

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

MATHEUS LOPES DEMITO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS MICRORGANISMOS
PRODUTORES DE AROMAS EM CAFÉS FERMENTADOS**

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2019

MATHEUS LOPES DEMITO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS MICRORGANISMOS
PRODUTORES DE AROMAS EM CAFÉS FERMENTADOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Vitória
Messias Bittencourt.

Coorientador: Prof. Dr. Luciano
Fernandes.

PONTA GROSSA

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa
n.65/19

D381 Demito, Matheus Lopes

Caracterização molecular dos microrganismos produtores de aromas em cafés fermentados. / Matheus Lopes Demito, 2019.
55 f.; il. 30 cm .

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt.
Coorientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

1. Cafés. 2. Aromas. 3. Micro-organismos. 4. Estrutura molecular. 5. Biotecnologia.
I. Bittencourt, Juliana Vitória Messias. II. Fernandes, Luciano. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 660.6

Eelson Heraldo Ribeiro Junior. CRB-9/1413. 26/08/2019.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

PPGBIOTEC
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título de Dissertação Nº 6/2019

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS MICRORGANISMOS PRODUTORES DE AROMAS EM CAFÉS FERMENTADOS

por

Matheus Lopes Dedito

Esta dissertação foi apresentada às **9 horas de 10 de julho de 2019**, na sala da **DIRPPG**, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora, composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof.^a Dr.^a Luciana de Boer Pinheiro de Souza (UEPG)

Prof.^a Dr.^a Safi Amaro Monteiro (UTFPR)

Prof.^a Dr.^a Simone Delezuk Inglez (UTFPR)

Prof.^a Dr.^a Juliana Vitória Messias Bittencourt (UTFPR)
Orientador e presidente da banca



Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
Coordenador do PPGBIOTEC
UTFPR – Câmpus Ponta Grossa

- A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE ARQUIVADA NA SECRETARIA DO CURSO -

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família por toda a disposição e apoio durante esse período de mestrado.

A Prof.^a Paula Rachel Rabelo Corrêa, da Fundação de Ensino e Pesquisa do Sul de Minas, por possibilitar essa pesquisa fornecendo as amostras iniciais de café.

A UTFPR por ser uma ótima universidade pública e gratuita que sempre forneceu infraestrutura, profissionais e os apoios necessários para me formar como profissional.

A minha orientadora, Prof.^a Juliana Bittencourt, pela dedicação para me guiar na elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Luciano Fernandes, por aceitar coorientar esse trabalho e por todo seu apoio.

Por fim, agradeço aos meus amigos, amigas e companheiros de trabalho, por tornarem a minha jornada mais branda e feliz.

Meus agradecimentos a todos e todas.

RESUMO

DEMITO, Matheus Lopes. **Caracterização molecular dos microrganismos produtores de aromas em cafés fermentados**. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

O café é responsável por 13,5% de PIB de Minas Gerais e atualmente há uma necessidade ascendente de estudos que possam contribuir para agregar valor ao café e torná-lo um produto tido como especial. Nesse sentido, a biotecnologia surge como uma ferramenta capaz de apoiar o desenvolvimento de bioprocessos para fabricação desse produto e suprir essa demanda, contribuindo também para a indispensabilidade atual de produção sustentável. Com esse intuito, foi realizado o isolamento e a caracterização dos microrganismos produtores de aromas de amostras de café mineiro. Após sequenciamento, tratamento das informações com o software BioEdit 2.0 a identificação das linhagens encontradas nas amostras foi feita através do National Center for Biotechnology Information (NCBI). As linhagens identificadas em nível de espécie foram: *Geotrichum candidum*, *Galactomyces candidus*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* e *Pichia fermentans*. Diante disso, uma ferramenta biotecnológica que pode ser usada para incrementar os produtos finais de café é a adição de bioaromas produzidos por fungos.

Palavras-chave: *Geotrichum candidum*. *Galactomyces candidus*. *Pichia membranifaciens*. *Pichia kudriavzevii*. *Pichia fermentans*.

ABSTRACT

DEMITO, Matheus Lopes. **Molecular characterization of microorganisms producing aromas in fermented coffee.** 2019. 55 p. Thesis (Master's Degree in Biotechnology) - Federal University of Technology - Parana, Ponta Grossa, 2019.

Coffee is responsible for 13.5% of GDP in Minas Gerais and has a rise in studies that may contribute to the value of coffee and make it a product considered as special. This case, biotechnology emerges as a tool capable of supporting the development of bioprocesses for the production of this product and supplying this demand, also contributing to a current indispensability of sustainable production. For this purpose, the isolation and characterization of the microorganisms that produced aromas of samples of Minas Gerais coffee were carried out. After sequencing, the treatment of information with software BioEdit 2.0 is an information identification tool for data collection (NCBI). The top lineages were: *Geotrichum candidum*, *Galactomyces candidus*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* and *Pichia fermentans*. Therefore, a biotechnological tool that can be used to enhance coffee end products is the addition of fungus-produced bioaroms.

Keywords: *Geotrichum candidum*. *Galactomyces candidus*. *Pichia membranifaciens*. *Pichia kudriavzevii*. *Pichia fermentans*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Amostras de café fermentado em 4 condições cedidas por produtores de Minas Gerais para realização da metagenômica | 22 |
| Figura 2 - Fotografia dos isolados filamentosos e análise microscópica | 28 |
| Figura 3 - Fotografia dos isolados leveduriformes e análise microscópica | 29 |
| Figura 4 - Gel de agarose de extração | 31 |
| Figura 5 - Gel de agarose da reação de cadeia polimerase do DNA | 32 |
| Figura 6 - Gel de agarose de purificação do DNA | 33 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Características dos microrganismos isolados..... | 30 |
| Tabela 2 - Taxonomia dos microrganismos sequenciados | 34 |
| Tabela 3 - Relação dos microrganismos com os tratamentos fermentativos | 35 |
| Tabela 4 - Identificação CMIB dos microrganismos | 42 |

LISTA SIGLAS E ACRÔNIMOS

| | |
|----------|---|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| BIO | <i>Biotechnology Industry Organization</i> |
| CMIB | Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico |
| CMRP | Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense |
| CTAB | Brometo de cetiltrimetilamônio |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ITS | Espaçador interno transcrito |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PEG | Polietilenoglicol |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PIB | Produto Interno Bruto |
| UFPR | Universidade Federal do Paraná |
| UTFPR-PG | Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Ponta Grossa |
| WFCC | <i>World Federation of Culture Collections</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 11 |
| 1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA | 11 |
| 2.REFERENCIAL TEÓRICO | 13 |
| 2.1 FERMENTAÇÃO..... | 13 |
| 2.2 PRODUÇÃO DE AROMAS POR FUNGOS | 16 |
| 2.3 CAFÉ..... | 17 |
| 2.3.1 Café especial..... | 19 |
| 3.METODOLOGIA | 21 |
| 3.1 PROPOSTA METODOLÓGICA | 21 |
| 3.2 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA | 21 |
| 3.3 AMOSTRAS DE CAFÉ..... | 22 |
| 3.4 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS | 24 |
| 3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS | 24 |
| 3.5.1 Extração de DNA..... | 24 |
| 3.5.2 Amplificação do DNA..... | 25 |
| 3.5.3 Purificação do DNA | 25 |
| 3.5.4 Sequenciamento do DNA | 26 |
| 3.6 DEPÓSITO NA COLEÇÃO MICROBIOLÓGICA DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO..... | 26 |
| 4.RESULTADOS E DISCUSSÕES | 28 |
| 4.1 AMOSTRAS DO CAFÉ | 28 |
| 4.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS | 28 |
| 4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS | 32 |
| 4.4 DEPÓSITO NA COLEÇÃO MICROBIOLÓGICA DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO..... | 42 |
| 5.CONSIDERAÇÕES FINAIS | 44 |
| REFERÊNCIAS | 45 |

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente melhoria de produtos e processos nos mercados do café surgiu a necessidade também de pequenos produtores tornarem-se competitivos no mercado frente a grandes produtores. Neste sentido a biotecnologia possui ferramentas valiosas para agregar valor a produtos, permitindo o desenvolvimento de processos inovadores que possibilitam ofertar produtos diferenciados com alto valor agregado.

Diante disso, Segundo Soccol et al. (2019), uma ferramenta biotecnológica que pode ser usada para incrementar os produtos finais de café é a adição de bioaromas.

A qualidade aromática de cafés fermentados por pequenos produtores mineiros recebeu destaque internacional devido ao padrão de seu produto final. Esses produtores fermentaram os seus frutos em diferentes condições e obtiveram produtos finais com diferentes aromas associados.

Entretanto, os produtores têm poucas informações de como esses bioaromas foram realçados, a hipótese de que microrganismos podem estar envolvidos na produção dos aromas surgiu. A partir do exposto, pode-se inferir que o aroma final dos produtos está associado à fermentação em que o café é submetido em suas etapas produtivas.

A fermentação é um processo realizado por microrganismos. No entanto, quais microrganismos estão associados em cada fermentação é a problemática que norteia esse trabalho.

Assim, isolou-se os microrganismos encontrados em diferentes tratamentos fermentativos realizados pelos produtores para que pudesse esclarecer quais eram os primeiros responsáveis pelo destaque dos produtos de café.

Conhecendo os microrganismos e seus respectivos aromas produzidos, pode-se propor bioprocessos fermentativos aplicados ao café visando um produto final com alto valor agregado. Desvendar quais os microrganismos isolados de diferentes amostras de fermentados de café que agregaram valor ao produto final dos pequenos produtores de café é o desafio que será cumprido nesse trabalho.

1.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o esclarecimento dos microrganismos envolvidos na fermentação de grãos de cafés por pequenos produtores em Minas Gerais.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Isolar os microrganismos a partir de grãos de cafés fermentados por pequenos produtores;
- Descrever os microrganismos por coloração, textura, velocidade de crescimento e aroma característico exalado.
- Identificar por sequenciamento de DNA os microrganismos isolados;
- Depositar na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB) as linhagens identificadas.

1.2 JUSTIFICATIVA

O café (*Coffea arabica*) é responsável por 13,50% do PIB de Minas Gerais e é uma das primeiras espécies de café a ser cultivado no estado. Fatores de pré e pós-colheita influenciam na qualidade do produto e o sabor e o aroma complexos da bebida de café são resultados de vários constituintes químicos e compostos que interferem no sabor experimentado.

Com o aumento do foco regional em Minas Gerais na produção de cafés especiais há o interesse por parte dos produtores em processos que forneçam cafés de alto valor agregado. Uma das opções para atingir esta qualidade são operações pós colheita a que estes grãos serão submetidos para que potencializem valores financeiros e através de uma baixa produção possam obter uma alta rentabilidade. Assim, processos realizados por pequenos produtores podem aumentar a lucratividade da sua safra por finalizarem cafés com diferenciais para a competitividade no mercado cafeeiro que paga por qualidade. Quando o processo de fermentação foi realizado por pequenos produtores da região de Três Pontas, o café

obtido atingiu um preço 5 vezes maior que um café convencional, o que justifica, indica e sinaliza os estudos a respeito desta técnica de modificação de café.

Assim, busca-se entender quais os microrganismos que participam deste processo de valorização. Produtos oriundos de processos biotecnológicos podem ser importantes aditivos para melhorar a qualidade de um café comercial. No entanto, é necessário conhecer o microrganismo responsável, seu comportamento, aromas produzidos e principalmente se pode ser um aditivo a um café convencional.

A literatura sobre fermentação para produção de cafés especiais ainda é escassa, indicando a necessidade de estudo sobre os parâmetros envolvidos nessas fermentações.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

De acordo com a Biotechnology Industry Organization (BIO), a biotecnologia refere-se ao uso de células e biomoléculas para a resolução de problemas, transformação e otimização de produtos. Atualmente, é uma das ferramentas tecnológicas mais importantes.

Segundo o Decreto n.º 6.041 da Política Nacional de Desenvolvimento da Biotecnologia, esse setor caracteriza-se como oportunidade extremamente promissora para fomentar o desenvolvimento nacional baseado no conhecimento e na inovação, gerando empregos, desenvolvimento regional, além de alavancar as exportações de produtos com maior valor agregado. Além disso, as preocupações com as questões ambientais forçaram o desenvolvimento de processos mais limpos que impulsionam cada vez mais a demanda por produtos naturais, funcionais e contendo compostos bioativos (BICAS, 2009). Portanto, os bioprocessos são uma necessidade evidente na indústria nacional.

2.1 FERMENTAÇÃO

Visando a demanda por produtos naturais e funcionais, contendo compostos bioativos, sustentando-se por preocupações com as questões ambientais e conceituais de indústria 4.0, surge um conceito de produção industrial de produtos, chamado de bioprocessos (BICAS, 2009).

Um bioprocessos é caracterizado por qualquer processo no qual há participação de um agente biológico, como bactérias, fungos ou leveduras, dentre outros. Nesse processo existe um conjunto de operações no qual ocorre transformação de substrato em produto por rota bioquímica. Em bioprocessos fermentativo o foco é a utilização de microrganismos como maquinário para obtenção de produtos biotecnológicos (PEREIRA et al, 2008).

A fermentação é um bioprocessos que consiste basicamente em metabolizar e biotransformar carboidratos em álcool e gás carbônico através de microrganismos, sob condições específicas (INGLEDEW, 2009).

A utilização de microrganismos para produção de compostos de aroma por fermentações é uma área promissora e em ascensão, em que surge também o conceito de biotransformação. Ela pode ser definida como uma reação química catalisada por enzimas ou por microrganismos (BICAS, 2009; LEUENBERGER, 1990). Muitos processos de biotransformação resultam em compostos dificilmente obtidos por métodos químicos convencionais (JANSSENS et al., 1992).

A maioria dos aromas utilizados no mundo são obtidos por processos químicos. No entanto, a fabricação de aromas por esses processos pode resultar na ocorrência de altos impactos ambientais por gerarem resíduos não biodegradáveis. Mesmo assim, esses processos são responsáveis pelas maiores escalas de produção até o momento (BICAS, 2009).

A extração de aromas a partir de fontes naturais é uma alternativa para a sua produção. Entende-se por fontes naturais a flora e fauna. A extração dos aromas de vegetais implica em algumas desvantagens decorrente de fatores climáticos e sazonais, além do problema pelo excesso do extrativismo vegetal que pode alterar negativamente a biodiversidade (MARÓSTICA JR, 2006).

No sentido de suprir essas desvantagens surgem estudos que analisam a produção desses compostos voláteis aromáticos através da aplicação de microrganismos em biotransformações. Esses compostos voláteis aromáticos são popularmente chamados de bioaromas (BERGER, 1995).

A aplicação dos aromas abrange várias áreas, desde a indústria alimentícia, farmacêutica à indústria de cosméticos. Os aromas aos alimentos são adicionados desde a época pré-histórica. Nos primeiros momentos, a aromatização era feita por especiarias em geral e também por microrganismos. A aplicação de aromas na área cosmética data de 3.000 a.C. com o uso de técnicas de destilação para a produção de perfumes (VASIC-RACKI, 2000).

Nos alimentos, os compostos de aroma são moléculas de baixo peso molecular (em geral menores que 400 Daltons e são frequentemente utilizados como aditivos na indústria de alimentos, bebidas, perfumes e cosméticos, para realçar, reforçar e melhorar o odor do produto, e mesmo sabor, como o caso dos alimentos (BERGER, 1995).

Estes compostos não pertencem a uma única classe química, podem ser hidrocarbonetos, alcoois, cetonas, aldeídos, ácidos, ésteres até lactonas (ácidos cíclicos), éteres, dentre outras (BICAS, 2009). Além de estarem presentes em pequenas concentrações na composição das matrizes alimentícias (ppm ou ppb), os aromas possuem uma grande diversidade de polaridades, solubilidade, volatilidade, temperatura e pH de estabilidade (BERGER, 1995).

Segundo a Resolução nº 2 de 2007 da ANVISA, aromas naturais são aqueles obtidos por métodos físicos, microbiológicos, fermentativos ou enzimáticos a partir de matérias-primas aromatizantes ou aromas naturais. Essa regulamentação é similar às regulamentações internacionais, como norte-americana e europeia.

Uma ferramenta para obtenção de aromas naturais é a sua produção por bioprocessos (SERRA et al., 2005). Essa tendência vem ao encontro das exigências do mercado consumidor, pois atualmente observa-se a preferência pelo consumo de alimentos que contenham ingredientes naturais substituindo os aditivos sintéticos. Os aromas produzidos biotecnologicamente agregam valor aos produtos nos quais são utilizados devido à sua origem sustentável e apelo de ser um produto natural (MARÓSTICA JR., 2006; TAN et al., 1998).

Desta forma, o mercado de aromas busca aromas que possam ser produzidos biotecnologicamente a partir de fontes alternativas e que atendam a demanda (KRINGS; BERGER, 1998). A preferência dos consumidores por consumir compostos mais saudáveis abriu um campo enorme na área dos bioprocessos para produção de aromas naturais, também chamados de aromas biotecnológicos ou bioaromas (DUBAL et al., 2008).

O bioprocessos para produção de bioaromas ocorre por duas vias biotecnológicas: a síntese *de novo* e a biotransformação. A produção de aromas empregando-se apenas os meios de culturas convencionais é conhecido como processo de síntese *de novo*. Esses processos acontecem sem a adição de substratos especiais e dependem do arsenal metabólico do microrganismo para a produção de aromas. Em contrapartida, o processo de biotransformação tem como objetivo a utilização de um substrato especial e selecionado previamente, com isso parte da rota metabólica do microrganismo é capaz de biotransformar o substrato em um produto desejado (Serra et al., 2005).

O mercado mundial de bioaromas ainda é pequeno representando apenas 5% do total de aromas produzidos; os 95% restantes são produzidos por métodos químicos (XU et al., 2007). A grande vantagem da síntese de aromas por vias microbianas é que um composto biossintetizado é considerado e rotulado como “natural”. Os processos conhecidos buscam produtos naturais com maior valor agregado e estão em melhoramento constante (TAN et al., 1997).

2.2 PRODUÇÃO DE AROMAS POR FUNGOS

Os processos envolvendo microrganismos desempenham um papel fundamental nos aromas presentes nos alimentos, como é o caso das cervejas, vinhos, queijos e molhos de soja, por exemplo (PINTO, 2017).

Omelianski (1923), um dos pioneiros mundiais a estudar a produção de aromas por microrganismos, analisou que os bioaromas produzidos dependem das várias famílias biológicas dos microrganismos. Leveduras, fungos e bactérias imprimem aromas cada qual com suas especificidades. Omelianski ainda aborda os bioaromas mais importantes até então produzidos por fungos leveduriformes, as leveduras dos gêneros *Mycoderma*, *Pichia*, *Willia* e *Torula* têm propriedades de produção desde muito cedo conhecidas.

A utilização de microrganismos em produção de compostos de aroma evoluiu com o tempo e o espectro de compostos voláteis produzidos por fungos é o que mais se aproxima da grande variedade e complexidade de aromas produzidos espontaneamente pelas plantas na natureza (KRINGS et al, 1998). Após esse desenvolvimento, foi possível identificar uma grande gama de processos para a produção dos mais diversos compostos por fungos como vanilina (FALCONNIER et al, 1994), benzaldeídos (FABRE et al, 1996), metil salicilato (WELSH, 1994), metil benzoatos e etil benzoatos (KAWABE et al, 1993), álcool feniletílico e ésteres (WELSH, 1994), 1-octanol e 1-octanona (ARMSTRONG et al, 1993), pirazinas (SEITZ, 1994), linalol, geraniol e citronelol (WELSH, 1994), cumarinas (BERGER, 1995), metil cetonas (ARMSTRONG et al, 1993), os jasmonatos e o ácido jasmônico (MIERSCH et al, 1993) entre muitos outros descritos (PINTO, 2017).

Uma discussão importante sobre bioprocessos para produção de bioaromas é a utilização de terpenos para tal, através de uma biotransformação.

Biotransformação remete a modificação de substâncias utilizando microrganismos, por meio de reações simples e quimicamente definidas (PINHEIRO, 2004).

Nos processos de biotransformação, a seleção dos microrganismos é apontada como uma das principais etapas. Isso justifica-se pelo fato de que o substrato utilizado nos processos de biotransformações devem ser pensados para cada microrganismo e a biotransformação dos terpenos é uma alternativa viável para produção de bioaromas (PINHEIRO, 2004).

A caracterização dos microrganismos existentes nos diversos alimentos é responsável pelos avanços da biotecnologia moderna na indústria alimentícia e da agricultura. As ferramentas de biotecnologia a partir da elucidação do DNA possibilitaram uma identificação a nível de espécie, muitas vezes difícil por métodos convencionais de taxonomia (CANHOS, 2003).

Com o avanço da informática e técnicas computacionais, a biotecnologia imprime resultados cada vez mais detalhados sobre os seres vivos e/ou biomoléculas (MALMSTROM, 2001). Por exemplo, tecnologias de sequenciamento de DNA tornaram-se técnicas essenciais para essa ciência, pois trazem esclarecimentos para várias lacunas do conhecimento em áreas como arqueologia, genética, microbiologia, biologia celular, ciências forenses, entre outras (FRANÇA et al., 2002). A interação da biologia computacional e da biologia experimental permite, por meio da utilização de bancos de dados biológicos, uma compreensão do organismo (COSTA, 2015).

2.3 CAFÉ

O café é a bebida não alcoólica mais consumida ao redor do mundo e é extremamente importante na produção agropecuária de mais de 50 países (SELVAMURUGAN et al., 2010).

O café desempenha um importante papel em vários cenários brasileiros, como na perspectiva econômica, política, social e ambiental. O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, e, o segundo maior consumidor mundial (THOMAZIELLO et al., 1996). O mercado do café perde apenas para o mercado do petróleo, em termos de quantidade de dinheiro movimentado no mundo (VENTURIM, 2000).

Embora exista um grande número de espécies de café (aproximadamente 80), somente o *Coffea arabica* e *Coffea canephora* têm importância econômica mundial (BERTHAUD et al., 1988). Aproximadamente 70% do café brasileiro provém de cultivos selecionados de *C. arabica* (AGRIANUAL, 2005).

Destacam-se no Brasil seis estados produtores de café: Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Bahia e Rondônia (ORMOND, 2002). O estado considerado o maior produtor é Minas Gerais, correspondendo a aproximadamente 50% da produção nacional (PEREIRA et al., 2006).

A produção do café pode ser através de dois processos, o úmido e o seco. O processo úmido é caracterizado por um estilo de produção onde as frutas são despulpadas e então submetidas à fermentação em tanques com água até a finalização com a drenagem d'água até aproximadamente 12% (MURTHY et al, 2012). Esse tipo de processo não é o mais usado no Brasil, mas está ganhando espaço por se tratar de um jeito eficaz para agregar valor ao café tornando-o especial (GONÇALVES et al., 2008). Em geral, cafés processados por via úmida são conhecidos por apresentarem maior acidez e aroma do que cafés processados a seco.

A qualidade da bebida do café está associada a diversos fatores. Como principais salienta-se a composição química do grão, determinada por fatores genéticos, biológicos e ambientais; e os processos envolvendo preparo e conservação dos grãos, os quais estão diretamente ligados com variáveis como umidade, temperatura e fermentações microbianas (CARVALHO, 1985).

Um contribuinte crítico para a qualidade da bebida do café é a série de processos pós-colheita realizados para obter grãos secos adequados para torrefação (HUCH & FRANZ, 2015).

Durante a produção de café pelo processo úmido, na fermentação acontece a ação dos microrganismos que naturalmente vivem na fruta, como leveduras, bactérias e fungos filamentosos. A fermentação nesse caso ajuda a agregar sabor ao produto final através dos *flavours* produzidos pelos microrganismos (EVANGELISTA et al., 2014).

Mesmo sabendo que existem fungos associados ao café e que estes podem imprimir alterações qualitativas no produto final, existem poucos trabalhos na literatura brasileira que correlacionam esses fungos do café (ALVES, 1996). Segundo Soccol

(2014), os microrganismos encontrados na fermentação do café são: *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Candida glabrata* e *C. quercirusa*. Outros trabalhos destacam também a ocorrência de *Pichia anomala*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* e *Torulaspota delbrueckii*. Etanol, acetaldeído e ácido acético são exemplos de compostos metabólitos primários produzidos por leveduras durante a despulpa do café.

Nesse sentido, sabendo que a preocupação atual do setor cafeeiro é agregar valor ao seu produto, ou seja, agregar insumos ou serviços ao café que valorizem seu preço (SANCHEZ, 2007) surge a possibilidade de internalizar aos cafés tradicionais bioaromas e com isso agregar valor ao produto. Estratégias para agregar valor ao produto são tido como “commodity” (VALLANO, 2008).

O commodity permite ao café sua rotulação como café especial. Esses cafés diferenciam-se dos convencionais por apresentarem uma qualidade superior, ou ainda por possuírem valores socioambientais sustentáveis intrínsecos em sua produção (TAVARES, 1998).

Os cafés especiais representam aproximadamente 15% do mercado da bebida (SOUZA et al., 2001) e principais categorias de cafés especiais são: café de origem certificada, café gourmet, café orgânico, café *fairtrade* e café certificado com responsabilidade social e ambiental (MARCOMINI, 2008).

2.3.1 Café Especial

Os cafés especiais são produtos com altíssima qualidade e a sua produção e comercialização estão em ascensão. O maior consumidor de café especial são os Estados Unidos e, em 2007, importaram cerca de 180 mil toneladas. O Brasil produz mais de 40% do café especial comercializado no mundo (UNICAMP, 2002).

Os cafés especiais diferenciam-se dos convencionais por diversos fatores, como principais pode-se apontar: qualidade da bebida, origem dos plantios, aromatização, processamento industrial e também fatores correlacionados com sustentabilidade econômica, ambiental e social durante a produção. (MARCOMINI, 2008).

O valor do preço dos cafés especiais pode chegar a ser até 100% superior em relação ao café convencional. Em casos excepcionais mostram-se ainda mais valiosos, como exemplo, no concurso Florada Premiada as sacas de café especiais foram vendidas por 7 mil reais (UNIS, 2018).

Diante disso, novas estratégias que visam a consolidação do mercado de cafés especiais no Brasil surgem, tais quais geralmente compreendem algum atributo de qualidade e/ou modificações nos processos de produção e comercialização do produto, conhecidas como estratégias de diferenciação. Essas estratégias são implementadas por pequenos produtores ou produtores independentes como forma de driblar a quantidade de produção e conseguir boa rentabilidade (SAES et al., 2006). Nesse contexto, Saes (2006), aponta:

A diferenciação do café pode assumir várias formas e pode-se defini-lo a partir do conceito de cafés especiais: O conceito de cafés especiais está intimamente ligado ao prazer proporcionado pela bebida. Tais cafés destacam-se por algum atributo específico associada ao produto, ao processo de produção ou a serviço a ele relacionado. Diferenciam-se por características como qualidade superior da bebida, aspecto dos grãos, forma de colheita, tipo de preparo, história, origem dos plantios, variedades raras e quantidades limitadas, entre outras.

Uma estratégia de diferenciação é a mudança de processo industrial do café adicionando substâncias de seu produto final, tais como os compostos aromáticos (SEBRAE-MG, 2001). O uso de processos fermentativos envolvendo microrganismos aromáticos vem ganhando espaço como forma de agregar valor aos produtos desenvolvidos pelas pequenas produções de Minas Gerais e, com isso, novo *flavours* de destaque estão sendo adicionados em cafés (DEMITO, 2018).

3. METODOLOGIA

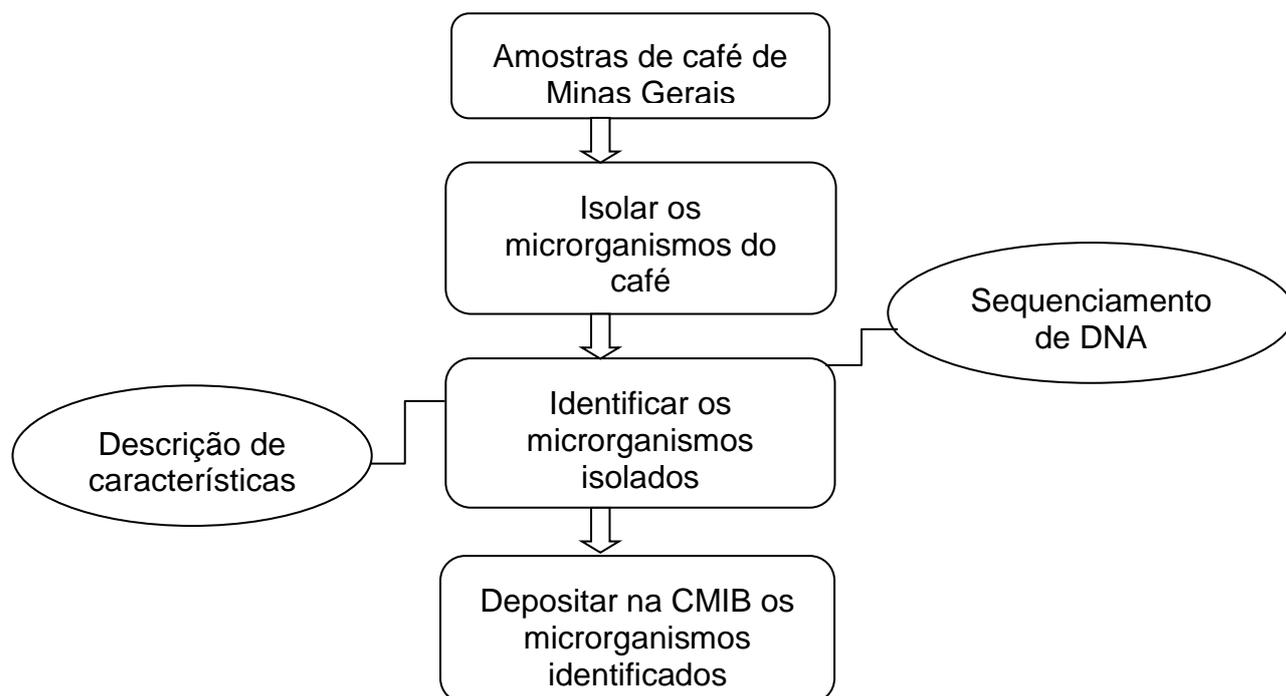
3.1 PROPOSTA METODOLÓGICA

O trabalho tem uma natureza aplicada de pesquisa, aborda o problema de uma maneira quantitativa e qualitativa, com objetivos exploratórios e com procedimentos experimentais.

3.2 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

O desenvolvimento da pesquisa foi realizado em algumas etapas visando chegar aos objetivos propostos. O trabalho foi iniciado com um trabalho realizado por pequenos produtores de Minas Gerais que visavam agregar valor à sua pequena safra. Sobre condução em pequena propriedade foram realizadas fermentações dos grãos de café. Amostra destes tratamentos foram enviadas para a UTFPR-PG para contribuir com informações quanto aos microrganismos que estavam envolvidos nestas fermentações que geraram naqueles produtos sabores tão distintos. Chegando ao laboratório as amostras foram mantidas em refrigerador para a realização das etapas posteriores, iniciadas com o isolamento das linhagens encontradas, destas amostras procede-se para a identificação molecular. As etapas estão descritas de acordo com o seguinte o Fluxograma 1.

Fluxograma 1: Etapas de desenvolvimento da pesquisa



Fonte: Autoria Própria (2018).

3.3 AMOSTRAS DE CAFÉ

Nos cafés o resultado do sabor final é uma consequência de vários fatores, entre eles os tratamentos pós colheita podem realçar características desejáveis para um requintado aroma final. Assim as condições em que ocorre a fermentação são de suma importância pois apresentam ambientes para o desenvolvimento de diferentes metabolismos por microrganismos. Neste trabalho, produtores de Minas Gerais cederam amostras de café fermentados em 4 condições diferentes: Fermentação convencional, fermentação em terreiro terra, fermentação em terreiro suspenso e fermentação em lama asfáltica. As características das amostras cedidas são mostradas abaixo na Figura 2:

Figura 1 - Amostras de café fermentado em 4 condições cedidas por produtores de Minas Gerais para realização da metagenômica.



Fonte: Autoria própria (2018).

A Figura 2 é a imagem das amostras como chegaram, representa as quatro condições de fermentação que foram submetidas. Sendo:

- 1: Fermentação Convencional.
- 2: Fermentação em Terreiro Terra.
- 3: Fermentação em Terreiro Suspenso.
- 4: Fermentação em Lama Asfáltica.

O tratamento prévio das amostras consistiu em preencher um ambiente fechado com capacidade de 120 litros (caixa de fermentação) com o café. Adicionou-se água de despulpa de outro café (30% da água utilizada no despulpamento foi adicionado) à caixa e fermentou-se por 52 horas. Mediu-se pH e temperatura, de duas em duas horas, os valores controlados foram de 3 e 22,4°C, respectivamente.

O café foi retirado da caixa de fermentação e transferido para três diferentes tipos de terreiros, onde permaneceu até atingir umidade aproximada de 15%. Coletou-se amostras de café da caixa de fermentação, do terreiro suspenso, do terreiro de terra e do terreiro de lama asfáltica.

3.4 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Para o isolamento dos fungos transferiu-se dois grãos de café de cada tratamento e colocados no centro de uma placa de Petri contendo meio de cultivo Sabouraud com pH 3 (40g de Dextrose, 10g de Peptona e 15g de Ágar para 1 L de água destilada). Estas placas foram identificadas, fechadas e incubadas a 22,5 °C por 7 dias. Após período de crescimento os microrganismos foram repicados até a obtenção de culturas puras.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Os microrganismos isolados foram caracterizados por coloração, textura, velocidade de crescimento e aroma característico. Esse material então foi separado para proceder a identificar os microrganismos isolados por sequenciamento de DNA. Assim, precisou-se primeiramente extrair o DNA de cada um, amplificar o DNA e purificá-lo, para posterior identificação a partir das bases sequenciadas com o banco de dados de sequências biológicas.

3.5.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA dos fungos, retirou-se aproximadamente 1 cm² de colônia e transferiu-se para microtubos de PCR de volume 1,5 mL contendo tampão CTAB (300 µL) e uma mistura de sílica e celite (proporção de 2:1), então seguiu-se o protocolo estabelecido por Vicente et al (2007). O material foi triturado por aproximadamente 5 minutos com auxílio de pistilos de plástico esterilizados. Em seguida, adicionou-se mais 200 µL de tampão CTAB aos tubos que foram então incubados a 65°C por 10 minutos. Após a incubação adicionou-se 500 µL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1), e homogeneizou-se por inversão dos tubos. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos obtendo-se duas fases: aquosa e orgânica. A fase aquosa foi coletada e transferida para novos tubos esterilizados, acrescentando-se 800 µL de etanol 96% para a precipitação do DNA em freezer -20°C pelo período de 12 horas. Depois da precipitação do DNA,

realizou-se nova centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos e todo o sobrenadante foi descartado. Na sequência, foi procedida a lavagem do DNA obtido com 1000 µL de álcool a 70% gelado.

O DNA obtido teve sua qualidade e integridade verificada em gel de agarose a 0,8% (70 Voltz por 40 minutos), corado com brometo de etídio e visualizado em Transiluminador.

3.5.2 Amplificação do DNA

Com as amostras de DNA isolado, realizou-se a reação de PCR. Os primers utilizados foram o ITS1 e ITS4. O mix usado foi calculado para o volume de 25 µL, onde para os valores de cada reação usaram-se 14 µL de H₂O ultrapura, 2,5 µL de dNTP's, 2,5 µL de tampão Buffer 10X, 1,3 µL do cofator enzimático MgCl₂, 1,3 µL de cada primer, 0,3 µL de enzima Taq DNA Polimerase Platinum e, por fim 2 µL de DNA molde. As condições de amplificação foram: 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, 94°C por 45 segundos para a desnaturação, 52°C por 45 segundos para o anelamento, 72°C por 2 minutos para a extensão e 72°C por 7 minutos para a extensão final. A reação foi realizada em 35 ciclos.

Os produtos de amplificação por PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,4% (70 Voltz por 40 minutos), corado com brometo de etídio visualizado em Transiluminador.

3.5.3 Purificação do DNA

Realizou-se a purificação do produto da PCR para eliminar da reação resto dos reagentes utilizados na amplificação, como por exemplo, primer e dNTP's. O protocolo de purificação foi realizado utilizando o polímero PEG, que foi adicionado ao microtubo da PCR em quantidade proporcional ao volume do produto da PCR (25 µL). Em seguida, prosseguiu-se com incubação a 37°C por 30 minutos, centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos seguido de descarte do sobrenadante com auxílio de micropipeta. Ao novo tubo adicionou-se 125 µL de etanol 80% gelado, submetendo o tubo a centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante novamente foi

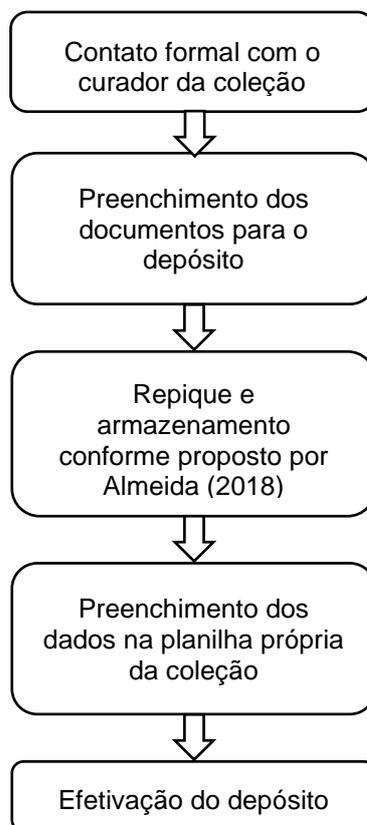
descartado e houve a adição de 125 μL de etanol 96% gelado que foi retirado logo em seguida. Após evaporar o restante do etanol 96% com a ajuda do banho-seco, ressuspendeu-se o DNA purificado em 15 μL de água ultrapura, deixando-o a 37°C por 30 minutos em banho-seco.

3.5.4 Sequenciamento do DNA

Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento na empresa Ludwig Biotec (<https://ludwigbiotec.com.br>), os quais foram preparados de acordo com as normas exigidas pela empresa. As sequências recebidas foram tratadas através do software BioEdit e, em seguida realizada comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na página.

3.6 DEPÓSITO NA COLEÇÃO MICROBIOLÓGICA DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

O depósito das linhagens identificadas na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico da UTFPR-PG seguiu a metodologia proposta por Almeida (2018), inicializando-se com um contato formal com o curador e responsável pela coleção e finalizando com a efetivação do depósito, como está explícito no Fluxograma 2:

Fluxograma 2: Etapas para o depósito na CMIB.

Fonte: Adaptado de Almeida (2018).

As amostras biológicas de DNA e PCR das linhagens, que nesses casos já existiam, também ficam depositadas na CMIB. O contato com a curadoria da coleção foi feito pelo e-mail oficial cmib-pg@utfpr.edu.br.

No período de depósito das linhagens desse projeto na CMIB a responsável pela gestão da coleção era a pós-doutoranda do programa de engenharia de produção, Prof^a. Dr^a. Mariana Nascimento Fidelis.

As informações necessárias para o preenchimento da planilha da coleção eram sobre origem das linhagens, data de coleta, métodos de isolamento e informações de espécie. Então, a codificação de cada linhagem foi feita pelo gestor da coleção seguindo a ordem de depósito. A codificação CMIB é de uso interno, no entanto existe a codificação global e oficial que é um código de CMRP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AMOSTRAS DO CAFÉ

Os grãos recebidos foram previamente caracterizados pelos produtores quanto ao aroma final do café produzido por cada fermentação. Dentre a descrição realizada pelos produtores eles destacam que a Fermentação Convencional apresenta o aroma suave de banana madura, já a Fermentação em Terreiro Terra exala um aroma com características alcoólicas e de maçã verde, enquanto o Fermentação em Terreiro Suspenso imprime um aroma suave de álcool, ao passo que a Fermentação em Lama Asfáltica apresenta um aroma com características alcoólicas e cítrico.

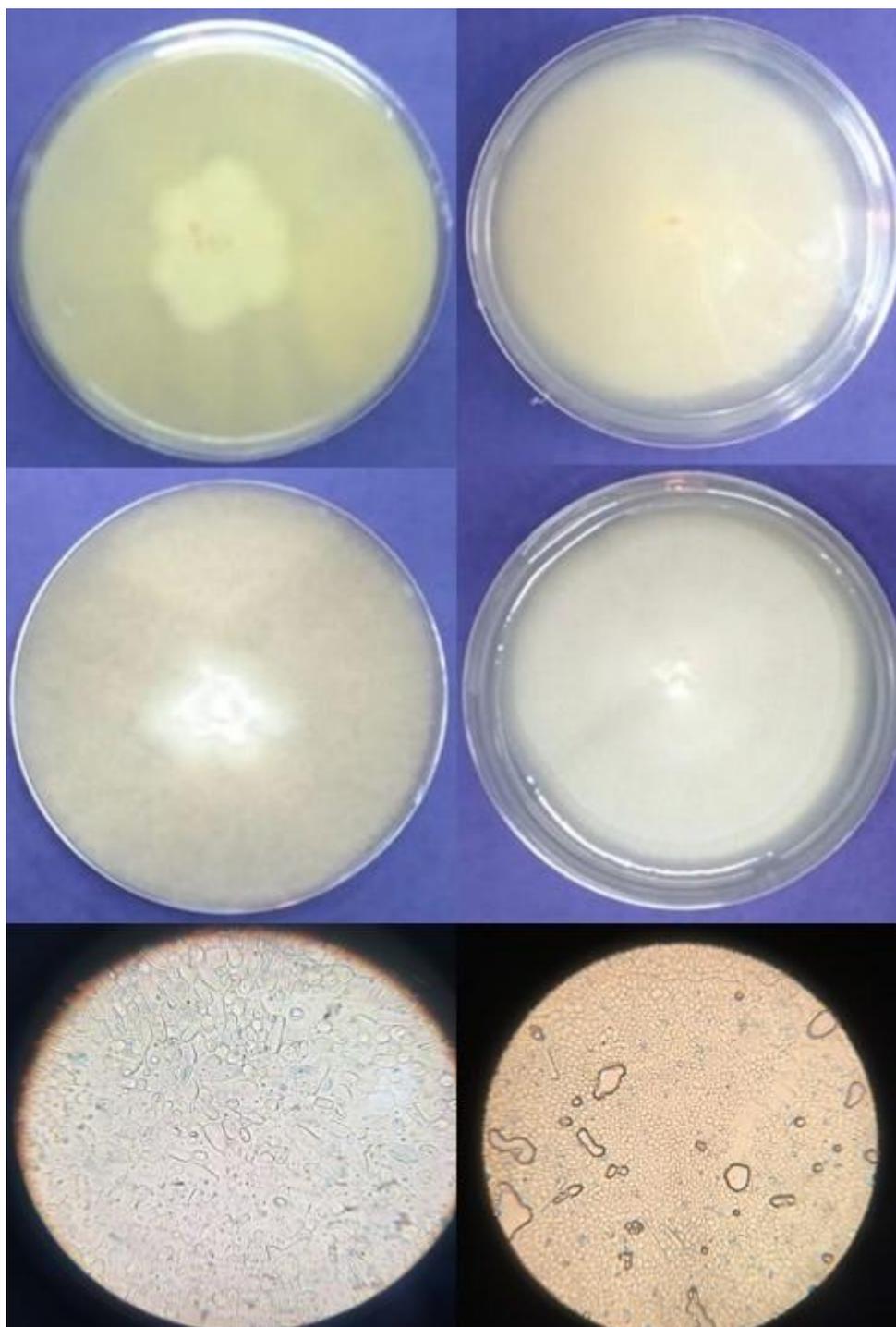
Os aromas classificados são respectivos aos grãos fermentados e após a preparação do produto final agregam sabores diferenciados na bebida de café. Essa classificação é feita rotineiramente pelos produtores rurais através de análise de campo e vivencia empírica. Acredita-se que em cada fermentação os aromas produzidos podem ser produtos de diferentes microrganismos. Para desvendar quais microrganismos estão associados a produção desses aromas sentidos durante às fermentações, começou-se um trabalho de isolamento de microrganismos.

4.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos isolados em meio de cultura tipo Sabouraud foram em sua totalidade fungos filamentosos e leveduriforme. Não houve crescimento de bactérias nas placas de cultivo. Isso foi confirmado através de uma descrição visual das características das colônias isoladas e também por análise dos microrganismos no microscópio, e, esse fato foi confirmado através da identificação molecular por sequenciamento.

Alguns padrões se repetem no aspecto das placas com os microrganismos filamentosos isolados, conforme dado pela Figura 3.

Figura 2: Fotografia dos isolados filamentosos e análise microscópica.

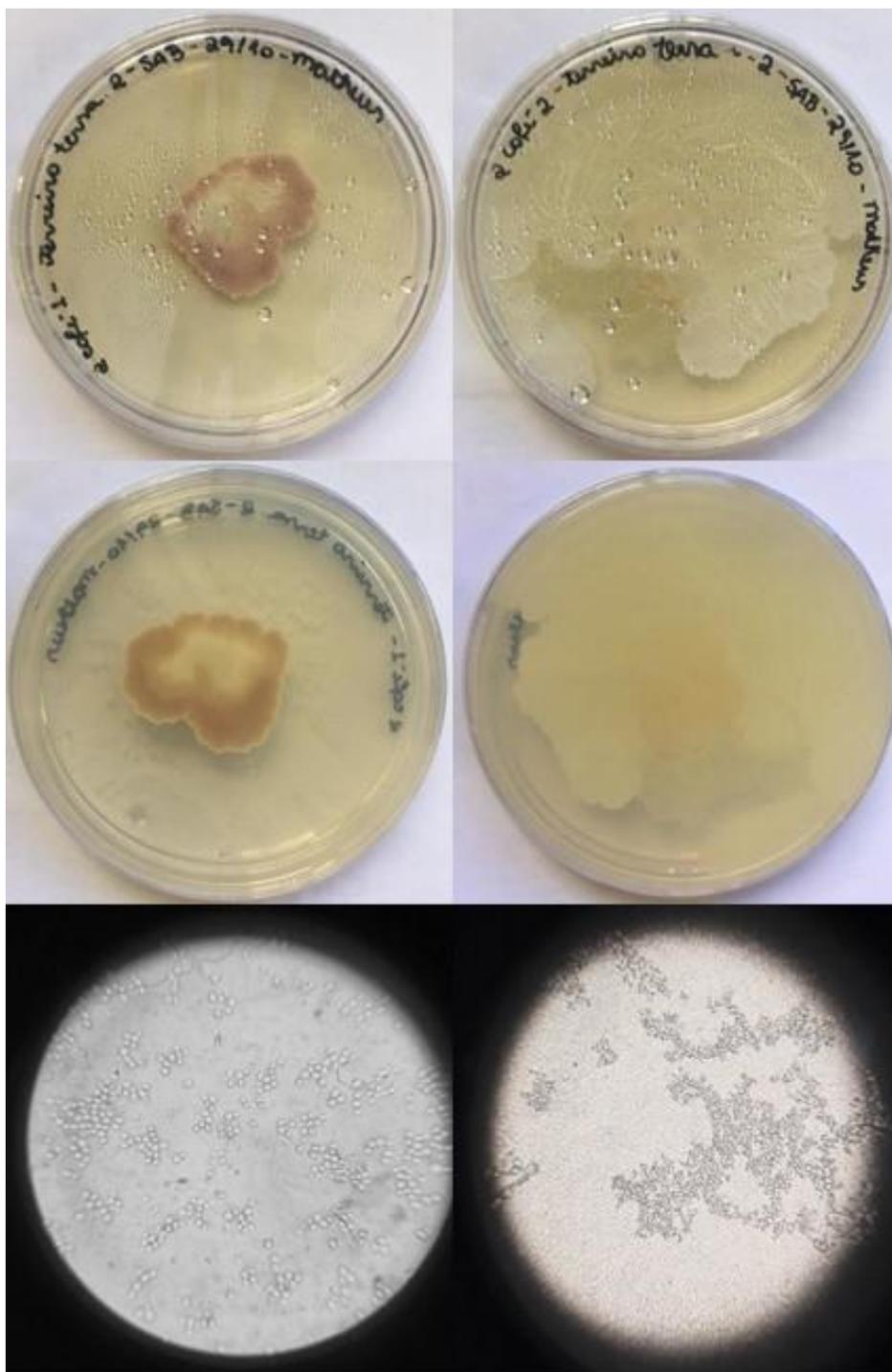


Fonte: Autoria Própria (2018).

Na Figura 3, a primeira linha mostra a foto do verso da colônia, a segunda linha mostra a frente da colônia e a última linha a sua imagem microscópica com aumento de 100x utilizado no equipamento. As colônias de todos os microrganismos isolados foram semelhantes e descritas conforme mostra a Tabela 1.

O aspecto das placas com os microrganismos leveduriformes isolados e da análise no microscópio estão representados na Figura 4, abaixo:

Figura 3: Fotografia dos isolados leveduriformes e análise microscópica.



Fonte: Autoria Própria (2018).

Na Figura 4, a primeira linha mostra a foto da colônia de frente, a segunda linha mostra o verso da colônia e a última coluna a sua imagem microscópica com o

aumento de 40x utilizado no equipamento. Os microrganismos leveduriforme seguiram esses padrões de colônias e aspectos microscópicos.

Os 16 microrganismos isolados foram caracterizados por coloração da colônia, textura da colônia, velocidade de crescimento e aroma característico exalado. Tais características estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1: Características dos microrganismos isolados.

| Fermentação | Código | Coloração | Textura | Crescimento | Aroma característico em laboratório |
|--------------------|---------------|------------------|----------------|--------------------|--|
| Convencional | 1F | Branco | Fofa | Rápido | Possui |
| Convencional | 2F | Branco | Fofa | Rápido | Possui |
| Convencional | C2F1 | Rosa | Rugoso | Lento | Possui |
| Lama Asfáltica | C2A | Branco | Fofa | Rápido | Possui |
| Lama Asfáltica | 1A | Branco | Fofa | Rápido | Possui |
| Lama Asfáltica | C1TT2 | Rosa | Rugoso | Lento | Possui |
| Lama Asfáltica | C2TT1 | Bege | Lisa | Médio | Possui |
| Lama Asfáltica | C2TT2 | Bege | Lisa | Médio | Possui |
| Terreiro Suspenso | 2S | Branco | Fofa | Rápido | Possui |
| Terreiro Suspenso | 1S | Branco | Fofa | Rápido | Possui |
| Terreiro Suspenso | C1S1 | Rosa | Rugoso | Lento | Possui |
| Terreiro Suspenso | C2S1 | Bege | Lisa | Médio | Possui |
| Terreiro Terra | 2PF | Branco | Fofa | Rápido | Possui |
| Terreiro Terra | 1PF | Branco | Fofa | Rápido | Possui |
| Terreiro Terra | C1TL1 | Bege | Lisa | Médio | Possui |
| Terreiro Terra | C2TL1 | Bege | Lisa | Médio | Possui |

Fonte: Autoria Própria (2019).

O crescimento foi dado de acordo com a quantidade de dias que a colônia demorou para ganhar espaço. Colônias que cresceram em até 3 dias foram classificadas como rápidas, colônias que cresceram de 3 a 5 dias foram classificadas como médias e colônias que cresceram de 5 a 7 dias foram classificadas como lentas. Além disso, cada microrganismo em seu crescimento produziu aromas notados na estufa em que ele foi posto para crescimento, portanto todos eles foram classificados como possuidores de aromas.

Notou-se que das fermentações, da do tipo asfalto isolou-se 5 microrganismos diferentes, da do tipo suspenso isolou-se 4 microrganismos diferentes, já da do tipo

convencional apenas 3 microrganismos foram isolados, ao passo que da fermentação em terreiro terra 4 microrganismos foram isolados.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A identificação molecular dos microrganismos foi feita através de sequenciamento de DNA. Para tal, precisou-se extrair, amplificar e purificar o DNA de cada microrganismo. A qualidade da extração, amplificação e purificação foram verificadas por gel de agarose através de eletroforese.

4.3.1 Extração de DNA

O método de extração de DNA utilizado foi eficiente na extração de todas as amostras. A Figura 5 mostra a imagem do gel de agarose da extração final e eficiente para todos os 16 microrganismos isolados.

Figura 4: Gel de agarose de extração.



Fonte: Autoria Própria (2018).

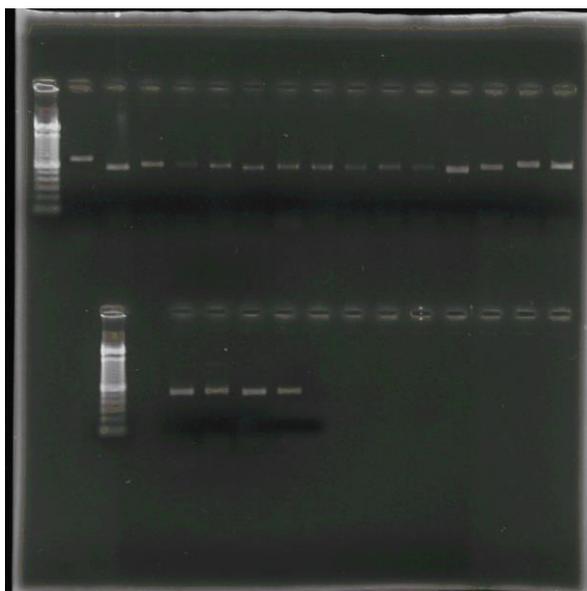
Durante a eletroforese as moléculas presentes foram separadas devido à diferença de velocidade de migração no gel. A partir da garantia da extração do DNA dos microrganismos, pode-se amplificá-lo através do PCR.

Um DNA de boa qualidade caracteriza-se por uma banda bem definida, sem arrastes, sem a presença de RNA mais abaixo no gel e sem a presença de proteínas no poço.

4.3.2 Amplificação do DNA

A reação de amplificação de DNA seguiu o procedimento descrito na metodologia desse trabalho. O resultado do gel de agarose obtido está mostrado na Figura 6.

Figura 5: Gel de agarose da reação de cadeia polimerase do DNA.



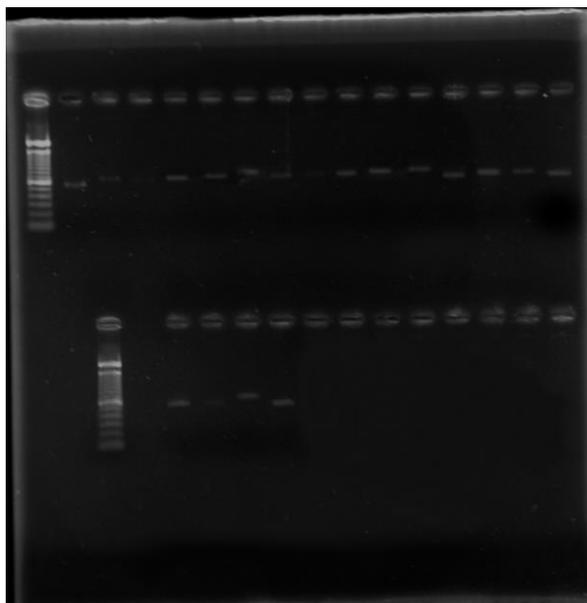
Fonte: Autoria própria (2018).

No gel de PCR nota-se presença de algumas impurezas em seus poços, e, por isso justifica-se a purificação do DNA. Quando comparado com o marcador de peso molecular, nas primeiras bandas de cada coluna, a banda tem 500 pares de bases, isso caracteriza que a região amplificada corresponde a região ITS utilizada. Trabalhos de Alves (1996) e Pietrowiski (2011) demonstram essas mesmas características.

4.3.3 Purificação do DNA

A purificação de DNA seguiu a metodologia proposta e foi possível purificar o DNA das 16 amostras de microrganismos isolados. A Figura 7 mostra o gel de agarose comprovando a qualidade e eficácia da purificação.

Figura 6: Gel de agarose de purificação do DNA.



Fonte: Autoria Própria (2018).

Após cada amostra de DNA dos microrganismos isolados ser purificada, mandou-se as amostras para sequenciamento terceirizado na empresa Ludwig Biotec.

4.3.4 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA permitiu a identificação dos microrganismos em nível de espécie, as espécies encontradas foram para os fungos filamentosos: *Geotrichum candidum* e *Galactomyces candidus*. Já as espécies encontradas de fungos leveduriformes foram: *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* e *Pichia fermentans*.

Dos 8 fungos filamentosos, 5 deles tiveram sua sequência de DNA 100% compatível para a espécie de *Geotrichum candidum*. Os outros 3 foram na totalidade compatível com *Galactomyces candidus*. Das leveduras encontradas, do gênero *Pichia*, 4 delas são *Pichia kudriavzevii*, 3 delas são *Pichia membranifaciens* a última encontrada foi *Pichia fermentans*, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Taxonomia dos microrganismos sequenciados.

| Código | Táxon - Family | Táxon - Genus | Táxon (IDName) | Epíteto |
|--------|----------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------|
| C2A | <i>Pichiaceae</i> | <i>Pichia</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>membranifaciens</i> |
| 1A | <i>Pichiaceae</i> | <i>Pichia</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>kudriavzevii</i> |
| 2S | <i>Pichiaceae</i> | <i>Pichia</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>membranifaciens</i> |
| 1F | <i>Pichiaceae</i> | <i>Pichia</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>kudriavzevii</i> |
| 2PF | <i>Pichiaceae</i> | <i>Pichia</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>kudriavzevii</i> |
| 1PF | <i>Pichiaceae</i> | <i>Pichia</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>membranifaciens</i> |
| 2F | <i>Pichiaceae</i> | <i>Pichia</i> | <i>Pichia fermentans</i> | <i>fermentans</i> |
| 1S | <i>Pichiaceae</i> | <i>Pichia</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>kudriavzevii</i> |
| C1S1 | <i>Dipodascaceae</i> | <i>Geotrichum</i> | <i>Geotrichum candidum</i> | <i>candidum</i> |
| C2F1 | <i>Dipodascaceae</i> | <i>Geotrichum</i> | <i>Geotrichum candidum</i> | <i>candidum</i> |
| C1TT2 | <i>Dipodascaceae</i> | <i>Galactomyces</i> | <i>Galactomyces candidus</i> | <i>candidus</i> |
| C1TL1 | <i>Dipodascaceae</i> | <i>Geotrichum</i> | <i>Geotrichum candidum</i> | <i>candidum</i> |
| C2TL1 | <i>Dipodascaceae</i> | <i>Geotrichum</i> | <i>Geotrichum candidum</i> | <i>candidum</i> |
| C2S1 | <i>Dipodascaceae</i> | <i>Geotrichum</i> | <i>Geotrichum candidum</i> | <i>candidum</i> |
| C2TT1 | <i>Dipodascaceae</i> | <i>Galactomyces</i> | <i>Galactomyces candidus</i> | <i>candidus</i> |
| C2TT2 | <i>Dipodascaceae</i> | <i>Galactomyces</i> | <i>Galactomyces candidus</i> | <i>candidus</i> |

Fonte: Autoria própria (2019).

Percebeu-se que os diferentes processos fermentativos podem favorecer diferentes espécies de microrganismos. As diferentes fermentações de cafés apresentaram os microrganismos listados anteriormente na Tabela 2. O gênero *Pichia* foi o único encontrado para as leveduras, já os gêneros *Geotrichum* e *Galactomyces* foram os encontrados para os microrganismos filamentosos isolados.

Já a relação encontrada entre quais espécies foram identificadas nos diferentes processos fermentativos está evidenciada na Tabela 3, onde destaca-se nos tratamentos fermentativos quais foram os microrganismos que estavam presentes.

Tabela 3: Relação dos microrganismos com os tratamentos fermentativos.

| Fermentação | Aroma constatado pelos produtores | Microrganismos isolados a partir das fermentações dos produtores | Código de depósito CMIB |
|-------------------------------|--|--|-------------------------|
| Fermentação Convencional | Aroma suave de banana madura | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 214 |
| | | <i>Pichia kudriavzevii</i> | CMIB 217 |
| | | <i>Pichia fermentans</i> | CMIB 218 |
| Fermentação Terreiro Terra | Aroma com características alcoólicas e de maçã verde | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 207 |
| | | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 210 |
| | | <i>Pichia membranifaciens</i> | CMIB 215 |
| | | <i>Pichia kudriavzevii</i> | CMIB 216 |
| Fermentação Terreiro Suspenso | Aroma suave e alcoólico | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 208 |
| | | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 211 |
| | | <i>Pichia membranifaciens</i> | CMIB 220 |
| | | <i>Pichia kudriavzevii</i> | CMIB 222 |
| Fermentação em Lama Asfáltica | Aroma com característica alcoólica e cítrico | <i>Galactomyces candidus</i> | CMIB 212 |
| | | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 213 |
| | | <i>Pichia membranifaciens</i> | CMIB 219 |
| | | <i>Pichia kudriavzevii</i> | CMIB 221 |

Fonte: Autoria própria (2019).

Os microrganismos que estiveram presentes em todos os tratamentos fermentativos foram o *Geotrichum candidum* e a *Pichia kudriavzevii* o que permite supor que esses podem ser os responsáveis pelos aromas agradáveis relatados pelos produtores rurais em suas análises empíricas de campo. Além disso, as outras espécies encontradas nas fermentações não podem ser descartadas como possíveis produtoras de aromas, uma vez que exalaram aromas característicos no seu crescimento em placa.

Todas as espécies encontradas nas fermentações do café já foram exploradas em outros trabalhos e a literatura já tem várias curiosidades e aplicabilidades sobre tais que podem justificar o porquê das mesmas terem sido encontradas nessas amostras de café.

O gênero *Geotrichum* foi descrito por Johann Heinrich Friedrich Link em 1809, uma vez que esse cientista isolou espécies de *G. candidum* de folhas em decomposição. Em literaturas antigas, ainda do século XIX, muitas vezes o gênero *Geotrichum* é erroneamente tratado como *Trichosporon* e *Protendomyopsis*. Segundo Paes (2016), a diversidade genética desse gênero é grande quando se analisam os envolvidos nos processos de podridões pós-colheita em frutas e hortaliças no Brasil. O fato dessa espécie estar associada com processos de pós-

colheita em frutas e hortaliças no Brasil pode justificar sua presença nas amostras de cafés desse trabalho.

O *Geotrichum candidum* é um fungo que é responsável em frutas e hortaliças pela podridão ácida, o que pode ser uma das causas que justificam os aromas sentidos pelos produtores em suas análises de campo.

Na fermentação em lama asfáltica, além do gênero *Geotrichum*, também foi encontrada a espécie *Galactomyces candidus*, no livro *The Yeasts*, que aborda diversas questões sobre fungos, em seu capítulo 31, escrito por Malloch (1977), traz definições importantes sobre o gênero *Galactomyces* e a conclusão principal é que a espécie encontrada nessa pesquisa, que é a *Galactomyces candidus* é parte de um gênero teleomórfico do gênero anamorfo *Geotrichum*, e por isso, hoje tanto *G. candidus*, quanto *G. candidum* são considerados o mesmo microrganismo em diferentes estágios de desenvolvimento.

A morfologia do *G. candidum* é composta por colônias finas, macias, cremosas e brancas em seu estado de anaformismo. Justamente as características encontradas nas análises morfológicas realizadas com os fungos filamentosos desse trabalho. Essa espécie tem características sexuais próprias, pois a mesma hifa pode apresentar características masculinas e femininas e com isso reproduzir-se sexualmente.

Além disso, o *G. candidum* também é encontrado em solos do mundo todo, como no Canadá, Estados Unidos, Inglaterra, Alemanha e diferentes países da América do Sul e esse fato nos sugere que essa espécie pode ter sido realocada do solo para os frutos de café durante o processo fermentativo.

Uma das aplicações do *G. candidum* é na melhoria de queijos comerciais. Segundo Dias (2007), a utilização de *Geotrichum candidum* na fabricação do queijo *Camembert* é uma boa alternativa para melhores características sensoriais do produto, inovando e melhorando o queijo. Essa espécie tem a característica de colonizar quase toda a superfície dos queijos tipo *Camembert*, *Saint-Nectaire* e *Reblochon* no seu estágio inicial de maturação, fornecendo, através de seus metabólitos secundários produzidos (como lipases, proteases e peptídeos), sabores únicos aos queijos.

Existem inúmeras outras aplicações para o *Geotrichum candidum*, como por exemplo, aplicá-lo na produção de compostos aromáticos. Silva (2012), estudou a possibilidade da utilização das lipases de *G. candidum* para a produção de compostos

aromáticos e concluiu que essa enzima quando imobilizada apresenta capacidade excelente de sintetizar o acetato de butila, bioaroma de abacaxi.

E, nesse sentido, vemos que a utilização dessa espécie para o melhoramento de alimentos já é uma realidade e isso pode estar acontecendo nessas amostras de café, a conclusão efetiva desse fato ainda demanda de outros estudos. O acetato de butila, comprovadamente produzido pela espécie pode ser uma das razões pela qual aromas cítricos são sentidos de alguns processos fermentativos.

Já com relação ao outro gênero encontrado nas amostras de café, o *Picchia*, sabe-se que é pertencente ao reino *Fungi*, filo dos *Ascomycotas*, sub-filo *Saccharomycotina*, a classe *Saccharomycetes*, a ordem *Saccharomycetales*, família *Saccharomycetaceae* (TOMA, 2011). Microrganismos deste gênero possuem características interessantes, como por exemplo, possuem um caminho específico para o consumo de metanol para geração de energia para as células, envolvendo enzimas próprias e únicas. Por isso são chamados de metilotróficos e sua aplicação em processos fermentativos industriais é possível.

De forma geral, o *Pichia sp.* tem muita diversidade no que se refere a habitat natural, morfologia de crescimento, metabolismo, tolerância de stress e propriedades antimicrobianas e tem aplicações em áreas como: biorremediação ambiental, biofarmácia e biocombustíveis (ROMERO, 2012). Uma das espécies mais conhecidas desse gênero é a *P. pastoris*, esse levedo é utilizado em muitos estudos, como a dissertação de Neto (2012), que estudou as secreções desse levedo a suas possíveis aplicações.

A seguir, serão abordadas três espécies identificadas nas amostras fornecidas de diferentes processos fermentativos de café estudados nesse trabalho, sendo elas a *P. membranifacens*, *P. kudriazevii* e a *P. fermentans*. Em geral, existem poucos estudos a respeito destes microrganismos e a literatura existente mostra o potencial das mesmas em serem utilizadas para várias finalidades.

A *P. membranifacens*, encontrada na fermentação em terreiro terra, terreiro suspenso e lama asfáltica, é uma levedura do gênero *Pichia*, encontrada por exemplo no vinho de mesa, e seu crescimento geralmente ocorre em ambientes de teor alcoólico maior que 11%, numa temperatura de 20 °C e não consegue crescer na presença de dióxido de enxofre. Quando presente no meio, produz substâncias como acetaldeído, acetato de etila, acetato de amila e outros componentes não

identificados, porém quantitativamente insignificantes (RANKINE, 1966). Esses componentes têm características próprias de odor, por exemplo o acetato de amila, assim como boa parte dos ésteres de baixo peso molecular, imprime odor frutado ao meio onde está presente, nesse caso odor de banana. Esse fato pode justificar os aromas sentidos pelos produtores em suas análises de campo.

Além disso, esta espécie produz um tipo de toxina, que tem função de deterioração de fungos, leveduras filamentosas e bactérias (GUIMARÃES, 2016). A toxina é chamada de PMKT2 e tem grande utilidade, um dele é o poder de inibir outras leveduras que causam a deterioração do vinho, por exemplo. Uma das leveduras que pode ser inibida por essa toxina é a *Brettanomyces bruxellensis*, que causa odores e aromas desagradáveis no vinho (SANTOS et al., 2009). Observa-se também, o possível uso dessa toxina como agente biocontrolador para a doença do mofo cinzento em videiras. A efetividade da toxina depende de fatores como o pH, que deve estar em torno de 4,0, e a temperatura, que deve permanecer em torno de 20°C. A produção da toxina pela levedura é estimulada em presença de detergentes não-iônicos (SANTOS et al., 2004). Nesse trabalho, não foi constatado a presença de bactérias em nenhum dos processos fermentativos, uma boa justificativa para tal é que os fungos isolados produzem toxinas capazes de inibir o crescimento bacteriano, como é o caso da *P. membranifacens* e das outras espécies que posteriormente serão exploradas.

Existem também estudos da utilização desse lêvedo como produtor de aromas, como o de Marques (1998), que estudou a *P. membranifacens* para a produção de aromas frutados. O estudo ocorreu em diversas composições do meio de cultura, temperaturas, pH do meio e tempo de incubação para que fossem identificados os melhores parâmetros de cultura. Os parâmetros que influenciaram de fato na produção do microrganismo foram composição do meio de cultura, tempo e temperatura de incubação. Essa espécie produz acetato de etila, e tem eficiência considerável na produção desse composto, já que a produção começa já na fase ativa de crescimento. Esse fato ajuda a explicar como os cafés fermentados na presença desse microrganismo exalaram aromas tão diferenciados e tiveram tamanho valor agregado em seus produtos finais.

Observa-se que a *P. membranifacens* tem grande potencial de utilização e é relativamente pouco explorado atualmente. Faltam mais estudos que validem suas

condições de uso e abranjam escalas maiores de uso, como por exemplo, na caracterização dos seus aromas produzidos.

Outra espécie encontrada nesse trabalho foi a *P. kudriavzevii*, que vem sendo isolada em vários alimentos, como pães, em produtos fermentados semelhantes a manteiga, no grão de cacau fermentado em Ghanaian, no grão de café, no suco de abacaxi fermentados, suco de laranja e uva, fermentado de mandioca africano, entre outros (CHAN, 2012). Porém, não é uma novidade o aparecimento dessa espécie em grãos fermentados de cafés.

As informações sobre a morfologia desse levedo e como ele se comporta são escassas na literatura e justifica-se por isso estudos relacionados a essa espécie. Por exemplo, um estudo mostra que a toxina produzida por essa levedura pode ser utilizada como antibacteriano contra vários agentes patológico (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas alcaligenes*) (BAJAJ et al., 2013). E, esse pode ser mais um contribuinte do porquê não foi encontrado bactérias nas amostras de cafés fermentados exploradas nesse trabalho.

Chan (2012), aponta que esse microrganismo também tem potencial de produção de xilose para fermentação e transformação em etanol, já que apresenta genes que codificam alguns compostos como xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulocinase, que servem como conversores da xilose em D-xilulose-5-P, utilizada na produção de etanol. Por isso, os aromas com características alcoólicas encontrados nas amostras de cafés podem ter sido gerados por esse microrganismo em questão. Outro estudo que também avalia a possibilidade de utilização do levedo como fonte de xilose para produção de etanol (ELAHI et al., 2018).

A *P. kudriavzevii* também pode atuar na degradação de L-málico para desacidificação de vinhos, sem causar dano a outras propriedades do vinho e causar o surgimento de aromas desagradáveis, causando exatamente o efeito contrário, já que leva aromas frutados à bebida. O mesmo pode ter acontecido na fermentação das amostras de café, uma vez que esses aromas frutados foram identificados. A diferença principal é que no caso do vinho o microrganismo seria adicionado na produção juntamente com o fermentador principal o *S. cerevisiae* melhorando a qualidade e reduzindo custos com o processo de desacidificação (DEL MONACO et al., 2014).

O aparecimento da *P. kudriavzevii* em alimentos é tradicional na culinária coreana com um prato conhecido e chamado de *kimchi*. A produção desse condimento, se dá através da fermentação do *kimchi* cru, através de várias espécies de microrganismos. Porém, a levedura em questão, acaba mudando a textura do prato e por isso sua presença nesse tipo de fermentação não é bem-vinda (MOON et al., 2014).

Estudos a respeito desse lêvedo, como também foi mencionado a respeito da *P. membranifacens*, são escassos, e em sua maioria, o microrganismo estudado é apenas identificado presente. Avaliando os trabalhos já realizados, percebe-se forte potencial para novos estudos a respeito de sua aplicação.

E, para finalizar, a terceira espécie do gênero *Pichia* encontrada nas amostras de cafés desse trabalho foi a *P. fermentans*. Essa espécie teve sua morfogênese estudada por Sanna et al. (2012), para identificar o motivo que na maçã se comporta como um agente de controle contra *Monilia spp.*, que causa podridão na fruta, e na pêra se comporta como agente patogênico. Observou-se que na pêra ocorre uma produção muito baixa de ureia e fosfato diamônico e a formação de pseudo-hifas, justamente devido aos baixos níveis dos dois compostos citados. Alguns compostos como aminoácidos (metionina, valina e fenilalanina), metionol, 1-butanol, isobutanol e isopropanol causam a formação desses filamentos, e feniletanol e álcool isoamilico causam falha na formação dos mesmos. Esses álcoois citados podem contribuir fortemente para os aromas alcoólicos sentidos pelos produtores nas amostras de cafés fermentados estudadas nesse trabalho.

A *P. fermentans* também pode atuar como alternativa sustentável para agente detoxificante em águas residuais de moinhos de azeitona, tóxicas para serem descartados, como mostra o estudo de Taccari & Ciani (2011).

Alguns compostos aromáticos produzidos na fermentação do café pela *Pichia Fermentans* são: acetato de isoamila, acetato de etila, acetaldeído (aroma fruidificado), acetado de n-butil, acetato de isobutil, isobutirato de etila, ácido caprilico, hexanona, e outros álcoois (aroma alcoólico). Ésteres em geral tem aromas de frutas. E compostos como o butaneodiona que tem o aroma amanteigado. O que pode ter acrescentado no aroma exalado das fermentações de café, bem como o butaneodiona pode ter imprimido a suavidade relatada na fermentação em terreiro suspenso.

4.4 DEPÓSITO NA COLEÇÃO MICROBIOLÓGICA DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Foi realizado para todos os microrganismos identificados o depósito na coleção microbiológica de interesse biotecnológico. Depositou-se uma colônia de microrganismos e seus resultados de extração de DNA e de PCR para asilo.

No Paraná, um conjunto de coleções biológicas de interesse biotecnológico que ganha destaque são as Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense (CMRP) (ALMEIDA, 2018). Esse conjunto de coleções, CMRP, foi criado sob a coordenação da Doutora Vania Aparecida Vicente, docente da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Atualmente, as coleções pertencentes a CMRP contam com diversos dados biológicos, como coleções microbiológicas, coleções botânicas e coleções zoológicas que transcendem a UFPR e atingem outras instituições, como a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Ponta Grossa (UTFPR-PG), nesse caso com a Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB) (PROJETO TAXONLINE, 2017).

A CMIB é uma coleção de microrganismos com potencial para aplicação biotecnológica, implementada e fundada em 2018 na UTFPR-PG sob a curadoria da Doutora Juliana Vitória Messias Bittencourt. Nos dias de hoje, a CMIB conta com 149 microrganismos depositados, dentre eles bactérias, fungos filamentosos e leveduriforme. Desses citados, 47 são potenciais produtores de aromas, o que fortalece essa linha de estudo, abrindo margem assim para novos depósitos com essa finalidade (ALMEIDA, 2018).

A Tabela 4 mostra os códigos da CMIB atrelados a cada microrganismo dessa pesquisa depositado.

Tabela 4: Identificação CMIB dos microrganismos.

| Código | Táxon (IDName) | Código CMIB |
|---------------|-------------------------------|--------------------|
| C2A | <i>Pichia membranifaciens</i> | CMIB 219 |
| 1A | <i>Pichia kudriavzevii</i> | CMIB 221 |
| 2S | <i>Pichia membranifaciens</i> | CMIB 220 |
| 1F | <i>Pichia kudriavzevii</i> | CMIB 217 |
| 2PF | <i>Pichia kudriavzevii</i> | CMIB 216 |
| 1PF | <i>Pichia membranifaciens</i> | CMIB 215 |
| 2F | <i>Pichia fermentans</i> | CMIB 218 |
| 1S | <i>Pichia kudriavzevii</i> | CMIB 222 |
| C1S1 | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 208 |
| C2F1 | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 214 |
| C1TT2 | <i>Galactomyces candidus</i> | CMIB 209 |
| C1TL1 | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 207 |
| C2TL1 | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 210 |
| C2S1 | <i>Geotrichum candidum</i> | CMIB 211 |
| C2TT1 | <i>Galactomyces candidus</i> | CMIB 212 |
| C2TT2 | <i>Galactomyces candidus</i> | CMIB 213 |

Fonte: Aatoria própria (2019).

O depósito dos microrganismos identificados na CMIB designa um papel de extrema importância para a conservação e preservação dos espécimes e possibilita a aplicabilidade das mesmas em projetos de pesquisa, processos industriais. O uso dos microrganismos depositados em coleções para desenvolver tecnologias, processos e produtos de interesse industrial possibilita a reprodutibilidade necessária para esses tipos de aplicações.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho cumpriu com os objetivos propostos. As amostras de cafés fermentado em 4 condições diferentes (Convencional, Terreiro Terra, Terreiro Suspenso e Lama Asfáltica) possibilitaram um isolamento eficaz dos microrganismos associados a elas. Através das técnicas utilizadas para extração de DNA, amplificação de DNA por PCR e sequenciamento do DNA amplificado pôde-se classificar em termos de espécie a taxonomia dos microrganismos isolados.

Com o tratamento das sequencias de DNA em software específico identificou-se dois gêneros principais entre os microrganismos, o *Geotrichum* e o *Pichia*. A comparação da sequência genômica no banco de dados biológicos virtual, NCBI, permitiu a taxonomia completa, sendo desvendada as seguintes espécies: *Geotrichum candidum*, *Galactomyces candidus*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* e *Pichia fermentans*.

Os microrganismos identificados nas amostras de cafés fermentados em diferentes condições já foram relatados na literatura como produtores de aromas e isso possibilita a justificar sua participação na produção dos aromas sentidos pelos produtores em suas análises de campo empíricas e relatados no início do desenvolvimento desse trabalho.

Todos os microrganismos identificados são associados à importância de diferentes trabalhos publicados na literatura e o seu depósito na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (sob os códigos CMIB 207, CMIB 208, CMIB 209, CMIB 210, CMIB 211, CMIB 212, CMIB 213, CMIB 214, CMIB 215, CMIB 216, CMIB 217, CMIB218, CMIB 219, CMIB 220, CMIB 221 e CMIB 222) permite a exploração de novas oportunidades de aplicação para os microrganismos, além de garantir a conservação e preservação dessas espécies.

Esse trabalho permitiu a identificação dos microrganismos produtores de aromas em cafés especiais e findou que esses reproduzem seus aromas em laboratório, tais microrganismos estão preservados na CMIB. Então, esses microrganismos depositados têm o potencial de se transformarem em produto, desde que trabalhos futuros testem blends e façam testes apropriados para que esses microrganismos sejam aplicados em grãos de café e reproduzam os aromas encontrados nessas fermentações.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Luciana de. **Gestão da coleção microbiológica de interesse biotecnológico na UTFPR Ponta Grossa**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - UTFPR – Ponta Grossa, 2018.

ALVES, Eduardo. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e às fases pré e pós colheita – relação com a bebida e local de cultivo**. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, 1996.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **RDC Nº 2: Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes**. 1. ed. Brasília: 2007. p.47. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/documents/1018376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a0940b. Acesso em: 10 set. 2018.

ARAUJO, D. M. F. et al. Emprego da levedura *Pichia membranifaciens* CE015 imobilizada em suporte de alginato de cálcio para redução da acetofenona. In: **Embrapa Amapá-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 53., 2013, Natal. Química e sociedade: motores da sustentabilidade: anais. Natal: ABQ; UFRN, 2013.

ARMSTRONG DW, BROWN LA, PORTER S, RUTTEN R. Biotechnological derivation of aromatic flavour compounds and precursors. In: Schreier P, Winterhalter P (eds) **Progress in flavour precursor studies**. Allured, Carol Stream, Ill, p. 425-438, 1993.

BAJAJ, Bijender Kumar; RAINA, Sandeepu; SINGH, Satbir. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 8, p. 645-656, 2013.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses**. 4th ed. Weinheim: Wiley - VCH, 2001.

BERGER, R. G. – **Aroma Biotechnology**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. 240 p.
BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee: Agromy**. London: Elsevier Applied Science, 1988. v.4, p. 1-42.

BICAS, J.L. – **Estudos de obtenção de bioaromas pela biotransformação de compostos terpênicos**. Tese de doutorado, 2009.

BIOTECHNOLOGY INDUSTRY ORGANIZATION (BIO). Guide to Biotechnology: 2008. Washington, DC: BIO, 2008.

BOUTROU, R., GUÉGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n.1, p. 1-20. 2005.

BRASIL. Decreto 6.041. **Política de Desenvolvimento da Biotecnologia**. Brasília: Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. 2007.

CANHOS, V. P. **Estratégia Nacional de Diversidade Biológica – Microrganismos e Biodiversidade de Solos**, 2003. Disponível em:

<http://www.bdt.fat.org.br/publicações/politica/gtt/gtt10>. Acesso em outubro de 2018.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n. 126, p. 79-92, 1985.

CEREGUINO, J. L., CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylophilic yeast by *Pichia Pastoris*. **FEMS Microbiol.** v.24, p. 45-66, 2000.

CHAN, Giek Far et al. **Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12**, a potential producer of bioethanol and phytase. 2012.

CORREA, P. R. **Café fermentado por alunos de Engenharia Agrônoma é premiado em concurso**, 2018. Disponível em: <http://noticias.unis.edu.br/cafe-fermentado-por-alunos-de-engenharia-agronomica-e-premiado-em-concurso>. Acesso em: 28 nov. 2018.

DEL MONACO, Silvana Maria et al. Selection and characterization of a P atagonian *P ichia kudriavzevii* for wine deacidification. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 2, p. 451-464, 2014.

DEMITO, M. L. ; BASÍLIO, Paula R C ; SANTOS, M. C. ; MEDINA-MACEDO, L. ; BITTENCOURT, J. V. M. . **Characterization of yeast related to aromatized coffee**. In: 2nd Biotechnology Ibero-American Congress and 7th Brazilian Biotechnology Congress, 2018, Brasilia. Annals of 2nd Biotechnology Ibero-American Congress and 7th Brazilian Biotechnology Congress, 2018.

DAVENPORT, T. H. **Ecologia da informação**: por que só a tecnologia não basta para o sucesso na era da informação. São Paulo: Futura, 1998.

DELEST P. **Natural flavours: biotech limited or unlimited.** In: Étiévant. P, Schreier P (eds) Bioflavour 95. INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) Paris, pp 13-19. 1995.

DRUMMOND, Isabela, **Avaliação da atividade de patenteamento em biotecnologia no brasil no período de 1996 a 2007.** Dissertação de mestrado em genética, 2009, Belo Horizonte – Mg - UFMG.

DUBAL, S.A; TILKARI, W.P; MOMIN, S.A; BORKAR, I.V. Biotechnological routes in flavor industries. **Advanced biotechnology**, 20-31, 2008.

ELAHI, Amina; REHMAN, Abdul. Bioconversion of hemicellulosic materials into ethanol by yeast, *Pichia kudriavzevii* 2-KLP1, isolated from industrial waste. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 50, n. 4, p. 417-425, 2018.

EVANGELISTA, S. R., SILVA, C. F., MIGUEL, M. G. P. C. CORDEIRO, C. S. A. C. M. DUARTE, W. F. e SCHWAN, R. F. **Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process.** *Food research international*, 61, 183-195, 2014.

FABRE C.E., BLANC P.J., GOMA G. Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*. **Sci Aliment.** v. 16. p. 61-68, 1996.

FALCONNIER B, LAPIERRE C, LESAGE-MEESSEN L, YONNET G, BRUNERIE P, COLONNACECCALDIB, CORRIEU G, ASTHER M. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: identification of metabolic pathways. **Journal of Biotechnology** v. 37. p. 123-132, 1994.

FIOCRUZ. **Manual de Organização de Coleções Biológicas da Fiocruz –** Exposição de Motivos. Disponível em: <http://cbam.fiocruz.br/index?history>. Acesso em: 14 jan. 2019.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agriannual 2005**, Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p.241-256.

FRANÇA, L.T.; CARRILHO, E.; KIST, T. B. **A review of DNA sequencing techniques.** Quarterly Reviews of Biophysics, v. 35, n. 2, p. 169-200, 2002.

FRANCO, M.R.B. **Aroma e Sabor dos Alimentos: Temas Atuais.** São Paulo: Livraria Varela. p.246, 2003.

GIACCHIETTA, J., **Estratégia empresarial e vantagem competitiva na produção de cafés especiais**. Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção na Agropecuária (Mestrado). Alfenas, Minas Gerais. 2011.

Gonçalves, M., GUERREIRO, M. C. OLIVEIRA, M. L., ROCHA, C. L. Materiais a base de óxido de ferro para oxidação de compostos presentes na despolpa do café. **Química nova**. n. 31, p 1636-1640, 2008.

GUIMARÃES, MATILDE. **Diversidade e afiliação filogenética de leveduras associadas á plantas de sorgo sacarino [sorghum bicolor (L.) moench] cultivadas no cerrado**. 2016. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas.

HARTNER, F. S., GLIEDER, A. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Fact**. 2006 Dec 14; v.5, p. 39.

HUCH, M. e FRANZ, C. M. A. P. Coffee: Fermentation and microbiota. **Advances in fermented foods and beverages**. p. 501-513. Woodhead Publishing, 2015.

INGLEDEW. **The Alcohol Textbook**. Nottingham: Nottingham University Press, 2009, p. 239-259. 2009.

ISIQUE, W. D.; CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Sulfur levels and acceptance of “cachaça”, a Brazilian sugar cane spirit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 356-359, 1998.

J. W. Carmichael (1957) *Geotrichum Candidum*, **Mycologia**, 49:6, 820-830, DOI: 10.1080/00275514.1957.12024694

JANSSENS, L.; DE POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. – Production of flavours by Microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 195-215, 1992.

KAWABE T., MORITA H. Volatile components in culture fluid of Polyporus tuberaster. **Journal of Agric Food Chem** v.41. p. 637-640, 1993

KRINGS, U., BERGER, R.G. Biotechnological production of flavors and fragrances. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49. p.1-8, 1998.

KRINGS, U.; HARDEBUSCH, B.; ALBERT, D.; BERGER, R.G.; MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. Odor-active Alcohols From the Fungal Transformation of α -Farnesene. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 9079-9084, 2006.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Yeast systematics and phylogeny—implications of molecular identification methods for studies in ecology. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 11-30.

LEE, P.C; SCHIMIDT-DANNERT, C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 1-11, 2002.

LEUENBERGER, H. G. W. Biotransformation: a useful tool in organic chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 62, n. 4, p 753-768, 1990.

MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L., MCNEIL, B., HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**. v. 22, p.249-270, 2005.

MALMSTROM BO G, ANDERSSON B. **The nobel prize in chemistry: the development of modern chemistry**. In: LEVINOVITZ, A. W.; RINGERTZ, N. (Ed.). **The Nobel Prize: the first 100 years**. Imperial College Press and World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 2001.

MARCOMINI, R. G. **Aspectos econômico-financeiros da produção de café convencional e café especial**. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano, Belo Horizonte, 2008.

MARÓSTICA, JR, M. R.; PASTORE, G.M. Biotransformation of citronellol in Rose-Oxide Using Cassava Wastewater as a Medium. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 690-696, 2006.

MARQUES, Danielle Barbosa et al. **Produção e caracterização de aroma de frutas por *Pichia membranaeficiens***. 1998.

MASIH, E. I.; PAUL, B. Secretion of β -1, 3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. **Current Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 391-395, 2002.

MIERSCH O., GÜNTHER T., FRITSCH W., SEMBDNER G. Jasmonates from different fungal species. **Nat Prod Lett.**, v. 2. p. 293-299, 1993.

MOLINA, GUSTAVO. **Produção biotecnológica de compostos de aroma por biotransformação de terpenos.** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

MOLINA, GUSTAVO. **Prospecção de processos biotecnológicos de interesse industrial.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Campinas, 2010.

MOON, Song Hee et al. *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened Kimchi. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 489-497, 2014.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: a review. **Resources, Conservation and Recycling**, v.66, 45-5.

NETO, Oliveira; DE SOUZA, Osmar. **Identificação e análise funcional de sinais de secreção de *Pichia pastoris*.** 2012.

NOBEL FOUNDATION. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2001.**

OMELIANSKI, V. L. **Aroma-Producing Microorganisms.** Department of General Microbiology, Institute of Experimental Medicine, Petrograd, Russia. October 6, 1923.

ORMOND, J. G. P; PAULA, S. R. L; FAVERET FILHO, P. **Café: (re)conquista dos mercados.** Campinas, 2002.

PAES, S. A. **Diversidade genética de isolados de *geotrichum ssp.* Associados a podridões pós-colheita em frutas e hortaliças no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Viçosa, Minas Gerais, 2016.

PALGAN, I. et al. Combined effect of selected non-thermal technologies on *Escherichia coli* and *Pichia fermentans* inactivation in an apple and cranberry juice blend and on product shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 1-6, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCOL, V.T. Biotechnological potential of agroindustrial residues I. Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v.74, p.69-80, 2000.

PEREIRA, N. J.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos. **Série em biotecnologia**. v.1, 2008.

PEREIRA, R. Artigo técnico "**Qualidade do café**". Disponível em: <http://www.coffeebreak.com.br>. Acesso em 03 out. 2018.

PIETROWISKI, G. A. M. **Isolamento, seleção, identificação e aplicação de leveduras não-convencionais com potencial para produção de aromas em fermentado de maçã**. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PINHEIRO, M. D. **Biotransformação de terpenos em compostos de aroma**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Alimentos, Campinas, 2004.

PINTO, L. L. L. **Produção biotecnológica de álcool feniletílico por fungos filamentosos em meio de cultura desenvolvido com utilização de resíduos de maçã (*malus domestica*)**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2017.

PROJETO TAXONLINE. Disponível em: <http://taxonline.bio.br/index.php#>. Acesso em: 2019.

RANKINE, B. C. *Pichia membranaefaciens*, a yeast causing film formation and off-flavor in table wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 17, n. 2, p. 82-86, 1966.

RIBEIRO, Natália Novais. **Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração**. 2019.

ROMERO, A. M.; MATEO, J. J.; MAICAS, S. Characterization of an ethanol-tolerant 1, 4- β -xylosidase produced by *Pichia membranifaciens*. **Letters in applied microbiology**, v. 55, n. 5, p. 354-361, 2012.

SANCHEZ, A. M. N. **Processo de produção e processo de trabalho na cultura do café: uma comparação entre café commodity e café especial do Sul de Minas Gerais**. Dissertação (Engenharia de Produção) - Universidade Federal de São Carlos, 2007.

SAES, Alexandre Macchione. **Do vinho ao café: aspectos sobre a política de diferenciação**. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/publicacoes/tec1-0206.pdf>. Acesso em 20 dez. 2018.

SAMPAIO, Fábio Coelho. **Seleção de microrganismos para a conversão de xilose em xilitol**. 2001.

SANNA, M. L.; et al. *Pichia fermentans* dimorphic changes depend on the nitrogen source. **Fungal biology**, v. 116, n. 7, p. 769-777, 2012.

SANTOS, A. et al. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. **Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 624-634, 2009.

SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, v. 150, n. 8, p. 2527-2534, 2004.

SIBBR. **Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira**. 2018

SILVA, M.; SÁ, M.R. Coleções vivas: as coleções microbiológicas da Fundação Oswaldo Cruz. **Museologia e Interdisciplinaridade**, v. 9, n. 5, 2016.

SILVA, G. S. **Imobilização de lipase em matriz polimérica para a produção de biomassa**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Pirassununga, São Paulo, 2012.

SCHICK, I.; HALTRICH, D.; KULBE, K. D. Trehalose phosphorylase from *Pichia fermentans* and its role in the metabolism of trehalose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 1088-1095, 1995.

SEITZ E.W. Fermentation production of pyrazines and terpenoids for flavors and fragrances. In: GABELMAN A (Ed.). **Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients**. Wiley, New York, pp 95-134, 1994.

SELVAMURUGAN, M., DORAISAMY, P., MAHESWARI, M. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. **Ecologic. Eng.** v. 36, p. 1686-1690. 2010.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends Biotechnology**, 23, 193–198. 2005.

SOCCOL, C. R.; et al. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans: a review. **Food Chemistry**. n. 272, p. 441-452. 2019.

SOCCOL, C. R.; 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, n. , p.60-66. 2014.

SOUZA, M. C.; SAES, M. A qualidade no segmento de cafés especiais. **Informativo Garcafé**, Seção: O cafezal: artigos e projetos. Disponível em <http://www.coffeekbreak.com.br>. Acesso em 3 nov. 2018.

TACCARI, M.; CIANI, M. Use of *Pichia fermentans* and *Candida* sp. strains for the biological treatment of stored olive mill wastewater. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 12, p. 2385-2390, 2011.

TAN, Q., DAY, D. F. , CADWALLADER, K.R. Bioconversion of (R)- (+)-limonene by *P. digitatum*, **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 29-37, 1997.

TAVARES, E. L. A. **A questão do café commodity e sua precificação: o “C Market” e a classificação, remuneração e qualidade do café**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, 1998.

TEISSEIRE, P. J. **Chemistry of fragrant substances**. New York: VCH Publishers, 1994.

KURTZMAN, G. P., FELL, J. W., ROFFHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. Elsevier Science. 2010.

THOMAZIELLO, R. A. **Cultura do café**. 2. ed. CATI, 1996. (Boletim Técnico 193).

THORNTON, C. R., SLAUGHTER, D. C., DAVIS, M. R., Detection of the sour-rot pathogen *Geotrichum candidum* in tomato fruit and juice by using a highly specific monoclonal antibody-based. **International Journal of Food Microbiology**. v. 143, n. 3, p. 166-172, 2010.

TOMA, Júlio Massao. **Efeito da adição de oxigênio na produção de glicerol quinase pela levedura recombinante de *Pichia pastoris***. 2011.

URUBU, F. History and services of culture collections. **International Microbiology**, v. 6, p. 101-103, 2003.

VASIC-RACKI, D. History of industrial Biotransformations – Dreams and Realities, **In: Industrial Biotransformations**, Ed. Liese, A.; Seelbach, K. & Wandrey, C.; WileyVCH, 2000, cap. 2, pp. 3-29.

VEIGA, A.; et al. Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. **FEMS yeast research**, v. 3, n. 2, p. 141-148, 2003.

VENTURIM, J. B. **Gestão de resíduos orgânicos produzidos no meio rural: o caso do beneficiamento do café**. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

VICENTE, V. A.; et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies In Mycology**, [s.l.], v. 61, p.137-144, 2008. Elsevier BV.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando CG-MS e coluna HP-Innowax. **Revista Química Nova**, vol. 30, nº. 8, p.2031-2034, 2007.

WELSH F. W. Overview of bioprocess flavor and fragrance production. In: GABELMAN A (Ed.). **Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients**. Wiley, New York, p 1-16, 1994.

XU, P.; HUA, D.; MA, C. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. **Trends in biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 571-6, 2007.

YOO, S. K.; DAY, D. F. Bacterial Metabolism of α - and β -Pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 739-745, 2002.