CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE MARÍLIA ESTUDANTE RAFAEL ALMEIDA CAMARINHA

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

CARLOS EDUARDO DIAS DE OLIVEIRA

LAURA BEATRIZ DE SOUZA

LUIZ CARLOS LAURENTINO DA SILVA JUNIOR

ADIÇÃO DE CULTURAS MICROBIANAS INICIADORAS AUTÓCTONES E ALÓCTONES EM FERMENTAÇÃO VIA ÚMIDA DE CAFÉS DA REGIÃO DE GARÇA-SP

MARÍLIA/SP

1 SEMESTRE/2021

CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE MARÍLIA ESTUDANTE RAFAEL ALMEIDA CAMARINHA

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

CARLOS EDUARDO DIAS DE OLIVEIRA

LAURA BEATRIZ DE SOUZA

LUIZ CARLOS LAURENTINO DA SILVA JUNIOR

ADIÇÃO DE CULTURAS MICROBIANAS INICIADORAS AUTÓCTONES E ALÓCTONES EM FERMENTAÇÃO VIA ÚMIDA DE CAFÉS DA REGIÃO DE GARÇA-SP

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Tecnologia de Marília para obtenção do Título de Tecnólogo(a) em Alimentos.

Orientador: Profª. Dra. Claudia Dorta.

MARÍLIA/SP
1º SEMESTRE/2021

RESUMO

Os cafés especiais fermentados ganham destaque econômico no setor comercial em todo o mundo. Este presente trabalho mostrou a influência de culturas microbianas iniciadoras no processo de fermentação do café arábica por via úmida e teve como objetivo verificar o desempenho microbiológico e sensorial dessas durante a fermentação em duas variedades de café arábica cultivados na Região de Garça/SP pela Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA): *Coffea arabica,* cultivar Topázio MG 1190 (amarelo) e *Coffea arabica* cultivar Catuai IAC 144 (vermelho), comparando os resultados com o café não fermentado e de fermentação natural (sem adição de culturas). As duas variedades de café arábica cereja testadas foram adicionadas junto à água potável em baldes brancos para alimento de 20L, divididas em dois experimentos com 5 tratamento, sendo T1 fermentação natural e os demais havendo adição de leveduras autóctones, alóctones, além de bactérias láticas comerciais. Nas amostras foram feitas análises de pH; temperatura; sólidos solúveis; microbiológicas; e análise sensorial pela prova de xícaras, sendo suas notas submetidas à análise estatística. Após as fermentações, que duraram 46hr, houve diminuição esperada do pH, existiu o aumento nos números dos micro-organismos desejados como leveduras e bactérias láticas e diminuição dos indesejados como as enterobactérias, resultando em aromas diferenciados uns dos outros. A cultura de bactérias láticas da Sacco Brasil estimulou o crescimento das leveduras no meio fermentativo, e por outro lado, o *Lactobacillus plantarum* (Lema) exerceu efeito inibitório. Todos os cafés que foram fermentados atingiram a escala de cafés especiais, acima de 80 pontos, onde as maiores notas originaram dos cafés que usaram as culturas iniciadoras. O café Topazio MG 1190 amarelo mostrou vantagem sensorial sobre o Catuai IAC 144 (vermelho). Os cafés que não passaram por fermentação tiveram nota abaixo de 80, mostrando que a tecnologia de fermentação controlada e a adição de culturas podem trazer melhorias na qualidade sensorial de seus produtos, repercutindo em sua valorização no competitivo mercado.

Palavras-chave: Culturas iniciadoras. Fermentação. Café arábica

ABSTRACT

Fermented specialty coffees gain economic prominence in the commercial sector worldwide. This present work showed the influence of microbial starter cultures in the process of wet Arabica coffee fermentation and aimed to verify their microbiological and sensory performance during fermentation in two varieties of Arabica coffee grown in the region of Garça/SP by Agência Paulista of Agribusiness Technology (APTA): *Coffea arabica*, cultivar Topázio MG 1190 (yellow) and *Coffea arabica*, cultivar Catuai IAC 144 (red), comparing the results with unfermented and naturally-fermented coffee (without the addition of cultures). The two varieties of cherry Arabica coffee tested were added to the drinking water in white buckets for 20L food, divided into two experiments with 5 treatments, T1 being natural fermentation and the others adding autochthonous and allochthonous yeasts, in addition to commercial lactic bacteria.The samples were analyzed for pH; temperature; soluble solids; microbiological; and sensory analysis through the cup test, and their scores were submitted to statistical analysis. After the fermentations, which lasted 46 h, there was an expected decrease in pH, there was an increase in the number of desired microorganisms such as yeast and lactic acid bacteria and a decrease in unwanted ones such as enterobacteria, resulting in aromas differentiated from each other. The culture of lactic bacteria at Sacco Brasil stimulated the growth of yeasts in the fermentation medium, and on the other hand, *Lactobacillus plantarum* (Lema) had an inhibitory effect. All coffees that were fermented reached the specialty coffee scale, above 80 points, where the highest grades came from the coffees that were used as starter cultures. The yellow Topazio MG 1190 coffee showed a sensory advantage over the Catuai IAC 144 (red). Coffees that did not undergo fermentation scored below 80, showing that controlled fermentation technology and the addition of cultures can improve the sensory quality of their products, resulting in their appreciation in the competitive market.

Keywords: Starter cultures. Fermentation. arabica coffee

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 5

2 MATERIAL E MÉTODOS 8

2.1 MATERIAL 8

2.2 MÉTODOS 8

2.2.1 Preparo dos inóculos de leveduras para as fermentações 8

2.2.2 Fermentação via úmida 9

2.2.2.1 Experimento 1 9

2.2.2.2 Experimento 2 10

2.2.3 Secagem do café 11

2.2.4 Análises de pH, temperatura e sólidos solúveis durante o processo de fermentação 12

2.2.5 Análises Microbiológicas por plaqueamento 12

2.2.6 Análises microbiológicas em microscópio óptico 13

2.2.7 Viabilidade e brotamento das leveduras 13

2.2.8 Contagem de leveduras e bactérias em câmara de Neubauer 13

2.2.9 Análise Sensorial 13

2.2.10 Análise Estatística 14

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 15

3.1 Resultados físico-químicos no meio fermentativo 15

3.2 Resultado microbiológico do café fermentado por via úmida 17

3.3 Resultado da contagem microbiológica através da Câmara de Neubauer em Microscópio óptico 23

3.4 Avaliações sensoriais dos cafés fermentados 28

CONSIDERAÇÕES FINAIS 33

AGRADECIMENTOS 34

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 35

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de café no mercado mundial e ocupa a segunda posição, entre os países consumidores da bebida. Esse país responde por um terço da produção mundial de café, o que o coloca como maior produtor mundial, posto que detém há mais de 150 anos (SUPLICY, 2012).

O café foi para o Brasil e ainda é para várias de suas regiões produtoras a força propulsora do desenvolvimento socioeconômico, produzindo e distribuindo riquezas, além de ter uma grande capacidade geradora de empregos e de ser importante fator de fixação de mão-de-obra na zona rural (CAFEICULTURA, 2006).

Devido à diversidade de regiões ocupadas pela cultura do café, a variedade de climas, relevos, altitudes e latitudes, o País produz tipos variados de grãos, o que possibilita atender às diferentes demandas de paladar e preços dos consumidores brasileiros e estrangeiros. Essa diversidade também permite o desenvolvimento de vários blends (misturas de tipos), tendo como base o café de terreiro ou natural, o despolpado, o descascado, o de bebida suave, os ácidos, os encorpados, além de cafés aromáticos e especiais. As duas principais espécies plantadas são o arábica (80% da área) e, o conilon ou robusta (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018).

As tendências mundiais apontam para o grande crescimento do segmento de cafés especiais. Numa concepção mais restrita, a Specialty Coffee Association of America (SCAA, 2009) considera como cafés especiais apenas aqueles que apresentam elevada qualidade física e sensorial, alcançando acima de 80 pontos, numa escala de 0 a 100. Desta forma, os cafés especiais representam em torno de 12% do mercado mundial de cafés e cresce em taxas bem maiores que o mercado de commodities. Os preços de comercialização são bastante compensadores com ágios superiores a 25% por saca, podendo atingir preços de até 100% do valor da bolsa de Nova York (MESQUITA et al., 2016).

Tendo em vista que o cenário da cafeicultura atual mostra uma tendência cada vez maior para a produção de cafés diferenciados de alta qualidade, ou seja, especiais, se torna uma alternativa para o produtor agregar valor ao seu produto e aumentar sua rentabilidade. A qualidade do café é resultante de uma série de fatores

associadas à agroecológica e o manejo dos produtores quanto ao local de plantio, sistema de cultivo e tipo de colheita manual ou mecanizada (BRANDÃO, 2015).

Após a colheita, os grãos de café podem ser separados de acordo com o estágio de maturação, conferindo homogeneidade ao lote quanto a esta característica. A forma de processamento pós-colheita dos grãos de café impacta nas características sensoriais da bebida, e normalmente no Brasil três métodos de processamento são utilizados para a produção do café: o processo seco, semi-seco e úmido (ESQUIVEL et al., 2012), em todos esses processos ocorrem fermentações as quais devem ser controladas para obtenção de resultados que os classifiquem em cafés especiais.

Há um grande avanço na tecnologia empregada nas lavouras de café e novos métodos têm sido usados na melhoria da qualidade do grão, principalmente na pós-colheita. Uma destas tecnologias é o processamento de fermentação do café por via úmida, que consiste na retirada de toda ou parte da polpa/mucilagem do café mecanicamente ou através de fermentação.

Ainda hoje, a fermentação do café ocorre principalmente de forma espontânea, mas diversos estudos têm demonstrado que a fermentação do café precisa ser controlada e padronizada a fim de se garantir a prevalência de micro-organismos que possam atribuir sabores e aromas especiais (SILVA et al., 2013). Uma alternativa para padronização das fermentações de café é a utilização de culturas iniciadoras.

A fermentação com emprego de culturas microbianas iniciadoras, têm aumentado a qualidade e diversidade de nuances sensoriais nos cafés especiais. Diferentes estudos são atualmente dedicados à seleção de leveduras fermentadoras do fruto café, como as produtoras de ésteres. Além disso, o metabolismo das bactérias do ácido láctico também foi usado recentemente para formação de éster (por exemplo, acetato de etila, isobutirato de etila e acetato de hexila) e a consequente produção de saborosos grãos de café. Essas bactérias são também capazes de controlar o crescimento de micro-organismos indesejados na fermentação, inibindo a produção de compostos que depreciam a bebida café (DE MELO PEREIRA et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Segundo Bressani et al. (2018), a qualidade e aromas superiores finais do grão de café, pode ser direcionada através de culturas iniciadoras. O emprego dessas culturas na fermentação do café é uma alternativa economicamente viável para obter

um café diferenciado, agregando valor ao produto, ajudando a manter o controle sobre a fermentação e padronizando o processo fermentativo.

O objetivo desse trabalho foi verificar a influência microbiológica e sensorial com a adição de culturas iniciadoras autóctones e alóctones durante a fermentação via úmida em duas variedades de café arábica na Região de Garça-SP, à qual é tradicional no cultivo de café, e está investindo na produção de cafés especiais, dentre eles, os de fermentação controlada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Café: *Coffea arabica*, cultivar Topázio MG 1190 (amarelo), da EPAMIG, cultivado no campo experimental da APTA /Marília em Vera Cruz, safra 2020; Coffea arabica cultivar Catuai IAC 144 (vermelho) obtido no mesmo campo experimental.

Micro-organismos: Leveduras autóctones A e E isoladas por esta equipe de pesquisa da fermentação natural da Região de Garça, e levedura comercial: *Saccharomyces cerevisiae* Belle Saison – Lallamend, usada para fermentação de cervejas artesanais; Bactérias láticas comerciais: *Lactobacillus delbrueckii sub. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* adaptados para fermentação vegetal (Lyofast SY1, Sacco Brasil) e *Lactobacillus plantarum* (distribuidora LEMA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo dos inóculos de leveduras para as fermentações

As leveduras A e E isoladas e selecionadas da região de Garça e a comercial *S. cerevisiae* Belle Sason armazenadas em meio YM com 10% de glicerol, em ultra freezer a -80º C, foram descongeladas e submetidas aos sucessivos repiques em meio líquido YEPG modificado (extrato de levedura 1%, peptona 1% e glicose 2,5%). Para tanto, 0,1mL da cultura inicial foi inoculado em dois repiques sucessivos em 5mL de meio por 48h, seguido por repasse de 5ml de inóculo em 50mL (por 24h), e finalmente em 500mL do meio (por 24h); a incubação foi à 25ºC em estufa bacteriológica (Figura 1). Os repiques foram feitos em duplicata e sob condições assépticas no Laboratório de Microbiologia da Fatec Marília - SP.

Figura 1 – Cultivo do inóculo em incubadora

Fonte: Dos autores

2.2.2 Fermentação via úmida

2.2.2.1 Experimento 1

Foram colhidos 52 kg de café cereja cultivar Topázio MG 1190 (amarelo) da EPAMIG, conforme Boas Práticas Agrícolas pela equipe da APTA, no dia 18 de maio de 2020, em campo experimental, Vera Cruz-SP, pela manhã e em seguida este foi levado para a ETEC GARÇA-SP para ser lavado (Figura 2), separado do café boia, descascado e levado para o Laboratório de Processamento da Fatec Marília - SP para a fermentação. Este café estava com os sólidos solúveis baixo, aproximadamente 12ºBx.

Figura 2 – Lavagem e retirada de casca do café cereja

Fonte: Dos autores

A fermentação foi feita em baldes brancos para alimento de 20L, devidamente lavados e higienizados (Figura 3). Esta foi dividida em 5 tratamentos, feitos em duplicata, com 4 kg de café em balde de 20 Litros com 6L de água potável, ou 5,5L de água mais 0,5 L de cultura de levedura a 17ºC: T1= fermentação natural-sem adição de culturas iniciadoras (controle), T2= com adição de 3 x 10^6 células viáveis de levedura isolada A /mL de água, T3= adição de 3 x 10^6 células de levedura isolada E/mL, T4= 3 x 10^6 Levedura isolada E/mL e 10^6 UFC de *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* (Lyofast SY 1, Sacco), T5= adição de 10^6 Levedura isolada A/mL e 10^6 UFC de *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* (Lyofast SY 1, Sacco). A fermentação foi feita por 46h. Os sólidos solúveis iniciais do café nesse experimento foram em média 12º Bx.

Figura 3 – Fermentação via úmida em baldes

Fonte: Dos Autores

2.2.2.2 Experimento 2

Nesse experimento foram colhidos 60 kg de café Catuaí IAC 144 (vermelho), usando Boas Práticas Agrícolas pela equipe da APTA no dia 10 de junho de 2020, no campo experimental de Vera Cruz-SP, pela manhã e em seguida este foi levado para a ETEC GARÇA-SP para ser lavado, retirado o café boia, descascado e levado para o Laboratório de Processamento da Fatec Marília, separado em baldes de 20L para a fermentação via úmida.

As amostras foram distribuídas em 5 tratamentos, nos quais adicionou-se 8kg de café no balde com 8L de água potável ou 7L de água potável e 1L de inóculo, a

17ºC, sendo T1= fermentação natural- sem adição de culturas (controle), T2= com adição de 5,6 x 10^6 células viáveis de levedura isolada E/mL de água, T3= adição de 5,6 x 10^6 levedura isolada E mL e 10^6 UFC de *L. plantarum*/mL, T4= 5,37 x 10^6 de células viáveis de levedura comercial *S. cerevisiae Belle Saison*/mL (Figura 4) e T5= adição de 5,37 x 10^6 levedura comercial *S. cerevisiae Belle Saison*/mL e 10^6 UFC de *L. plantarum*. A fermentação foi feita por 44h. Os sólidos solúveis iniciais desse café foram em média 16,5°Bx.

Figura 4 - Adição de levedura Belle Sason

Fonte: Dos Autores

2.2.3 Secagem do café

Após a fermentação, os frutos de cafés foram levados para O Sítio Olho D´Água, região de Padre Nóbrega distrito de Marília-SP, e secos (cerca de 15 dias) em terreiro suspenso até atingirem umidade 12% (Figura 5).

Figura 5 – Secagem do café em terreiro suspenso

Fonte: Dos autores

2.2.4 Análises de pH, temperatura e sólidos solúveis durante o processo de fermentação

As análises seguiram metodologias oficiais do Instituto Adolfo Lutz (2008). Para a medição de sólidos solúveis iniciais, pesou-se 5g de cada amostra (em triplicata), as quais foram individualmente maceradas em cadinhos para obtenção da polpa do grão e semente; em seguida adicionou-se sobre cada amostra 50mL de água destilada, agitando-se as misturas por 30 minutos. A partir das amostras prontas, foram feitas individualmente as determinações de teor de sólidos solúveis por refratômetro de bancada.

No meio fermentativo os sólidos solúveis foram medidos por refratômetro portátil, O pH foi medido em triplicata por pHmetro digital de bancada, e a temperatura foi aferida no local da fermentação por termômetro digital.

2.2.5 Análises Microbiológicas por plaqueamento

Nos frutos e meio fermentativo foram realizadas as seguintes análises: bactérias mesófilas aeróbias através do plaqueamento em superfície no meio PCA com adição de Cetoconazol (100 mg/L); bolores e leveduras em superfície no PDA acidificado; enterobactérias em superfície no meio Macconkey; e bactérias láticas através do plaqueamento em profundidade no meio MRS Agar com Cisteína 0,05% (SILVA et al. 2010, com modificações).

2.2.6 Análises microbiológicas em microscópio óptico

Como análises microbiológicas complementares, no Experimento 2, foram aplicadas as técnicas de Viabilidade celular, Brotamento de leveduras e o número total de células de leveduras e bactérias. mL-1 através da contagem em câmara de Neubauer em Microscopia Óptica, por ser mais rápida e tão precisa quanto ao de plaqueamento. O intuito da aplicação dessas análises foi trazê-las dos processos de fermentação alcoólica (etanol combustível, cerveja) adaptando-as à fermentação de café via úmida.

2.2.7 Viabilidade e brotamento das leveduras

A porcentagem de brotamento e de células vivas (viabilidade) em relação ao total de células no experimento 2 foi determinada através do microscópio óptico em câmara de Neubauer. Para tanto, as células de leveduras foram coradas com solução eritrosina diluída 5000X. Os resultados foram dados em porcentagem de células vivas (células descoradas) e porcentagem de brotos vivos (descorados) em função do número total de células contadas (DORTA et al., 2006).

2.2.8 Contagem de leveduras e bactérias em câmara de Neubauer

A contagem de células totais no experimento 2 foi determinada através do microscópio óptico em câmara de Neubauer. A equação 1 representa o cálculo para obtenção do número de células por mL (DORTA *et al.,* 2006)

Equação 1: Número de células = Média de 5 x 25 x 10^4 x F,

F = fator de diluição.

2.2.9 Análise Sensorial

Foram realizadas análises sensoriais dos experimentos na empresa Capricórnio Coffes (Ourinhos-SP) seguindo o protocolo do SCAA (SPECIALTY

COFFEE ASSOCIATION OF AMERICA, 2008) por 3 especialistas da área. Utilizando-se 150g de café verde (sem pergaminho) de cada tratamento para a torra, os grãos torrados a 150ºC por 5 minutos foram separados em 5 xícaras com 8g cada e foram moídos e então feita a prova sensorial de fragrância. Adicionou-se água quente até a boca da xícara e feita à prova de aroma, uniformidade, ausência de defeitos, doçura, sabor, acidez, corpo, finalização, equilíbrio e final.

2.2.10 Análise Estatística

As amostras para a análise sensorial foram feitas em triplicatas. Os dados obtidos na nota sensorial foram analisados pelos testes ANOVA, complementado com o Teste de Tukey, no nível de 5% de significância. (BUSSAB; MORETTIN, 2017).

O software estatístico utilizado foi BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2020).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados físico-químicos no meio fermentativo

A *S. cerevisiae* é um microrganismo aeróbio facultativo que se reproduz assexuadamente sendo a temperatura ótima de seu crescimento entre 20 e 30°C, com o pH entre 4,5 e 5,5 (DUJON et al., 2017). A *S. cerevisiae* é a espécie mais explorada comercialmente dentre as leveduras e apresenta grande emprego na indústria, para fabricação de vários produtos (RAI et al., 2019).

As tabelas 1 e 2 mostram os sólidos solúveis, pH e Temperatura dos meios de fermentações dos experimentos feitos com duas variedades de café.

Tabela 1 – Sólidos solúveis (ºBx), pH e Temperatura (ºC) aferidos nos meios de fermentações do café arábica cultivar Topázio MG 1190 (amarelo)

Tempo	Aferições	T1	T2	T3	T4	T5
0h	Sólidos Solúveis	1,0	1,5	1,5	3,0	3,0
	pH	5,6	5,5	5,4	5,5	5,6
	Temperatura	17	17	17	17	17
24h	Sólidos Solúveis	2,0	2,0	2,0	3,0	2,5
	pH	4,5	4,5	4,5	4,2	4,2
	Temperatura	24	24	24	24	24
46h	Sólidos Solúveis	2,5	2,3	2,0	3,0	2,5
	pH	4,10	4,12	4,06	3,95	3,92
	Temperatura	24	24	24	24	24

Legenda: T1= fermentação natural, T2 = com adição de levedura isolada A, T3 = com adição de levedura isolada E, T4 = com adição de Levedura isolada E mais *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* (Lyofast SY 1/ Sacco), T5 = com adição de Levedura isolada A e de *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* (Lyofast SY 1/ Sacco).

Fonte: Dos Autores

A temperatura inicial foi de 17ºC, devido a água utilizada no enchimento dos baldes ser refrigerada, entretanto, em 24h até 46 h esta subiu 6ºC, encontrando-se dentro da faixa considerada ótima para a fermentação.

O tempo pode variar de acordo com as condições locais, mas estudos demonstram fermentações positivas próximas de 48h à temperatura ambiente em

torno de 25ºC. Para temperaturas maiores o tempo deverá ser reduzido (MUINHOS, 2019).

Quanto aos constituintes químicos presentes no café, uma maior quantidade de sólidos solúveis é desejada, considerando a sua relação com o rendimento industrial e contribuição para assegurar o corpo da bebida. Desta forma, torna-se interessante a utilização de cultivares que apresentem maior conteúdo desta fração, propiciando a obtenção de bebida de boa qualidade (MENDONÇA; PEREIRA; MENDES, 2005).

Tabela 2 – Sólidos solúveis (°Bx), pH e Temperatura (ºC) aferidos nos meios de fermentações do café arábica cultivar Catuai IAC 144 (vermelho), por processo via úmida

Tempo	Aferições	T1	T2	T3	T4	T5
0h	Sólidos Solúveis	1,0	2,0	2,0	2,1	2,0
	pH	5,6	5,0	5,0	5,2	5,2
	Temperatura	14	14	14	14	14
24h	Sólidos Solúveis	1,5	2,0	2,0	1,9	1,9
	pH	4,4	4,4	4,25	4,5	4,22
	Temperatura	26,6	26,6	26,6	26,6	26,6
46h	Sólidos Solúveis	2,15	2,55	2,70	2,30	2,0
	pH	4,13	4,1	3,86	4,16	3,9
	Temperatura	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5

Legenda: T1= fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada E, T3= com adição de levedura isolada E e *L. plantarum*, T4= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) e T5= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand)/mL e *L. plantarum.*

Fonte: Autores.

A média dos sólidos solúveis das cerejas do café Topázio MG 1190 inicial foi apenas 12º Bx e do Catuai IAC 144 (vermelho), 16ºBx. Esses foram descascados e diluídos em água, o que justifica o baixo ºBx mostrado no meio de reação (de fermentação) (Tabela 1 e 2). No início dos experimentos, nos tratamentos que não foram adicionados culturas (T1), essa média foi menor em 33% a 66% quando comparados aos tratamentos que tiveram adição de culturas iniciadoras, o que era

esperado pois esses micro-organismos não são células puras, e sim associadas com o meio de cultura, no caso das leveduras, ou mesmo com agentes usados como veículo para as bactérias láticas liofilizadas. Durante a fermentação a porcentagem desses sólidos solúveis não sofreu expressivas oscilações devido sua alta carga de diluição, chegando em alguns tratamentos até aumentar, o que pode ser em parte por liberação de ácidos orgânicos pelo metabolismo fermentativo dos micro-organismos, os quais contabilizam para esse parâmetro.

De acordo com a literatura o processo fermentativo é interrompido quando se atinge pH 4,0 a 5,0. O tempo pode variar de acordo com as condições locais, mas estudos demonstram fermentações positivas próximas de 48h à temperatura ambiente de 25ºC. Para temperaturas maiores o tempo deverá ser reduzido (MUINHOS, 2019).

Nos dois experimentos, os valores finais dos tratamentos ficaram em sua maioria dentro da faixa de pH desejada, entretanto, a adição de bactéria lática, resultou em valores pouco abaixo de 4,0. Esses micro-organismos são produtores de ácidos orgânicos, principalmente o lático. Esse ácido é caracterizado por ter pKa 3,86, nesse sentido, provavelmente contribuiu para que o equilíbrio da reação no meio resultasse em maior quantidade na sua forma aniônica, o que leva a maior liberação de H+ e a eventual queda do pH do meio. Esse resultado também mostra que a adição das culturas láticas é uma forma de acelerar a fermentação, podendo ser uma vantagem para a economia do processo.

A acidez em grão de café também tem sido relacionada à qualidade do produto. Sua intensidade está relacionada a vários fatores como os níveis de fermentação ocorrida nos grãos, condições climáticas durante secagem e colheita, estágios de maturação, local de origem e forma de processamento (SIQUEIRA ABREU, 2006).

3.2 Resultado microbiológico do café fermentado por via úmida

Fermentações desejadas de cafés resultam da diminuição de enterobactérias, clostridium e bolores após a fermentação e aumento de bactérias láticas e leveduras (Zhang et al., 2019; Carvalho-Neto et al., 2017; De Melo Pereira et al., 2017).

Os micro-organismos responsáveis pela fermentação natural são espécies autóctones que se originam como contaminantes do processo, incluindo leveduras (por exemplo, *Pichia, Debaryomyces, Sacharomyces* e Espécies de Candida),

bactérias (por exemplo, membros da família Enterobacteriaceae, bactérias do ácido lático e Bacillus spp.) e fungos filamentosos (por exemplo, espécies de *Aspergillus, Penicillium* e *Fusarium*), (Vilela et al., 2010; Loew, 2014; Pereira et al., 2014).

Os micro-organismos fermentativos (por exemplo, leveduras e bactérias láticas) podem desempenhar vários papéis, como degradação da mucilagem (atividade pectinolítica), inibição do crescimento de fungos produtores de micotoxinas e produção de componentes com sabor ativo. (DE MELO PEREIRA et al., 2015).

O uso de culturas iniciadoras (principalmente linhagens de leveduras) emergiu nos últimos anos como uma promissora alternativa para controlar o processo de fermentação e promover o desenvolvimento da qualidade de produtos de café (BRESSANI et al., 2018).

A Tabela 3 mostra os resultados do perfil microbiológico antes e após a fermentação via úmida do café Topázio.

Bactérias aeróbias apenas simbolizam quantidade geral de bactérias presentes no processo, sem informações detalhadas de divisão de grupos. Os resultados mostram que a população dessas bactérias não atingiu a ordem de 10^8 UFC/mL de meio, resultado semelhante encontrado por Zhang et al. (2019). Esses autores estudando fermentação via úmida em cafés cerejas arábicas, em 48 horas, também chegaram aos números de leveduras, bactérias láticas e enterobactérias muito próximos aos de nossos experimentos.

A maior parte dos bolores não é desejada no crescimento do café, tanto por produzirem ocratoxinas, quanto por liberarem metabólitos que depreciam a qualidade sensorial desse produto. A Tabela 3 mostra que este grupo microbiano não foi detectado em nenhuma das amostras testadas.

A fermentação natural (T1) resultou na diminuição de 3,52 logarítmicos de enterobactérias, entretanto, nos demais tratamentos, onde foram adicionadas leveduras e bactérias láticas como culturas iniciadoras, houve redução dessa família de bactérias Gram-negativas em quantidades superiores a 4 ciclos logarítmicos.

Tabela 3 – Micro-organismos analisados nos experimentos de fermentação via úmida do café Topázio MG 1190 amarelo

Micro-organismo (UFC/mL de meio fermentativo)	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Bactérias mesófilas	$5,0 \times 10^{6}$	$3,2 \times 10^{7}$	$3,0 \times 10^{7}$	$7,0 \times 10^{7}$	$9,0 \times 10^{7}$	$1,2 \times 10^{7}$
Enterobactérias	$3,3 \times 10^{6}$	10^{3}	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$
Bactérias láticas	$9,0 \times 10^{3}$	$3,2 \times 10^{7}$	$3,4 \times 10^{7}$	$7,5 \times 10^{7}$	$8,5 \times 10^{7}$	$5,0 \times 10^{7}$
Leveduras	$6,0 \times 10^{5}$	$5,0 \times 10^{6}$	$7,0 \times 10^{6}$	$1,0 \times 10^{7}$	$8,0 \times 10^{7}$	$9,0 \times 10^{6}$
Bolores	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Legenda: T0= café antes da fermentação, T1= fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada A, T3= com adição de levedura isolada E, T 4= com adição de levedura isolada E mais delbrueckii e S. thermophilus (Lyofast SY 1/ Sacco), T5= com adição de levedura isolada A e de *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* (Lyofast SY 1/ Sacco).
Fonte: Autores.

Segundo Massawee e Lifa (2010), a ação das bactérias do ácido lático permite que o pH ácido impeça a proliferação de outras bactérias e favoreçam o crescimento de leveduras, que são consideradas importantes para o desempenho da fermentação e para o desenvolvimento de sabores de café. Nesse sentido, a Tabela 3 mostra concordância com os autores, pois os tratamentos com a adição de bactérias láticas da empresa Sacco Brasil, resultaram no maior estímulo de crescimento das leveduras, principalmente no T4 (adição de bactérias láticas Sacco e Levedura E), cujo o crescimento foi de 8X em relação a T3 (amostra com adição apenas da Levedura E), e de 26X em relação ao inóculo inicial. Já no T3, observou-se aumento de apenas 3,3% em relação ao inóculo, e as leveduras autóctones em T1 cresceram 8,33X em relação ao T0. Entretanto, ao final do processo fermentativo T1 mostrou a menor concentração de leveduras e bactérias láticas.

Dorta *et al.* (2021) também mostraram que a adição de quatro tipos diferentes bactérias láticas da empresa Sacco Brasil resultou no maior número de leveduras autóctones no processo (acima de 1,5 ciclos logarítmicos), em comparação aos tratamentos sem adição.

Entre as leveduras isoladas de fermentações naturais de cafés na região de Garça, a denominada “E” teve melhor desempenho em termos de competição com a microbiota natural do que a levedura “A”. Embora essas tenham semelhanças na morfologia celular (Figura 6) e de suas colônias quando cultivadas em meio PDA, e exalem aroma frutado, indicando que podem ser talvez da mesma espécie, mas cepas diferentes, elas serão enviadas para a Fundação André Tosello- Coleção de Culturas Tropicais, Campinas-SP, para a identificação de suas espécies.

Figura 6 – Fotomicroscopia (Aumento 400X) da levedura E isolada e selecionada como cultura iniciadora para o processo de fermentação via úmida

Fonte: Dos autores

A melhor modulação microbiana, ou seja, diminuição de enterobactérias e aumento de leveduras e bactérias láticas ao final da fermentação, ocorreu no T4 e T3 os quais tiveram a adição da levedura E. Uma adequada interação microbiana no processo fermentativo, por diminuir micro-organismos indesejados e estimular grupos tidos como produtores de substâncias aromáticas agradáveis, pode resultar nas maiores notas sensoriais.

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

Garça/SP, mostrou o melhor desempenho microbiológico, sendo selecionada para a próxima etapa de pesquisa deste trabalho (Experimento 2).

A Tabela 4 mostra o perfil microbiológico antes e após a fermentação via úmida do café arábica Catuaí IAC 144 (vermelho).

Tabela 4 – Micro-organismos analisados nos experimentos de fermentação via úmida do café Catuaí IAC 144 vermelho

Micro-organismo (UFC/mL de meio fermentativo)	**T0**	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
Bactérias mesófilas	$1,56 \times 10^{8}$	1×10^{7}	1×10^{7}	10^{7}	$2,4 \times 10^{8}$	3×10^{7}
Enterobactérias	$1,5 \times 10^{7}$	4×10^{4}	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$
Bactérias láticas	10^{6}	$6,72 \times 10^{7}$	$7,52 \times 10^{7}$	$6,72 \times 10^{7}$	$6,72 \times 10^{7}$	$6,56 \times 10^{7}$
Leveduras	$1,9 \times 10^{6}$	$1,6 \times 10^{6}$	$1,48 \times 10^{7}$	$5,4 \times 10^{6}$	$1,16 \times 10^{7}$	$8,8 \times 10^{6}$
Bolores	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Legenda: T0= café antes da fermentação, T1= fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada E, T3= com adição de levedura isolada E e *L. plantarum*, T4= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) e T5= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) / mL e *L. plantarum.*

Fonte: Autores.

Os mesófilos atingiram no máximo a ordem de 10^{8} UFC. mL-1, sendo um número esperado em processo fermentativo. Não houve detecção de bolores assim como no Experimento1.

As enterobactérias presentes no café cereja antes da fermentação estavam em concentrações consideradas elevadas (ordem de 10^{7} UFC/mL), entretanto, após o processo fermentativo estas sofreram reduções de 2,57 ciclos logarítmicos no T1 e > 5,17 ciclos logarítmicos nos demais tratamentos. Nesse sentido, mais uma vez a fermentação controlada, principalmente com adição de culturas, promoveu efeito inibitório para essas bactérias gram-negativas, sendo um dos motivos de possível melhoria da qualidade sensorial do produto.

O *L. plantarum* (Lema) adicionado como cultura iniciadora, ao contrário das bactérias láticas da empresa Sacco Brasil, não exerceu efeito promotor de crescimento das leveduras, ao contrário, as inibiu. T3 (fermentação com adição de *L. plantarum* e Levedura E) mostrou uma redução de 63,5% de suas células viáveis de leveduras quando comparado com T2 (adição apenas de Levedura E). O T5 (adição de *L. plantarum* e *Levedura Belle Sason*) teve inibição de suas leveduras em 32% quando comparado ao T4 (adição de *Levedura Belle Sason*).

O melhor perfil microbiológico após processo fermentativo foi encontrado no T2, seguido pelo T4.

A levedura regional E mostrou adaptação ao meio fermentativo, sobressaindo-se na sucessão microbiológica com outras leveduras indígenas, crescendo em 275% em relação ao inóculo. Esse resultado indica que essa espécie pode ser comum na região de Garça, e já está bem adaptada à competição ou interação com a microbiota nativa. Temos encontrado no café, leveduras com morfologia celular e de colônia muito próximas a essa estudada, em anos diferentes, e em cidades diferentes da Região de Garça.

Pesquisadores de café fermentado têm mostrado que é uma vantagem isolar microrganismos regionais para introduzi-los como culturas iniciadoras, no intuito de não alterar muito as características gerais do café local, e não ter o risco de mal desempenho fermentativo em caso de culturas alóctones, que podem sofrer antagonismo com a microbiota local (DE MELO PEREIRA et al., 2015, 2014; BRESSANI et al., 2017).

A levedura comercial Belle Sason resultou no aumento de 220% em relação ao inóculo, mostrando uma positiva relação com a microbiota autóctone. Entretanto, essa levedura foi escolhida para este experimento, pois a equipe de pesquisa já havia feito testes de sua fermentação em meio formulado à base de extrato de polpa de café, e esta mostrou rápido consumo de sólidos solúveis, além de exalar um aroma frutado bastante agradável.

A adição de *Pichia fermentans* YC5.2 em processamento via úmida de café foi implementado com sucesso como uma cultura inicial, tendo a capacidade de dominar esta fermentação (DE MELO PEREIRA et al., 2015). Esta levedura foi isolada de fermentação natural do café arábica Mundo Novo, em Lavras- MG, e selecionada para ser empregada como cultura iniciadora no processo via úmida regional.

3.3 Resultado da contagem microbiológica através da Câmara de Neubauer em Microscópio óptico

O Gráfico 1 mostra o número de células totais de leveduras e bactérias láticas em zero, 24 e 46 horas de fermentação em baldes, em microaerofilia, pois mesmo havendo adição de água o sistema foi aberto. A microaerofilia é uma boa condição para o crescimento de muitas bactérias láticas como *L. bulgaricus* e *L. plantarum* usadas como culturas iniciadoras nesse trabalho. As bactérias láticas são G+, podem ser cocos ou bacilos, que obtêm energia pela fermentação de carboidratos, produzindo ácido lático como maior produto de fermentação (MASSAGUER, 2005; ALONSO BURITI, F. C., ISAY SAAD, 2007).

As leveduras são fungos unicelulares, sendo a maioria anaeróbia facultativa, podendo crescer também em condições microaerófilas, nas quais obtêm energia principalmente na forma de fermentação de carboidratos (AMABIS, 2006).

Segundo resultados apresentados por Zhang et al. (2019), ao testarem fermentação via úmida natural, as bactérias láticas tiveram um maior desenvolvimento durante a fermentação submersa do café cereja após 24h, chegando ao ápice em 48 a 64h, sendo que essas iniciaram na ordem de 10^7 UFC (7 LogUFC) mL^{-1} e atingiram 10^8 UFC (8LogUFC) mL^{-1}. Ainda, segundo esses autores, as bactérias láticas prevaleceram em número microbiológico no processo principalmente após 48h de fermentação, com predomínio de *Lactobacillus vacinostercus*, *Lactobacillus brevis* e *L. plantarum,*

O Gráfico 1 mostra que o número de bactérias láticas nos tratamentos T1, T2 e T4 (sem adição de *L. plantarum*), iniciou na ordem de 5 Log. número de células. mL^{-1} e atingiu valores próximos a 8 Log. número de células. mL^{-1}, resultando num aumento próximo a 3 ciclos logarítmicos em 46 horas, sendo o maior crescimento dentre os grupos microbianos investigados, assim como observado por Zhang et al. (2019). Nos tratamentos com adição de *L. plantarum* (Lema), T3 e T5, as bactérias láticas partiram de 6 Log. número de células. mL^{-1} e atingiram valores próximos a 8 Log. mL^{-1}, significando aumento de quase 2 ciclos logarítmicos, ou seja, menor que nos outros tratamentos. A adição de culturas exógenas necessita de estudos, pois nem sempre elas possuem boa interação com a microbiota nativa, não conseguindo

predominar. Entretanto, é importante lembrar que muitos Lactobacillus têm seu crescimento estacionado quando o pH do meio atinge valores abaixo de 4,0, o que aconteceu em T3 e T5, mostrando que existe um limite de aumento, pois seus metabólitos como ácido lático em excesso começam exercer efeito inibitório sobre sua população (DE MELO PEREIRA, 2015; MASSAGUER, 2005).

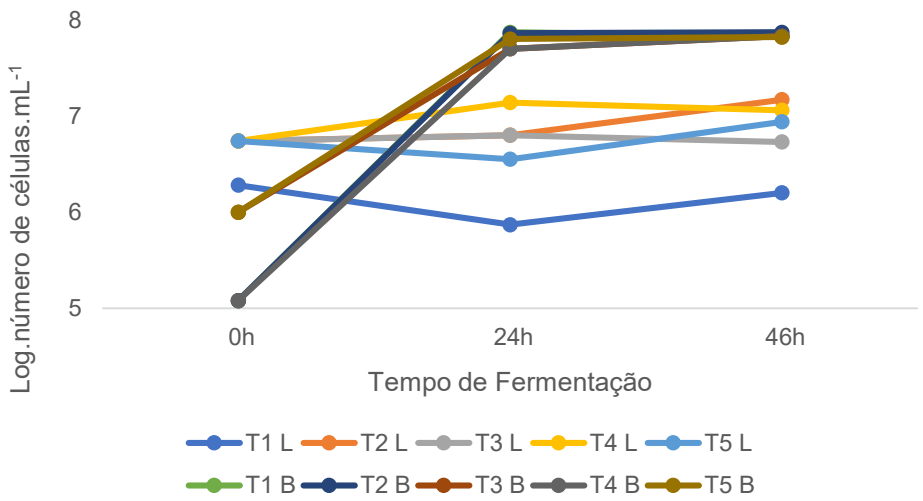
Dentro das comunidades de levedura, estudas por Zhang et al. (2019) *Pichia kluyveri* e *Hanseniospora uvarum* emergiram como proeminentes após a imersão em fermentações padrões e prolongadas (acima de 48h).

De Melo Pereira et al. (2014) investigaram a microbiota nativa de leveduras de café cereja durante fermentação pelo processamento via úmida e através do sequenciamento do gene ITS-rRNA, verificaram *Pichia fermentans* e *Pichia kluyveriwere* como isolados mais frequentes, seguidos por *Candida glabrata, Candida quercitrusa, Saccharomyces sp., Pichia guilliermondii, Pichia caribbica* e *Hanseniaspora opuntiae*. Verificaram, ainda, que o crescimento máximo da população de leveduras na fermentação natural atingiu a ordem de 10^{7} UFC/ mL^{-1} em 40 horas de processo.

O Gráfico 1 mostra que as leveduras atingiram no máximo 7,17 Log. número de células. mL^{-1} no T2 (Adição de levedura E regional) em 46 horas de fermentação, estando esse valor próximo ao descrito pela literatura (DE MELO PEREIRA et al., 2014; ZHANG et al., 2019). Entretanto, a levedura comercial Belle Saison (T4) em 24h mostrou o maior número (7,14 Log), indicando como discutido no item anterior também boa adaptação no processo e rápido crescimento.

Os resultados ainda mostram que a presença de *L. plantarum* exerceu maior inibição da levedura comercial em 24 h de processo, e da Levedura regional, em 44h.

Gráfico 1 – Log do número de leveduras (L) e bactérias láticas (B) durante o processo fermentativo do café Catuai IAC 144 (vermelho) através da via úmida



Legenda: T1= café de fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada E, T3= com adição de levedura isolada E e L. plantarum, T4= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) e T5= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) / mL e L. plantarum.
Fonte: Dos Autores.

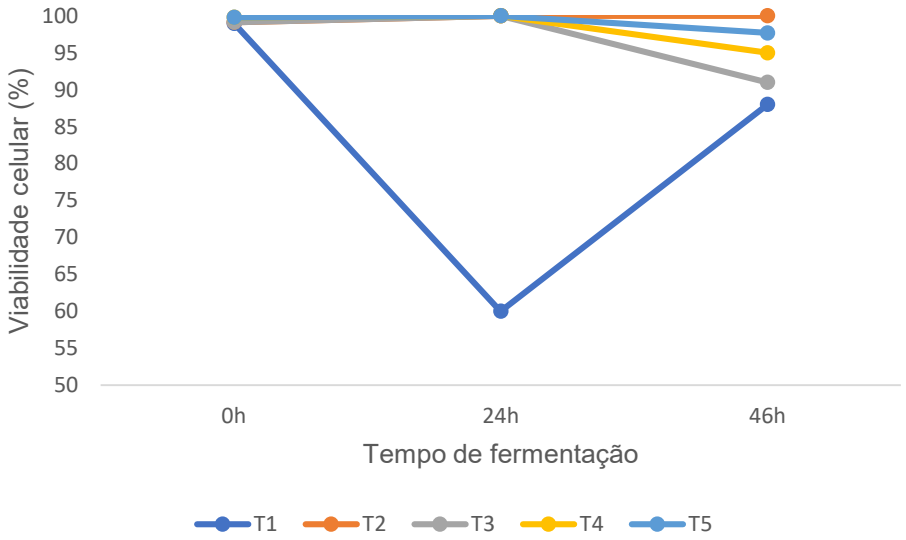
O Gráfico 2 mostra a viabilidade celular das leveduras nos diferentes tratamentos fermentativos. Essa análise faz uma relação do número de células vivas sobre o número total de células (vivas e mortas), o que não pode ser detectada em técnicas de plaqueamento. Viabilidades próximas a 100% conferem que as células estão metabolicamente e fisiologicamente em seus estados otimizados e adaptados ao processo, por outro lado, quando o meio fermentativo vai ficando muito competitivo ou estressante para esses micro-organismos, sua viabilidade vai diminuindo (DORTA et al., 2006). Essa medida permite um maior controle durante as horas de fermentação, podendo ajudar na compreensão do grau de adaptação da levedura com a microbiota autóctone, ou mesmo sua interação ao utilizarmos em cultura mista.

A levedura E isolada e selecionada de café cereja regional fermentado, quando adicionada como cultura pura no processo fermentativo (T2), resultou na maior viabilidade (100%) celular em 46 horas de fermentação, além de maior estabilidade nos diferentes tempos analisados. Ao final da fermentação, em cultura mista, este

fungo teve redução de 9% de sua Viabilidade celular, mostrando, que o *L. plantarum* exerceu um certo grau de competição com a Levedura, entretanto, essa diminuição não é considerada preocupante em termos fisiológicos e metabólicos. Na fermentação de álcool combustível viabilidade celular entre 85 e 95% são desejadas para a otimização do processo (Dorta, 2006) *L. plantarum* exerceu menor influência na Viabilidade da levedura comercial avaliada.

O Gráfico 2 ainda mostra que as leveduras naturais do processo fermentativo T1 sofreram maior estresse fermentativo, principalmente em 24 h, tendo uma redução de 40% de sua viabilidade celular, ressaltando a importância de trabalhar com culturas iniciadoras, pois se forem bem-sucedidas elas exercerão efeito modulador e otimizador do processo (BRESSANI et al., 2017).

Gráfico 2 – Viabilidade celular de leveduras durante o processo fermentativo do café Catuai IAC 144 (vermelho)



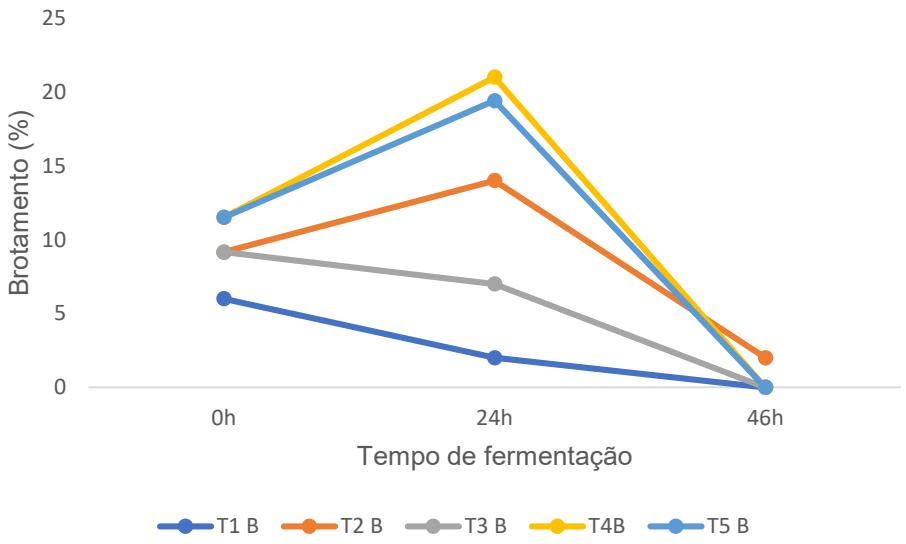
Legenda: T1= café de fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada E, T3= com adição de levedura isolada E e L. plantarum, T4= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) e T5= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) / mL e L. plantarum.
Fonte: Dos Autores

As leveduras multiplicam-se principalmente pelo processo de reprodução assexuada chamado brotamento. Nesse sentido, quando consideramos a contagem

do número de brotos sobre o total de células de leveduras, temos uma indicação da velocidade ou fase de crescimento que essas se encontram.

O Gráfico 3 mostra que em 24h o brotamento (%) atingiu o valor máximo para T4, seguido por T5 e T2. No T1 e T3 a taxa de brotamento teve um declínio constante a cada tempo analisado. O que reforça a observação que a adição da Levedura E em cultura individual, ou a Levedura Belle Sason com ou sem adição de *L. plantarum* trouxe maior equilíbrio para o desenvolvimento desses fungos no processo, que são tão estimados para a produção de compostos aromáticos.

Gráfico 3 – Brotamento celular de leveduras durante o processo fermentativo do café Catuai IAC 144 (vermelho)



Legenda: T1= café de fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada E, T3= com adição de levedura isolada E e *L. plantarum*, T4= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) e T5= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) / mL e *L. plantarum.*

Fonte: Dos Autores.

Estes resultados sugerem, ainda, que a adaptação de técnicas microbiológicas através da contagem em câmara de Neubauer para a fermentação de café foi viável e uma forma mais rápida para se analisar o comportamento do grupo levedura, ou mesmo bactérias láticas dentro da dinâmica da fermentação.

3.4 Avaliações sensoriais dos cafés fermentados

As moléculas responsáveis pelos odores do café são formadas principalmente durante o processo de torrefação, a partir de precursores não voláteis presentes em grãos de café verdes, como polissacarídeos, lipídios, proteínas e aminoácidos livres ácidos (DE MELLO PEREIRA, 2019).

O flavor pode ser descrito como uma combinação entre aroma, sabor, textura e sensação na boca de um alimento. O aroma é um atributo mais importante no flavor do café (SUNARHARUM et al., 2014; NOBLE, 1996).

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

A análise sensorial é uma ferramenta útil para se avaliar a qualidade do produto final. Dentre as metodologias existentes, a mais comumente empregadas para café é o teste de xícara proposto pela Associação Americana de Cafés Especiais (SCAA). O teste de xícara avalia o café em duas categorias, a subjetiva, que representa fragrância/aroma, sabor, sabor residual, acidez, corpo, equilíbrio e impressão global da bebida, e a objetiva, representada pela uniformidade, doçura e xícara limpa (ausência de defeitos).

A Specialty Coffee Association of America (SCAA, 2009) considera como cafés especiais apenas aqueles que apresentam elevada qualidade física e sensorial, alcançando acima de 80 pontos, numa escala de 0 a 100 a partir de um processo de degustação de café. A literatura define como café especial, o café que é cultivado em climas adequados, paladar e sabor característicos, e com pouquíssimo ou nenhum defeito (GUIMARÃES et al., 2018).

No primeiro experimento (Tabela 5) todos os cafés fermentados tiveram notas que os colocam dentro da categoria “cafés especiais” pela SCAA, não havendo diferença estatística ($P > 0,05$) entre os 5 tratamentos. Nesse sentido, desde a fermentação natural, quanto as adicionadas de leveduras e bactérias láticas foram bem sucedidas, principalmente quando comparada com o mesmo café que passou pelo processamento natural via seca e recebeu nota 79,25, ou seja, abaixo da categoria considerada especial.

As diferenças nas sucessões microbiológicas em cada tratamento testado não interferiram significativamente na pontuação final, entretanto, contribuíram para diversificação das características sensoriais.

Tabela 5 – Médias de notas (SCAA) sensoriais atribuídas Topázio MG 1190 amarelo fermentado por via úmida

Café	Tratamentos				
	T1	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
Topázio MG 1190 amarelo	82,0 ± 0,5 a1	82,5 ± 0,5 a	83,0 ± 0,3 a	83,0 ± 0,0 a	82,0 ± 0,3 a

Legenda: T1= café de fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada A, T3= com adição de levedura isolada E, T 4= com adição de levedura isolada E mais delbrueckii e S. thermophilus (Lyofast SY 1/ Sacco), T5= com adição de levedura isolada A e de *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* (Lyofast SY 1/ Sacco).

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si

Fonte: Dos Autores

No experimento 2 (Tabela 6) as culturas iniciadoras trouxeram um resultado favorável para o café Catuaí IAC 144, elevando de forma significativa ($P < 0,05$) no mínimo 1,6 até 2,5 pontos a nota do café fermentado, quando comparado com a fermentação natural. Todas as fermentações resultaram em diferentes características sensoriais.

Os cafés especiais remetem a aqueles de maior qualidade, onde o sabor e aromas distintos são formados durante à torra. Os cafés mais valorizados são aqueles que transmitem uma sensação ou percepção sensorial única. (FARAH et al., 2005; RIBEIRO et al., 2016).

Não houve diferença significativa entre a nota final atribuída para T2, T3, T4 e T5, mostrando que toda as adições de cultura única (Levedura regional e comercial) ou mista (Levedura Regional com *L. plantarum* e *Levedura Belle Sason* com *L. plantarum*) surtiram em desejadas experiências sensoriais.

Tabela 6 – Médias de notas (SCAA) sensoriais atribuídas ao café Catuaí IAC 144 vermelho fermentado por via úmida

Café	Tratamentos				
	T1	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
Catuaí IAC 144 vermelho	80,0 ± 0,0 a1	81,6 ± 0,6 b	81,6 ± 0,4 b	82,0 ± 0,3 b	82,5 ± 0,5 b

Legenda: T1= café de fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada E, T3= com adição de levedura isolada E e *L. plantarum*, T4= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) e T5= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) / mL e *L. plantarum.*

Fonte: Autores

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si

O mesmo café Catuai IAC 144 vermelho que não passou pelo processamento via úmida, foi avaliado com nota média de 79,8 pontos, o que ainda o deixa abaixo da categoria café especial, mostrando mais uma vez que a fermentação submersa trouxe vantagens sensoriais.

Considerando que as diferentes fermentações dos dois experimentos resultaram em variadas características sensoriais (Tabela 7), há o aumento de oferta para diferentes nichos de mercado consumidor. Termos descritivos sensoriais positivos foram descritos pelos provadores especialistas nos cafés fermentados como: caramelo, chocolate, amêndoa, avelã, “calda de pudim”.

De Melo Pereira et al. (2015) mostraram que a análise sensorial indicou que o sabor das bebidas de café fermentado via úmida foi influenciado por culturas iniciais, sendo avaliadas como tendo as pontuações sensoriais mais altas para aroma frutado, amanteigado e fermentado. Esta demonstra um papel complementar das leveduras associadas à qualidade do café por meio da síntese de constiuintes voláteis por leveduras específicas. As cepas de levedura *Pichia fermentans* YC5.2 e Saccharomyces sp. YC9.15 regionais tiveram um grande potencial para uso como culturas iniciadoras no processamento úmido de café e possivelmente podendo ajudar a controlar e padronizar processos fermentativos e produzir bebidas de café com novos e desejáveis perfis de sabor.

Tabela 7 – Termos descritivos sensoriais dados por provadores especialistas após análise das amostras obtidas dos experimentos 1 e 2

Experimento 1	Características sensoriais
T1	Caramelo, limão rosa, noz moscada, corpo e acidez média
T2	Suave, leve caramelo, chocolate, cacau
T3	Cacau, caramelo, amêndoa, rosa, tabaco
T4	Especiarias, calda de pudim, cacau, licoroso
T5	Cravo, avelã, caramelo
Experimento 2	
T1	Castanha, amêndoa, amendoim. Baixo corpo e acidez
T2	Castanha, amêndoas
T3	Cacau, Avelã, amêndoa
T4	Cacau, avelã, chocolate
T5	Caramelo, cítrico, cacau, baunilha

Legenda: Experimento 1: T1= café de fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada A, T3= com adição de levedura isolada E, T 4= com adição de levedura isolada E mais delbrueckii e S. thermophilus (Lyofast SY 1/ Sacco), T5= com adição de levedura isolada A e de *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* (Lyofast SY 1/ Sacco). Experimento 2: T1= café de fermentação natural, T2= com adição de levedura isolada E, T3= com adição de levedura isolada E e *L. plantarum*, T4= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) e T5= com adição de levedura comercial Belle Sason (Lallemand) / mL e *L. plantarum.*
Fonte: Autores

De Melo Pereira (2015) demonstraram em cafés fermentados via úmida, que dentro a análise sensorial descritiva, atributos positivos foram detectados, como frutado, floral, ácido, cítrico e caramelo, que são sempre mencionados em avaliações de bebidas de café. O uso da cultura de levedura demonstrou ser favorável para a produção de café com perfis sensoriais distintos. O ‘floral’, ‘limão siciliano’ e percepções de 'baunilha' detectadas no tratamento suplementado inoculado e percepção corporal "cítrica", "lática", "fosfórica" e aveludada no inoculado não suplementados com sacarose são sensações desejáveis. Sua atividade metabólica durante o processo de fermentação mostrou influenciar a fração volátil final dos grãos torrados. As bebidas de café com sabor distinto e alta qualidade sensorial foram

produzidos de grãos inoculados e poderiam ser usados para adquirir diferentes segmentos mercadológicos de café.

Esses autores mostraram notas sensoriais acima de 87 pontos usando a metodologia SCAA. Em nossos experimentos as notas não chegaram a 84 pontos, entretanto, temos que considerar as diferenças na variedade dos cafés, na composição, região geográfica, das condições atmosféricas, de cultivo, e processamento até chegarem no grão verde.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, dada a importância que as culturas iniciadoras têm para a fermentação controlada de café por via úmida, com o presente trabalho pode-se verificar a eficiência de usá-las, pois todas as fermentações resultaram em um aumento benéfico no número microbiológico frente ao café antes da fermentação, diminuindo as bactérias que prejudicam a fermentação do café, e todos os tratamentos resultaram em um aumento na pontuação final do café depois de fermentado, elevando o seu nível para cafés especiais.

As leveduras isoladas da Região cafeeira de Garça mostraram potencial para serem aplicadas como culturas iniciadoras no café regional. A levedura E mostrou um bom desempenho no equilíbrio desejado da microbiota do café, obtendo as maiores viabilidades celulares e maior estabilidade fisiológica durante 0 h, 24h e 44h de fermentação do café Catuaí IAC 144.

A cultura lática da empresa Sacco Brasil estimulou o crescimento das leveduras regionais no processo fermentativo.

O *Lactobacillus plantarum* competiu com a Levedura E regional, entretanto, não resultou na diminuição significativa da nota sensorial.

A Levedura comercial Belle Sason, usada para cervejas artesanais, resultou numa viável adaptação à fermentação do café, resultando em atributos sensoriais desejados.

Dada a grandeza que é o estudo de culturas iniciadoras para a fermentação controlada, onde que em apenas um estudo não é possível extrair todos os resultados dessas culturas, fica a sugestão como estudo futuro, a identificação de leveduras e bactérias regionais selecionadas e um estudo do metabolismo e fisiologia dos mesmos para estabelecer melhores formas de aplicação nas fermentações via úmida, seca e semi-seca, adicionando diferentes culturas iniciadoras, testando a cultura entre bactérias láticas comerciais (Sacco) ou isoladas da região com as leveduras regionais e/ou comerciais, entre outros.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus por ternos mantido na trilha certa durante este trabalho com dedicação, saúde e força para chegar até o final.

À nossas famílias que nos apoiou incondicionalmente durante toda essa trajetória.

Aos professores da Fatec Marília por todos seus ensinamentos, especialmente a Profa. Dra. Renata Bonini Pardo e ao Café Dona Santina por ter auxiliado na secagem dos cafés.

Também agradecemos ao APTA, pela doação dos cafés e contribuição para a pesquisa.

À ETEC Garça por ter descascado os cafés.

Agradecemos também a empresa Capricórnio Coffees, que gentilmente fizeram as analises sensoriais dos cafés.

À empresa Sacco Brasil por ter doado o fermento lático para os nossos experimentos.

Um agradecimento especial à Profa. Dra. Claudia Dorta pelos seus grandes ensinamentos e paciência conosco neste projeto, pois sem ela não seria possível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A IMPORTÂNCIA Socioeconômica. **Revista cafeicultura**, 2006. Disponível em: <https://revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=5548> Acesso em: 05 outubro. 2020.

ALONSO BURITI, F. C.; ISAY SAAD, S. M. **Bactérias do grupo Lactobacillus casei: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana.** *ALAN* [online]. 2007, vol.57, n.4, pp. 373-380. Disponível em: <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000400010&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0004-0622.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Fundamentos da Biologia Moderna**. Volume Único. 4. ed. São Paulo: Moderna, 2006

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. de A. dos S. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Belém; Sociedade Civil Mamirauá: MCT-CNPq, 2007.

BRANDÃO, R. P. Café com qualidade – Uma opção do cafeicultor**. Revista Campo e Negócios**, set. 2015.

BRESSANI, A. P. P; MARTINEZ, S. J.; EVANGELISTA, S. R.; DIASA, D. R.; SCHWAN, R. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods**. LWT - Food Science and Technology,** v. 92, p. 212-219, 2018.

BUSSAB W.O. MORETTIN P.A., **Estatística Básica.** Saraiva, São Paulo, 9ed, 2017.

Carvalho-Neto, D.P, De Melo Pereira, G.V., Tanobe, V.O.A, Soccol, V.T, Silva, B.J.G., Rodrigues, C., Soccol, C. R. (2017). **Yeast Diversity and Physicochemical Characteristics Associated with Coffee Bean Fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro Region.** Fermentation, 3 (11), 2-1.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. **Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt.** J. Dairy Sci., v.81, p. 2804-2816, 1998.

DE MELO PEREIRA, G. V.; CARVALHO NETO, D. P.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. I.; VÁSQUEZ, Z. S.; MEDEIROS, A. B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans - **A review. *Food Chem*,** v. 272, p. 441-452, 2019.

De Melo Pereira, G. V.; Neto, E., Soccol, V. T., Medeiros, A.B.P, Woiciechowski, A. L., Soccol, C. R. (2015) Conducting starter culture-controlled fermentation sof coffee beans duringon-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. **Food Research International**, 75, 348- 356.

Dorta, C., Oliva-Neto, P., de -Abreu-Neto, M. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of Saccharomyces cerevisiae (PE-2 and M-26). **World J Microbiol Biotechnol** 22, 177 (2006).

DORTA, Claudia *et al*. Fermentação de café via úmida com adição de culturas iniciadoras e a inclusão de características sensoriais na bebida / Wet coffee fermentation with addition of starter cultures and the inclusion of sensory characteristics in the beverage. **Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 579-589, 2021. BJAER - Brazilian Journal of Animal and Environmental Research.

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

fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** v. 22, p.177–182, 2006.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International,** v. 46, p. 488-495, 2012.

FARAH, A. et al. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 53, n. 5, p. 1105-1113, Feb. 2005.

GUIMARÃES, E. R. et al. The brand new Brazilian specialty coffee market. **Journal of food products marketing**, v. 25, n. 1, p. 49-71, 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4. ed. São Paulo, 2008. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/. Acesso em: 13 fev. 2021.

LUDLOW, C. L.; CROMIE, G. A.; GARMENDIA-TORRES, C.; JEFFERY, E. W.; FAY, J. C.; FIELD, C. (2016). Independent origins of yeast associated with coffee and cacao fermentation report. **Current Biology**, v. 26, n.7, p. 965-971.

MASSAGUER, P. R. De. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2005. 258 p. ISBN 85-85519-54-1.

MENDONÇA, L.M.V.L., PEREIRA, R.G.F.A., MENDES, A.N.G. **Parâmetros Bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café (Coffea arabica L.).** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.25, n.2, p. 239-243, abr.-jun. 2005.

MESQUITA, Carlos Magno de et al. **Manual do café:** colheita e preparo (Coffea arábica L.). Belo Horizonte: EMATER-MG, 2016. 52 p. il.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Café no Brasil**. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>. Acesso em: 01 out. 2020.

MUINHOS, Ronaldo. FERMENTAÇÃO DE CAFÉ. **Buenavista Café**, Juiz de Fora, Mg, v. 10, n. 5, p. 21-22, 08 jun. 2019. Disponível em: https://buenavistacafe.com.br/blog/2019/06/08/fermentacao-de-cafe/. Acesso em: 23 maio 2021.

NOBLE, A. C.Taste-aroma interactions, Responses to flavor. **Trends in Food Science & Technology,** v. 7, p. 439-444, 1996.

PEREIRA, G. V. M.; SOCCOL, V. T.; PANDEY, A.; MEDEIROS, A. B. P.; ANDRADE, J. M. R. L.; GOLLO, A. L.; SOCCOL, C. R. (2014). **Isolation, selection and evaluation yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process.** International Journal of Food Microbiology, 188(64), 60-66.

PEREIRA, Gilberto Vinícius de Melo *et al*. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: growth, metabolic analyses and sensorial effects. **Food Research International**, [S.L.], v. 75, p. 348-356, set. 2015. Elsevier BV.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Lavras: UFLA, 2003. 304 p.:il.
Rai, A. K., Pandey, A., Sahoo, D. (2019). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. Trends in Food Science & Technology, 83, 129-137.

RIBEIRO, L.S. et al. Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final beverage. **Food Research International**, v.92, p.26–32, 2017a.

Ribeiro, L.S., Duarte, W.F., Dias, D.R., & Schwan, R.F. (2015). Fermented sugarcane and pineapple beverage produced using Saccharomyces cerevisiae and non-Saccharomyces yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, 121, 262 - 272.
SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. (2008). **Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (Coffea arabica) fermentation.** Food Microbiology, 25, 951–957.

SILVA, C. F.; VILELA, D. M.; CORDEIRO, C. S.; 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, 2013.

SILVA, N.; FERRAZ, V. C. N.; HIROMI, M.; FRANCISCO, R.; ABELIAR, R. Manual de Análise Microbiológica de Alimentos e Água- ITAL. **Instituto de Tecnologia de Alimentos- DPTO.** 4ª Edição, 2010.

SIQUEIRA, H. H.; ABREU, C. M. P. Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.1, p.112-117, 2006.

SPECIALITY COFFEE ASSOCIATION OF AMERICA. SCAA Protocols. **Cupping Specialty Coffee.** Long Beach: SCAA, p. 7, 2009.

SUNARHARUM, W. B.; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. **Food Research International**, v. 62, p. 315-325, Aug. 2014.

SUPLICY, Eduardo Matarazzo. Brasil se consolida na tradição de grande produtor mundial de café**.** **Embrapa**. Jacuí, MG. 2012. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/va12-custos-e-comercializacao03>. Acesso: 01 out 2020.

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

ZHANG, Sophia Jiyuan; BRUYN, Florac de; POTHAKOS, Vasileios; TORRES, Julio; FALCONI, Carlos; MOCCAND, Cyril; WECKX, Stefan; VUYST, Luc de. Following Coffee Production from Cherries to Cup: microbiological and metabolomic analysis of wet processing ofcoffea arabica. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 85, n. 6, p. 1-22, fev. 2019.