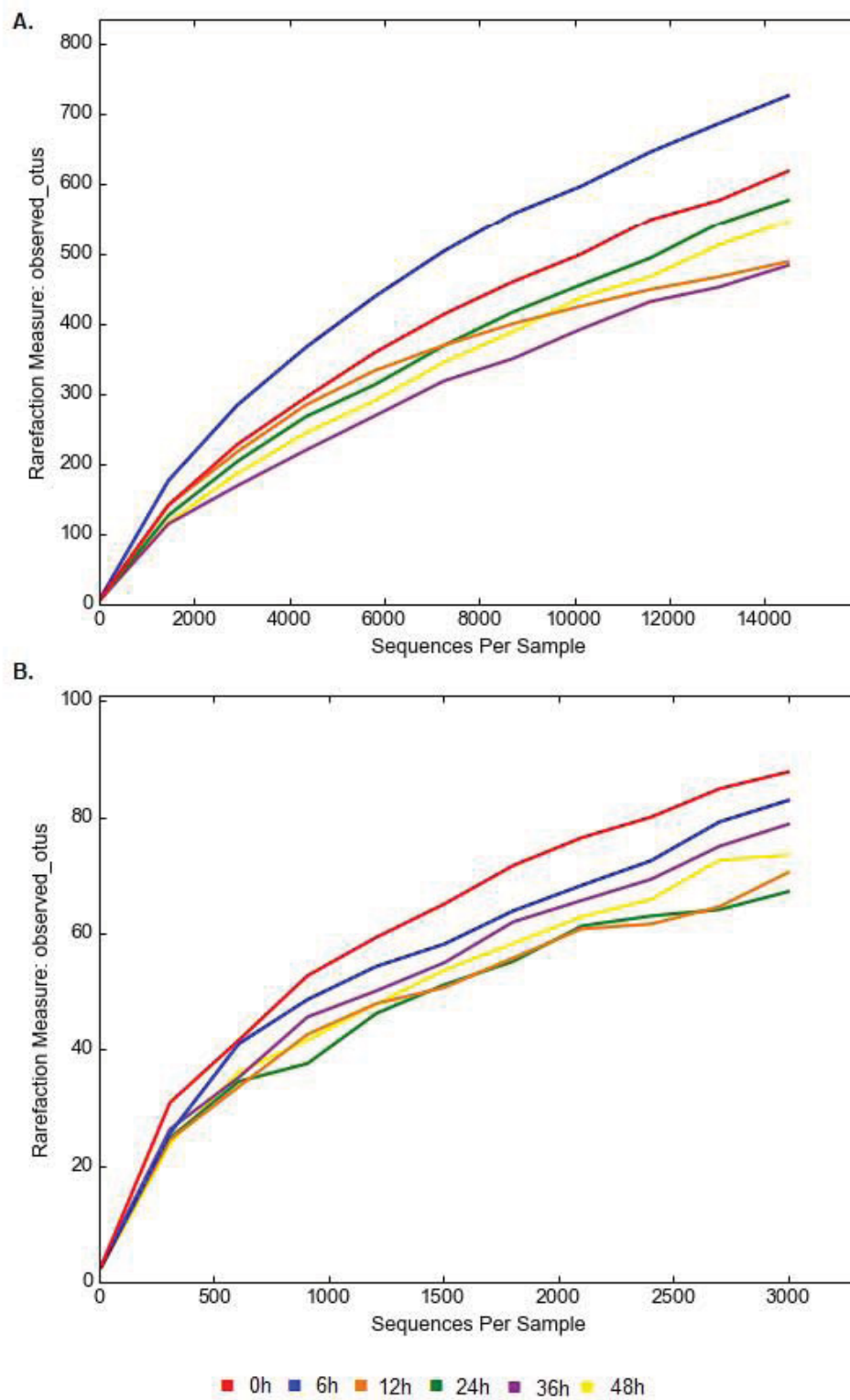
Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, v. 83, n. 2, p. 233–239, 5 jun. 2013.

VILJOEN, B. C. Yeast Ecological Interactions. Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents. In: **Yeasts in Food and Beverages**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, [s.d.]. p. 83–110.

WANG, C. et al. Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 3 ago. 2018.

WATERS, D. M.; ARENDT, E. K.; MORONI, A. V. Overview on the mechanisms of coffee germination and fermentation and their significance for coffee and coffee beverage quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 259–274, 2017.

ANEXO 1 – CURVAS DE RAREFAÇÃO ALFA DE OTUS (UNIDADES TAXONÔMICAS OPERACIONAIS) DAS AMOSTRAS TEMPORAIS. A. ANÁLISE BACTERIANA, B. ANÁLISE FÚNGICA.



ANEXO 2 – ABUNDÂNCIA RELATIVA (%) DE BACTÉRIAS E FUNGOS AO NÍVEL DE GÊNERO DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DO CAFÉ COLOMBIANO. AS BACTÉRIAS REPORTADAS PELA PRIMEIRA VEZ NA FERMENTAÇÃO DO CAFÉ ESTÃO DESTACADAS EM ASTERÍSCO (*)

Família	Gênero	Tempo de fermentação (h)						
		0	6	12	24	36	48	
Bacterias	Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	46.40	72.24	73.93	84.66	83.72	65.81
		<i>Fructobacillus</i>	0.08	-	0.10	0.09	0.29	0.40
		<i>Oenococcus</i>	-	-	-	-	-	0.03
		<i>Weisella</i>	0.02	-	-	0.09	1.14	1.17
		<i>Lactococcus</i>	20.38	0.41	1.81	5.22	1.97	1.21
	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	0.17	0.84	1.03	0.95	7.53	27.28
		<i>Pediococcus</i>	0.01	-	0.02	0.02	0.03	0.07
		<i>Erwinia</i>	17.00	7.33	8.69	3.41	2.55	1.66
	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	0.50	0.31	0.31	0.17	0.12	0.05
		<i>Citrobacter</i>	0.07	0.02	-	0.01	0.01	0.01
		<i>Enterobacter</i>	0.06	0.06	-	0.01	0.01	-
		<i>Serratia</i>	0.06	0.04	-	0.01	0.01	0.01
		<i>Plesiomonas*</i>	0.03	-	-	0.01	0.01	-
		<i>Trabulsilla*</i>	0.01	-	-	0.01	-	-
		<i>Acetobacter</i>	0.19	0.37	0.31	0.05	0.08	0.06
<i>Gluconacetobacter</i>		0.05	0.10	-	0.01	0.02	0.01	
Methylobacteriaceae	<i>Roseomonas</i>	0.09	0.12	0.08	0.03	0.01	0.01	
	<i>Roseococcus</i>	0.02	-	0.02	-	-	-	
	<i>Gluconobacter</i>	3.03	3.30	1.43	0.80	0.48	0.35	
	<i>Methylobacterium</i>	1.28	1.19	0.77	0.55	0.21	0.15	
	<i>Sphingomonas</i>	0.67	0.80	0.49	0.37	0.14	0.15	
Cytophagaceae	<i>Sphingobium</i>	0.14	0.33	0.18	0.11	0.02	0.03	
	<i>Novosphingobium</i>	0.12	0.21	0.11	0.03	0.01	0.02	
	<i>Kaisobacter</i>	0.04	0.10	0.14	0.05	0.02	0.01	
	<i>Sphingopyxis</i>	-	-	-	0.01	-	-	
	<i>Spirosoma</i>	0.46	0.55	0.20	0.12	0.10	0.08	
	<i>Dyadobacter*</i>	0.26	0.37	0.23	0.15	0.03	0.03	
	<i>Larkinella</i>	0.07	0.02	0.09	0.01	0.01	0.01	
	<i>Hymenobacter</i>	0.06	0.14	0.06	0.02	0.01	0.01	
	<i>Rudanella*</i>	0.01	0.02	0.02	-	-	-	

	<i>Chitinophaga*</i>	0.01	-	-	-	-	-	<0.01
	<i>Niabella*</i>	0.02	-	-	-	-	-	-
	<i>Sediminibacterium</i>	0.04	-	-	-	-	<0.01	-
	<i>Segetibacter</i>	-	0.05	-	-	-	-	-
Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	0.09	0.06	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01
	<i>Kaistia*</i>	0.01	0.06	0.01	0.01	0.01	-	-
	<i>Agrobacterium</i>	1.09	1.05	0.34	0.51	0.10	0.10	0.09
	<i>Rhodococcus</i>	0.10	0.10	0.15	0.01	0.01	0.01	0.01
Hyphomicrobiaceae	<i>Rhodoplanes</i>	0.07	0.06	-	0.02	0.02	0.01	0.01
Beutenbergiaceae	<i>Salana*</i>	0.06	0.12	-	0.02	0.02	-	-
Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	0.06	0.10	0.13	0.02	0.02	0.01	0.02
	<i>Capnocytophaga*</i>	-	-	-	-	-	-	<0.01
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus</i>	0.03	-	0.10	0.03	0.03	0.01	0.02
	<i>Blautia*</i>	-	0.04	0.04	0.01	-	-	0.01
	<i>Coprococcus</i>	-	-	-	-	-	<0.01	<0.01
	<i>Dorea</i>	0.01	-	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Gemmataceae	<i>Gemmata</i>	0.03	0.18	0.02	0.02	0.03	0.03	<0.01
Dermabacteraceae	<i>Brachybacterium</i>	-	0.02	0.12	-	0.04	0.04	0.03
Fimbrimonadaceae	<i>Fimbrimonas</i>	0.08	0.10	0.04	0.03	0.01	0.01	-
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter*</i>	0.01	-	-	-	0.01	0.01	-
	<i>Kocuria*</i>	0.01	0.12	-	-	-	-	-
	<i>Micrococcus*</i>	-	-	0.02	-	-	-	-
	<i>Rothia*</i>	0.02	-	-	-	-	-	-
Kineosporiaceae	<i>Kineococcus</i>	0.04	0.10	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02
	<i>Kineosporia*</i>	0.02	-	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01
Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>	0.05	-	-	0.01	0.01	0.01	0.04
Bdellovibrionaceae	<i>Bdellovibrio</i>	0.04	0.04	0.02	0.01	-	-	-
Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	0.04	-	0.05	0.02	0.02	-	-
Nocardioideaceae	<i>Aeromicrobium</i>	0.01	-	-	0.02	0.02	-	0.01
	<i>Nocardioides</i>	0.03	-	-	0.02	0.02	0.01	-
Oxalobacteraceae	<i>Janthinobacterium</i>	0.03	0.08	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01
	<i>Polynucleobacter*</i>	-	-	0.02	-	-	-	-

Beijerinckiaceae	<i>Beijerinckia</i>	0.06	-	-	0.01	<0.01	-
Micromonosporaceae	<i>Actinoplanes</i>	0.03	-	0.07	0.01	-	<0.01
Porphyromonadaceae	<i>Dysgonomonas</i> *	0.02	-	-	-	-	<0.01
	<i>Paludibacter</i> *	-	-	-	-	-	<0.01
	<i>Parabacteroides</i> *	0.02	-	-	-	-	-
Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>	0.03	-	0.09	<0.01	-	0.01
Intrasporangiaceae	<i>Arseniococcus</i>	-	-	-	-	-	<0.01
	<i>Terracoccus</i>	0.03	-	-	-	<0.01	<0.01
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	0.03	-	-	0.01	<0.01	0.01
Phyllobacteriaceae	<i>Methylophilla</i> *	-	-	-	0.02	-	<0.01
	<i>Methylosinus</i> *	0.02	-	0.05	-	<0.01	-
	<i>Aminobacter</i>	0.03	0.06	0.03	0.01	<0.01	<0.01
Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	0.02	-	0.02	0.01	-	<0.01
	<i>Lautropia</i> *	0.01	-	-	-	-	<0.01
Blattabacteriaceae	<i>Blattabacterium</i> *	0.02	-	0.03	-	0.01	<0.01
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	0.02	-	-	-	<0.01	-
Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>	0.01	0.02	-	0.01	0.01	0.02
	<i>Oscillospira</i>	0.01	-	-	0.01	<0.01	0.01
Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i>	0.02	-	0.02	0.01	0.01	0.01
Methylocystaceae	<i>Methylopila</i> *	-	-	-	-	-	<0.01
	<i>Methylosinus</i> *	0.02	-	0.05	0.03	<0.01	<0.01
Rhodospirillaceae	<i>Azospirillum</i>	-	-	0.02	-	-	-
	<i>Rhodospirillum</i> *	0.02	-	-	-	-	-
Alcaligenaceae	<i>Achronobacter</i>	-	-	-	-	-	<0.01
	<i>Pigmentiphaga</i> *	0.02	-	-	<0.01	<0.01	-
Chthoniobacteraceae	<i>Candidatus</i> <i>Xiphinematobacter</i>	0.02	-	0.02	-	-	-
	<i>Chthoniobacter</i>	-	-	0.03	-	-	-
Trueperaceae	<i>Truepera</i> *	0.02	-	-	-	-	-
Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i>	0.01	-	-	<0.01	<0.01	<0.01
Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	0.01	-	-	<0.01	<0.01	<0.01

Gemmatimonadaceae	<i>Gemmatimonas</i>	-	0.01	-	0.02	-	<0.01
Alteromonadaceae	<i>Cellvibrio</i> *	-	0.01	-	<0.01	-	<0.01
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	-	-	-	<0.01	<0.01	<0.01
Geodermatophilaceae	<i>Geodermatophilus</i>	-	-	-	0.01	0.01	<0.01
Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	0.01	<0.01	<0.01
Williamsiaceae	<i>Williamsia</i> *	-	-	-	<0.01	-	<0.01
Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	-	-	0.03	-	-	-
Patulibacteraceae	<i>Patulibacter</i> *	-	-	0.02	-	<0.01	<0.01
Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	-	-	0.02	<0.01	<0.01	0.01
Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	-	-	-	-	<0.01	<0.01
Turicibacteraceae	<i>Turicibacter</i>	-	-	0.02	-	-	-
Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	-	-	-	<0.01	<0.01	<0.01
Nitrospiraceae	<i>Nitrospira</i>	-	-	-	-	<0.01	<0.01
Planctomycetaceae	<i>Planctomyces</i>	-	-	0.02	0.01	-	-
Bradyrhizobiaceae	<i>Bosea</i>	-	-	0.03	-	-	-
Xanthobacteraceae	<i>Labrys</i> *	-	-	-	0.01	<0.01	<0.01
Rickettsiaceae	<i>Wolbachia</i>	0.04	-	-	<0.01	<0.01	-
Neisseriaceae	<i>Eikenella</i> *	-	-	-	<0.01	<0.01	-
	<i>Neisseria</i> *	-	-	-	<0.01	-	0.01
Nannocystaceae	<i>Nannocystis</i>	-	-	0.05	0.01	<0.01	<0.01
Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>	-	-	0.04	-	-	-
	<i>Campylobacter</i>	-	-	-	<0.01	-	<0.01
Cardiobacteriaceae	<i>Cardiobacterium</i> *	-	-	-	<0.01	-	<0.01
Legionellaceae	<i>Legionella</i>	-	-	0.03	0.01	-	<0.01
Pasteurellaceae	<i>Aggregatibacter</i> *	-	-	-	<0.01	<0.01	<0.01
Sinobacteraceae	<i>Steroidobacter</i> *	-	-	-	-	-	<0.01
Deinococcaceae	<i>Deinococcus</i> *	-	-	-	<0.01	<0.01	<0.01

Fungos									
Saccharomycetaceae	<i>Pichia nakasei</i> *	59.70	70.89	80	72.02	73.21	82.52		
	<i>Candida</i> sp.	20.90	27.85	18	24.31	20.57	13.16		
	<i>Candida vanderwaltii</i> *	-	-	-	-	-	0.94		
Dipodascaceae	<i>Dipodascus tetrasporeus</i> *	11.94	0.63	-	1.84	2.87	2.61		
Classiculaceae	Classiculaceae	4.48	0.63	-	0.92	0.48	0.19		
Malasseziaceae	<i>Malassezia</i> sp.*	1.49	-	-	-	-	0.38		
Saccharomycopsidaceae	Saccharomycopsidaceae	1.49	-	-	-	-	-		
Pichiaceae	<i>Martiniomyces asiatica</i> *	-	-	2	-	0.48	-		
Konodaceae	<i>Bensingtonia</i> *	-	-	-	0.46	1.44	-		
Tremellaceae	Tremellaceae	-	-	-	0.46	-	-		
Lobulomycetales	Lobulomycetales*	-	-	-	-	0.48	-		
Physiceae	Physiceae	-	-	-	-	0.48	-		
Debaryomycetaceae	<i>Schwanniomycetes</i> sp.	-	-	-	-	-	0.19		

ANEXO 3 – APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE ALGUNS GRUPOS DE BACTÉRIAS RELATADAS NESTE ESTUDO.

Família	Gênero	Potencial biotecnológico de aplicação	Ref.
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	Probiótico, produz nisina, modulação do aroma na maturação de queijos.	1,2
Acetobacteraceae	<i>Acetobacter</i> , <i>Gluconoacetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Roseomonas</i> , <i>Roseococcus</i>	Biossíntese de celulose. Produção de vinagre.	3,4
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	Produção de enzimas e biossurfactantes.	5
Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i> , <i>Novosphingobium</i> , <i>Kaistobacter</i> , <i>Sphingopyxis</i>	Biorremediação de moléculas tóxicas e recalctrantes, biossíntese de nanopartículas de prata (atividade antimicrobiana), produção giberelinas and IAA (promotores do crescimento em plantas), biossíntese de goma.	6–9
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	Degrada hidrocarbonetos, produção de emulsificantes (emulsan), biorremediação de águas contaminadas por metais pesados.	10,11
Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	Consumem fontes de uma molécula de carbono, conversão de CO ₂ em moléculas de valor agregado, melhora a tolerância ao arsênio em plantas, fixação de nitrogênio em plantas, contribui na formação de sabor em morangos.	10,12–14
Cytophagaceae	<i>Spirosoma</i> , <i>Dyadobacter</i> , <i>Larkinella</i> , <i>Hymenobacter</i> , <i>Emiticia</i> , <i>Rudanella</i>	Biorremediação de locais contaminados por hidrocarbonetos.	15,16
Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Kaistia</i>	Habita a rizosfera de plantas. Pode ser utilizada como ferramenta do DNA recombinante em biotecnologia vegetal.	17
Comamonadaceae	<i>Polaromonas</i> , <i>Paucibacter</i> <i>Hylemonella</i>	Habilidade em degradar o naftaleno.	18,19
Microbacteriaceae	<i>Agrococcus</i> , <i>Cryocola</i> , <i>Curto bacterium</i> , <i>Mycetocola</i> , <i>Frigoribacterium</i> , <i>Salimibacterium</i> , <i>Rathayibacter</i>	Isoladas de uma grande variedade de ambientes (de pintura de parede, permafrost, deserto, e da superfície de queijos), mas estudos são necessários para avaliar seu potencial biotecnológico.	20–23
Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i> , <i>Luteimonas</i> , <i>Luteibacter</i> , <i>Dokdonella</i>	Promove o crescimento de plantas, atividade antifúngica, produção de enzimas (xilanas e lipase), biorremediação de efluentes contaminados por corantes.	24–29
Sphingobacteriaceae	<i>Pedobacter</i> , <i>Olivibacter</i> , <i>Sphingobacterium</i>	Biodegradação de uma variedade de moléculas, tais como o ácido poli-aspártico, hidrocarbonetos, 17 α -etinilestradiol.	30–32
Chitinophagaceae	<i>Flavisolibacter</i> , <i>Sediminibacterium</i> , <i>Niabella</i> , <i>Chitinophaga</i>	Produção de antibióticos e biossíntese de compostos aromáticos.	33–35
Actinomycetales	<i>Actinomycetaceae</i> , <i>Beutenbergiaceae</i> , <i>Brevibacteriaceae</i> , <i>Cellulomonadaceae</i> ,	Produção de uma ampla gama de antibióticos, pigmentos, aminoácidos, enzimas e ácidos orgânicos. Algumas cepas são resistentes à radiação. Biorremediação de sítios	36–53

	<i>Corynebacteriaceae, Dermabacteraceae, Frankiaceae, Geodermatophilaceae, Intrasporangiaceae, Kineosporiaceae, Micrococcaceae, Micromonosporaceae, Mycobacteriaceae, Nakamurellaceae, Nocardiaceae, Nocardioidaceae, Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae, Williamsiaceae</i>	contaminados por petróleo e metais.	
Aeromonadales	<i>Aeromonadaceae</i>	Habilidade em degradar lignina.	54
Alteromonadales	<i>Alteromonadaceae</i>	Produção de exopolissacarídeos.	55
Armatimonadales	<i>Armatimonadaceae</i>		
Bacillales	<i>Bacillaceae, Paenibacillaceae</i>	Controle biológico contra patógenos na rizosfera de plantas.	56
Bacteroidales	<i>Bacteroidaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae</i>	Participa da microbiota gastrointestinal, potencial probiótico.	57
Bdellovibrionales	<i>Bacteriovoracaceae, Bdellovibrionaceae</i>	Pode ser aplicada no tratamento de água.	58
Bifidobacteriales	<i>Bifidobacteriaceae</i>	Probiótico.	59
Burkholderiales	<i>Alcaligenaceae, Burkholderiaceae, Oxalobacteraceae</i>	Tratamento de efluentes da indústria têxtil. Produção de violaceína, pigmento violeta que possui propriedades anticancerígena.	60,61
Caulobacterales	<i>Caulobacteraceae</i>	Degradação de alquibenzenos lineares sulfonados.	62
Chthoniobacteriales	<i>Chthoniobacteraceae</i>		
Clostridiales	<i>Christensenellaceae, Clostridiaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae</i>	Associadas a microbiota do trato digestivo.	63
Deinococcales	<i>Deinococcaceae</i>	Síntese e acumulação extracelular de nanopartículas de prata.	64
Erysipelotrichales	<i>Erysipelotrichaceae</i>		
Fimbrimonadales	<i>Fimbrimonadaceae</i>		
Flavobacteriales	<i>Blattabacteriaceae, Flavobacteriaceae, Weeksellaceae</i>	Produção de pigmentos com propriedades antioxidantes.	65
Fusobacteriales	<i>Fusobacteriaceae</i>		
Gemmatales	<i>Gemmataceae, Isosphaeraceae</i>		
Gemmatimonadales	<i>Gemmatimonadaceae</i>	Biossíntese de carotenoides (oscillo 2,2'-dirhamnoside).	66
Lactobacillales	<i>Aerococcaceae, Enterococcaceae</i>	Culturas iniciadoras e probiótico.	67,68
Legionellales	<i>Legionellaceae</i>		
Myxococcales	<i>Cystobacterineae, Haliangiaceae, Nannocystaceae, Polyangiaceae</i>	Biossíntese de moléculas anticâncer e antifúngicas.	69-71
Neisseriales	<i>Neisseriaceae</i>		
Nitrospirales	<i>Nitrospiraceae</i>	Oxida nitrito e Fe. Degradação de compostos orgânicos.	72
Pasteurellales	<i>Pasteurellaceae</i>	Patógenos.	73
Pirellulales	<i>Pirellulaceae</i>		

Rhizobiales	<i>Beijerinckiaceae</i> , <i>Bruceaceae</i> , <i>Phyllobacteriaceae</i> , <i>Xanthobacteraceae</i> , <i>Methylocystaceae</i> , <i>Bradyrhizobiaceae</i> , <i>Hyphomicrobiaceae</i>	Microbioma associado à plantas, atuando na fixação de nitrogênio, biossíntese de nutrientes e fitohormônios.	74
Rhodobacterales	<i>Hypomonadaceae</i> , <i>Rhodobacteraceae</i>	Presente em água do mar de regiões costeiras.	75
Rhodocyclales	<i>Rhodocyclaceae</i>	Podem degradar moléculas aromáticas.	76
Rhodospirillales	<i>Rhodospirillaceae</i>	Biossíntese de poliésteres biodegradáveis.	77
Rickettsiales	<i>Rickettsiaceae</i>		
Saprospirales	<i>Saprospiraceae</i>	Hidrólise e utilização de fontes de carbono complexas.	78
Solirubrobacterales	<i>Conexibacteraceae</i> , <i>Patulibacteraceae</i> , <i>Solirubrobacteraceae</i>	Biodegradação de compostos farmacologicamente ativos.	79
Verrucomicrobiales	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	Atividade enzimática hidrolítica.	80
Xanthomonadales	<i>Sinobacteraceae</i>	Podem degradar a borracha.	81

1. VAN MASTRIGT, O. et al. Aroma formation during cheese ripening is best resembled by *Lactococcus lactis* retentostat cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 104, 4 dez. 2018.
2. COSTAS MALVIDO, M. et al. Production of a highly concentrated probiotic culture of *Lactococcus lactis* CECT 539 containing high amounts of nisin. **3 Biotech**, v. 8, n. 7, p. 292, 25 jul. 2018.
3. NGUYEN, V. T. et al. Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain from Kombucha. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 449–453, 14 nov. 2008.
4. CHAUHAN, P. S.; JHA, B. Pilot scale production of extracellular thermo-alkali stable laccase from *Pseudomonas* sp. S2 using agro waste and its application in organophosphorous pesticides degradation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1022–1030, 1 abr. 2018.
5. SILVA, M. A. M. et al. Production of Biosurfactants by *Pseudomonas* Species for Application in the Petroleum Industry. **Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation**, v. 89, n. 2, p. 117–126, 1 fev. 2017.
6. WU, H. et al. Bioaugmentation potential of a newly isolated strain *Sphingomonas* sp. NJUST37 for the treatment of wastewater containing highly toxic and recalcitrant tricyclazole. **Bioresource Technology**, v. 264, p. 98–105, 1 set. 2018.
7. DU, J.; SINGH, H.; YI, T.-H. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Novosphingobium* sp. THG-C3 and their antimicrobial potential. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 211–217, 17 fev. 2017.
8. KHAN, A. L. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 689–695, 4 ago. 2014.

Continuação ANEXO 3

9. SÁ-CORREIA, I. et al. Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: Genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 170–176, out. 2002.
10. NAKAR, D.; GUTNICK, D. L. Involvement of a protein tyrosine kinase in production of the polymeric bioemulsifier emulsan from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 1001–9, fev. 2003.
11. BOSWELL, C. D.; DICK, R. E.; MACASKIE, L. E. The effect of heavy metals and other environmental conditions on the anaerobic phosphate metabolism of *Acinetobacter johnsonii*. **Microbiology**, v. 145, n. 7, p. 1711–1720, 1 jul. 1999.
12. SY, A. et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 214–20, 1 jan. 2001.
13. ALCÁNTARA-MARTÍNEZ, N. et al. An endophytic strain of *Methylobacterium* sp. increases arsenate tolerance in *Acacia farnesiana* (L.) Willd: A proteomic approach. **Science of The Total Environment**, v. 625, p. 762–774, 1 jun. 2018.
14. ZABETAKIS, I. Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 50, n. 3, p. 179–183, 1997.
15. ALI, N. et al. Autochthonous bioaugmentation with environmental samples rich in hydrocarbonoclastic bacteria for bench-scale bioremediation of oily seawater and desert soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8686–8698, 22 maio 2016.
16. WILLUMSEN, P. A. et al. Isolation and taxonomic affiliation of N-heterocyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 420–428, 14 maio 2005.
17. HOOYKAAS, P. J. J. et al. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Yeast and Fungi. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2018. p. 1–26.
18. JEON, C. O. et al. *Polaromonas naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalene-contaminated sediment. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 93–97, 1 jan. 2004.
19. RAPALA, J. et al. *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1563–1568, 1 jul. 2005.
20. LUO, X. et al. *Mycetocola manganoxydans* sp. nov., an actinobacterium isolated from the Taklamakan desert. **Int Jour Of Systm Evol Microbiol**, v. 62, n. Pt 12, p. 2967–2970, 1 dez. 2012.
21. BORA, N. et al. *Mycetocola reblochoni* sp. nov., isolated from the surface microbial flora of Reblochon cheese. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 2687–2693, 1 dez. 2008.
22. HANSEN, A. A. et al. Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 2870–2884, 1 nov. 2007.
23. WIESER, M. et al. *Agrococcus citreus* sp. nov., isolated from a medieval wall painting of the chapel of Castle Herberstein (Austria). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 3, p. 1165–1170, 1 jul. 1999.
24. HAN, Z.; SHANG-GUAN, F.; YANG, J. Characterization of a novel cold-active xylanase from *Luteimonas* species. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 123, 27 ago. 2018.

Continuação ANEXO 3

25. BRESCIANI, F. R. et al. Production and activity of extracellular lipase from *Luteibacter* sp. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 251–258, 19 mar. 2014.
26. LIU, Y. et al. *Dokdonella immobilis* sp. nov., isolated from a batch reactor for the treatment of triphenylmethane dye effluent. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt 4, p. 1557–1561, 1 abr. 2013.
27. ROJAS-SOLÍS, D. et al. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 46–52, 1 jan. 2018.
28. BERG, G. et al. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1937–1944, 1 nov. 2002.
29. SCHMIDT, C. S. et al. *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 8, p. 947–960, 3 nov. 2012.
30. TABATA, K. et al. Poly(aspartic acid) degradation by a *Sphingomonas* sp. isolated from freshwater. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4268–70, 1 set. 1999.
31. SZABO, I. et al. *Olivibacter oleidegradans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a biofilter clean-up facility on a hydrocarbon-contaminated site. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 2861–2865, 1 dez. 2011.
32. HAIYAN, R. et al. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 α -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. **Chemosphere**, v. 66, n. 2, p. 340–346, 1 jan. 2007.
33. BECKMANN, A. et al. Optimization of the biotechnological production of a novel class of anti-MRSA antibiotics from *Chitinophaga sancti*. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 143, 17 dez. 2017.
34. JANSEN, R. et al. Elansolid A3, a Unique p-Quinone Methide Antibiotic from *Chitinophaga sancti*. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, n. 28, p. 7739–7744, 4 jul. 2011.
35. NAWRATH, T. et al. The Biosynthesis of the Aroma Volatile 2-Methyltetrahydrothiophen-3-one in the Bacterium *Chitinophaga* Fx7914. **ChemBioChem**, v. 11, n. 13, p. 1914–1919, 3 set. 2010.
36. LEE, J.-Y. et al. The Actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an Industrial Workhorse. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 807–822, 28 maio 2016.
37. VON WINTZINGERODE, F. et al. *Salana multivorans* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from an anaerobic bioreactor and capable of selenate reduction. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 51, n. 5, p. 1653–1661, 1 set. 2001.
38. NOUIOUI, I. et al. High quality draft genome of *Nakamurella lactea* type strain, a rock actinobacterium, and emended description of *Nakamurella lactea*. **Standards in Genomic Sciences**, v. 12, n. 1, p. 4, 6 dez. 2017.
39. SUBASHCHANDRABOSE, S. R. et al. *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: An efficient p-nitrophenol degrader with a great potential for bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 347, p. 176–183, 5 abr. 2018.
40. KUDDUS, M. Cold-active enzymes in food biotechnology: An updated mini review. 2018.
41. BHARAGAVA, R. N.; MISHRA, S. Hexavalent chromium reduction potential of *Cellulosimicrobium* sp. isolated from common effluent treatment plant of tannery industries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 102–109, 1 jan. 2018.

Continuação ANEXO 3

42. APINYA, T.; SOMBATSOMPOP, N.; PRAPAGDEE, B. Selection of a *Pseudonocardia* sp. RM423 that accelerates the biodegradation of poly(lactic) acid in submerged cultures and in soil microcosms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 23–30, 1 abr. 2015.
43. DE LIMA PROCÓPIO, R. E. et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466–471, set. 2012.
44. YASSIN, A. F. et al. *Williamsia serinedens* sp. nov., isolated from an oil-contaminated soil. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 558–561, 1 mar. 2007.
45. ZHANG, S. et al. Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil. **Canadian Journal of Microbiology**, p. 1–11, 27 ago. 2018.
46. MOUNIER, J. et al. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6489–500, nov. 2005.
47. STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. Cellulomonadaceae. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–3.
48. GONTIA, I. et al. *Brachybacterium saurashtrense* sp. nov., a halotolerant root-associated bacterium with plant growth-promoting potential. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 61, n. 12, p. 2799–2804, 1 dez. 2011.
49. HEZBRI, K. et al. *Geodermatophilus pulveris* sp. nov., a gamma-radiation-resistant actinobacterium isolated from the Sahara desert. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 3828–3834, 1 out. 2016.
50. ZHANG, W. et al. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection regulates alternative splicing in Macrophages. **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 203–208, 13 jan. 2018.
51. LIU, M. et al. *Kineococcus xinjiangensis* sp. nov., isolated from desert sand. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1090–1093, 1 maio 2009.
52. UZAIR, B. et al. Isolation, purification, structural elucidation and antimicrobial activities of kocumarin, a novel antibiotic isolated from actinobacterium *Kocuria marina* CMG S2 associated with the brown seaweed *Pelvetia canaliculata*. **Microbiological Research**, v. 206, p. 186–197, jan. 2018.
53. GOLÍŃSKA, P. et al. Synthesis of silver nanoparticles from two acidophilic strains of *Pilimelia columellifera* subsp. *pallida* and their antibacterial activities. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 541–556, maio 2016.
54. BILLINGS, A. F. et al. Genome sequence and description of the anaerobic lignin-degrading bacterium *Tolomonas lignolytica* sp. nov. **Standards in Genomic Sciences**, v. 10, n. 1, p. 106, 19 dez. 2015.
55. MATA, J. A. et al. Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family Alteromonadaceae. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 521–528, ago. 2008.
56. GÓMEZ-LAMA CABANÁS, C. et al. Bacillales Members from the Olive Rhizosphere Are Effective Biological Control Agents against the Defoliating Pathotype of *Verticillium dahliae*. **Agriculture**, v. 8, n. 7, p. 90, 23 jun. 2018.
57. TAN, H. et al. Isolation of Low-Abundant Bacteroidales in the Human Intestine and the Analysis of Their Differential Utilization Based on Plant-Derived Polysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1319, 19 jun. 2018.
58. ÖZKAN, M. et al. Application of *Bdellovibrio bacteriovorus* for reducing fouling of membranes used for wastewater treatment. **Turkish Journal of Biochemistry**, 2018.

Continuação ANEXO 3

59. QUIGLEY, E. M. M. Bifidobacteria as Probiotic Organisms: An Introduction. **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology**, p. 125–126, 1 jan. 2017.
60. HUANG, J. et al. Microbial biodegradation of aniline at low concentrations by *Pigmentiphaga daeguensis* isolated from textile dyeing sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 129, p. 117–122, 1 abr. 2018.
61. MASUELLI, L. et al. Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 3705–3717, 13 mar. 2016.
62. CORTÉS-LORENZO, C. et al. Two novel strains within the family Caulobacteraceae capable of degradation of linear alkylbenzene sulfonates as pure cultures. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 62–65, 1 nov. 2013.
63. MEEHAN, C. J.; BEIKO, R. G. A Phylogenomic View of Ecological Specialization in the Lachnospiraceae, a Family of Digestive Tract-Associated Bacteria. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 703–713, mar. 2014.
64. DEOBAGKAR, D. et al. Synthesis and extracellular accumulation of silver nanoparticles by employing radiation-resistant *Deinococcus radiodurans*, their characterization, and determination of bioactivity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 963, jan. 2015.
65. JIMÉNEZ, M. E. P. et al. Extraction and partial characterisation of antioxidant pigment produced by *Chryseobacterium* sp. kr6. **Natural Product Research**, p. 1–9, 5 jan. 2018.
66. TAKAICHI, S. et al. Carotenoids of *Gemmatimonas aurantiaca* (Gemmatimonadetes): identification of a novel carotenoid, deoxyoscillo 2-rhamnoside, and proposed biosynthetic pathway of oscillo 2,2'-dirhamnoside. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 757–763, 1 mar. 2010.
67. AL ATYA, A. K. et al. Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 227, 2015.
68. DOS SANTOS, K. M. O. et al. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 46, n. 1, p. 237–49, mar. 2015.
69. KUNDIM, B. A. et al. New haliangicin isomers, potent antifungal metabolites produced by a marine myxobacterium. **The Journal of antibiotics**, v. 56, n. 7, p. 630–8, jul. 2003.
70. BOUHIREN, S. M. et al. Biosynthesis of Phenylannolone A, a Multidrug Resistance Reversal Agent from the Halotolerant Myxobacterium *Nannocystis pusilla* B150. **ChemBioChem**, v. 15, n. 5, p. 757–765, 21 mar. 2014.
71. GERTH, K. et al. Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. **The Journal of antibiotics**, v. 49, n. 6, p. 560–3, jun. 1996.
72. DAIMS, H. The Family Nitrospiraceae. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 733–749.
73. CHRISTENSEN, H. et al. The Family Pasteurellaceae. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 535–564.
74. ERLACHER, A. et al. Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 53, 2015.
75. DANG, H. et al. Cross-Ocean Distribution of Rhodobacterales Bacteria as Primary Surface Colonizers in Temperate Coastal Marine Waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 52–60, 1 jan. 2008.

Continuação ANEXO 3

76. OREN, A. The Family Rhodocyclaceae. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 975–998
77. BRANDL, H. et al. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly (beta-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. **International journal of biological macromolecules**, v. 11, n. 1, p. 49–55, fev. 1989.
78. MCILROY, S. J.; NIELSEN, P. H. The Family Saprospiraceae. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 863–889.
79. ALMEIDA, B. et al. Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain 111. **Biodegradation**, v. 24, n. 5, p. 615–630, 2 set. 2013.
80. CARDMAN, Z. et al. Verrucomicrobia Are Candidates for Polysaccharide-Degrading Bacterioplankton in an Arctic Fjord of Svalbard. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 12, p. 3749–3756, 15 jun. 2014.
81. SHARMA, V. et al. Metabolic and taxonomic insights into the Gram-negative natural rubber degrading bacterium *Steroidobacter cummioxidans* sp. nov., strain 35Y. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0197448, 31 maio 2018.

CAPÍTULO III – ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS EM FERMENTAÇÃO DE CAFÉ

1 INTRODUÇÃO

A fermentação dos grãos de café é um processo que ainda é realizado de maneira tradicional e rústica, conduzida por uma cultura mista de microrganismos, composta por leveduras e bactérias (SCHWAN; WHEALS, 2003). Por se tratar de um processo não controlado, os açúcares disponíveis na fermentação nem sempre são totalmente consumidos ao final do processo (CARVALHO NETO et al., 2017). Dado que a grande maioria dos microrganismos consome preferencialmente glicose à frutose, a concentração de frutose residual tende a ser consideravelmente maior. O açúcar residual pode trazer problemas para o produto final, pois a disponibilidade de substrato pode acarretar em fermentações indesejáveis, ou mesmo a contaminação por fungos filamentosos.

Neste intuito, a aplicação de culturas iniciadoras possui o potencial em melhorar os processos fermentativos. As culturas iniciadoras são microrganismos que estão bem adaptados ao processo fermentativo, do qual são selecionados aqueles que possam dominar entre os microrganismos presentes, diminuindo o tempo de fermentação e/ou que possa adicionar benefícios sensoriais ao produto final (HOLZAPFEL, 2002; TAMIME, 2003). Os critérios de seleção podem variar para cada processo, visando selecionar microrganismos com características que possam contribuir positivamente no produto final. A aplicação de culturas iniciadoras na produção de café ainda representa um campo pouco explorado. Entretanto, já se tem relatos na seleção e aplicação de microrganismos para a produção de enzimas pectinolíticas, ácidos orgânicos, compostos aromáticos e precursores de aroma (LEE et al., 2016, 2017a, PEREIRA et al., 2014, 2015, 2016; SILVA et al., 2013).

As bactérias do ácido láctico (BAL) são um grupo heterogêneo de bactérias amplamente utilizadas na produção de alimentos por apresentarem status GRAS (geralmente consideradas como seguras) pela FDA (Food and Drug Administration, EUA), sendo empregadas na produção de laticínios (iogurtes e queijos), vegetais fermentados (chucrute e pickles), produtos cárneos (salame), pães (sourdough) e vinhos (fermentação malo-láctica) (CENCI-GOGA et al., 2012; LUCIO et al., 2016; MILESI; MCSWEENEY; HYNES, 2008; OUATTARA et al., 2017; TERZIĆ-VIDOJEVIĆ et al., 2015; TORRIANI; FELIS;

FRACCHETTI, 2011; YILMAZ; GÖKMEN, 2017). Este grupo de bactérias também podem atuar no processo de produção de cacau bem como de café através da fermentação da camada mucilaginosa presente nestes frutos (PEREIRA et al., 2016; SCHWAN; WHEALS, 2004). Estudos recentes relatam que durante a fermentação de café, o grupo de bactérias ácido lácticas é dominante (CARVALHO NETO et al., 2018; DE BRUYN et al., 2017). Além disso, as BAL possuem a habilidade de fermentar a frutose pela via glicolítica ou via fosfoacetolase, porém, como a maioria dos microrganismos, preferem a glicose à frutose como fonte de carbono (HOLZAPFEL; WOOD, 2014). No entanto, pesquisas recentes conduzidas por Endo, Futagawa-Endo e Dicks (2009) resultou na descrição de um novo sub-grupo especial dentro do grupo de BAL, as bactérias ácido lácticas frutofílicas. As espécies classificadas neste grupo apresentam características bioquímicas distintas, como a preferência pela frutose como fonte de carbono e a necessidade de um aceptor de elétrons, como piruvato ou oxigênio, em meio de cultivo com glicose (ENDO; FUTAGAWA-ENDO; DICKS, 2009; ENDO; OKADA, 2008). O gênero *Fructobacillus*, reclassificado da família Leuconostocaceae, foi isolado a partir de ambientes ricos em frutose, tais como o trato gastrointestinal de abelhas, flores e superfície de frutos (ENDO et al., 2010; ENDO; FUTAGAWA-ENDO; DICKS, 2009; MAENO et al., 2016). Embora o número restrito de espécies isoladas, o gênero *Fructobacillus* já foi detectado através de métodos independentes de cultivo em fermentações de cacau e café (CARVALHO NETO et al., 2018; GARCIA-ARMISEN et al., 2010; LEFEBER et al., 2011).

Visto que a fermentação de café apresenta concentração residual de frutose e que existe uma rica diversidade microbiana a ser explorada, o objetivo deste estudo é selecionar bactérias ácido lácticas com capacidade em consumir a frutose em ensaio de fermentação de café realizado em laboratório.

2 MATERIAL E MÉTODOS

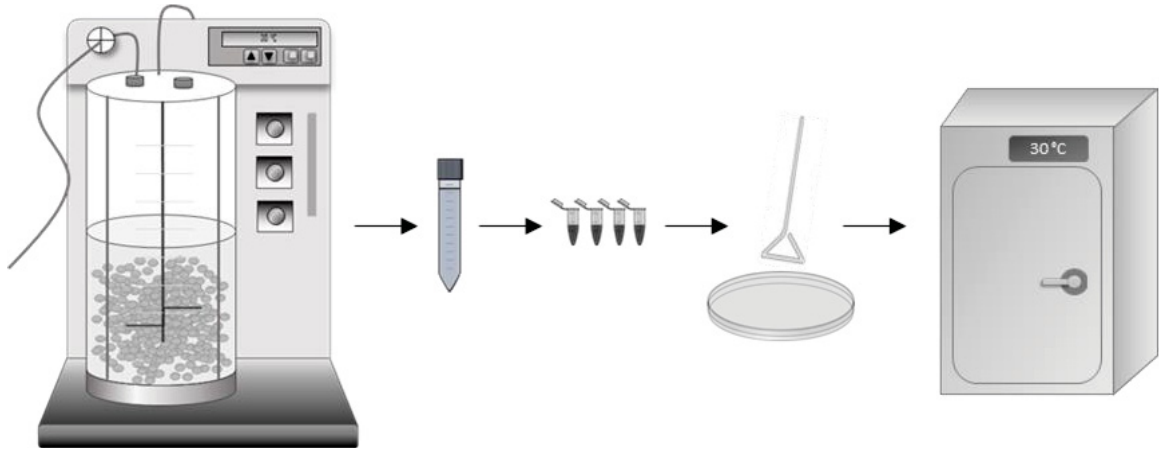
2.1 FERMENTAÇÃO DE CAFÉ EM BIORREATOR

As cerejas de café foram colhidas de uma fazenda cafeeira do Cerrado Mineiro (Brasil) e armazenadas em freezer (-20 °C) até sua utilização no presente estudo. A fermentação do café foi realizada em laboratório (Cenbapar, Curitiba, Brasil) em biorreator agitado (Marubishi Modelo MDL, Tailândia) onde foram adicionados 1000 g de café (900 g despulpados manualmente e 100 g adicionados inteiros para suprir os microrganismos presentes na superfície do fruto) e cobertos com 1 L de água mineral estéril. A fermentação ocorreu por 30 h, a 30 °C e 3 vvm de aeração.

2.2 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS

Amostras temporais (0h, 6h, 12h, 24h e 30h) de 10 mL da fração líquida da fermentação foram retiradas em triplicata para contagem e isolamento das bactérias. Amostras foram diluídas em série com água peptonada a 0.1% (p/v) e inoculadas por espalhamento em meio ágar De Man, Rogosa Sharpe (MRS) (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil), para contagem total BAL, e ágar FYP, para a contagem e isolamento de bactérias do ácido láctico frutofílicas. O meio FYP foi adaptado de Endo, Futagawa-Endo e Dicks (2009) e segue a composição em (L⁻¹): 12g de ágar, 10 g de D-frutose, 10 g de extrato de levedura, 5 g de peptona bacteriológica, 5 g de CaCO₃, 2 g de acetato de sódio, 0.2 g de MgSO₄ 7H₂O, 0.01 g MnSO₄ 4H₂O, 0.01 g de FeSO₄ 7H₂O, 0.01 g de NaCl, 2 mL de Tween® 80 e 2.2 mL de nistatina para inibir o crescimento de fungos. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 48 h. Após o crescimento e contagem, as colônias cultivadas em ágar FYP foram coletadas com base nas diferenças morfológicas observadas (tamanho da colônia, forma da margem, elevação), e pela formação da zona clareada ao redor das colônias indicando a hidrólise do CaCO₃ pela liberação de ácidos orgânicos. As colônias foram purificadas por cultivos sucessivos em meio ágar FYP por esgotamento, e estocadas em meio FYP caldo contendo 20% de glicerol (v/v) em freezer (-20 °C).

FIGURA 1 – ESQUEMA GERAL DO ENSAIO. FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR, AMOSTRAGEM, DILUIÇÃO E CULTIVO POR ESPALHAMENTO.



Fonte: Autora (2018)

2.3 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE FRUTOSE

A capacidade de consumo de frutose foi determinada por em fermentação em caldo FYP (10 mL) em tubos de ensaio a 30 °C por 24 h. Os isolados foram previamente reativados em meio ágar FYP por 24 h a 30 °C. Uma colônia (aproximadamente 3 mm³) foi adicionada em 1 mL de água peptonada a 0.1% (p/v) até a turbidez 0.5 da escala McFarland que representa 1.5×10^8 UFC mL⁻¹. Esta suspensão foi adicionada em 9 mL de FYP, em triplicata, e incubada a 30 °C por 24 h. A cada 6 h, 500 µL de amostra foram retirados para monitorar o consumo de frutose pelo ensaio do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) utilizando o método descrito por Miller (1959). Para tanto, soluções de frutose de diferentes concentrações variando até a concentração final de 2 g/L foram preparadas para a elaboração da curva-padrão.

2.4 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS

2.4.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o método fenol/clorofórmio modificado por Cheng e Jiang (2006). As bactérias foram reativadas em meio líquido (FYP) por 24 horas. Amostras de 1 mL de suspensão celular foram utilizadas para a extração total de DNA. As amostras foram centrifugadas (8000×g, 2 min) e o sobrenadante removido. Os pellets foram suspensos com de tampão Tris-EDTA (pH 8.0) e centrifugadas novamente (8000×g, 2 min). O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 200 µL de tampão TE. Em seguida, foram adicionados 100 µL de Tris-fenol saturado (pH 8.0), seguido por homogeneização em vortex. As amostras foram centrifugadas (13.000×g, 5 min, 4°C), onde 160 µL do sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados 40 µL de tampão TE e foram então misturados a 100 µL de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas (5 min, 13.000×g, 4°C) e o lisado foi purificado por extração com clorofórmio por três vezes. O sobrenadante (160 µL) foi transferido para novo tubo e foram adicionados 40 µL de tampão TE e 5 µL de RNase (10 mg/mL). As amostras foram incubadas a 37°C por 10 min para digestão do RNA. Finalmente, 100 µL clorofórmio foram adicionados, agitados e centrifugados (13.000×g, 5 min, 4°C). O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novo tubo. A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose a 0.8% (p/v) e quantificada com o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

2.4.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Os fragmentos de RNA ribossomal 16S foram amplificados por PCR utilizando primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1512R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') (DEVEREUX; WILKINSON, 2004). A composição da solução de PCR seguiu: 1 µL (aprox. 50 ng) de DNA, 1U/µL de polimerase Taq, 0.2 mM de

primers (forward e reverse), 0.22 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1 X de tampão, e o volume foi completo até 25 µL com água ultrapura Mili-Q® (Merck, Darmstadt, Alemanha). A reação de amplificação foi realizada conforme descrito por Wang et al. (2006). Os produtos purificados de PCR foram sequenciados em sequenciador automático ABI3730 XL (Applied Biosystems®, Foster City, USA). As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o editor de alinhamento de sequências BioEdit 7.7 e comparadas com a base de dados GenBank usando o algoritmo BLAST.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

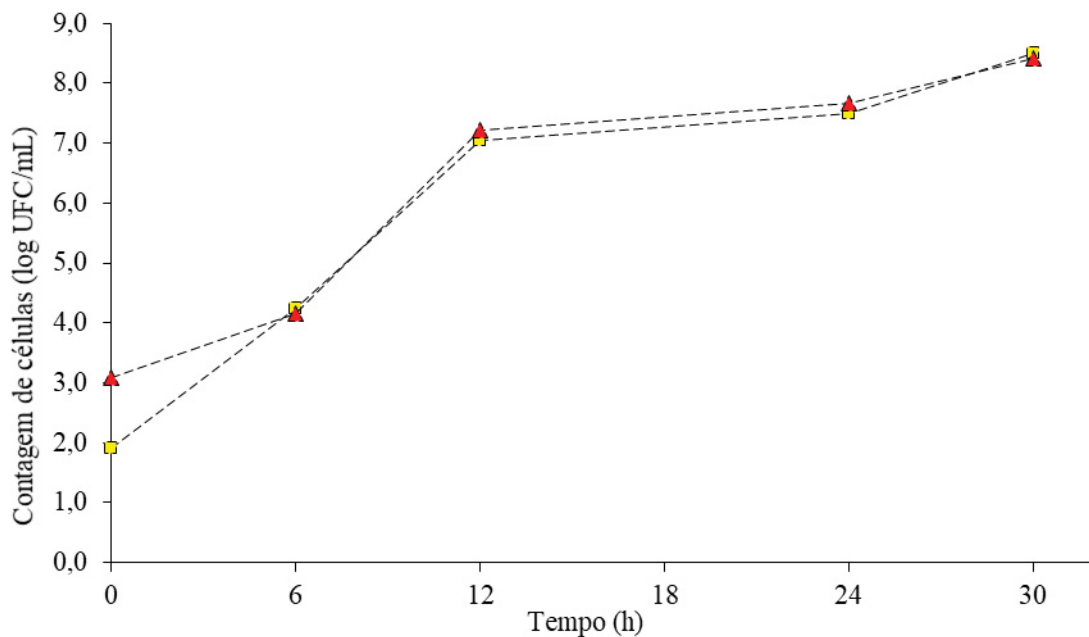
A significância estatística das médias do consumo de frutose em 24 h foi calculada utilizando o teste de Duncan. As análises foram realizadas no programa Statistica™ versão 7.0.61.0 (TIBCO®, Palo Alto, USA). O nível de significância foi estabelecido <0.05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONTAGEM DE CÉLULAS

O resultado das contagens de células nos meios de cultivo MRS e FYP está apresentada na FIGURA 2. No início do processo ($t = 0$ h), foram recuperadas $3.08 \log \text{CFU mL}^{-1}$ em meio FYP e $1.9 \log \text{CFU mL}^{-1}$ em meio MRS. O perfil de crescimento apresentado nos dois meios foi similar durante o processo de fermentação. Ao final da fermentação, a contagem de BAL totais atingiu $8.51 \log \text{CFU mL}^{-1}$, enquanto as bactérias que consumiram frutose no meio FYP atingiram $8.41 \log \text{CFU mL}^{-1}$. Este resultado está de acordo com a literatura, onde estudos relatam que existe um aumento significativo da população de bactérias ácido lácticas em fermentações de café (AVALLONE et al., 2001). Além disso, este grupo pode se tornar o grupo microbiano dominante ao final do processo da fermentação (CARVALHO NETO et al., 2018; DE BRUYN et al., 2017), podendo indicar uma adaptação das BAL às condições físico-químicas do processamento de café.

FIGURA 2 – CURVAS DE CRESCIMENTO NOS MEIOS DE CULTIVO FYP E MRS

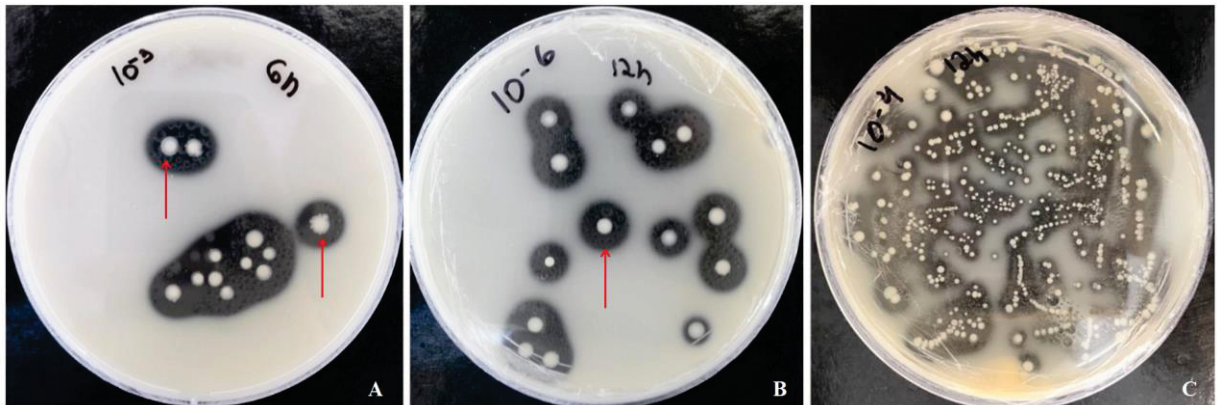


Legenda: (▲) BAL em FYP ágar; (■) BAL total em MRS.

3.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

As amostras da fração líquida da fermentação de café, retiradas a cada 6 horas, foram diluídas serialmente e plaqueadas por espalhamento em meio diferencial de FYP. Este meio é diferencial pela presença do sal carbonado de cálcio (CaCO_3), que pela reação química entre sal e ácido se faz possível identificar as colônias que produzem ácidos orgânicos através da observação das zonas de clareamento, como é mostrado na FIGURA 3. Além disso, as colônias foram escolhidas ao avaliar as diferenças visuais da morfologia das colônias, indicada na FIGURA 3 pelas setas vermelhas. Ao total foram selecionadas 34 colônias, dos tempos de 0h a 30h, dando preferência as placas de maior diluição, como é FIGURA 3B, para auxiliar a coleta de colônias isoladas.

FIGURA 3 - PLACAS DE FYP DA FERMENTAÇÃO DE CAFÉ USADA PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

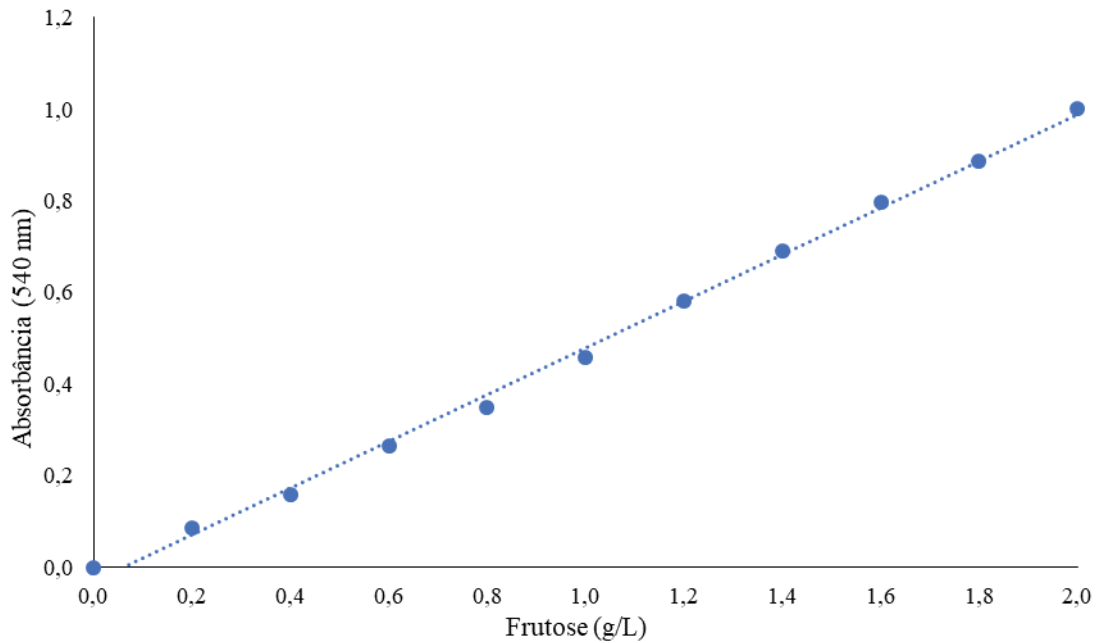


Legenda: **A.** Aliquota do tempo 6h, diluída a 10^{-3} ; **B.** Aliquota do tempo 12h, diluída a 10^{-6} ; **C.** Aliquota do tempo 12h, diluída a 10^{-4} .

3.3 FERMENTAÇÃO DE FRUTOSE

Das 34 cepas isoladas, apenas 27 foram avaliadas quanto à capacidade em fermentar a frutose, visto que 7 cepas não apresentaram crescimento satisfatório para o experimento. A curva padrão de frutose utilizada obteve o coeficiente de regressão (R^2) de 0.9973. A equação regente da reta utilizada para calcular a concentração de frutose presente no meio após a fermentação foi: $y = 0,5093x - 0,0297$

FIGURA 4 – CURVA PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE PELA ABSORBÂNCIA



A TABELA 1 apresenta as concentrações de frutose (g/L) durante 24h de fermentação em meio FYP pelos isolados indicados. É possível observar que todas as cepas foram capazes de consumiram frutose em 24 h, porém em diferentes proporções. A TABELA 1 apresenta os isolados em ordem decrescente de consumo de frutose.

TABELA 1 – CONSUMO DE FRUTOSE (g/L) EM 24h DE FERMENTAÇÃO EM MEIO FYP

Isolados	Concentração de frutose (g/L) por tempo de fermentação			
	0h	6h	12h	24h
F24 10.4	10 ^a	10.55 ± 1.29 ^a	3.30 ± 0.18 ^b	0.95 ± 0.13 ^c
F0 4.2	10 ^a	11.52 ± 0.10 ^a	2.47 ± 0.20 ^b	0.96 ± 0.14 ^c
F6 9.1	10 ^a	10.98 ± 0.73 ^b	2.55 ± 0.24 ^c	1.13 ± 0.13 ^d
F0 5.4	10 ^a	10.73 ± 0.83 ^b	1.99 ± 0.24 ^c	1.16 ± 0.18 ^c
F6 10.2	10 ^a	10.67 ± 0.39 ^a	10.10 ± 0.70 ^a	1.24 ± 0.07 ^b
F 12 9.2	10 ^{ab}	10.00 ± 0.84 ^a	9.04 ± 0.64 ^b	1.24 ± 0.08 ^d
F12 9.4	10 ^a	10.89 ± 0.32 ^b	6.94 ± 0.43 ^c	1.25 ± 0.21 ^d
F12 10.1	10 ^a	9.60 ± 0.71 ^a	4.05 ± 3.11 ^b	1.59 ± 0.13 ^b
F0 4.1	10 ^a	10.29 ± 0.82 ^a	5.12 ± 0.34 ^b	1.65 ± 0.10 ^c
F30 3	10 ^a	9.78 ± 1.35 ^a	10.94 ± 1.07 ^a	1.73 ± 0.70 ^b
F6 10	10 ^a	10.46 ± 2.23 ^a	6.52 ± 0.36 ^b	1.76 ± 0.40 ^c
F6 10.1	10 ^a	10.01 ± 0.47 ^a	6.67 ± 0.64 ^b	1.79 ± 0.04 ^c
F0 6	10 ^a	10.16 ± 1.40 ^a	3.50 ± 2.91 ^b	1.82 ± 0.07 ^b
F0 1	10 ^a	10.12 ± 1.47 ^a	7.84 ± 0.72 ^b	1.91 ± 0.22 ^c
F0 8	10 ^a	10.38 ± 1.71 ^a	7.88 ± 0.49 ^b	1.98 ± 0.13 ^c

Continua

Conclusão

Isolados	Concentração de frutose (g/L) por tempo de fermentação			
	0h	6h	12h	24h
F30 1	10 ^a	10.13 ± 0.18 ^a	11.34 ± 1.88 ^a	2.05 ± 1.12 ^b
F30 7.8	10 ^a	10.43 ± 0.48 ^a	4.04 ± 1.50 ^b	2.05 ± 0.19 ^c
F30 1.1	10 ^a	10.41 ± 0.53 ^a	10.92 ± 6.12 ^a	2.25 ± 0.51 ^b
F24 3.1	10 ^a	9.84 ± 0.85 ^a	6.70 ± 0.37 ^b	2.62 ± 0.45 ^c
F6 3	10 ^a	9.91 ± 0.63 ^a	4.57 ± 3.84 ^b	2.88 ± 0.44 ^b
F30 7.7	10 ^a	10.47 ± 0.49 ^a	8.91 ± 1.36 ^a	3.12 ± 0.89 ^b
F0 5.5	10 ^a	10.31 ± 0.82 ^a	10.16 ± 0.65 ^a	3.89 ± 0.13 ^b
F6 9.5	10 ^a	10.77 ± 0.11 ^a	5.33 ± 3.58 ^b	4.14 ± 0.79 ^b
F30 3.1	10 ^a	8.99 ± 0.17 ^a	10.40 ± 2.67 ^a	4.50 ± 0.87 ^b
F6 10.3	10 ^a	10.68 ± 0.27 ^a	10.66 ± 0.33 ^a	5.98 ± 4.05 ^b
F6 9.3	10 ^a	11.62 ± 0.10 ^b	8.03 ± 0.40 ^c	8.63 ± 0.70 ^c
<i>Branco</i>	10 ^a	10.61 ± 0.64 ^a	9.19 ± 0.37 ^a	10.32 ± 1.57 ^a

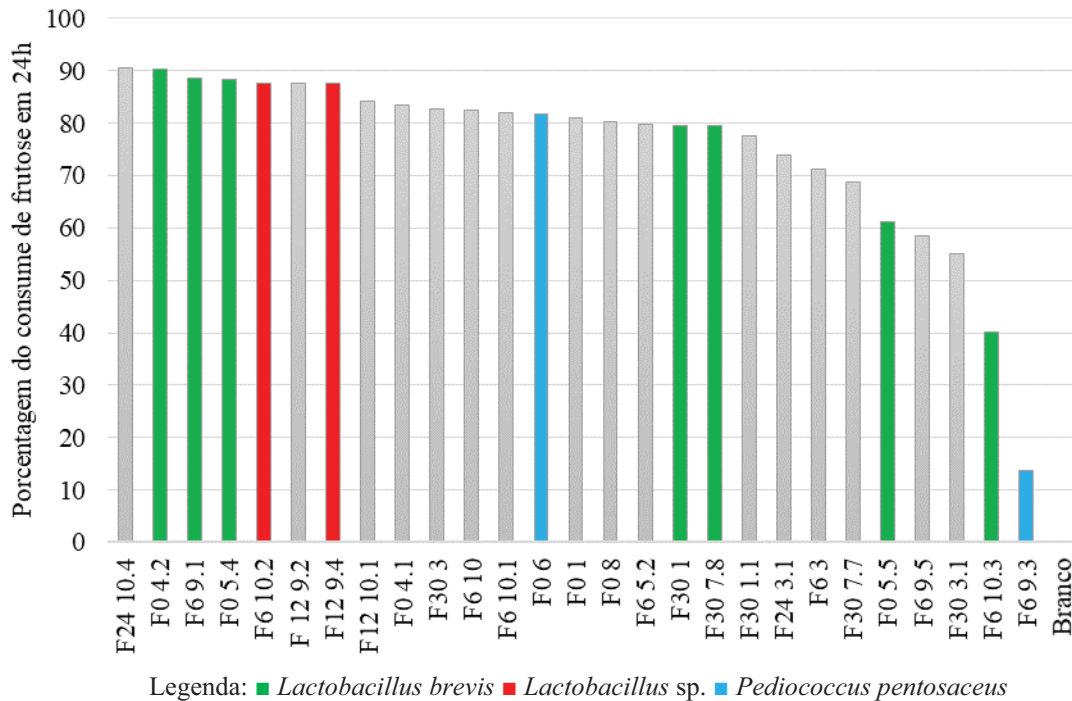
As médias de cada linha que apresentam a mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0.05$) um do outro, utilizando o teste de Duncan.

Após 12 h do tempo de fermentação, apenas 8 isolados (F0 5.4, F0 4.2, F6 9.1, F24 10.4, F0 6, F30 7.8, F12 10.1 e F6 3) consumiram mais de 50% da frutose disponível. Ao final do experimento (24 h), apenas 2 isolados consumiram 90% de frutose (F0 4.2 e F24 10.4), 23 isolados consumiram mais de 50% de frutose e 2 consumiram menos de 40%. Visto que os isolados apresentam comportamentos distintos, 11 isolados distintos foram selecionados para a identificação molecular. Vale salientar que por se tratar de uma pré-seleção foi utilizado o método colorimétrico de açúcares redutores, porém, para uma maior confiabilidade seriam necessários testes utilizando-se a cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Após a avaliação do consumo de frutose, foram selecionados 11 isolados para a identificação molecular pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A análise de sequenciamento identificou a presença de *Lactobacillus brevis* (n = 7) e *Lactobacillus* sp. (n = 2) e *Pediococcus pentosaceus* (n = 2). Na FIGURA 5 os isolados estão identificados pelas cores: verde (*Lactobacillus brevis*), vermelho (*Lactobacillus* sp.) e azul (*Pediococcus pentosaceus*).

FIGURA 5 – PORCENTAGEM DE CONSUMO DE FRUTOSE E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS



Legenda: ■ *Lactobacillus brevis* ■ *Lactobacillus sp.* ■ *Pediococcus pentosaceus*

Apesar de consumirem frutose, não é possível classificar as cepas isoladas como frutofílicas. Cepas frutofílicas preferem frutose à glicose como substrato, e desta forma, apresentam crescimento limitado em meio contendo glicose sem um aceptor de elétrons externo. Portanto, testes futuros se fazem necessários para avaliar o crescimento destas cepas em meio contendo glicose, bem como em glicose suplementada com um aceptor de elétrons externo, conferido pela condição aeróbica, adição de piruvato ou de frutose (ENDO et al., 2018). Por outro lado, estudos relatam que cepas de *Lactobacillus sp.* possuem a capacidade de consumir frutose usando oxigênio ou piruvato como aceptor externo de elétrons, podendo em alguns casos apresentar características do grupo de bactérias frutofílicas (ENDO; FUTAGAWA-ENDO; DICKS, 2009).

Os isolados de *Lactobacillus brevis* (F0 4.2, F0 5.4 e F0 5.5) podem ser selecionados para estudos posteriores e inoculados em fermentações de café para avaliar seus impactos na concentração residual de frutose. A cultura inicial de *L. brevis* é reconhecida por sua atividade probiótica, produção de ácido γ -amino-butírico e produção de bacteriocinas, características estas que poderão ser exploradas futuramente (BANÍĆ et al., 2018; OGUNBANWO; SANNI; ONILUDE, 2002; WU et al., 2018).

O isolado que apresentou o menor consumo de frutose foi identificado como *Pediococcus pentosaceus*. Esta espécie é utilizada como cultura iniciadora em outros alimentos fermentados, pois auxilia no desenvolvimento de componentes voláteis durante o tempo de maturação de salsichas fermentadas devido a sua atividade lipolítica e proteolítica (JOHANSSON et al., 1994). Além disso, apresenta atividade anti-listerial, produção de bacteriocinas e propriedades probióticas (GUTIÉRREZ-CORTÉS et al., 2018; KINGCHA et al., 2012; ZOMMITI et al., 2018). As culturas iniciadoras são geralmente selecionadas para determinado processo, visando suas condições específicas. No entanto, a cepa *Pediococcus pentosaceus* pode ter um impacto benéfico nas fermentações do café, visto que culturas iniciadoras específicas de outros processos já foram testadas na fermentação de café, como é o caso de *Rhizopus oligosporus*, usado principalmente na produção de tempê, e *Yarrowia lipolytica*, usado para produtos lácteos (LEE et al., 2016, 2017b).

Embora o gênero *Fructobacillus* tenha sido previamente detectado por métodos independentes de cultivo em fermentações de café e cacau (CARVALHO NETO et al., 2018; PAPALEXANDRATOU et al., 2011), não foi possível isolar representantes deste gênero no presente ensaio. Isto pode se dar ao fato de que, apesar de sua detecção, a concentração de *Fructobacillus* não seja suficiente para o cultivo. Há também relatos de microrganismos não-cultiváveis, ou que requerem condições específicas para seu crescimento. Além disso, os relatos de isolamento de espécies de *Fructobacillus* é restrita a fontes como flores, superfícies de frutos e insetos (ENDO et al., 2011; MAENO et al., 2016; RUIZ RODRÍGUEZ et al., 2017; YAACOB et al., 2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* foram isolados em ensaios de fermentações de café conduzidas em biorreator, onde ambos apresentaram a capacidade em fermentar a frutose, porém em proporções diferentes. O consumo de frutose foi avaliado por métodos colorimétricos e revelou o potencial das cepas de *Lactobacillus lactis* para o consumo de frutose em fermentações de café. Além disso, *Pediococcus pentosaceus* poderá ser testada quanto às suas atividades proteolíticas e lipolíticas. Embora o gênero *Fructobacillus* seja relatado em fermentações de café, não foi possível cultivá-lo em meio sólido FYP. Para isto, pode-se realizar ensaios futuros para o isolamento de bactérias do gênero *Fructobacillus* diretamente de frutas e flores, locais onde se tem o relato de isolamento deste gênero, podendo, assim, ser empregado em fermentações de café.

REFERÊNCIAS

- AVALLONE, S. et al. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 252–256, 2001.
- BANIĆ, M. et al. Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. **LWT**, v. 93, p. 257–267, 1 jul. 2018.
- CARVALHO NETO, D. P. et al. Yeast Diversity and Physicochemical Characteristics Associated with Coffee Bean Fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro Region. **Fermentation**, v. 3, n. 1, p. 11, 2017.
- CARVALHO NETO, D. P. DE et al. High-Throughput rRNA Gene Sequencing Reveals High and Complex Bacterial Diversity Associated with Brazilian Coffee Bean Fermentation. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 90–95, mar. 2018.
- DE BRUYN, F. et al. Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and Metabolite Profiles during Green Coffee Bean Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 1, p. e02398-16, 2017.
- ENDO, A. et al. *Fructobacillus tropaeoli* sp. nov., a fructophilic lactic acid bacterium isolated from a flower. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 61, n. 4, p. 898–902, 1 abr. 2011.
- ENDO, A. et al. Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose-Fermenting Microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 19, 27 jul. 2018.
- ENDO, A.; FUTAGAWA-ENDO, Y.; DICKS, L. M. T. Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 593–600, 1 dez. 2009.
- GUTIÉRREZ-CORTÉS, C. et al. Enhanced Bacteriocin Production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in Co-Culture with *Lactobacillus plantarum* LE27 on Cheese Whey Broth. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2952, 2018.
- HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 197–212, 25 maio 2002.

- JOHANSSON, G. et al. Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosum* as starter cultures. **Meat Science**, v. 38, n. 2, p. 203–218, 1 jan. 1994.
- KINGCHA, Y. et al. Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 190–196, 1 maio 2012.
- LEE, L. W. et al. Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: I. Green coffee. **Food Chemistry**, v. 211, p. 916–924, 15 nov. 2016.
- LEE, L. W. et al. Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: I. Green coffee. **LWT**, v. 77, p. 225–232, 1 abr. 2017a.
- LEE, L. W. et al. Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: II. Roasted coffee. **LWT**, v. 80, p. 32–42, 1 jul. 2017b.
- MAENO, S. et al. Genomic characterization of a fructophilic bee symbiont *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche-specific adaptation. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 516–526, 1 dez. 2016.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- OGUNBANWO, S. T.; SANNI, A. I.; ONILUDE, A. A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 8, p. 219–227, 2002.
- PAPALEXANDRATOU, Z. et al. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7698–7714, 1 nov. 2011.
- PEREIRA, G. V. DE M. et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60–66, 2014.
- PEREIRA, G. V. DE M. et al. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. **Food Research International**, v. 75, p. 348–356, 1 set. 2015.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 7, p. 1689–1695, jul. 2016.

RUIZ RODRÍGUEZ, L. G. et al. Enhanced mannitol biosynthesis by the fruit origin strain *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 6165–6177, 3 ago. 2017.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: BOEKHOUT, T.; ROBERTS, V. (Eds.). . **Yeasts in Food**. Hamburg: [s.n.]. p. 426–459.

SILVA, C. F. et al. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 235–247, 28 fev. 2013.

TAMIME, A. Y. Dairy Microbiology Handbook. In: ROBINSON, R. K. (RICHARD K. (Ed.). . **Microbiology of starter cultures**. Wiley-Inte ed. New York: [s.n.]. p. 261–366.

WANG, X. et al. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, n. 1, p. 106–115, jul. 2006.

WU, C.-H. et al. Characterization of a Potential Probiotic *Lactobacillus brevis* RK03 and Efficient Production of γ -Aminobutyric Acid in Batch Fermentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 143, 4 jan. 2018.

YAACOB, S. N. S. et al. Identification of *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 3, p. 395–405, 27 maio 2018.

ZOMMITI, M. et al. In vitro Assessment of the Probiotic Properties and Bacteriocinogenic Potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16 Isolated From Artisanal Tunisian Meat “Dried Ossban”. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2607, 9 nov. 2018.