

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS
PRESENTES EM FRUTOS DE CAFEIRO COM POTENCIAL
EFEITO DE INIBIÇÃO FÚNGICA**

WÁLACI DA SILVA SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO/2024**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS
PRESENTES EM FRUTOS DE CAFEIRO COM POTENCIAL
EFEITO DE INIBIÇÃO FÚNGICA**

WÁLACI DA SILVA SANTOS

**“Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia Vegetal.”**

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO/2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

S237

Santos, Wálaci da Silva.

Isolamento e caracterização de microrganismos presentes em frutos de cafeeiro com potencial efeito de inibição fúngica / Wálaci da Silva Santos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

116 f. : il.
Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho.

1. Inibição fúngica. 2. Leveduras. 3. Frutos do cafeeiro. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

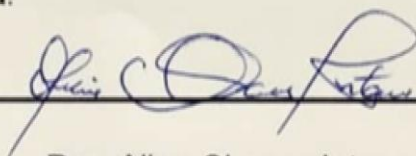
**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES
EM FRUTOS DE CAFEIEIRO COM POTENCIAL EFEITO DE INIBIÇÃO
FÚNGICA**

WÁLACI DA SILVA SANTOS

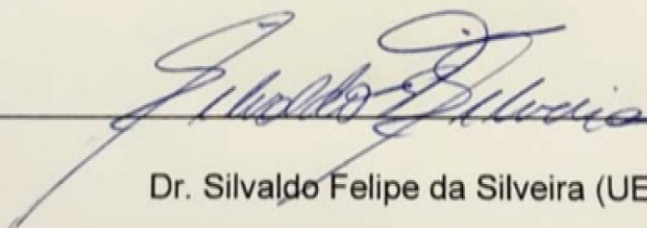
Tese de doutorado apresentada ao
Centro de Biociências e Biotecnologia
da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia Vegetal

Aprovada em 26 de fevereiro de 2024

Banca examinadora:



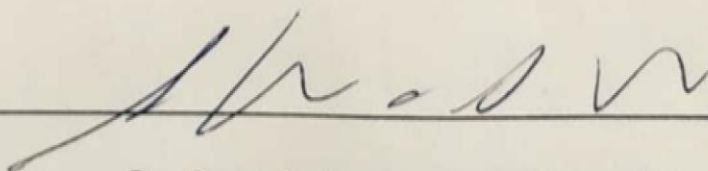
Dra. Aline Chaves Intorne (UENF)



Dr. Silvaldo Felipe da Silveira (UENF)

Documento assinado digitalmente
gov.br CHRISTIANE MILEIB VASCONCELOS
Data: 08/05/2024 17:39:36-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Christiane Mileib Vasconcelos (UUV)



Dr. Gonçalo Apolinário de Sousa Filho (Orientador)

Ao meu pai, Jamir
Á minha mãe, Terezinha
Ao meu irmão William
Á minha esposa, Paula,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção, saúde e força para conduzir esse trabalho, me tornando uma pessoa melhor.

A meu pai Jamir, minha mãe Terezinha e meu irmão William, que mesmo distantes, me deram todo suporte para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador Gonçalo Apolinário, pela confiança na execução deste trabalho e pela orientação e compreensão diante dos desafios.

A minha esposa Paula, por todo carinho, compreensão e por estar sempre ao meu lado, me dando todo suporte.

Aos meus amigos e amigas de laboratório, Júlia, Fabiano, Kariny, Jéssica, Rafael, Matheus, Arthur, Ana Clara, pelas conversas, pela distração necessária e pela ajuda na realização desse trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Nicolas e Maria Gabrielly, pela amizade e por toda a ajuda na execução deste trabalho.

Aos produtores de café da região de Conceição do Muqui - ES, que direta ou indiretamente contribuíram com material biológico ou com equipamentos para montagem dos experimentos.

Ao laboratório LBT pela disponibilização dos equipamentos utilizados durante esse trabalho.

A UENF, por me possibilitar realizar um doutorado gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, por todo suporte que foi dado.

Aos professores do PGBV, por todo conhecimento compartilhado, fundamental para me tornar um pesquisador.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1- Café: Cultivo e importância econômica	1
1.2. Microrganismos associados ao fruto de café	4
1.2.1. <i>Utilização de leveduras em processos de melhoria da qualidade da bebida do café</i>	4
1.2.2. <i>Utilização de bactérias ácido-láticas em processos de melhoria da qualidade da bebida do café</i>	6
1.2.3. <i>Utilização de bactérias ácido-láticas em processos de melhoria da qualidade da bebida do café</i>	7
1.3. Análise sensorial da qualidade da bebida do café	8
1.4. Efeito da torra no perfil metabólico e sensorial dos grãos de café	9
1.5. Fungos deletérios nos procedimentos pós-colheita.....	11
2. Objetivo geral.....	12
2.1. Objetivos específicos	12
3 . Metodologia	13
3.1. Coleta de frutos de café.....	13
3.2- Isolamento de microrganismos do processo fermentativo de frutos de café.....	13
3.2.1. 3.2.1. Plaqueamento de bactérias presente em frutos de café.....	13
3.2.2. Plaqueamento de leveduras presente em frutos de café.....	14
3.3 Isolamento.....	14
3.4. Armazenamento e conservação de cepas	14
3.5. Identificação Molecular dos Microrganismos Isolados	15
3.6. Identificação de bactérias pecnolíticas.....	16
3.7. Obtenção do meio de cultura com pectina degradada por microrganismos (PDM)	16
3.8. Curva de crescimento das leveduras com diferentes fontes de carbono	17
3.9.Obtenção de cepas fúngicas.....	17
3.10. Ensaio de antagonismo microbiano	17
3.10.1. Ensaio <i>in vitro</i>	17
3.10.2. Avaliação do crescimento de fungos em frutos de café	18

3.10.3. Avaliação do crescimento de fungos em frutos de café em em condições de campo	19
3.10.4. Avaliação de desenvolvimento de microrganismos em frutos de café tratados com leveduras em condições controladas de cultivo	20
3.10.4. Análise estatística	20
4. Resultados	20
4.1- Isolamento de microrganismos presente no processo fermentativo de frutos de café.....	21
4.2 – Identificação molecular dos microrganismos isolados	22
4.3 – Identificação de bactérias pecnolíticas	24
4.4- Determinação da concentração apropriada de PDM (pectina degradada por microrganismo) adicionada ao meio de cultivo YEPG.	26
4.5 - Curva de crescimento das leveduras mediante diferentes fontes de carbono..	27
4.6 - Efeito antagônico das leveduras isoladas do fruto do café sobre o desenvolvimento de fungos filamentosos.....	28
4.7 – Efeito inibitório da levedura <i>Meyorozyma carpophila</i> sobre o desenvolvimento de fungos filamentosos aplicados em frutos de café.....	29
4.8 – Efeito inibitório das leveduras selecionadas Wasobre o desenvolvimento de fungos filamentosos na superfície de frutos de café em condições de campo.	30
5– Discussão.....	32
6 – Conclusões	38
7 – Referências.....	38
Apêndice 1	46
Tabela de análise estatística da curva de crescimento das leveduras em meio de cultura com diferentes fontes de açúcares.....	46
Apêndice 2.....	47
Análise de variância do experimento de antagonismo	47
Apêndice 3.....	53
Tabela de identificação das bactérias no NCBI.....	53
Apêndice 4.....	66
Tabela de identificação das leveduras.....	66
Apêndice 6.....	69
Artigo de revisão.....	69
Apêndice 7.....	92
Patente.....	92

RESUMO

A qualidade da bebida do café tem sido cada vez mais requisitada pelos consumidores. Dentre os fatores que influenciam essa qualidade, está a microbiota associada ao fruto. A composição microbiológica dos frutos varia de acordo com as condições de cultivo e os processos pós-colheita aos quais são submetidos. A presença de fungos e bactérias do solo interfere na qualidade. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar comunidades microbianas associadas aos frutos de café. Para execução do trabalho, foram coletados frutos de *Coffea arabica*, na fase ótima da maturação. Amostras foram obtidas a partir da extração e diluição da mucilagem dos frutos submetidos ao processo de fermentação por 72h, com amostragem a cada 12 horas. As bactérias foram isoladas e cultivadas em placas com meio DYGS e as leveduras foram isoladas e cultivadas em placas com meio YEPG. Tais microrganismos foram submetidos a análises moleculares para extração de DNA, PCR e Sequenciamento para identificação. As sequências foram analisadas no programa BioEdit e submetidas programa BLAST no NCBI, onde foi possível identificar três leveduras e sete bactérias. Foi realizado um ensaio para identificação de bactérias produtoras de ácido lático e de atividade peconlítica. Em seguida, foi realizada curvas de crescimento das leveduras com diferentes fontes de açúcares. As curvas de crescimento mostraram que as leveduras possuem preferências por tipos de açúcar monossacarídeos. Os ensaios de antagonismo, mostraram que as leveduras possuem grande potencial inibitório contra fungos do gênero *Fusarium* e *Aspergillus* potencialmente deletérios para a produção de café. Com esse trabalho, vislumbramos gerar formulação com aplicação biotecnológica na finalidade de proporcionar ao produtor de café de alta qualidade, uma ferramenta que o permita escalonar a produção, evitando as contaminações fúngicas que ocorrem no processo de secagem.

ABSTRACT

The quality of the coffee beverage has been increasingly demanded by consumers. Among the factors that influence the final quality of the coffee drink is the microbiota associated with the fruit. The microbiological composition of fruits varies according to the cultivation conditions and the post-harvest processes to which they are subjected. The presence of microorganisms such as fungi and soil bacteria in coffee fruits interferes with quality. In this sense, this work aims to identify and characterize microbial communities associated with the quality of the coffee drink. To carry out the work, *Coffea arabica* fruits were collected at the optimum stage of maturation. The samples were obtained from the extraction and dilution of mucilage from fruits subjected to the fermentation process for 72 hours, with sampling every 12 hours. Bacteria were isolated and cultivated on plates with DYGS medium and yeasts were isolated and cultivated on plates with YEPG medium. These microorganisms were subjected to molecular analysis for DNA extraction, PCR and sequencing for identification. The sequences were analyzed in the BioEdit program and submitted to the BLAST program at NCBI, where it was possible to identify three yeasts and seven bacteria. An assay was carried out to identify bacteria that produce lactic acid and pectinolytic activity. Then, yeast growth curves were carried out with different sugar sources. The growth curves showed that yeasts have preferences for monosaccharide sugar types. Antagonism tests showed that yeasts have great inhibitory potential against potentially harmful fungi for coffee production. With this work, we aim to generate a formulation with biotechnological application in order to provide high-quality coffee producers with a tool that allows them to scale production, avoiding fungal contamination that occurs in the drying process.

1. Introdução

1.1- Café: Cultivo e importância econômica

O café arábica (*Coffea arabica*) é uma planta da família das Rubiáceas, típica de clima tropical com sua origem no continente africano, mais precisamente numa região que hoje é conhecida como a Etiópia (KRUG; CARVALHO; MENDES, 1950). O gênero *Coffea* abrange mais de 100 espécies diferentes, entretanto apenas as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são cultivadas em grandes produções de café pelo mundo. Outras espécies como *Coffea liberico* e *Coffea excelsa* são utilizadas em pesquisas (DAVIS et al., 2006).

O café é a segunda principal commodity comercializada no mundo, perdendo apenas para o petróleo. O Brasil ocupa o primeiro lugar mundial na produção e exportação de café, seguido por Vietnã, Colômbia e Indonésia

Figura 1: Diferentes estágios de maturação de frutos de café. (Srnke ET AL, 2015)

(FAOSTAT, 2020). A Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), registra que em 2022 o consumo interno de café tradicional cresceu 0,45% e o consumo de café superior ou especial teve um acréscimo de cerca de 20%. Diversos fatores contribuem para esse aumento de consumo de cafés especiais, dentre eles o novo perfil de consumidor, que aprecia café recém preparado, o aumento das cafeterias que preparam receitas com cafés especiais e o foco na sustentabilidade. A estimativa é que em 2030 o consumo mundial de café fique próximo de 200 milhões de sacas (FERREIRA; SANTOS, 2019; GRAND VIEW RESEARSH, 2023). Entretanto, menos de 20% dos cafés produzidos no Brasil conseguem atingir a classificação gourmet e especial.

O cultivo de café arábica demanda diversas técnicas e manejos, que variam de acordo com o tipo de produção, além de procedimentos de tratamentos culturais desde o plantio até colheita dos frutos (MESQUITA et al., 2016). No momento da colheita, o grau de maturação dos frutos é determinante para a qualidade da bebida. Os diferentes estágios de maturação resultam em

diferentes características físico-químicas distintas, bem como alteração na composição bioquímica, incluindo concentrações de lipídios, sacarose, ácidos graxos, compostos voláteis e ácidos clorogênicos. A produção de café com qualidade superior é geralmente encontrada no grau de maturação do tipo “uva”, onde se encontra a melhor relação de açúcares e ácidos (SMRKE et al., 2015).



Figura 2: Diferentes estágios de maturação de frutos de café. (Smrke et al, 2015). Em A estágio verde-cana, em B, maduro cereja e em C, maduro uva

Os tratos culturais, incluindo técnicas de manejo e controle de pragas, as condições climáticas da região cultivada, a temperatura média, o volume de chuva anual e a altitude, são componentes que determinam a qualidade final da bebida de café. Similarmente, a genética das variedades também possui importante influência, considerando que algumas cultivares podem armazenar mais sacarose nos frutos maduros, outras produzem mais ácido clorogênico. Adicionalmente, a microbiota associada ao fruto também pode influenciar o resultado sensorial (DAMATTA et al., 2008). Os microrganismos naturalmente associados ao fruto do café, adicionado no processo fermentativo ou adquiridos durante os procedimentos de secagem e armazenamento do grão, produzem grande variedade de compostos que afetam a qualidade final da bebida (Silva et al., 2008).

A fermentação é considerada pela indústria alimentar como uma estratégia natural e sem impactos ambientais para produzir alimentos e bebidas funcionais com maior teor nutricional e agregar valor aos subprodutos alimentares (ANNUNZIATA et al., 2020). Os microrganismos são os agentes da fermentação, afetando as características químicas e sensoriais e a eficiência

processo fermentativo, contribuindo para a produção de bebidas tradicionais na indústria alimentar (BLANCO et al., 2013; REZAEI et al., 2016; VARELA et al., 2009).

A fermentação pode alterar, a composição dos grãos de café, modificando sua estrutura, liberando mais de compostos fenólicos e aumentando o valor nutricional da bebida produzida (RAWEL; KULLING, 2007). O café é uma das maiores fontes de ácido clorogênico, que é um polifenol reconhecido como um antioxidante importante na prevenção de câncer e doenças cardíacas (GONTHIER et al., 2003). Além disso o processo de fermentação induzido pode aumentar a quantidade de proteínas na bebida do café (BRESSANI et al., 2020a).

A bebida do café pode possuir uma grande variedade de sabores e aromas devido aos metabólitos presentes nos grãos antes e depois da torra. Grande parte dos estudos sobre a influência da microbiota associada ao fruto de café com a qualidade da bebida, aborda a importância desses microrganismos para degradação da mucilagem durante o processo de secagem (VILELA et al., 2007). Entretanto, bactérias, leveduras e fungos filamentosos desempenham um papel crucial na qualidade do café, produzindo metabólitos que afetam o perfil sensorial da bebida, enquanto algumas espécies de microrganismos produzem metabólitos que trazem ganho dessa qualidade sensorial, já outros produzem compostos deletérios (EVANGELISTA et al., 2014).

Compostos voláteis aromáticos são substâncias químicas responsáveis por atribuir aroma e sabor aos alimentos. Dentre esses compostos, podemos encontrar os ésteres que são formados pela ligação entre um álcool e um ácido e são atribuídos aos principais aromas encontrados em frutas (MOSTAFA et al., 2022).

A composição aromática do café é formada por diversas reações metabólicas que produzem compostos voláteis percebidos por nossas células receptoras olfativas e pelos receptores do paladar, que são responsáveis por distinguir os sabores entre doce, salgado, azedo, amargo e umami (GRAVINA;

YEP; KHAN, 2013). Os principais precursores desses compostos voláteis são moléculas de classe dos furanos, pirazinas, fenóis e tióis, uma variedade de ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres, pirróis, cetonas, lactonas, fenóis e piridinas presentes no grão verde. Após a torra, a proporção dos metabólitos presentes determina o perfil sensorial da bebida (BRESSANI et al., 2020b; GROSCH, 2008). A torra do café verde é importante para esse processo, pois durante esse procedimento, açúcares e aminoácidos são quebrados e produzem compostos voláteis que formam o aroma do café. A eliminação de água de moléculas de furanos produz reações de isomerização que resultam em moléculas voláteis como 2,3 butanodiona e 2,3 pentanodiona, que atribuem percepção sensorial de caramelo ao sabor do café (GROSCH, 2008).

1.2. Microrganismos associados ao fruto de café

Os microrganismos podem ocorrer naturalmente associados ao fruto do café, mas também podem ser incorporados involuntariamente durante os procedimentos de secagem e armazenamento dos grãos. Adicionalmente, podem ser inoculados no processo fermentativo visando a melhoria da qualidade sensorial do produto final. Juntos, os microrganismos presente geram grande variedade de compostos que afetam a qualidade final da bebida (SILVA et al., 2008).

1.2.1. Utilização de leveduras em processos de melhoramento da qualidade da bebida do café

As leveduras têm sido utilizadas como agente de biotransformação de moléculas para aplicação em diversos setores industriais (SIDDIQUI et al., 2012). Vilela et al demonstraram que alguns compostos voláteis presentes em grãos de café torrado tem origem durante o processo de reação térmica da fermentação, como é o caso de 2,3 butanodiona e hexanol, responsáveis pelo sensorial “amanteigado” (VILELA et al., 2007). De Melo Pereira et al, demonstraram que a inoculação de *Pichia fermentans* no processo de fermentação de cafés por via úmida, durante 24 horas, resultou em uma maior

concentração de acetaldeídos em relação a fermentação espontânea. Esse metabólito é responsável pela sensorial doce e pungente no aroma e no sabor da bebida. O aumento das concentrações de isoamil acetato, isobutil acetato e etil laurato em relação a fermentação espontânea, foram observados apenas após a torra dos grãos fermentados, fornecendo sensorial de abacaxi, maçã, banana e pêra a bebida do café. O composto 2,3-butanodiana, responsável pela sensorial “amanteigado” e “caramelo”, teve seus níveis de concentração diminuídas nos grãos fermentados com *Pichia fermentans*, após a torra dos grãos, sugerindo que a levedura agrega sabor frutado a bebida do café. Em tal trabalho, a concentração de etanol aumentou progressivamente durante a fermentação, porém não foi observado após a torra dos grãos (DE MELO PEREIRA et al., 2014, 2015).

A composição de ácidos produzidos durante a fermentação pode variar de acordo com o processo conduzido e com a variedade cultivada (CHENG et al., 2016). Bressani et al 2020, demonstraram que a utilização de culturas *starters* de diferente espécies de leveduras na fermentação, apresenta produção variada de compostos orgânicos, onde as concentrações de ácido oxálico, ácido isobutírico e ácido isovalérico aumentaram após 40h de fermentação quando foram utilizadas as espécies *Meyerozyma caribbica*, *Torulasporea delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Já a concentração de ácido cítrico aumenta na fermentação com *M. caribbica* e *S. cerevisiae*, resultando em bebidas com percepção sensorial de frutas cítricas. A concentração de ácido málico diminui na presença de *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* e *C. caribbica*.

O uso de *S. cerevisiae* induz a produção de diversos compostos das mesmas classes citadas anteriormente, porém a variação na proporção entre eles gera uma bebida com percepção sensorial variando entre azedo, caramelo, doce e floral. A levedura *C. parapilosis* produz uma elevada concentração de álcoois e aldeídos como nonenal, etil-decanol e octenol, responsáveis pela percepção sensorial de frutado na bebida. A utilização de *T. delbrueckii* em fermentação de café induz a produção de vários compostos, principalmente na classe de furanos e cetonas, que acrescentam sensorial frutada e doce a bebida do café (BRESSANI et al., 2020a).

1.2.2. Utilização de bactérias ácido-lácticas em processos de melhoria da qualidade da bebida do café

A presença de bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) na fermentação de café pode fornecer benefícios para a qualidade da bebida, devido a sua ação no metabolismo do citrato e produção de oxaloacetato como subproduto. O oxaloacetato pode ser utilizado na via de fermentação do piruvato, produzindo metabólitos que conferem uma acidez agradável na bebida (HUGENHOLTZ, 1993). Adicionalmente, as BALs convertem ácidos graxos livres e aminoácidos em ésteres e aldeídos. A junção de moléculas de frutose e arabinose forma xilulose que degradada produz moléculas de piruvato. As BALs convertem moléculas de piruvato em ácido láctico, dicetonas e 2,3 butanodiona (AVALLONE et al., 2000; SNOEP et al., 1992). A glicose formada pela quebra da sacarose também é utilizada na via de fermentação de piruvato. O metabolismo do piruvato produz ácido láctico, 2,3 butanodiona e dicetonas, que são metabólitos que agregados nos grãos de café, gerando percepção sensorial caramelizada na bebida (DE MELO PEREIRA et al., 2020).

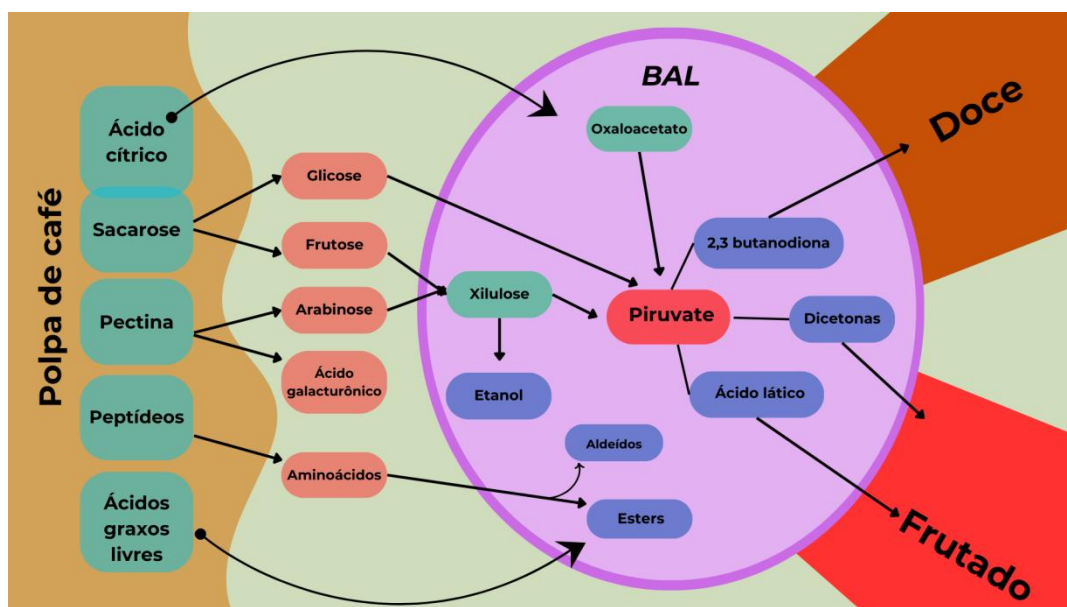


Figura 2: Representação esquemática simplificada das principais vias metabólicas e metabólitos gerados por bactérias ácido-lácticas durante a fermentação natural do café a partir de precursores existentes mucilagem do fruto e o efeito sensorial agregado a bebida.

As bactérias *Oenococcus oeni*, *Streptococcus thermophilus* e diversas espécies de *Lactobacillus sp.* atuam no catabolismo de aminoácidos para produzir benzaldeído, acetaldeído e 3 metil-butanal, que são compostos que acrescentam notas frutadas e de chocolate a bebida (HERNANDEZ-ORTE et al., 2009; KRANENBURG et al., 2002; OTT; GERMOND; CHAINTREAU, 2000). As bactérias do gênero *Lactobacillus sp.* podem ainda atuar na oxidação de lipídeos e de ácidos graxos livres para produzir 2-nonenal, nonal e decanal. Além disso, atuam na reação de esterificação de álcoois e ácidos graxos, produzindo acetato de etila, butanoato de etila, propionato de etila e hexanoato de etila que geram percepção sensorial de frutas cítricas na bebida do café (AYAD et al., 1999; KLEIN et al., 2001; SGARBI et al., 2013). Bactérias do gênero *Bacillus* podem produzir β - damascenona, através da oxidação de ácidos graxos livre, gerando sensorial floral na bebida do café (GROSCH, 2008).

De forma geral, as *BALs* são consideradas microrganismos benéficos para a fermentação do café, e seus produtos metabólicos são responsáveis pela percepção sensorial frutada e floral na bebida.

1.2.3. Utilização de bactérias ácido-láticas em processos de melhoria da qualidade da bebida do café

A pectina é um polissacarídeo de estrutura complexa contendo ácido galacturônico em sua cadeia, geralmente é extraída de frutas cítricas através de métodos que incluem acidificação e altas temperaturas, o principal objetivo é para aplicação na indústria alimentícia, produzindo geleificantes para dar textura e estabilizar alimentos líquidos (CANTERI et al., 2012)

A polpa do fruto do café em estágio de maturação elevada, é rica em pectina. Nesse estágio a microbiota do fruto passa por modificações, diminuindo a população bacteriana e aumentando a população de leveduras (REICHEMBACH; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, 2020). Algumas bactérias do gênero enterobacter são capazes de degradar pectina, liberando galacturose

no meio e isso pode favorecer o crescimento de leveduras no estágio de maturação avançado do fruto (ABBOTT; BORASTON, 2008).

1.3. Análise sensorial da qualidade da bebida do café

A análise sensorial da bebida do café é um procedimento protocolar estabelecido pela SCAA (Specialty Coffee Association of America) adotada para qualificar e classificar a bebida a partir de atributos como aroma, sabor, doçura, acidez entre outros. Um grupo de degustadores realiza a seleção e preparo das amostras e identificam nuances da bebida a partir de avaliação visual, olfativa e gustativa. As características são classificadas com pontuação de 0-10 em uma tabela de avaliação. Durante esse procedimento os degustadores podem utilizar a roda de sabores, uma ferramenta gráfica que o auxiliam os degustadores a categorizar as características encontradas na xícara de café. A roda de sabores é dividida em categorias mais amplas que incluem aromas como frutado, doce, floral, químico, herbáceo entre outros e subdivisões de cada categoria com características mais específicas, por exemplo, a categoria “doce” pode ser subdividida em “caramelo”, “mel”, “chocolate” etc. As características frutadas, florais, caramelo, chocolate e frutas secas evidenciam boa qualidade da bebida e características herbais, especiarias, químico e queimado evidenciam defeitos na qualidade na bebida devido algum procedimento errôneo durante o processo de produção (SCAA, 2008).

temperatura para 70°C. Em seguida, os grãos são aquecidos até atingir 100 °C e perdem água acumulada. Na segunda etapa, o aquecimento chega 180 °C e ocorre a dilatação dos grãos, gerando pequenos sons de estalos devido à alta temperatura dentro dos grãos e o rompimento das células, liberando compostos voláteis através de microporos dos grãos (YERETZIAN et al., 2002). Nessa etapa ocorre um processo de escurecimento de açúcares redutores e aminoácidos, através de uma reação não enzimática denominada Reação de Maillard, com a produção de compostos voláteis associados a qualidade na bebida do café, principalmente furanos e 2,3 pentanodiona (CHA; DEBNATH; LEE, 2019). O tempo de 10 a 15 minutos é quando são produzidas as maiores concentrações de compostos agradáveis na bebida do café. A extensão do tempo de torra causa carbonização e formação de pirróis, produzindo cheiro de queimado na bebida do café. A última etapa da torra é o resfriamento dos grãos para interromper o processo (YERETZIAN et al., 2002). A figura 4 demonstra como ocorre todo o processo de torra dos grãos de café.

Após a torra, os principais ácidos que prevalecem no grão são ácidos cítricos e ácidos málicos. Parte dos compostos produzidos e incorporados aos grãos durante seu desenvolvimento é preservados após a torra, como é o caso dos tióis. Entretanto, alguns são eliminados durante esse processo, como é o caso dos compostos de etanol, aldeídos e alcoóis (BRESSANI et al., 2020a; DE MELO PEREIRA et al., 2015).

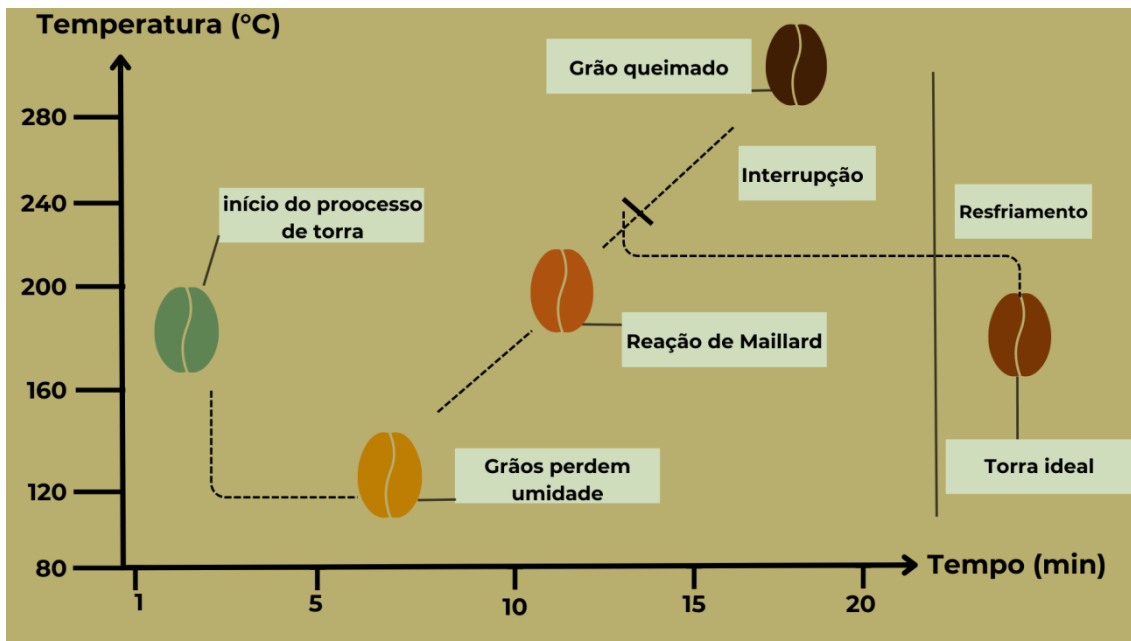


Figura 4: Representação do processo de torra do grão de café de uma amostra de 500g. Os grãos mudam de cor conforme a relação tempo/temperatura. Os grãos de café verde são inseridos no torrador pré-aquecido a 180°C, depois ocorre a troca de calor e os grãos começam a ser torrados a 120°C, quando perdem toda a umidade e atingem uma temperatura entre 190°C e 200°C. , inicia-se a reação de Maillard e em 1 ou 2 minutos o processo de torra deve ser interrompido para que os grãos não queimem. Após a interrupção, o grão deve ser resfriado rapidamente. O tempo ideal para assar é de aproximadamente 15 minutos.

De maneira geral, a torrefação aumenta a concentração de ácidos, ésteres, furanos, pirazinas, pirróis e pirimidinas (figura 19). Em alguns casos, aumenta a presença de compostos específicos de fenóis e cetonas (BRESSANI et al., 2020a).

1.5. Fungos deletérios nos procedimentos pós-colheita.

Durante os procedimentos de pós colheita do café como secagem e armazenamento, é comum o surgimento de microrganismos indesejáveis e prejudiciais como *Aspergillus* e *Fusarium*, que produzem moléculas como a ocratoxina A (OTA), que é prejudicial a saúde humana e conseqüentemente acarreta na diminuição do preço do produto (DE MELO PEREIRA et al., 2016; MASSAWE; LIFA, 2010).

Uma das formas de reduzir a proliferação desses microrganismos é através do controle biológico com microrganismos que antagonizam com esses fungos durante seu desenvolvimento. Os antagonistas microbianos são alternativas

eficazes e ecológicas aos fungicidas sintéticos para controlar doenças fúngicas pós-colheita em frutas e vegetais, oferecendo uma alternativa sustentável aos fungicidas sintéticos (DUKARE et al., 2019).

Nesse sentido, alguns estudos apontam a eficácia de alguns gêneros de leveduras na inibição de fungos que causam apodrecimento de frutas e os autores relacionam a produção de diversos compostos voláteis ao processo de inibição desses fungos, entretanto não apontam com precisão quais são os compostos responsáveis pela inibição (MEWA-NGONGANG et al., 2019).

Portanto, esse estudo tem como justificativa, identificar e desvendar as interações que esses microorganismos têm com os frutos do cafeeiro e a partir disso, desenvolver ferramentas biotecnológicas para combatê-los de maneira sustentável e garantir a qualidade da bebida.

2. Objetivo geral

Isolar e caracterizar microrganismos presentes no processo fermentativo de frutos de café e avaliar seu potencial antagonismo a fungos deletérios a qualidade da bebida do café.

2.1. Objetivos específicos

- A. Isolar e identificar microrganismos do processo fermentativo de frutos de café arábica.
- B. Caracterizar os microrganismos quanto ao potencial biotecnológico de atividade pecnolítica.
- C. Avaliar os açúcares preferenciais para cultivo das leveduras selecionadas
- D. Avaliar a capacidade de leveduras selecionadas de antagonizar o desenvolvimento de fungos potencialmente deletérios a qualidade da bebida do café.

3 . Metodologia

3.1. Coleta de frutos de café

Foram colhidas amostras de frutos de café maduros no estágio “uva”, mantendo o pedúnculo para não contaminação interna, na lavoura localizada no sitio Barra da Forquilha em Mimoso do Sul – ES, latitude 20°55'18”S e longitude 41°29'41”W, no mês de maio de 2022. Os frutos foram transportados para o laboratório dentro de sacos plásticos e isopor.

3.2- Isolamento de microrganismos do processo fermentativo de frutos de café

Quatro litros de frutos de café no estágio de maturação “uva” foram colocados em um balde de plástico com tampa e com válvula improvisada para saída de gás carbônico e submetidos ao processo fermentativo do tipo *sprout process*, sem adição de água, por 72h à 25°C.

Amostras dos frutos fermentados foram coletadas nos pontos de 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h. Os frutos foram pressionados em espremedor de porcelanato para obtenção da mucilagem que, posteriormente, foi coletada e transferida para microtubos de 1,5 ml. Em seguida, 30 µl de amostra da mucilagem extraída foram utilizados para diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura YEPG para leveduras e DYGS para bactérias.

3.2.1. 3.2.1. Plaqueamento de bactérias presente em frutos de café

Para isolamento de bacterias presentes em frutos de cafeiro, as amostras de mucilagem coletadas durante a fermentação foram diluídas nas concentrações 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e posteriormente plaqueadas com alça de Drygalsky em placas de Petri com meio de cultura DYGS (1 L: 15g de Agar, 2 g de glicose; 2 g de extrato de levedura; 1,5 g de peptona; 1,3 g de

ácido glutâmico; 500 mg de K₂HPO₄; 500 mg de MgSO₄.7H₂O; pH 6,0) e incubadas em estufa de crescimento à 30°C por sete dias.

3.2.2. Plaqueamento de leveduras presente em frutos de café

Para isolamento de leveduras, as amostras de mucilagem coletadas durante a fermentação foram diluídas nas concentrações 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ e posteriormente plaqueadas com alça de drygalsky em placas de petri com meio de cultura YEPG (1 L: 15g de Agar, 20 g de glicose; 10 g de extrato de levedura; 10 g de peptona, pH 5,5) e incubadas em estufa de crescimento à 30°C por sete dias.

3.3 Isolamento

Os microrganismos foram isolados das placas de petri de 15 cm de diâmetro. Ponteiros estéreis de micropipeta (100 ul) foram utilizadas para coletar as colônias e em seguida colocadas em tubo falcon contendo 5ml de meio líquido. Os tubos foram incubados em agitador a 30°C até atingir a turbidez do meio, indicando o crescimento e multiplicação das colônias. Em seguida, para confirmação de pureza e isolamento, foram obtidas colônias isoladas via semeadura com auxílio de uma alça de metal, em placas com meio sólido (DYGS para bactérias e YEPG para leveduras), que foram então crescidas em estufa a 30°C e armazenadas em geladeira.

3.4. Armazenamento e conservação de cepas

Os microrganismos foram cultivados em meio líquido (DYGS para bactérias e YEPG para leveduras) a partir de colônias isoladas. Em erlenmayer de 250 ml, os cultivos foram incubados em agitador a 230 rpm e 30°C. Foi feito o acompanhamento de crescimento através de absorbância medida via espectrofotômetro a 592 nm. Quando os cultivos atingiram D.O. =

1.0, 250 ml foram coletados e misturados com 25% de glicerol, e congelados instantaneamente em NO² e armazenados em freezer – 80 C.

3.5. Identificação Molecular dos Microrganismos Isolados

O DNA genômico dos microrganismos foi obtido utilizando o protocolo de extração do kit Plant DNAzol seguindo as instruções do fabricante e a integridade das amostras foi observada em gel de agarose 1% em corrida de 30 min a 100 volts, utilizando 10ul de amostra. As amostras foram coradas com GelRed (Sigma) 1:500 misturadas ao tampão de carregamento na proporção de 1:2. Para cada 4ul de amostra, foi adicionado 1ul da mistura GelRed +Tampão de carregamento.

Para identificação das bactérias, amostras de DNA bacteriano foram utilizadas para amplificação do gene 16S usando os pares de primers 16sDF (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') e 16sDR (5'- AAGGAGGTGATCCAGCCCCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGC - 3') em termociclador programado para realizar o seguinte ciclo: Desnaturação inicial á 95°C por 5 minutos, desnaturação á 95°C por 1 min, anelamento á 53°C por 1min e extensão á 72°C por 1min, extensão final á 72°C por 10 min e resfriamento á 4-°C. O mesmo ciclo foi aplicado para identificação das leveduras, onde amostras de DNA fúngico foram utilizadas para amplificação do gene ITS usando os pares de primers ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') com temperatura de anelamento de 55°C (Tran et al., 2017).

As reações foram realizadas com volume final de 50ul utilizando 2ul de DNA; 3ul de MgCl₂ 25 mM; 5ul de PCR Buffer 10x; 8ul de dNTPs 12,5mM; 1ul de primerF 20p.mol; 1ul de primerR 20 p.mol; 0,4ul de Taq Polimerase e 29,6ul de H₂O. Para envio de amostras para sequenciamento foram preparados 2 microtubos de 50ul de produto da PCR, misturados e homogenizados somando 100ul. Destes, 10ul foram utilizados para eletroforese em gel 0,8% em corrida

de 5 minutos a 100 volts + 30 minutos á 50 volts. O restante do conteúdo foi enviado para empresa parceira realizar purificação e sequenciamento.

Os produtos de PCR foram concentrados em speed vac e enviados para a empresa GOGNETCs (Curitiba, PR, Brasil) para sequenciamento Sanger. As sequências Forward e Reverse foram analisadas no programa Bioedit. O eletroferograma foi utilizado para avaliação da qualidade de cada sequencia e montagem da sequencia completa.

3.6. Identificação de bactérias pecnolíticas

Foi avaliado a capacidade das bactérias crescerem em meio de cultura simulando a polpa natural do café. Para isso foi utilizado placas com o meio YEPG como controle do crescimento bacteriano e para avaliar a atividade pecnolítica, as bactérias foram cultivadas em placas com o meio YEPP, substituindo a glicose por pectina industrial. O meio foi corado com azul de brotimol e vertido em placas de Petri. As bactérias foram previamente cultivadas em meio DYGS líquido e foi utilizado uma gota de 5µl de inóculo no centro da placa. As placas foram encubadas em estufa de crescimento á 30°C por sete dias. Bactérias positivas para degradação de pectina foram identificadas através da observação de um halo translúcido ao redor da colônia.

3.7. Obtenção do meio de cultura com pectina degradada por microrganismos (PDM)

Foi preparado um meio de cultura modificado, utilizando uma solução de pectina degradada por microrganismo. Para obter a solução, cepas da bactéria *Enterobacter ludwigii*, que apresentou melhor atividade pecnolítica, foi cultivada em meio YEPG onde a glicose foi substuida por pectina industrial. Tal meio foi denominado YEPP. Após 48h de cultivo em agitador a 230 rpm a 30°C, o meio de cultivo foi purificado por filtração em membrana de 0.22 µm, acoplada a uma seringa.

3.8. Curva de crescimento das leveduras com diferentes fontes de carbono

Foi avaliado o crescimento das leveduras isoladas, em exposição a diferentes fontes de carbono. Para isso, foi utilizado o meio de cultura de leveduras com a composição para 1L: 10g de extrato de levedura, 10g de peptona e 20 gramas de uma fonte de carboidrato, sendo alternada entre: glicose, frutose, manose, sacarose, pectina e (PDM) pectina degradada por microrganismos. As leveduras foram cultivadas em erlenmayer contendo 5ml de inóculo e 45 de meio de cultura, incubados em agitador shaker á 30°C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em intervalos de 4 horas e os gráficos foram elaborados no programa Prism Graphic.

3.9.Obtenção de cepas fúngicas

As cepas dos fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides* foram cedidas pela Clinica fitossanitária do LEF-CCTA – UENF. Após o crescimento dos fungos em placas de petri com meio PDA, os fungos foram armazenados pela metodologia de Castellani (CASTELLANI, 1963) onde foi coletado um disco de meio contendo esporos e hifas fúngicas e adicionado em um frasco previamente esterilizado contendo água destilada estéril.

3.10. Ensaio de antagonismo microbiano

3.10.1. Ensaio *in vitro*

O experimento foi realizado segundo Chen et al, 2018, com modificações. Foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura PDA (CARNAÚBA et al., 2007), onde foram pipetados 10 ul de solução de esporos de cada fungo, na concentração de 1×10^4 cel/ml, nas extremidades das placas. Uma linha horizontal no meio da placa com gotas de 10 ul na

concentração de 1×10^7 cel/ml. As placas foram mantidas à 28°C por 7 dias (CHEN; CHEN; CHOU, 2018).

3.10.2. Avaliação do crescimento de fungos em frutos de café

Foi avaliado a capacidade dos fungos filamentosos se desenvolverem em frutos de café previamente tratados com levedura. Para realizar esse experimento, frutos de café, em estágio “uva” de maturação, foram previamente esterilizados com solução de hipoclorito de sódio e álcool 70% e posteriormente lavados com água destilada. Em seguida foram colocadas em placas de petri contendo meio ágar-água, sem nutrientes, e os tratamentos com os fungos *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus niger* e a levedura *Meyerozyma carophilla* foram aplicados como demonstra o esquema na figura 5.

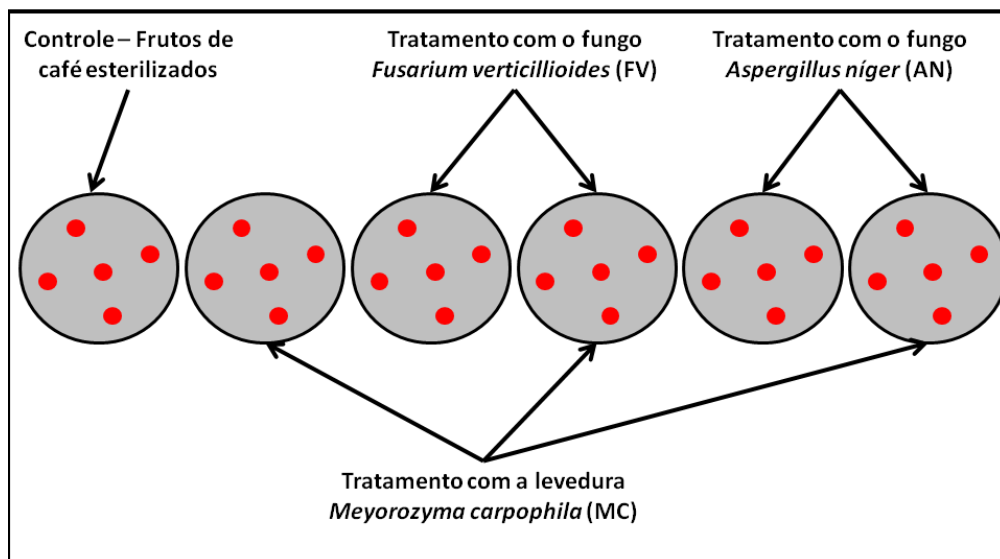


Figura 5: Esquema ilustrativo de montagem de experimento de antagonismo entre fungos e leveduras em frutos de café dispostos em placas de petri.

Na condição de controle, os frutos esterilizados não receberam nenhuma inoculação de fungos ou leveduras. Nos tratamentos com os fungos, foram aplicados 10 ml de esporos na concentração de 1×10^4 esporos/ml em cada placa. Nas condições de tratamento com a levedura, foram pulverizados 1 ml da solução de levedura *Meyerozyma carophilla* na concentração de 1×10^7

cel/ml antes de pulverizar as soluções de esporos dos fungos.

3.10.3. Avaliação do crescimento de fungos em frutos de café em condições de campo

Foi realizado o experimento de antagonismos microbiano em frutos de café em condições de campo. Para isso, foram coletados frutos de café maduro, e separados em porções de 1 kg. As porções foram separadas por hastes de bambu, em uma estufa de secagem com piso pavimentando comumente utilizado na secagem de frutos de café, como pode ser visualizado na figura 6. Tais frutos não passaram pelo processo de esterilização e nem por inoculação artificial de fungos indesejáveis, para que os microrganismos característicos do ambiente pudessem se desenvolver.

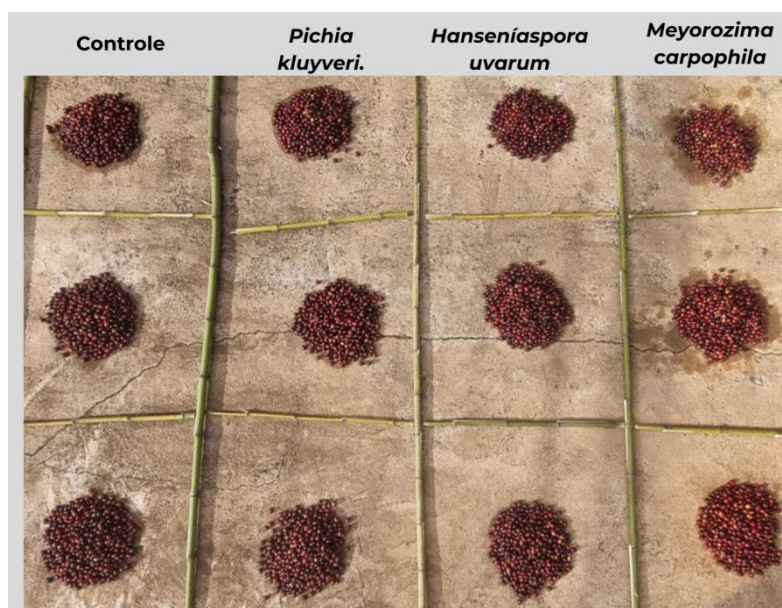


Figura 6: Distribuição de frutos de café divididos por hastes de bambu em terreiro de secagem pavimentado.

Nas condições de tratamento foram pulverizados 100 ml de solução com as leveduras *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum* e *Meyerozima carpophila* na concentração de 1×10^9 cél/ml. Na condição de controle foram pulverizados 100 ml de água fervida e resfriada a temperatura ambiente.

3.10.4. Avaliação de desenvolvimento de microrganismos em frutos de café tratados com leveduras em condições controladas de cultivo

Foi realizado uma avaliação do desenvolvimento de microrganismos em frutos de café tratados previamente tratados com leveduras em condições controladas. Para realizar o experimento, amostras de 1 kg de frutos de café foram dispostos em bandejas. Os frutos de café foram coletados e lavados com água não fervida/filtrada. As bandejas foram vedadas com plástico filme e dispostas em sala de cultivo a 23°C. Nas condições de tratamento foram pulverizados 100 ml de solução contendo 1×10^9 cél/ml de cada levedura e uma mistura de 33,3 ml de cada uma das leveduras formando um tratamento que denominado Mix de leveduras. Na condição controle foi pulverizado 100 ml água destilada. Não houve inoculação de esporos fúngicos e nem esterilização dos frutos, para que os microrganismos de origem ambiental pudessem se desenvolver. A temperatura da sala manteve a umidade alta e o plástico filme causou abafamento nas bandejas favorecendo o crescimento dos fungos.

Após 15 dias, o experimento foi avaliado, classificando os frutos em três classes: 1 – 0% a 20% de área contaminada na superfície dos frutos; 2- 21% a 60% de área contaminada na superfície dos frutos e 3- 61% a 100% de área contaminada na superfície dos frutos. Os frutos foram separados em bechers de vidro e posteriormente pesados.

3.10.4. Análise estatística

Os dados e os gráficos foram analisados e gerados pelo programa Prism Graphic e a análise estatística foi realizada através do programa Sisvar. Foi realizado um Delineamento de Inteiramente Casualizado (DIC), com três repetições e os dados foram submetidos á análise de variância e os testes de média foram submetidos ao modelo de Scott-Knott.

4. Resultados

4.1- Isolamento de microrganismos presente no processo fermentativo de frutos de café.

Visando isolar bactérias e leveduras presentes no processo fermentativo de frutos de café, um ensaio de fermentação controlada foi conduzido durante 72h. Amostras de mucilagem foram coletadas em intervalos de 12 horas e submetidas a diluição seriada para plaqueamento em meio sólido YEPG, para o crescimento de leveduras, e DYGS, para o crescimento de bactérias.

A seleção de colônias para isolamento se baseou em características morfológicas como a cor, tamanho e forma da borda da colônia. Assim, foram selecionadas 22 colônias de bactérias consideradas distintas, e 4 colônias diferentes de leveduras.. As colônias foram preliminarmente nomeadas como L1, L2, L4 e L5, para as leveduras, e B1a B22, para bactérias.

Tabela 1: Características morfológicas observadas nas colonias isoladas.

Código	Descrição
B1	Colonia grande, translúcida, formato escorrido
B2	Colônia média, translúcida com anel de cor branco leitosa e formato oval
B3	Colonia pequena, marron translucido e formato arredondado
B4	Colonia media, corbranca leitosa, arredondada
B5	Colonia pequena, cor amarela com um anel branco leitoso e outro translucido, formato arredonddo
B6	Colonia pequena, cor marron leitoso e formato arredondado
B7	Colonia media/pequena, cor intercalando aneis branco leitoso e translucido e formato oval
B8	Colonia muito pequena, cor amarela e formato arredondado
B9	Colonia média/pequena, cor amarelo claro leitoso e formato oval(3)
B10	Colonia muito grande, cor translúcida e formato indefinido
B11	Coloia media, cor translucida e formato estriado

B12	Colonia pequena, cor marron translucido com anel branco leitoso e formato oval
B13	Colonia pequena de cor intercalando em aneis brancos translucidos e leitosos e formato arredondado
B14.	Colonia média/pequena, cor amarelo claro leitoso e formato oval (2)
B15	Colonia média/pequena, cor com nucleo amarelado e aneis de cor translúcida e leitoso, formato oval
B16	Colonia media, cor transparente levemente amarronzado e formato oval.
B17	Colonia media/pequena, transparente com microbolhas e borda estriada
B18	Colonia pequena, cor com nucleo branco e anel transparente, borda estriada
B19	Colonia grande, de cor branco leitoso e formato de mancha
B20	Colonia media, de cor branco leitoso em formato oval, predominante na placa
B21	isolada de contaminação da B2
L1	Colonia pequena, cor branca leitoso e formato arredondado. Predominante na placa
L2	Colonia media/pequena, cor branca com marcas internas similares a digitais, nucleo visível e formato oval
B22	Colonia muito pequena, avermelhada e formato redondo
L4	Colonia media/pequena, branca com desenhos estriado e formato oval
L5	Colonia pequena, cor branca com aspecto marron internamente e formato arredondado

4.2 – Identificação molecular dos microrganismos isolados

Com o objetivo de identificar os microrganismos isolados do processo de fermentação dos frutos de café, foi realizado a extração do DNA de cada isolado e, por seguinte, as regiões de 1.600 pb do gene 16S rRNA. de bactérias e 600 pb da região ITS1 e ITS4, de leveduras, foram amplificadas através da técnica de PCR.

Foram obtidos os amplicons 16S com tamanho aproximado de 1550 pares de bases e amplicons dos primers ITS com tamanho estimado em 550 pares de bases. Após análise em gel de eletroforese, intensidade das bandas foram consideradas ideais para a realização de sequenciamento de qualidade.

A tabela 1 apresenta a identificação de cada amostra.

Tabela 2: Identificação de microrganismos no Genbank-NCBI, demonstrando a presença de réplicas entre as amostras

Código Microrganismo	Pares de bases	Identificação	Per. Identidade (%)
B6	1.455	<i>Acinetobacter baylyi</i>	97,43
B12	1.469	<i>Acinetobacter baylyi</i>	98,76
B13	1.483	<i>Acinetobacter baylyi</i>	97,64
B14	1155	<i>Acinetobacter baylyi</i>	98,01
B15	1479	<i>Acinetobacter baylyi</i>	98,62
B16	1482	<i>Acinetobacter baylyi</i>	95,95
B17	1488	<i>Acinetobacter baylyi</i>	97,73
B7	1483	<i>Enterobacter ludwigii</i>	98,84
B9	1481	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,01
B10	1472	<i>Enterobacter ludwigii</i>	97,68
B11	1464	<i>Enterobacter ludwigii</i>	98,83
B19	1504	<i>Enterobacter ludwigii</i>	96,48
B20	1485	<i>Enterobacter ludwigii</i>	97,38
B2	1440	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	98,02
B18	1149	<i>Enterobacter mori</i>	98,97
B3	1464	<i>Pantoea sp1.</i>	99,19
B4	1418	<i>Pantoea sp1.</i>	98,50
B21	1474	<i>Pantoea sp1.</i>	87,31
B1	1494	<i>Pantoea sp2.</i>	87,38
B5	1490	<i>Pantoea sp2.</i>	86,62
B8	1159	<i>Pantoea sp2.</i>	92,59
B22	1404	<i>Gluconobacter cerinus</i>	98,62
L1	618	<i>Meyerozyma carpophila</i>	99,63
L2	414	<i>Pichia kluyvery</i>	97,83
L4	452	<i>Pichia kluyvery</i>	97,83
L5	743	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	98,81

O número de pares de bases obtido das sequências do gene 16s, correspondeu à expectativa de 1550 pares de bases,

Nas sequências obtidas do sequenciamento do gene ITS das leveduras, L1 e L5 foram superior aos 550 pares de bases esperados e L2 e L4 apresentaram sequências menor do que o esperado. As sequências completas estão disponíveis no apêndice I.

Dentre os 22 isolados bacterianos, foram identificadas 7 espécies diferentes, sendo *Acinetobacter baylyi*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter mori*, *Kluyvera cryocrescens*, *Gluconobacter cerinus* e duas espécies diferentes do gênero *Pantoea* (*Pantoea sp1.* e *Pantoea sp2.*). Foi possível identificar a presença de várias réplicas entre as amostras isoladas de bactérias. Dentre as 4 colônias de leveduras isoladas, foram identificadas 3 espécies diferentes: *Meyerozyma carophila*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum*. Foi possível constatar que as amostras L2 e L4 correspondem a repetições do mesmo microrganismo.

4.3 – Identificação de bactérias pectolíticas

Com o objetivo de identificar bactérias competentes para degradar pectina, foi realizado o ensaio utilizando placas com meio DYGS sólido, onde o açúcar glicose foi substituído por pectina industrial, na presença de azul de bromotimol. Como pode ser observado na figura 7^a, as bactérias *Enterobacter ludwigii*, *Kluyvera cryocrescens* e *Enterobacter mori* apresentaram formação de um halo azul proveniente da degradação de pectina, em comparação com a placa controle. .

A partir desse resultado, as cepas selecionadas foram avaliadas quanto ao desenvolvimento em meio sólido YEPG, modificado com a substituição de glicose por pectina industrial. O resultado revela que, após 72h de cultivo, as bactérias *Enterobacter ludwigii* e *Enterobacter mori*, foi superior no meio com presença de pectina (YEPP) em relação ao meio com glicose (YEPG), como pode ser observado na figura 7B. Esse resultado demonstra que as bactérias

do gênero *Enterobacter*, possuem maior afinidade por pectina como fonte de açúcar.

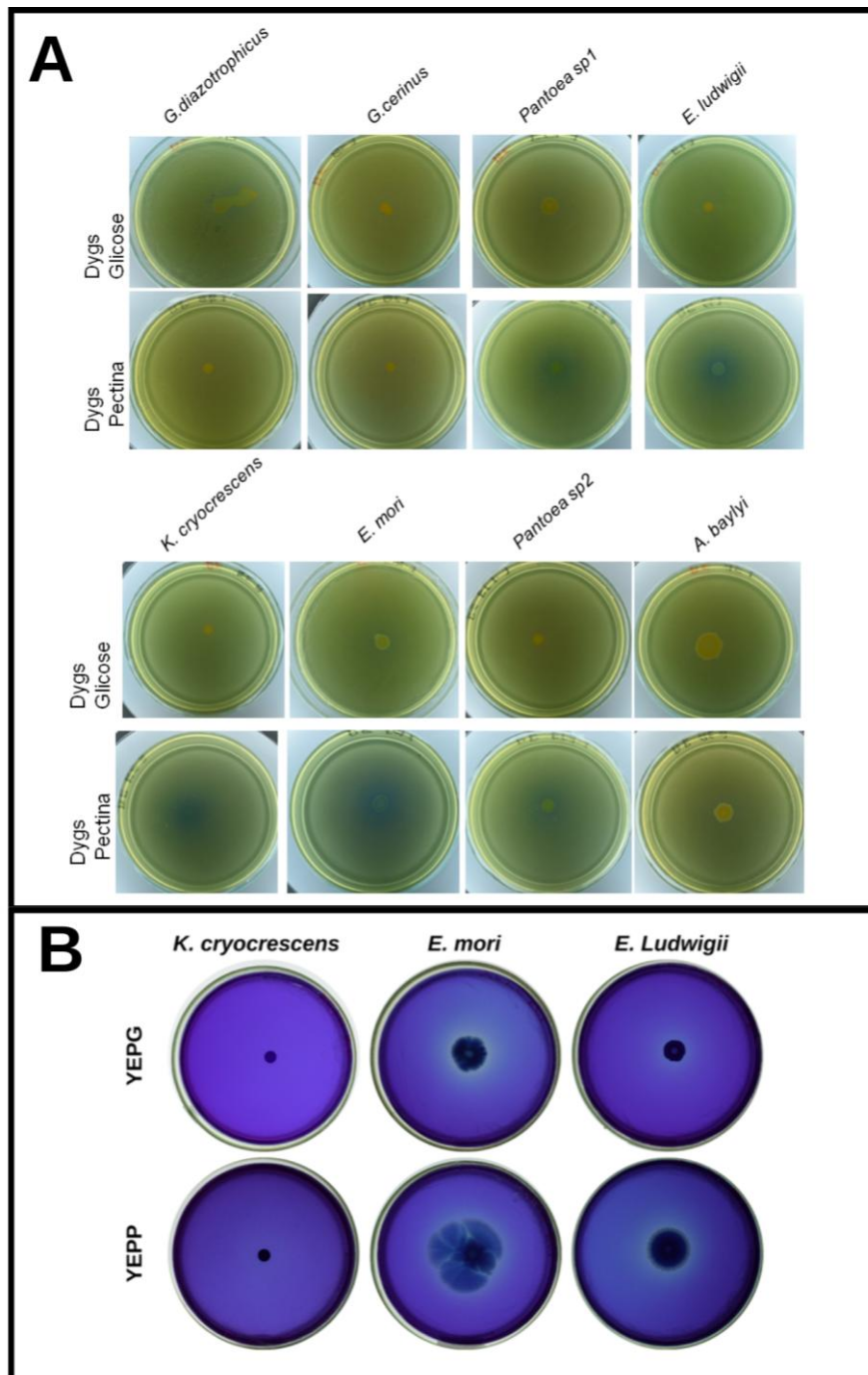


Figura 7: Em A: Ensaio para detecção de bactérias pectolíticas, com placas com meio de cultura com Dygs e logo abaixo a placa correspondente com Dygs sem glicose e adição de pectina. Em B: Ensaio para detecção de bactérias pectolíticas, com placas com meio de cultura com Dygs e logo abaixo a placa correspondente com Dygs sem glicose e adição de pectina.

4.4- Determinação da concentração apropriada de PDM (pectina degradada por microrganismo) adicionada ao meio de cultivo YEPG.

A fim de determinar a melhor concentração de PDM adicionada ao meio de cultura YEPG, foi utilizado PDM degradado por *Enterobacter ludwigii* por 12 horas e 24 horas em concentrações de 5%, 10%, 20% e 30%, aplicado no meio YEPG líquido. Tais meios foram utilizados para o cultivo da levedura *Hanseniaspora uvarum* durante 50 horas, cujo resultado é apresentado na figura 8.

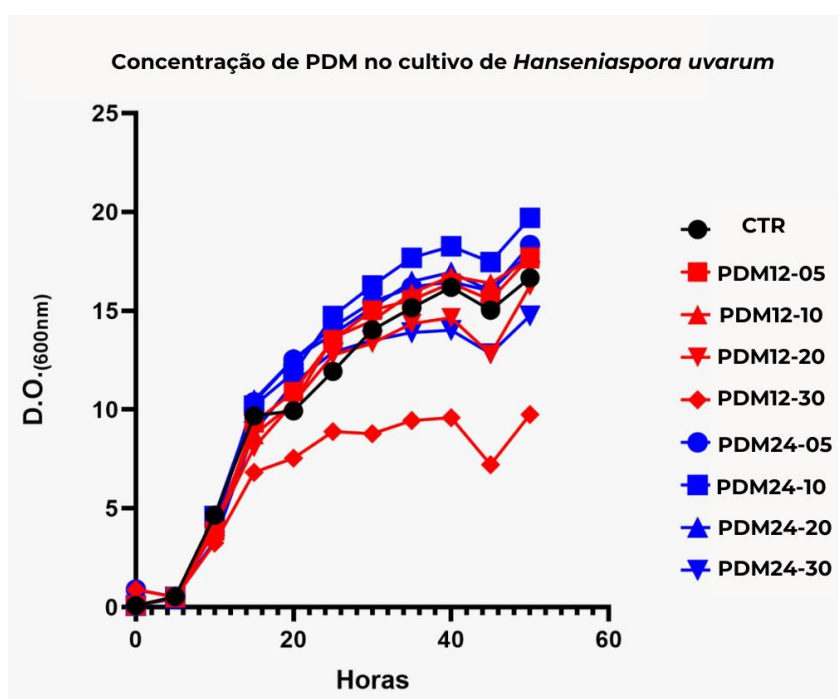


Figura 8: Curva de crescimento da levedura *Hanseniaspora uvarum* em meio de cultura líquido utilizando PDM em substituição a glicose. A linha preta representa a situação controle com a utilização de glicose no meio. As linhas vermelhas representam o tempo de cultivo/degradação de 12 horas de *Enterobacter ludwigii* no meio com pectina, As linhas azuis representam o tempo de cultivo/degradação de 24 horas de *Enterobacter ludwigii* no meio com pectina. Os números 05,10,20 e 30 representam a concentração de PDM no meio de cultura.

Após leitura de D.O em intervalos de 5 horas, esse ensaio demonstrou que a utilização de PDM degradada por 24 horas, por *Enterobacter ludwigii*, na concentração de 10% do meio, favoreceu o desenvolvimento da levedura *Hanseniaspora uvarum* em relação às demais condições elaboradas, inclusive em relação a condição controle, onde foi utilizada glicose.

4.5 - Curva de crescimento das leveduras mediante diferentes fontes de carbono.

Visando avaliar a resposta de cada levedura selecionada a diferentes fontes de açúcar, curvas de cultivo foram realizadas, onde as fontes de açúcar glicose, frutose, manose, sacarose, pectina e PDM foram adicionadas aos meios de cultivo. As D.Os de cada cultivo foram avaliadas a cada 4 horas. Os resultados são apresentados na figura 09 e a diferença estatística é apresentada no apêndice 1.

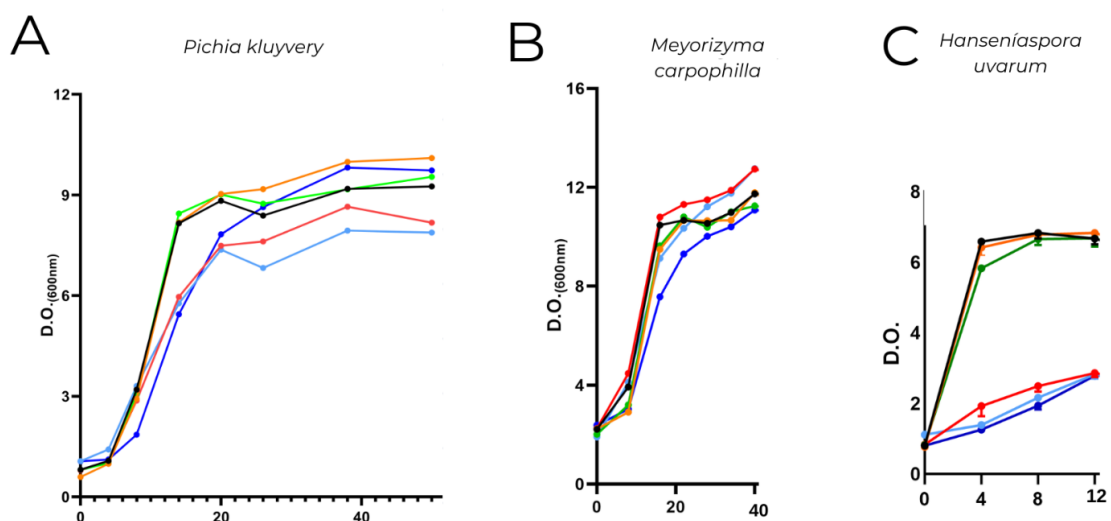


Figura 9: Curva de crescimento das leveduras com diferentes fontes de açúcares. Em A: *Pichia kluyveri* ; em B: *Meyerozyma carpophila* e em C: *Hanseniaspora uvarum*. Representação das cores: Preto – Glicose, laranja – frutose, verde – manose, vermelho – sacarose, azul claro – pectina e azul escuro - PDM

Conforme apresentado na figura 9A, após 15 horas de cultivo, a levedura *Pichia kluyveri* apresenta maior crescimento na presença de açúcares monossacarídeos (glicose, frutose e manose) em comparação às demais fontes de açúcar testadas.

A levedura *Meyerozyma carpophila*, (figura 9B), se desenvolve de modo mais rápido nas 20 horas iniciais de crescimento quando expostas à sacarose e glicose. Entretanto, após 70 horas de avaliação, apenas o cultivo com PDM permaneceu em crescimento exponencial.

A levedura *Hanseniaspora uvarum*, (figura 9C), após 4 horas de cultivo, apresentou melhor desempenho quando exposta aos açúcares monossacarídeos (glicose, frutose e manose).

4.6 - Efeito antagônico das leveduras isoladas do fruto do café sobre o desenvolvimento de fungos filamentosos

Para avaliar a capacidade das leveduras em estudo de inibir o desenvolvimento de fungos filamentosos, foram conduzidos ensaios de cocultivo, *in vitro*, os fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides* foram cultivados na presença das leveduras *Pichia kluyveri*, *Meyerozyma carpophila* e *Hanseniaspora uvarum*, em placas de petri contendo meio de cultura PDA.

Na figura 10, é possível observar que o crescimento dos discos fúngicos foi menor nas placas com a presença da leveduras. Especificamente, nos casos dos tratamentos com *Hanseniaspora uvarum* e *Meyerozyma carpophila*, observa-se uma menor densidade de esporos do fungo *Aspergillus niger* próximo às colônias da levedura.

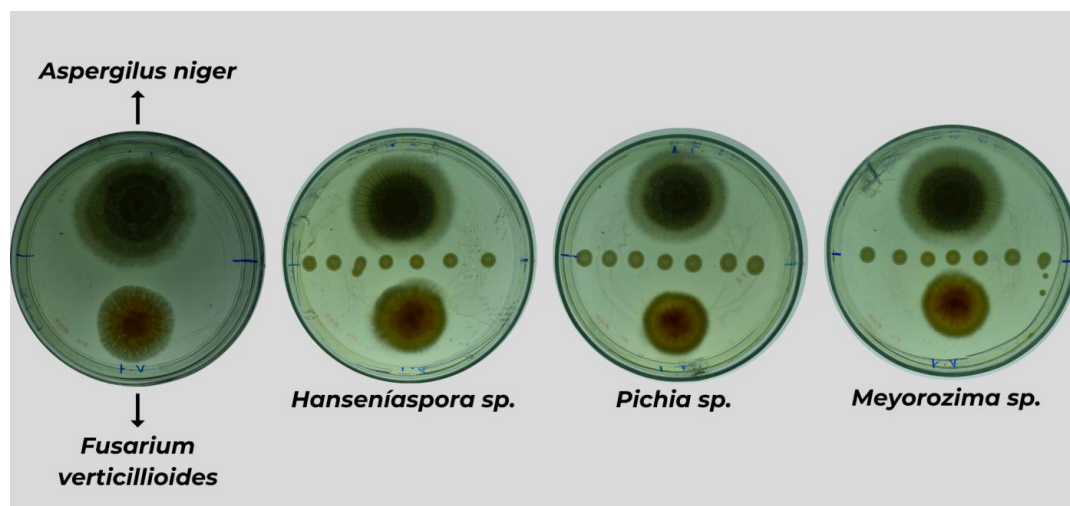


Figura 10: Teste *in vitro* de antagonismo microbiano entre as leveduras (gotas no meio da placa) dos gêneros *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum* e *Meyerozyma carpophila* versus os fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides*.

Esses dados sugerem que as leveduras isoladas dos frutos de café possuem potencial inibição contra o desenvolvimento de fungos filamentosos.

4.7 – Efeito inibitório da levedura *Meyorozyma carpophila* sobre o desenvolvimento de fungos filamentosos aplicados em frutos de café

O efeito inibitório da levedura *Meyorozyma carpophila* sobre o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides*, durante o crescimento na superfície de frutos de café, foi avaliado. Para tanto, frutos de café foram previamente desinfestados e posicionados em placas de petri contendo meio ágar-água. Em seguida esporos dos fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides* foram pulverizados sobre os frutos controle, e sobre frutos previamente pulverizados com a levedura *Meyorozyma carpophila*

A partir desse experimento, foi possível observar que nas condições de tratamento com o fungo *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus niger* houve um crescimento dos fungos sobre toda superfície dos frutos. Porém nas condições onde a levedura *Meyorozyma carpophila*, foi previamente pulverizada houve uma redução significativa da área de contaminação dos frutos tratamento com *Fusarium verticillioides* e inibição total do crescimento de *Aspergillus Níger*.

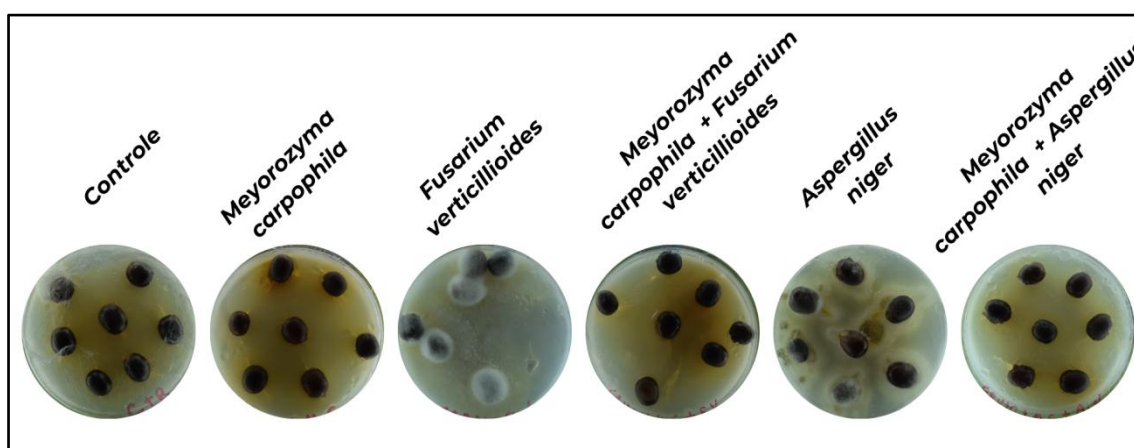


Figura 11: Teste *in vitro* do crescimento dos fungos *Aspergillus niger* (AN) e *Fusarium verticillioides* (FV) pulverizados na superfície de frutos de café previamente tratados com a leveduras *Meyorozyma carpophila* (MC). Na condição controle os frutos esterilizados não foram inoculados com nenhum microrganismo. A condição tratada com *Meyorozyma carpophila*, foi utilizada como controle negativo para os demais tratamentos.

Esses dados indicam que a levedura *Meyerozyma carpophila* possui ação inibitória sobre o desenvolvimento dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus Níger* durante sua colonização sobre frutos de café

4.8 – Efeito inibitório das leveduras selecionadas Wasobre o desenvolvimento de fungos filamentosos na superfície de frutos de café em condições de campo.

A fim de testar a eficiência das leveduras na inibição de frutos de café em condições de campo, foi realizado o teste de antagonismo, utilizando frutos de café divididos em amostras de 1 kg e dispostos em estrutura de secagem do tipo estufa.

Na condição de controle, não foi aplicado nenhum procedimento nos frutos colhidos, para que os microrganismos originários dos frutos pudessem se desenvolver. Nos tratamentos com as leveduras, foi realizado um procedimento de pulverização das leveduras diluídas em água, sobre os frutos .

Após vinte dias, os frutos de cada amostra foram avaliados quanto à área de superfície contaminada e acondicionados em beckers de vidro para pesagem e comparação visual. Na figura 12A é possível observar que o número de frutos totalmente livre de contaminação foi superior em todos os tratamentos com as leveduras. O número de frutos com 1% a 60% de área contaminada foi similar entre todos as condições de tratamento e controle. Porém o número de frutos com área contaminada superior a 60% foi significativamente menor nos tratamentos com as leveduras em relação a condição de controle. Dentre as leveduras utilizadas, *Meyerozyma carpophila* e *Hanseniaspora uvarum* apresentaram melhor desempenho inibitório com os fungos, como pode ser observados na figura 12B.

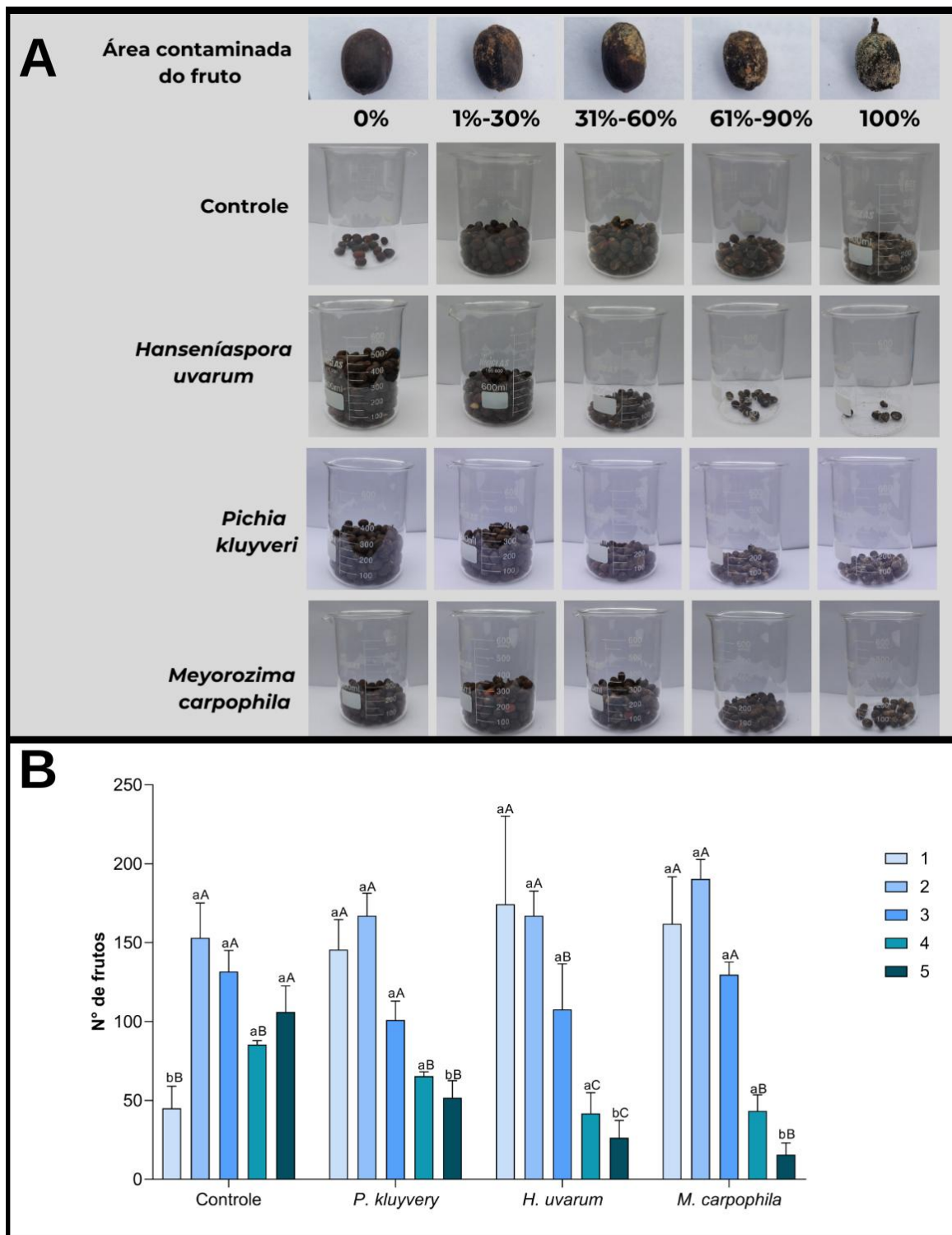


Figura 12: Em A: Distribuição dos frutos por área contaminada em becheres, de acordo com os tratamentos e controle do experimento de antagonismo com fungos naturalmente presente em frutos de café. Em B: Resultado do experimento de campo após 20 dias. : 1- Fruto totalmente livre de contaminação; 2- fruto com 1% a 30% de área contaminada; 3- fruto com 31% a 60% de área contaminada; 4- fruto com 61% a 90% de área contaminada; 5 – fruto com 90% a 100% de área contaminada. A diferença estatística é representada por letras minúsculas para diferença de inibição entre as categorias e letras maiúsculas para diferença dentro de cada tratamento.

Portanto, a prévia pulverização das leveduras testadas sobre frutos recém-colhidos de café é capaz de inibir o crescimento de fungos filamentosos sobre os mesmos, no decorrer do processo fermentativo.

5– Discussão

A microbiota relacionada ao fruto do cafeeiro pode sofrer alterações influenciadas pelo manejo pós-colheita, ou por fatores climáticos que interferem no desenvolvimento das espécies microbianas. A altitude e a disposição da lavoura em relação a radiação solar, são os principais fatores ambientais que criam condições de estresse ou de desenvolvimento para espécies microbianas (FERREIRA et al., 2016; VELOSO et al., 2020). De modo geral locais com altitude elevada proporcionam condições para maior diversidade microbiana nos frutos de café (VELMOUROUGANE, 2016).

Dentre as espécies bactérias que identificamos no processo de fermentação dos frutos de café, algumas já possuem descrições em cultura cafeeira. Outras, não são relacionadas a cultura do café, mas possuem alguma aplicação biotecnológica relatada.

A bactéria *Acinetobacter baylyi* é comumente encontrada em solos e é considerada modelo para biologia sintética, devido ao sistema altamente eficiente para transformação natural e incorporação cromossômica de DNA exógeno, viabilizando sua aplicação em ambientes laboratoriais e industriais. (ELLIOTT; NEIDLE, 2011). Além disso é eficiente para biotransformação de moléculas, como por exemplo a degradação de lignina em mevalonato a partir da degradação de compostos aromáticos de lignina (ARVAY et al., 2021), e realizar biotransformação de furfural em éter difurfurílico (ARTEAGA et al., 2021). Outras espécies do gênero *Acinetobacter* já foram isoladas de frutos de café fermentados e *Acinetobacter baylyi* já foi isolada em comunidades microbianas no intestino de *Hypothenemus hampei*, popularmente conhecida

como broca do café que causa muitos danos a qualidade do grão (MEJÍA-ALVARADO et al., 2021; S R et al., 2022).

As bactérias do gênero *Enterobacter*, são encontradas em habitats diferentes, podendo ser intestino humano, urina, plantas e solo. Em hospedeiros distintos, elas podem causar reações diferentes, podendo ser patógenos em humanos ou promotora de crescimento vegetal em espécies comercialmente importantes (DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019).

Enterobacter ludwigii é considerada uma rizobactéria, e tem forte potencial para atuar no crescimento vegetal. Possui capacidade de solubilizar fosfato e silicato em *Oryza sativa* (ADHIKARI et al., 2020) e eficiência para promover o crescimento de *Solanum lycopersicum* e da grama *Cynodon dactylon* cultivada em solos com estresse salino. Outros trabalhos descreveram sua capacidade de colonizar plantas e degradar alcanos e hidrocarbonetos, sugerindo uma aplicação em regiões contaminadas para recuperação de atividade agrícola. Além disso, é eficiente em atuação nematocida de contra o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus* causador da doença da murcha do pinheiro (ADHIKARI et al., 2020; RANI et al., 2023; WEI et al., 2022; YOUSAF et al., 2011; ZHAO et al., 2022). Já a bactéria *E. mori* foi relatada como causadora de doenças em plantações de amora, melão e cana de açúcar (HUIJIE WU, 2018; L. L. ZHANG, 2018; ZHU et al., 2011). Entretanto não relatos na literatura de isolamento dessas espécies em frutos de café fermentados.

A bactéria identificada como *Kluyvera cryocrescens*, pertence a família das *Enterobacteriaceae*. Entretanto, diferentemente do gênero *Enterobacter*, não há relatos da aplicação de *K. cryocrescens* em processos biotecnológicos para produção agrícola de qualquer natureza. Portanto nosso trabalho é o primeiro a relatar essa espécie isolada em frutos de café. Entretanto é relatada como uma bactéria hospitalar infecciosa em humanos, portando não é interessante prosseguir os experimentos nem recomendá-la para aplicação biotecnológica (FARMER et al., 1981; WEST; VIJAYAN; SHEKAR, 1998).

Gluconobacter é um gênero de bactérias produtoras de ácido acético (AAB) e a espécie *Gluconobacter cerinus* é relatada com essa atividade na

produção de vinhos fermentados (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008). Além disso, *G. cerinus* é capaz de produzir compostos voláteis que inibem o crescimento de vários fungos relacionados a podridão de frutas (OLIVERA et al., 2021). Entretanto, não há relatos de seu uso na cultura cafeeira, portanto *G. cerinus* possui potencial biotecnológico para aplicação em processos pós colheita de café.

Algumas sequências das amostras das bactérias identificadas como gênero *Pantoea* apresentaram identidade inferior a 90%, não sendo possível determinar a identidade no nível de espécie. Entretanto, a literatura apresenta vários relatos desse gênero em aplicações biotecnológicas, principalmente no crescimento vegetal. Sendo considerada uma rizobactéria, foram associadas ao crescimento de plantas de trigo em solo salinizado a capacidade de degradar resíduos de inseticida aplicados no solo (EGAMBERDIEVA et al., 2008; RAMYA et al., 2016). Entretanto, não há relatos dessas espécies sendo associadas a cultura cafeeira.

Dentre as bactérias identificadas, *E. ludwigii* se apresenta características interessantes, devido as referências citadas acima que demonstram sua eficiência na solubilização de fosfato, hidrocarbonetos e sua tolerância a solos salinos. Além disso, nosso trabalho demonstrou sua atividade pecnolítica, o que a torna viável para aplicação em processos de fermentação controlada. Além disso, *G. cerinus* também possui potencial aplicação em processos pós colheita de café, devido as referências citadas na literatura, quanto a sua capacidade de inibir o crescimento fungico (OLIVERA et al., 2021)

Os resultados obtidos, sugerem que as leveduras possuem preferência por açúcares monossacarídeos. Outros trabalhos já haviam relatado a preferência das leveduras por glicose, como fonte de carbono (GALDIERI et al., 2010), o que corrobora com nosso resultado, porém observamos que a preferência de fonte não se limita apenas em glicose, mas em monossacarídeos que são moléculas simples e que agilizam o metabolismo das leveduras durante a fermentação.

Nos últimos anos, as leveduras do gênero *Saccharomyces* dominaram os processos iniciais de fermentação controlada. Entretanto, a descoberta de

novas espécies de leveduras fermentativas tem induzido a produção de cepas comerciais que estão sendo apreciadas em diversas culturas (VICENTE et al., 2021).

Dentre as leveduras não *Saccharomyces*, o gênero *Pichia* tem alcançado destaque nos trabalhos científicos por sua eficácia em aplicações biotecnológicas. Especificamente a espécie *P. Kluyveri*, identificada em nosso trabalho, tem grande aplicação em processos fermentativos de naturezas diferentes, devido a capacidade de produção de álcool e éster (MÉNDEZ-ZAMORA et al., 2020).

Alguns trabalhos já relataram a influência de *P. Kluyveri* na composição aromática de kombucha, devido sua capacidade de produzir éster de acetato agregando perfil sensorial frutado sem a necessidade de aromatizantes artificiais (VAN WYK et al., 2023). Essa característica, se deve ao fato de sua capacidade de produzir acetato de isoamila, proveniente de transaminação de aminoácidos (CHEN et al., 2023).

As espécies de leveduras *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* dominam a fermentação e secagem de *Coffea arabica* na África Oriental, com variações em concentrações e espécies. A utilização de cepas da levedura *Pichia Kluyveri* aumentou a produção de ésteres, principalmente acetato de isoamila e acetato de fenetila, causando perfil sensorial frutado na bebida (WANG et al., 2020). A levedura *Hanseniaspora uvarum* aumenta a concentração de álcoois, aldeídos, ésteres e ácidos que também contribuem para uma percepção sensorial frutada na bebida (ELHALIS et al., 2021). Não há relatos na literatura da utilização da levedura *Meyerozyma carpophila* em processos de fermentação ou aplicações em processos pós colheita. Entretanto, *Meyerozyma caribicca*, inoculada em processo de fermentação de 40 horas, aumentou as concentrações de ácido oxálico, ácido isobutírico e ácido isovalérico, resultando em bebidas com percepção sensorial de frutas cítricas (BRESSANI et al., 2020b).

É fundamental a participação de microrganismos na formação do aroma e sabor do café. O manejo que os produtores aplicam após a colheita é crucial para determinar quais microrganismos vão estar presentes no processo fermentativo dos frutos e determinar quais metabólitos poderão ser

incorporados a percepção sensorial da bebida (BRESSANI et al., 2020a; DE MELO PEREIRA et al., 2015). Entretanto alguns compostos, em grandes concentrações, podem ser prejudiciais à qualidade da bebida do café. Por exemplo, o ácido clorogênico é um antioxidante crucial para a qualidade da bebida, mas em grandes concentrações atribui um perfil sensorial herbáceo na bebida (FERNANDES; NÍSIA; PEREIRA, 2001). A presença de ácido acético, em baixas concentrações, pode fornecer notas sensoriais peculiares à bebida do café, remetendo a vinho ou uísque. Porém em elevadas concentrações, pode trazer notas muito azedas que remetem a vinagre ou fruta podre. O ácido acético é produzido principalmente por bactérias do gênero *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Enterobacter*, que utilizam glicose e ácido cítrico como substrato, durante a fermentação (DE ROOS; DE VUYST, 2018).

Alguns compostos, mesmo em baixas concentrações, alteram negativamente a qualidade sensorial da bebida, como os compostos de pirazinas (3-Isopropil-2-metoxipirazina, 2-Etil-3,5-dimetilpirazina, 2,3-Dietil-5-metilpirazina) que são produzidas por fungos do gênero *Tolypocladium* ou bactérias do gênero *Bacillus spp.* e *Serratia spp.*. Tais compostos podem ser encontrados na bebida do café mesmo após a torra, apresentando um odor sensorial de batata assada, nozes ou herbáceo (FADEL et al., 2022; SILVA-JUNIOR et al., 2018). Geosmina é um composto responsável pelo odor característico de terra, encontrado em cafés de baixa qualidade. Esse composto é produzido por bactérias como *Norcardia cumidellens*; *N. fluminea*; *Streptomyces luridiscabiei*; *S. albidoflavus* e fungos *Penicillium discolor*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea* e *Chaetomium spp.*, geralmente encontrados em solos (CHURRO et al., 2020). Altas concentrações de alguns compostos de éster como etil 2-metilbutirato e etil 3-metilbutirato, geram um odor desagradável de fruta podre, indicando uma fermentação negativa no grão de café verde (GROSCH, 2008). O acúmulo de butano-1,3-diol resulta em aromas herbáceos e terrosos na bebida do café (BERTRAND et al., 2012).

Enquanto a maioria dos trabalhos utilizam leveduras na fermentação do café para buscar novas moléculas que atribuam sensorias agradáveis, nosso trabalho demonstra que além da competência citada acima, as leveduras

podem atuar inibindo o crescimento de fungos potencialmente deletérios a qualidade da bebida.

Através dos nossos resultados dos experimentos, foi possível observar a que as leveduras prejudicam o crescimento de fungos que se desenvolvem de maneira espontânea nos frutos de café, devido as varias fontes de contaminação possíveis, podendo ser desde o cafeeiro, passando pela água do lavador até o contato com o piso de secagem.

Depois de alguns dias, os filamentos dos fungos se desintegram, entretanto os esporos e as possíveis toxinas produzidas, permanecem nos frutos já secos e que serão armazenados (SANTOS; CHALFOUN; PIMENTA, 2009).

Alguns trabalhos relataram a eficácia de *P. kluyvry* na inibição de fungos que causam apodrecimento de frutas como uva e pêra, os autores relacionam a produção de diversos compostos voláteis ao processo de inibição de fungos de gêneros diferentes, entretanto, não apontam com precisão quais são os compostos responsáveis pela inibição (MEWA-NGONGANG et al., 2019). Além disso, foi observado que a inoculação da levedura *M. caribbica* no processo fermentativo de café conilon (*Coffea canephora*) controlou a população de fungos filamentosos durante a fermentação e conseqüentemente, aumentou a pontuação atribuída durante análise sensorial da bebida (DA SILVA et al., 2021). Por fim, *P. kluyveri* e *H. uvarum* inibiram o crescimento de *Aspergillus ochraceus* e conseqüentemente, a biossíntese de OTA (MASOUD; KALTOFT, 2006).

Essas informações corroboram a ideia de que as leveduras são importantes agentes na qualidade da bebida do café, não apenas por produzir metabólitos originados na fermentação e alterar positivamente a qualidade da bebida, mas pelo fato de inibir o crescimento de microrganismos deletérios para a qualidade. Nesse sentido, é possível que uma espécie de levedura possa inibir o crescimento de um fungo específico, mas diante de cepas de fungos de outra espécie, o resultado possa ser reduzido ou insignificante.

A partir dessas observações, sugerimos que uma composição que inclua espécies diferentes de leveduras, possa ter maior eficiência de inibição, diante da diversidade fungos originários da produção de café. Nesse sentido, o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para combater o crescimento de fungos nos frutos de café, apresenta-se como uma importante ferramenta para auxiliar os cafeicultores a produzir café de alta qualidade e agregar valor ao seu produto, sem a necessidade de utilizar produtos químicos que afetam negativamente o ambiente, e a qualidade nutricional do café.

6 – Conclusões

Através desse trabalho foi possível elucidar perguntas importantes para a produção de café de alta qualidade, principalmente na relação entre as leveduras e os fungos que colonizam os frutos de café nos procedimentos pós colheita.

Foi possível concluir que as leveduras isoladas e identificadas nesse trabalho, se pulverizadas na superfície das cascas dos frutos, inibem o crescimento dos fungos filamentosos, o que pode favorecer a conservação da qualidade intrínseca dos frutos maduros.

Podemos concluir, portanto, que é potencialmente viável a utilização dessas leveduras em um futuro produto biotecnológico, para aplicação em campo, com finalidade de contribuir para elevação na alta qualidade do café produzido.

7 – Referências

ABBOTT, D. W.; BORASTON, A. B. Structural Biology of Pectin Degradation by Enterobacteriaceae . **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 301–316, 2008.

ADAMS, A.; DE KIMPE, N. Formation of pyrazines and 2-acetyl-1-pyrroline by *Bacillus cereus*. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1230–1238, 2007.

ADHIKARI, A. et al. Effect of Silicate and Phosphate Solubilizing Rhizobacterium *Enterobacter ludwigii* GAK2 on *Oryza sativa* L. under Cadmium Stress. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 118–126, 2020.

- ANNUNZIATA, G. et al. Fermentation of foods and beverages as a tool for increasing availability of bioactive compounds. focus on short-chain fatty acids. **Foods**, v. 9, n. 8, 2020.
- ARTEAGA, J. E. et al. Furfural biotransformation in *Acinetobacter baylyi* ADP1 and *Acinetobacter schindleri* ACE. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 5, p. 1043–1050, 2021.
- ARVAY, E. et al. Engineering *Acinetobacter baylyi* ADP1 for mevalonate production from lignin-derived aromatic compounds. **Metabolic Engineering Communications**, v. 13, n. May 2020, p. e00173, 2021.
- AVALLONE, S. et al. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1308–1311, 2000.
- AYAD, E. H. E. et al. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 725–735, 1999.
- BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine-A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 60–70, 2008.
- BERTRAND, B. et al. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2575–2583, 2012.
- BLANCO, P. et al. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of godello and albariño wines as influenced by *saccharomyces cerevisiae* yeast strains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 11, p. 2849–2857, 2013.
- BRESSANI, A. P. P. et al. Coffee protein profiles during fermentation using different yeast inoculation methods. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, 2020a.
- BRESSANI, A. P. P. et al. Organic acids produced during fermentation and sensory perception in specialty coffee using yeast starter culture. **Food Research International**, v. 128, p. 108773, 2020b.
- CANTERI, M. H. G. et al. Pectin: From raw material to the final product. **Polimeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.
- CAO, X. et al. Enhancing linalool production by engineering oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1641–1644, 2017.
- CARNAÚBA, J. P. et al. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 199–200, 2007.
- CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 20, n. 1–2, p. 1–6, 1963.
- CHA, J.; DEBNATH, T.; LEE, K. G. Analysis of α -dicarbonyl compounds and volatiles formed in Maillard reaction model systems. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8–13, 2019.
- CHEN, P. H.; CHEN, R. Y.; CHOU, J. Y. Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. **Mycobiology**, v. 46, n. 1, p. 33–46, 2018.

- CHEN, S. et al. Inoculation of *Lactobacillus sakei* with *Pichia kluyveri* or *Saccharomyces boulardii* improves flavor compound profiles of salt-free fermented wheat-gluten: Effects from single strain inoculation. **Current Research in Food Science**, v. 6, n. July 2022, 2023.
- CHENG, B. et al. Influence of genotype and environment on coffee quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 57, p. 20–30, 2016.
- CHEON, Y. et al. A biosynthetic pathway for hexanoic acid production in *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Biotechnology**, v. 182–183, n. 1, p. 30–36, 2014.
- CHURRO, C. et al. A novel cyanobacterial geosmin producer, revising *GeoA* distribution and dispersion patterns in Bacteria. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2020.
- COGHE, S. et al. Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 602–608, 2004.
- DA SILVA, B. L. et al. Fermentation of *Coffea canephora* inoculated with yeasts: Microbiological, chemical, and sensory characteristics. **Food Microbiology**, v. 98, n. March, 2021.
- DAMATTA, F. M. et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 19, n. 4, p. 179–211, 2008.
- DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 1–32, 2019.
- DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006.
- DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60–66, 2014.
- DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. **Food Research International**, v. 75, p. 348–356, 2015.
- DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 96–101, 2016.
- DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Lactic acid bacteria: what coffee industry should know? **Current Opinion in Food Science**, v. 31, p. 1–8, 2020.
- DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 115–119, 2018.
- DEMYTTENAERE, J. C. R. Biotransformation of terpenoids by microorganisms. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 25, n. PART F, p. 125–178, 2001.
- DONAGHY, J. A.; KELLY, P. F.; MCKAY, A. Conversion of ferulic acid to 4-vinyl

guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 453–456, 1999.

DUKARE, A. S. et al. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 9, p. 1498–1513, 2019.

EGAMBERDIEVA, D. et al. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2008.

ELHALIS, H. et al. Microbiological and Chemical Characteristics of Wet Coffee Fermentation Inoculated With *Hansinasporea uvarum* and *Pichia kudriavzevii* and Their Impact on Coffee Sensory Quality. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. August, p. 1–13, 2021.

ELLIOTT, K. T.; NEIDLE, E. L. *Acinetobacter baylyi* ADP1: Transforming the choice of model organism. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1075–1080, 2011.

ETSCHMANN, M. M. W. et al. Production of the aroma chemicals 3-(methylthio)-1-propanol and 3-(methylthio)-propylacetate with yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 579–587, 2008.

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

FADEL, H. H. M. et al. Optimization of the production of roasted-nutty aroma by a newly isolated fungus *Tolyposcladium inflatum* SRH81 and impact of encapsulation on its quality. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, 2022.

FAOSTAT. **Mundo 1995-2019**.

FARMER, J. J. et al. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae: Identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 919–933, 1981.

FERNANDES, S.; NÍSIA, P.; PEREIRA, R. Teores De Polifenóis, Ácido Clorogênico, Cafeína E Proteína Em Café Torrado. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 3, p. 197–199, 2001.

FERREIRA, L. T.; SANTOS, J. Taxa de crescimento do consumo mundial de café de 2% ao ano projetada 208 milhões de sacas até 2030. **Embrapa**, p. 5–6, 2019.

FERREIRA, W. P. M. et al. Effects of the Orientation of the Mountainside, Altitude and Varieties on the Quality of the Coffee Beverage from the “Matas de Minas” Region, Brazilian Southeast. **American Journal of Plant Sciences**, v. 07, n. 08, p. 1291–1303, 2016.

GALDIERI, L. et al. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 14, n. 6, p. 629–638, 2010.

GONTHIER, M. P. et al. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1853–1859, 2003.

GRAND VIEW RESEARCH. Specialty Coffee Market Size & Trends. **Grand View Research**, 2023.

GRAVINA, S. A.; YEP, G. L.; KHAN, M. Human biology of taste. **Annals of Saudi Medicine**, v. 33, n. 3, p. 217–222, 2013.

GROSCH, W. Chemistry III: Volatile Compounds. **Coffee: Recent Developments**, p. 68–89, 2008.

HAILE, M.; KANG, W. H. Antioxidant activity, total polyphenol, flavonoid and tannin contents of fermented green coffee beans with selected yeasts. **Fermentation**, v. 5, n. 1, 2019.

HANSEN, E. H. et al. De novo biosynthesis of Vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2765–2774, 2009.

HAYASHIDA, Y. et al. Production of 4-hydroxyfuranones in simple media by fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 6, p. 505–509, 1999.

HERNANDEZ-ORTE, P. et al. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 773–781, 2009.

HOFFMANN, A. et al. Synthesis of ethyl acetate from glucose by *Kluyveromyces marxianus*, *Cyberlindnera jadinii* and *Wickerhamomyces anomalus* depending on the induction mode. **Engineering in Life Sciences**, v. 21, n. 3–4, p. 154–168, 2021.

HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1–3, p. 165–178, 1993.

HUIJIE WU, ET AL. First Report of Bacterial Soft Rot Caused by *Enterobacter mori* Affecting Host Watermelon. **Plant Disease**, v. 106, n. 6, p. 1–2, 2018.

INOUE, Y. et al. Roles of Esterase and Alcohol Acetyltransferase on Production of Isoamyl Acetate in *Hansenula mrakii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 644–649, 1997.

KLEIN, N. et al. Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 404–411, 2001.

KRANENBURG, V. et al. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 111–121, 2002.

KRUG, C. A.; CARVALHO, A.; MENDES, J. E. T. Taxonomia de *Coffea arabica* L. III- *Coffea arabica* L. var. *anomalis*. **Bragantia**, v. 10, n. 11, p. 335–343, 1950.

KUNJAPUR, A. M.; TARASOVA, Y.; PRATHER, K. L. J. Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of *Escherichia coli*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 33, p. 11644–11654, 2014.

L. L. ZHANG, ET AL. First Report of Leaf Spot Disease Caused by *Enterobacter mori* on *Canna indica* in China. **Plant Disease**, v. 106, n. 6, p. 1–2, 2018.

LIAN, J.; CHAO, R.; ZHAO, H. Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R,3R)-butanediol. **Metabolic Engineering**, v. 23, p. 92–99, 2014.

- LIATO, V.; AÏDER, M. Geosmin as a source of the earthy-musty smell in fruits, vegetables and water: Origins, impact on foods and water, and review of the removing techniques. **Chemosphere**, v. 181, p. 9–18, 2017.
- MANDALIKA, A. et al. Integrated biorefinery model based on production of furans using open-ended high yield processes. **Green Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 2480–2489, 2014.
- MANZONI, M. et al. Phenylacetaldehyde by acetic acid bacteria oxidation of 2-phenylethanol. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 4, p. 341–346, 1993.
- MARELLA, E. R. et al. A single-host fermentation process for the production of flavor lactones from non-hydroxylated fatty acids. **Metabolic Engineering**, v. 61, n. August 2019, p. 427–436, 2020.
- MARTINS, P. M. M. et al. Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical compounds and the quality of fermented coffees. **Food Research International**, v. 129, p. 108872, 2020.
- MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin a (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 229–234, 2006.
- MASSAWE, G. A.; LIFA, S. J. Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 41–82, 2010.
- MEJÍA-ALVARADO, F. S. et al. Structure and Dynamics of the Gut Bacterial Community Across the Developmental Stages of the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. July, p. 1–11, 2021.
- MÉNDEZ-ZAMORA, A. et al. The non-Saccharomyces yeast *Pichia kluyveri* for the production of aromatic volatile compounds in alcoholic fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 8, p. 1–14, 2020.
- MESQUITA, C. et al. MANUAL DO CAFÉ Implantação de cafezais. **Belo Horizonte, Emater-Mg**, p. 52, 2016.
- MEWA-NGONGANG, M. et al. The Use of *Candida pyralidae* and *Pichia kluyveri* to Control Spoilage Microorganisms of Raw Fruits Used for Beverage Production. **Foods**, v. 8, n. 454, p. 1–14, 2019.
- MOSTAFA, S. et al. Floral Scents and Fruit Aromas: Functions, Compositions, Biosynthesis, and Regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. March, p. 1–23, 2022.
- NISHIMURA, O.; MIHARA, S. Investigation of 2-Hydroxy-2-Cyclopenten-1-Ones in Roasted Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 1038–1041, 1990.
- NOBA, S. et al. Elucidation of the Formation Mechanism of 2-Mercapto-3-Methyl-1-Butanol in Beer. Part II: Identification of the Key Enzymes in Yeast. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 79, n. 1, p. 82–89, 2020.
- OLIVERA, M. et al. Diffusible compounds produced by *Hanseniaspora osmophila* and *Gluconobacter cerinus* help to control the causal agents of gray rot and summer bunch rot of table grapes. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, 2021.

- OTT, A.; GERMOND, J. E.; CHAINTREAU, A. Origin of acetaldehyde during milk fermentation using ¹³C-labeled precursors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1512–1517, 2000.
- POSPÍŠIL, S. et al. Excretion of butyraldehyde, isobutyraldehyde and valeraldehyde by *Streptomyces cinnamonensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 119, n. 1–2, p. 95–98, 1994.
- RAMYA, S. L. et al. Detection of carboxylesterase and esterase activity in culturable gut bacterial flora isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), from India and its possible role in indoxacarb degradation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 327–336, 2016.
- RANI, N. et al. Development of Zn biofertilizer microbeads encapsulating *Enterobacter ludwigii*-PS10 mediated alginate, starch, poultry waste and its efficacy in *Solanum lycopersicum* growth enhancement. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 240, n. April, p. 124381, 2023.
- RAWEL, H. M.; KULLING, S. E. Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 2, n. 4, p. 399–406, 2007.
- REICHEMBACH, L. H.; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L. Extraction and characterization of a pectin from coffee (*Coffea arabica* L.) pulp with gelling properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 245, n. June, p. 116473, 2020.
- REZAEI, M. N. et al. The impact of yeast fermentation on dough matrix properties. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 96, n. 11, p. 3741–3748, 2016.
- RONCORONI, M. et al. The yeast IRC7 gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 926–935, 2011.
- S R, S. et al. Microbial ecology and functional coffee fermentation dynamics with *Pichia kudriavzevii*. **Food Microbiology**, v. 105, n. July 2021, p. 104012, 2022.
- SANTOS, M. A.; CHALFOUN, S. M.; PIMENTA, C. J. Influence of the wet processing and drying types on chemical and physicochemical composition of coffee (*Coffea arabica* L.). **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 213–218, 2009.
- SCAA. Protocolo Para Análise Sensorial De Café. **Scaa Cupping Protocols**, n. December, p. 13, 2008.
- SGARBI, E. et al. Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4223–4234, 2013.
- SIDDIQUI, M. S. et al. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 2, p. 144–170, 2012.
- SILVA-JUNIOR, E. A. et al. Pyrazines from bacteria and ants: Convergent chemistry within an ecological niche. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4–10, 2018.
- SILVA, C. F. et al. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 951–957, 2008.
- SIRIPONG, W. et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isopentanol (3-Methyl-1-butanol). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 138, n.

February, p. 109557, 2020.

SMRKE, S. et al. Differentiation of degrees of ripeness of Catuai and Tipica green coffee by chromatographical and statistical techniques. **Food Chemistry**, v. 174, p. 637–642, 2015.

SNOEP, J. L. et al. Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and α -acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4838–4841, 1992.

TANG, J. et al. Screening of β -damascenone-producing strains in light-flavor Baijiu and its production optimization via response surface methodology. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. November, p. 1–13, 2022.

VAN WYK, N. et al. The Influence of *Pichia kluyveri* Addition on the Aroma Profile of a Kombucha Tea Fermentation. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 1–7, 2023.

VARELA, C. et al. Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with “wild” indigenous and inoculated yeasts: Role of yeast volatile compounds. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 15, n. 3, p. 238–248, 2009.

VELMOUROUGANE, K. Impact of Organic and Conventional Systems of Coffee Farming on Soil Properties and Culturable Microbial Diversity. **Scientifica**, v. 2016, 2016.

VELOSO, T. G. R. et al. Effects of environmental factors on microbiota of fruits and soil of *Coffea arabica* in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

VICENTE, J. et al. High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1–15, 2021.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 20, n. 8, p. 87–95, 2007.

VLASSI, A. et al. Volatile Organic Compounds From *Lysobacter capsici* AZ78 as Potential Candidates for Biological Control of Soilborne Plant Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. August, p. 1–11, 2020.

WANG, C. et al. Coffee flavour modification through controlled fermentations of green coffee beans by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri*: Part I. Effects from individual yeasts. **Food Research International**, v. 136, n. July, 2020.

WEI, H. et al. Salt-tolerant endophytic bacterium *Enterobacter ludwigii* B30 enhance bermudagrass growth under salt stress by modulating plant physiology and changing rhizosphere and root bacterial community. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. August, p. 1–20, 2022.

WEST, B. C.; VIJAYAN, H.; SHEKAR, R. *Kluyvera cryocrescens* finger infection: Case report and review of eighteen *Kluyvera* infections in human beings. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 32, n. 3, p. 237–241, 1998.

XU, X. et al. Unraveling the Mechanisms for Low-Level Acetaldehyde Production during Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces pastorianus* Lager Yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 2020–2027, 2019.

YERETZIAN, C. et al. From the green bean to the cup of coffee: Investigating coffee

roasting by on-line monitoring of volatiles. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 2, p. 92–104, 2002.

YOUSAF, S. et al. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2675–2683, 2011.

ZHA, M. et al. Generation of 2-Furfurylthiol by Carbon-Sulfur Lyase from the Baijiu Yeast *Saccharomyces cerevisiae* G20. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 9, p. 2114–2120, 2018.

ZHAO, Y. et al. Gene *sdaB* Is Involved in the Nematocidal Activity of *Enterobacter ludwigii* AA4 Against the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. May, p. 1–18, 2022.

ZHU, B. et al. *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 2769–2774, 2011.

et al. A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications. **Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering**, v. 59, n. 4, p. 66–74, 2017.

Apêndice 1

Tabela de análise estatística da curva de crescimento das leveduras em meio de cultura com diferentes fontes de açúcares

Tabela 3: Tabela de média dos dados de leitura de Densidade óptica durante o crescimento das leveduras em meio de cultura com diferentes fontes de açúcar.

<i>Pichia kluyveri</i>						
Tempo	Glicose	Frutose	Manose	Sacarose	Pectina	Degr. de Pectina
0	a 0,81	a 0,59	a 0,81	a 0,79	a 1,06	a 1,06
4	a 1,07	a 0,99	a 1,00	a 1,05	a 1,41	a 1,11
8	a 3,20	a 2,92	a 3,07	a 2,87	a 3,30	b 1,86
14	a 8,15	a 8,18	a 8,44	b 5,96	b 5,77	b 5,44
20	a 8,83	a 9,03	a 9,01	b 7,49	b 7,37	b 7,82
26	a 8,38	a 9,17	c 8,74	b 7,62	c 6,82	a 8,64
38	b 9,18	a 9,99	b 9,17	c 8,65	d 7,94	a 9,81

50	a 9,26	a 10,10	a 9,54	b 8,17	b 7,88	a 9,73
<i>Hanseniaspora uvarum</i>						
Tempo	Glicose	Frutose	Manose	Sacarose	Pectina	Degr. de Pectina
0	b 0,80	b 0,77	b 0,82	b 0,83	a 1,11	b 0,80
4	a 6,59	a 6,42	b 5,83	c 1,92	d 1,38	d 1,26
8	a 6,83	a 6,78	a 6,65	b 2,49	c 2,16	d 1,94
12	a 6,67	a 6,83	a 6,68	b 2,86	b 2,82	b 2,78
<i>Meyerozyma carpophilla</i>						
Tempo	Glicose	Frutose	Manose	Sacarose	Pectina	Degr. de Pectina
0	a 2,22	a 2,24	a 2,01	a 2,25	a 1,91	a 2,38
8	a 3,93	b 2,91	b 3,20	a 4,48	a 4,12	b 3,02
16	a 10,48	b 9,49	b 9,64	a 10,80	c 9,13	c 7,57
22	a 10,67	a 10,66	a 10,80	a 11,31	a 10,35	b 9,31
28	a 10,55	a 10,66	a 10,39	a 11,50	a 11,22	a 10,02
34	a 10,98	a 10,67	a 11,01	a 11,89	a 11,77	a 10,40
40	b 11,74	b 11,79	b 11,25	a 12,74	a 12,76	b 11,08

Apêndice 2

Análise de variância do experimento de antagonismo

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	206.850000	68.950000	0.059	0.9810
CAT	4	122007.233333	30501.808333	26.303	0.0000
TRAT*CAT	12	53916.233333	4493.019444	3.875	0.0006
erro	40	46384.666667	1159.616667		
Total corrigido	59	222514.983333			

CV (%) = 32.28
Média geral: 105.4833333 Número de observações: 60

Teste Scott-Knott (1974) para a FV TRAT

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 15
Erro padrão: 8,79248416420398

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
HU	103.400000 a1	
CTR	104.200000 a1	
PK	106.133333 a1	
MC	108.200000 a1	

Teste Scott-Knott (1974) para a FV CAT

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12
Erro padrão: 9,83029614112526

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
E	49.916667 a1	
D	58.916667 a1	
C	117.500000 a2	
A	131.750000 a2	
B	169.333333 a3	

Análise do desdobramento de TRAT dentro de cada nível de:

CAT

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	/1 3	31342.916667	10447.638889	9.010	0.0001
TRAT	/2 3	2156.000000	718.666667	0.620	0.6063
TRAT	/3 3	2153.000000	717.666667	0.619	0.6068
TRAT	/4 3	3838.250000	1279.416667	1.103	0.3590
TRAT	/5 3	14632.916667	4877.638889	4.206	0.0112
Erro	40	46384.666667	1159.616667		

Codificação usada para o desdobramento
cod. CAT

- 1 = A
- 2 = B
- 3 = C
- 4 = D
- 5 = E

Teste de Scott-Knott (1974) para o
desdobramento de TRAT dentro da codificação:

1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 19,6605922822505

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CTR	45.000000	a1
PK	145.666667	a2
MC	162.000000	a2
HU	174.333333	a2

Teste de Scott-Knott (1974) para o
desdobramento de TRAT dentro da codificação:

2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 19,6605922822505

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
-------------	--------	---------------------

CTR	153.000000 a1
PK	167.000000 a1
HU	167.000000 a1
MC	190.333333 a1

Teste de Scott-Knott (1974) para o
desdobramento de TRAT dentro da codificação:

3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 19,6605922822505

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
PK	101.000000 a1	
HU	107.666667 a1	
MC	129.666667 a1	
CTR	131.666667 a1	

Teste de Scott-Knott (1974) para o
desdobramento de TRAT dentro da codificação:

4

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 19,6605922822505

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
HU	41.666667 a1	
MC	43.333333 a1	
PK	65.333333 a1	
CTR	85.333333 a1	

Teste de Scott-Knott (1974) para o
desdobramento de TRAT dentro da codificação:

5

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 19,6605922822505

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
MC	15.666667 a1	
HU	26.333333 a1	
PK	51.666667 a1	
CTR	106.000000 a2	

Análise do desdobramento de CAT dentro de cada nível de:

TRAT

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAT	/1 4	20999.066667	5249.766667	4.527	0.0041
CAT	/2 4	56534.933333	14133.733333	12.188	0.0000
CAT	/3 4	68613.733333	17153.433333	14.792	0.0000
CAT	/4 4	29775.733333	7443.933333	6.419	0.0004
Erro	40	46384.666667	1159.616667		

Codificação usada para o desdobramento
cod. TRAT
1 = CTR
2 = HU
3 = MC
4 = PK

Teste de Scott-Knott (1974) para o
desdobramento de CAT dentro da codificação:

1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente
NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 19,6605922822505

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
A	45.000000 a1	
D	85.333333 a1	

E 106.000000 a2
C 131.666667 a2
B 153.000000 a2

Teste de Scott-Knott (1974) para o
desdobramento de CAT dentro da codificação:

2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 19,6605922822505

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
E	26.333333 a1	
D	41.666667 a1	
C	107.666667 a2	
B	167.000000 a3	
A	174.333333 a3	

Teste de Scott-Knott (1974) para o
desdobramento de CAT dentro da codificação:

3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 19,6605922822505

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
E	15.666667 a1	
D	43.333333 a1	
C	129.666667 a2	
A	162.000000 a2	
B	190.333333 a2	

Teste de Scott-Knott (1974) para o
desdobramento de CAT dentro da codificação:

4

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 19,6605922822505

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
E	51.666667 a1	
D	65.333333 a1	
C	101.000000 a1	
A	145.666667 a2	
B	167.000000 a2	

Apendice 3

Tabela de identificação das bactérias no NCBI

Tabela 4: Planilha de alinhamento das sequencias de bactérias com o banco de dados do NCBI

B1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pantoea agglomerans strain NBRC 102470 16S	Pantoea agglomerans	1666	1666	93%	0.0	87.38%	1466	NR_114111.1
[Curtobacterium] plantarum strain CL63 16S	[Curtobacterium] plantarum	1665	1665	93%	0.0	87.30%	1440	NR_104943.1
Pantoea agglomerans strain DSM 3493 16S	Pantoea agglomerans	1665	1665	93%	0.0	87.30%	1473	NR_041978.1
Pantoea agglomerans strain NCTC9381 16S	Pantoea agglomerans	1660	1660	93%	0.0	87.16%	1512	NR_114735.1
Pantoea agglomerans strain LMG 1286 16S	Pantoea agglomerans	1651	1651	91%	0.0	87.27%	1387	NR_116751.1
Pantoea vagans strain LMG 24199 16S	Pantoea vagans	1647	1647	92%	0.0	86.94%	1429	NR_116115.1
Pantoea brenneri strain LMG 5343 16S	Pantoea brenneri	1631	1631	91%	0.0	87.01%	1376	NR_116748.1
Flavobacterium acidificum strain LMG 8364 16S	Flavobacterium acidificum	1627	1627	92%	0.0	86.59%	1432	NR_104962.1
Pantoea deleyi strain LMG 24200 16S	Pantoea deleyi	1627	1627	91%	0.0	86.93%	1443	NR_116114.1

Pantoea anthophila strain LMG 2558 16S	Pantoea anthophila	1627	1627	92%	0.0	86.80%	1432	NR_116113.1
--	--------------------	------	------	-----	-----	--------	------	-------------

B2

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Kluyvera cryocrescens strain NBRC 102467 16S	Kluyvera cryocrescens	2400	2400	98%	0.0	98.02%	1465	NR_114108.1
Enterobacter bugandensis strain 247BMC 16S	Enterobacter bugandensis	2397	2397	98%	0.0	97.95%	1444	NR_148649.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	2395	2395	98%	0.0	97.81%	1495	NR_044977.1
Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis strain 10-17 16S	Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis	2388	2388	97%	0.0	98.14%	1429	NR_126208.1
Kluyvera cryocrescens strain 12993 16S	Kluyvera cryocrescens	2388	2388	97%	0.0	98.08%	1459	NR_028803.1
Klebsiella aerogenes strain NBRC 13534 16S	Klebsiella aerogenes	2382	2382	98%	0.0	97.74%	1465	NR_113614.1
Klebsiella aerogenes KCTC 2190 16S ribosomal RNA, complete sequence	Klebsiella aerogenes KCTC 2190	2381	2381	98%	0.0	97.74%	1540	NR_102493.2
Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S	Enterobacter ludwigii	2381	2381	98%	0.0	97.74%	1513	NR_042349.1
Klebsiella aerogenes strain NCTC10006 16S	Klebsiella aerogenes	2380	2380	98%	0.0	97.66%	1511	NR_114737.1
Leclercia adecarboxylata strain NBRC 102595 16S	Leclercia adecarboxylata	2378	2378	98%	0.0	97.66%	1465	NR_114154.1

B3

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pantoea dispersa strain LMG 2603 16S	Pantoea dispersa	2388	2388	93%	0.0	99.19%	1361	NR_116755.1
Pantoea dispersa strain LMG 2603 16S	Pantoea dispersa	2377	2377	92%	0.0	99.19%	1347	NR_043883.1
Pantoea dispersa strain DSM 30073 16S	Pantoea dispersa	2399	2399	94%	0.0	98.71%	1506	NR_116797.1
Pantoea wallisii strain LMG 26277 16S	Pantoea wallisii	2316	2316	92%	0.0	98.37%	1344	NR_118122.1

Pantoea eucrina strain LMG 2781 16S	Pantoea eucrina	2286	2286	92%	0.0	97.78%	1344	NR_116246.1
Pantoea cyripedii strain ATCC 29267 16S	Pantoea cyripedii	2309	2309	95%	0.0	97.27%	1457	NR_118857.1
Erwinia psidii strain LMG 7039 16S	Erwinia psidii	2291	2291	94%	0.0	97.25%	1494	NR_104569.1
Pantoea cyripedii strain DSM 3873 16S	Pantoea cyripedii	2305	2305	95%	0.0	97.20%	1495	NR_041973.1
Pseudocitrobacter anthropi strain C138 16S	Pseudocitrobacter faecalis	2273	2273	93%	0.0	97.08%	1419	NR_125691.1
Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis ATCC 13884 16S	Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis ATCC 13884	2264	2264	93%	0.0	97.07%	1436	NR_114507.1

B4

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pantoea rodasii strain LMG 26273 16S	Pantoea rodasii	2288	2288	93%	0.0	98.50%	1344	NR_118120.1
Pantoea rwandensis strain LMG 26275 16S	Pantoea rwandensis	2264	2264	93%	0.0	98.12%	1344	NR_118121.1
Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis strain 10-17 16S	Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis	2278	2278	94%	0.0	97.92%	1429	NR_126208.1
Kluyvera cryocrescens strain 12993 16S	Kluyvera cryocrescens	2278	2278	94%	0.0	97.92%	1459	NR_028803.1
Kluyvera cryocrescens strain NBRC 102467 16S	Kluyvera cryocrescens	2274	2274	94%	0.0	97.85%	1465	NR_114108.1
Enterobacter asburiae strain JCM6051 16S	Enterobacter asburiae	2257	2257	94%	0.0	97.83%	1422	NR_024640.1
Klebsiella aerogenes strain ATCC 13048 16S	Klebsiella aerogenes	2241	2241	93%	0.0	97.82%	1376	NR_118556.1
Enterobacter cloacae strain ATCC 13047 16S	Enterobacter cloacae	2237	2237	93%	0.0	97.81%	1369	NR_118568.1
Enterobacter bugandensis strain 247BMC 16S	Enterobacter bugandensis	2270	2270	94%	0.0	97.77%	1444	NR_148649.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	2271	2271	94%	0.0	97.70%	1495	NR_044977.1

B5

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pantoea agglomerans strain ATCC 27155 16S	Pantoea agglomerans	1412	1412	80%	0.0	86.62%	1271	NR_114505.1
Pantoea agglomerans strain LMG 1286 16S	Pantoea agglomerans	1540	1540	91%	0.0	85.54%	1387	NR_116751.1
[Curtobacterium] plantarum strain CL63 16S	[Curtobacterium] plantarum	1546	1546	92%	0.0	85.47%	1440	NR_104943.1
Pantoea agglomerans strain DSM 3493 16S	Pantoea agglomerans	1546	1546	92%	0.0	85.47%	1473	NR_041978.1
Pantoea agglomerans strain NBRC 102470 16S	Pantoea agglomerans	1543	1543	92%	0.0	85.47%	1466	NR_114111.1
Pantoea agglomerans strain NCTC9381 16S	Pantoea agglomerans	1541	1541	92%	0.0	85.32%	1512	NR_114735.1
Pantoea conspicua strain LMG 24534 16S	Pantoea conspicua	1505	1505	90%	0.0	85.31%	1344	NR_116247.1
Pantoea brenneri strain LMG 5343 16S	Pantoea brenneri	1509	1509	91%	0.0	85.10%	1376	NR_116748.1
Pantoea deleyi strain LMG 24200 16S	Pantoea deleyi	1508	1508	91%	0.0	85.10%	1443	NR_116114.1
Pantoea vagans strain LMG 24199 16S	Pantoea vagans	1530	1530	92%	0.0	85.03%	1429	NR_116115.1

B6

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Acinetobacter baylyi strain B2 16S	Acinetobacter baylyi	2309	2309	96%	0.0	97.43%	1408	NR_115042.2
Acinetobacter soli strain B1 16S	Acinetobacter soli	2308	2308	96%	0.0	97.42%	1422	NR_044454.1
Acinetobacter antiviralis strain KNF2022 16S	Acinetobacter antiviralis	2251	2251	97%	0.0	95.99%	1445	NR_115739.1
Acinetobacter baylyi strain B2 16S	Acinetobacter baylyi	2087	2087	93%	0.0	95.81%	1325	NR_028848.1
Acinetobacter halotolerans strain R160 16S	Acinetobacter halotolerans	2223	2223	97%	0.0	95.50%	1468	NR_149800.1
Acinetobacter pittii strain LMG 1035 16S	Acinetobacter pittii	2167	2167	95%	0.0	95.47%	1392	NR_117930.1
Acinetobacter junii strain Mannheim 2723/59 16S	Acinetobacter junii	2131	2131	93%	0.0	95.39%	1416	NR_119360.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	2213	2213	97%	0.0	95.36%	1515	NR_117677.1

Acinetobacter baumannii strain ATCC 19606 16S	Acinetobacter baumannii	2213	2213	97%	0.0	95.36%	1529	NR_117620.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	2213	2213	97%	0.0	95.36%	1459	NR_026206.1

B7

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S	Enterobacter ludwigii	2379	2379	92%	0.0	98.84%	1513	NR_042349.1
Pantoea agglomerans strain JCM1236 16S	Pantoea agglomerans	2370	2370	92%	0.0	98.69%	1449	NR_111998.1
Leclercia adecarboxylata strain CIP 82.92 16S	Leclercia adecarboxylata	2352	2352	92%	0.0	98.40%	1527	NR_104933.1
Enterobacter tabaci strain YIM Hb-3 16S	Enterobacter mori	2340	2340	92%	0.0	98.39%	1522	NR_146667.2
Leclercia adecarboxylata strain NBRC 102595 16S	Leclercia adecarboxylata	2349	2349	92%	0.0	98.33%	1465	NR_114154.1
Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 strain LMG 2803 16S	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595	2347	2347	92%	0.0	98.26%	1506	NR_117405.1
Enterobacter asburiae strain JCM6051 16S	Enterobacter asburiae	2313	2313	91%	0.0	98.09%	1422	NR_024640.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	2316	2316	92%	0.0	97.95%	1387	NR_116756.1
Klebsiella aerogenes strain ATCC 13048 16S	Klebsiella aerogenes	2279	2279	91%	0.0	97.86%	1376	NR_118556.1
Enterobacter cloacae strain 279-56 16S	Enterobacter cloacae	2318	2318	92%	0.0	97.82%	1511	NR_028912.1

B8

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
[Curtobacterium] plantarum strain CL63 16S	[Curtobacterium] plantarum	968	1670	89%	0.0	92.59%	1440	NR_104943.1
Pantoea agglomerans strain DSM 3493 16S	Pantoea agglomerans	968	1674	89%	0.0	92.59%	1473	NR_041978.1
Pantoea agglomerans strain NBRC 102470 16S	Pantoea agglomerans	968	1674	89%	0.0	92.59%	1466	NR_114111.1
Pantoea agglomerans strain LMG	Pantoea agglomerans	968	1650	88%	0.0	92.59%	1387	NR_116751.1

1286 16S

Pantoea agglomerans strain NCTC9381 16S	Pantoea agglomerans	966	1663	89%	0.0	92.44%	1512	NR_114735.1
Pantoea stewartii strain ATCC 8199 16S	Pantoea stewartii	946	1598	89%	0.0	91.83%	1456	NR_044800.1
Buttiauxella izardii strain S3/2-161 16S	Buttiauxella izardii	946	1552	89%	0.0	91.83%	1498	NR_025331.1
Pantoea rwandensis strain LMG 26275 16S	Pantoea rwandensis	941	1569	88%	0.0	91.68%	1344	NR_118121.1
Buttiauxella noackiae strain NSW 11 16S	Buttiauxella noackiae	941	1548	89%	0.0	91.68%	1497	NR_036919.1
Buttiauxella warmboldiae strain NSW 326 16S	Buttiauxella warmboldiae	941	1534	89%	0.0	91.68%	1507	NR_028893.1

B9

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S	Enterobacter ludwigii	2452	2452	95%	0.0	99.01%	1513	NR_042349.1
Pantoea agglomerans strain JCM1236 16S	Pantoea agglomerans	2439	2439	95%	0.0	98.79%	1449	NR_111998.1
Leclercia adecarboxylata strain NBRC 102595 16S	Leclercia adecarboxylata	2422	2422	95%	0.0	98.51%	1465	NR_114154.1
Leclercia adecarboxylata strain CIP 82.92 16S	Leclercia adecarboxylata	2421	2421	95%	0.0	98.51%	1527	NR_104933.1
Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 strain LMG 2803 16S	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595	2420	2420	95%	0.0	98.44%	1506	NR_117405.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	2343	2343	92%	0.0	98.18%	1387	NR_116756.1
Enterobacter tabaci strain YIM Hb-3 16S	Enterobacter mori	2369	2369	94%	0.0	98.07%	1522	NR_146667.2
Klebsiella aerogenes strain ATCC 13048 16S	Klebsiella aerogenes	2332	2332	93%	0.0	97.97%	1376	NR_118556.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	2394	2394	95%	0.0	97.94%	1495	NR_044977.1
Enterobacter cloacae strain 279-56 16S	Enterobacter cloacae	2387	2387	95%	0.0	97.94%	1511	NR_028912.1

B10

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S	Enterobacter ludwigii	2315	2315	93%	0.0	97.68%	1513	NR_042349.1
Pantoea agglomerans strain JCM1236 16S	Pantoea agglomerans	2302	2302	93%	0.0	97.46%	1449	NR_111998.1
Leclercia adecarboxylata strain NBRC 102595 16S	Leclercia adecarboxylata	2294	2294	93%	0.0	97.32%	1465	NR_114154.1
Leclercia adecarboxylata strain CIP 82.92 16S	Leclercia adecarboxylata	2293	2293	93%	0.0	97.32%	1527	NR_104933.1
Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 strain LMG 2803 16S	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595	2292	2292	93%	0.0	97.25%	1506	NR_117405.1
Enterobacter tabaci strain YIM Hb-3 16S	Enterobacter mori	2271	2271	92%	0.0	97.02%	1522	NR_146667.2
Enterobacter bugandensis strain 247BMC 16S	Enterobacter bugandensis	2259	2259	93%	0.0	96.74%	1444	NR_148649.1
Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis strain 10-17 16S	Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis	2257	2257	93%	0.0	96.74%	1429	NR_126208.1
Enterobacter asburiae strain JCM6051 16S	Enterobacter asburiae	2246	2246	92%	0.0	96.72%	1422	NR_024640.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	2246	2246	92%	0.0	96.72%	1387	NR_116756.1

B11

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S	Enterobacter ludwigii	2349	2349	93%	0.0	98.83%	1513	NR_042349.1
Pantoea agglomerans strain JCM1236 16S	Pantoea agglomerans	2335	2335	93%	0.0	98.61%	1449	NR_111998.1
Leclercia adecarboxylata strain NBRC 102595 16S	Leclercia adecarboxylata	2318	2318	93%	0.0	98.32%	1465	NR_114154.1
Leclercia adecarboxylata strain CIP 82.92 16S	Leclercia adecarboxylata	2317	2317	93%	0.0	98.32%	1527	NR_104933.1
Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 strain LMG 2803 16S	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595	2316	2316	93%	0.0	98.24%	1506	NR_117405.1
Enterobacter tabaci strain YIM Hb-3 16S	Enterobacter mori	2305	2305	92%	0.0	98.24%	1522	NR_146667.2

Enterobacter hormaechei strain 0992-77 16S	Enterobacter hormaechei	2220	2220	89%	0.0	98.02%	1365	NR_042154.1
Citrobacter freundii strain NBRC 12681 16S	Citrobacter freundii	2223	2223	90%	0.0	97.95%	1324	NR_114345.1
Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain ATCC 23373 16S	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens	2292	2292	93%	0.0	97.88%	1507	NR_118011.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	2281	2281	92%	0.0	97.86%	1387	NR_116756.1

B12

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Acinetobacter baylyi strain B2 16S	Acinetobacter baylyi	2377	2377	93%	0.0	98.76%	1408	NR_115042.2
Acinetobacter soli strain B1 16S	Acinetobacter soli	2368	2368	93%	0.0	98.62%	1422	NR_044454.1
Acinetobacter antiviralis strain KNF2022 16S	Acinetobacter antiviralis	2306	2306	93%	0.0	97.67%	1445	NR_115739.1
Acinetobacter halotolerans strain R160 16S	Acinetobacter halotolerans	2265	2265	93%	0.0	97.16%	1468	NR_149800.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	2255	2255	93%	0.0	97.01%	1515	NR_117677.1
Acinetobacter baumannii strain ATCC 19606 16S	Acinetobacter baumannii	2255	2255	93%	0.0	97.01%	1529	NR_117620.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	2255	2255	93%	0.0	97.01%	1459	NR_026206.1
Acinetobacter baumannii strain JCM 6841 16S	Acinetobacter baumannii	2255	2255	93%	0.0	97.01%	1459	NR_113237.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S	Acinetobacter oleivorans	2250	2250	93%	0.0	96.87%	1537	NR_102814.1
Acinetobacter seifertii strain LUH 1472 16S	Acinetobacter seifertii	2250	2250	93%	0.0	96.87%	1460	NR_134684.1

B13

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Acinetobacter baylyi strain B2 16S	Acinetobacter baylyi	2316	2316	94%	0.0	97.64%	1408	NR_115042.2
Acinetobacter soli strain B1 16S	Acinetobacter soli	2305	2305	93%	0.0	97.70%	1422	NR_044454.1
Acinetobacter antiviralis strain KNF2022 16S	Acinetobacter antiviralis	2248	2248	93%	0.0	96.84%	1445	NR_115739.1

Acinetobacter halotolerans strain R160 16S	Acinetobacter halotolerans	2205	2205	93%	0.0	96.19%	1468	NR_149800.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S	Acinetobacter oleivorans	2199	2199	94%	0.0	95.93%	1537	NR_102814.1
Acinetobacter seifertii strain LUH 1472 16S	Acinetobacter seifertii	2199	2199	94%	0.0	95.93%	1460	NR_134684.1
Acinetobacter pittii DSM 21653 strain CIP 70.29 16S	Acinetobacter pittii DSM 21653	2198	2198	94%	0.0	95.86%	1533	NR_116774.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	2195	2195	93%	0.0	96.05%	1515	NR_117677.1
Acinetobacter baumannii strain ATCC 19606 16S	Acinetobacter baumannii	2195	2195	93%	0.0	96.05%	1529	NR_117620.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	2195	2195	93%	0.0	96.05%	1459	NR_026206.1

B14

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Acinetobacter soli strain B1 16S	Acinetobacter soli	1024	1620	90%	0.0	98.01%	1422	NR_044454.1
Acinetobacter baylyi strain B2 16S	Acinetobacter baylyi	1019	1624	90%	0.0	97.68%	1408	NR_115042.2
Acinetobacter vivianii strain NIPH 2168 16S	Acinetobacter vivianii	1015	1529	90%	0.0	97.68%	1489	NR_148847.1
Acinetobacter courvalinii strain ANC 3623 16S	Acinetobacter courvalinii	1015	1520	90%	0.0	97.68%	1489	NR_148843.1
Acinetobacter parvus strain LUH4616 16S	Acinetobacter parvus	1012	1525	90%	0.0	97.82%	1465	NR_025425.1
Acinetobacter venetianus RAG-1 = CIP 110063 strain ATCC 31012 16S	Acinetobacter venetianus RAG-1 = CIP 110063	1003	1530	90%	0.0	97.49%	1463	NR_042049.1
Acinetobacter modestus strain NIPH 236 16S	Acinetobacter modestus	1003	1508	90%	0.0	97.49%	1489	NR_148845.1
Acinetobacter defluvii strain WCHA30 16S ribosomal RNA, complete sequence	Acinetobacter defluvii	999	1536	90%	0.0	97.32%	1539	NR_156989.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	997	1556	90%	0.0	97.01%	1515	NR_117677.1
Acinetobacter baumannii strain ATCC 19606 16S	Acinetobacter baumannii	997	1556	90%	0.0	97.01%	1529	NR_117620.1

B15

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Acinetobacter baylyi strain B2 16S	Acinetobacter baylyi	2370	2370	93%	0.0	98.62%	1408	NR_115042.2
Acinetobacter soli strain B1 16S	Acinetobacter soli	2360	2360	93%	0.0	98.27%	1422	NR_044454.1
Acinetobacter antiviralis strain KNF2022 16S	Acinetobacter antiviralis	2300	2300	94%	0.0	97.13%	1445	NR_115739.1
Acinetobacter halotolerans strain R160 16S	Acinetobacter halotolerans	2260	2260	94%	0.0	96.42%	1468	NR_149800.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	2252	2252	93%	0.0	96.54%	1515	NR_117677.1
Acinetobacter baumannii strain ATCC 19606 16S	Acinetobacter baumannii	2252	2252	93%	0.0	96.54%	1529	NR_117620.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	2252	2252	93%	0.0	96.54%	1459	NR_026206.1
Acinetobacter baumannii strain JCM 6841 16S	Acinetobacter baumannii	2252	2252	93%	0.0	96.54%	1459	NR_113237.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S	Acinetobacter oleivorans	2249	2249	94%	0.0	96.28%	1537	NR_102814.1
Acinetobacter seifertii strain LUH 1472 16S	Acinetobacter seifertii	2249	2249	94%	0.0	96.28%	1460	NR_134684.1

B16

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Acinetobacter baylyi strain B2 16S	Acinetobacter baylyi	2177	2177	92%	0.0	95.95%	1408	NR_115042.2
Acinetobacter soli strain B1 16S	Acinetobacter soli	2164	2164	92%	0.0	95.48%	1422	NR_044454.1
Acinetobacter antiviralis strain KNF2022 16S	Acinetobacter antiviralis	2103	2103	92%	0.0	94.55%	1445	NR_115739.1
Acinetobacter halotolerans strain R160 16S	Acinetobacter halotolerans	2094	2094	92%	0.0	94.72%	1468	NR_149800.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S	Acinetobacter oleivorans	2078	2078	92%	0.0	94.50%	1537	NR_102814.1
Acinetobacter seifertii strain LUH 1472 16S	Acinetobacter seifertii	2078	2078	92%	0.0	94.50%	1460	NR_134684.1
Acinetobacter pittii DSM 21653 strain ATCC 19004 16S	Acinetobacter pittii DSM 21653	2074	2074	92%	0.0	94.43%	1530	NR_117621.1
Acinetobacter calcoaceticus strain NCCB 22016 16S	Acinetobacter calcoaceticus	2074	2074	92%	0.0	94.43%	1516	NR_042387.1
Acinetobacter lactucae strain	Acinetobacter lactucae	2069	2069	92%	0.0	94.36%	1526	NR_152082.1

JVAP01 16S

Acinetobacter lactucae strain NRRL B-41902 16S	Acinetobacter lactucae	2069	2069	92%	0.0	94.36%	1526	NR_152004.1
--	------------------------	------	------	-----	-----	--------	------	-------------

B17

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Acinetobacter baylyi strain B2 16S	Acinetobacter baylyi	2414	2414	94%	0.0	97.73%	1408	NR_115042.2
Acinetobacter soli strain B1 16S	Acinetobacter soli	2398	2398	95%	0.0	97.33%	1422	NR_044454.1
Acinetobacter antiviralis strain KNF2022 16S	Acinetobacter antiviralis	2346	2346	96%	0.0	96.38%	1445	NR_115739.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S	Acinetobacter oleivorans	2329	2329	97%	0.0	95.87%	1537	NR_102814.1
Acinetobacter seifertii strain LUH 1472 16S	Acinetobacter seifertii	2326	2326	97%	0.0	95.93%	1460	NR_134684.1
Acinetobacter pittii DSM 21653 strain ATCC 19004 16S	Acinetobacter pittii DSM 21653	2324	2324	97%	0.0	95.80%	1530	NR_117621.1
Acinetobacter calcoaceticus strain NCCB 22016 16S	Acinetobacter calcoaceticus	2324	2324	97%	0.0	95.80%	1516	NR_042387.1
Acinetobacter halotolerans strain R160 16S	Acinetobacter halotolerans	2320	2320	97%	0.0	95.74%	1468	NR_149800.1
Acinetobacter pittii DSM 21653 strain CIP 70.29 16S	Acinetobacter pittii DSM 21653	2314	2314	97%	0.0	95.67%	1533	NR_116774.1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S	Acinetobacter baumannii	2307	2307	97%	0.0	95.60%	1515	NR_117677.1

B18

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Enterobacter tabaci strain YIM Hb-3 16S	Enterobacter mori	1704	1704	91%	0.0	96.97%	1522	NR_146667.2
Pantoea agglomerans strain JCM1236 16S	Pantoea agglomerans	1700	1700	91%	0.0	96.87%	1449	NR_111998.1
Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S	Enterobacter ludwigii	1695	1695	91%	0.0	96.78%	1513	NR_042349.1
Enterobacter mori LMG 25706 strain R18-2 16S	Enterobacter mori LMG 25706	1692	1692	91%	0.0	96.78%	1285	NR_116430.1
Enterobacter asburiae strain JCM6051 16S	Enterobacter asburiae	1686	1686	91%	0.0	96.49%	1422	NR_024640.1

Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	1678	1678	91%	0.0	96.21%	1495	NR_044977.1
Leclercia adecarboxylata strain NBRC 102595 16S	Leclercia adecarboxylata	1678	1678	91%	0.0	96.40%	1465	NR_114154.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	1678	1678	91%	0.0	96.21%	1387	NR_116756.1
Leclercia adecarboxylata strain CIP 82.92 16S	Leclercia adecarboxylata	1677	1677	91%	0.0	96.40%	1527	NR_104933.1
Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 strain LMG 2803 16S	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595	1676	1676	91%	0.0	96.30%	1506	NR_117405.1

B19

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Enterobacter tabaci strain YIM Hb-3 16S	Enterobacter mori	2198	2198	92%	0.0	96.48%	1522	NR_146667.2
Enterobacter asburiae strain JCM6051 16S	Enterobacter asburiae	2184	2184	93%	0.0	95.94%	1422	NR_024640.1
Pantoea agglomerans strain JCM1236 16S	Pantoea agglomerans	2183	2183	92%	0.0	96.13%	1449	NR_111998.1
Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S	Enterobacter ludwigii	2169	2169	92%	0.0	95.92%	1513	NR_042349.1
Leclercia adecarboxylata strain CIP 82.92 16S	Leclercia adecarboxylata	2160	2160	92%	0.0	95.77%	1527	NR_104933.1
Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 strain LMG 2803 16S	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595	2159	2159	92%	0.0	95.70%	1506	NR_117405.1
Enterobacter bugandensis strain 247BMC 16S	Enterobacter bugandensis	2158	2158	92%	0.0	95.70%	1444	NR_148649.1
Enterobacter cloacae strain ATCC 13047 16S	Enterobacter cloacae	2157	2157	92%	0.0	95.90%	1369	NR_118568.1
Leclercia adecarboxylata strain NBRC 102595 16S	Leclercia adecarboxylata	2157	2157	92%	0.0	95.70%	1465	NR_114154.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	2154	2154	92%	0.0	95.56%	1495	NR_044977.1

B20

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
-------------	-----------------	-----------	-------------	-------------	---------	------------	----------	-----------

Enterobacter bugandensis strain 247BMC 16S	Enterobacter bugandensis	2330	2330	95%	0.0	97.38%	1444	NR_148649.1
Pantoea agglomerans strain JCM1236 16S	Pantoea agglomerans	2315	2315	95%	0.0	97.24%	1449	NR_111998.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	2315	2315	95%	0.0	97.03%	1495	NR_044977.1
Enterobacter asburiae strain JCM6051 16S	Enterobacter asburiae	2312	2312	93%	0.0	97.56%	1422	NR_024640.1
Enterobacter tabaci strain YIM Hb-3 16S	Enterobacter mori	2303	2303	94%	0.0	97.43%	1522	NR_146667.2
Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S	Enterobacter ludwigii	2301	2301	95%	0.0	97.03%	1513	NR_042349.1
Leclercia adecarboxylata strain CIP 82.92 16S	Leclercia adecarboxylata	2296	2296	95%	0.0	96.96%	1527	NR_104933.1
Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 strain LMG 2803 16S	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595	2296	2296	95%	0.0	96.89%	1506	NR_117405.1
Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis strain 10-17 16S	Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis	2295	2295	94%	0.0	97.15%	1429	NR_126208.1
Leclercia adecarboxylata strain NBRC 102595 16S	Leclercia adecarboxylata	2293	2293	95%	0.0	96.89%	1465	NR_114154.1

B21

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pantoea agglomerans strain JCM1236 16S	Pantoea agglomerans	1618	1618	91%	0.0	87.31%	1449	NR_111998.1
Enterobacter tabaci strain YIM Hb-3 16S	Enterobacter mori	1618	1618	91%	0.0	87.31%	1522	NR_146667.2
Enterobacter ludwigii strain EN-119 16S	Enterobacter ludwigii	1613	1613	91%	0.0	87.23%	1513	NR_042349.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	1605	1605	91%	0.0	87.01%	1495	NR_044977.1
Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S	Enterobacter cancerogenus	1602	1602	91%	0.0	87.26%	1387	NR_116756.1
Enterobacter asburiae strain JCM6051 16S	Enterobacter asburiae	1599	1599	91%	0.0	87.01%	1422	NR_024640.1
Enterobacter bugandensis strain 247BMC 16S	Enterobacter bugandensis	1597	1597	91%	0.0	86.94%	1444	NR_148649.1
Leclercia adecarboxylata strain	Leclercia	1596	1596	91%	0.0	86.94%	1465	NR_114154.1

NBRC 102595 16S	a decarboxylata								
Leclercia adecarboxylata strain CIP 82.92 16S	Leclercia adecarboxylata	1595	1595	91%	0.0	86.94%	1527	NR_104933.1	
Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 strain LMG 2803 16S	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595	1594	1594	91%	0.0	86.87%	1506	NR_117405.1	

B22

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Gluconobacter cerinus strain IFO 3267 16S	Gluconobacter cerinus	2416	2416	98%	0.0	98.62%	1390	NR_112156.1
Gluconobacter cerinus strain LMG 1368 16S	Gluconobacter cerinus	2377	2377	96%	0.0	98.53%	1346	NR_118192.1
Gluconobacter cerinus strain NBRC 3267 16S	Gluconobacter cerinus	2425	2425	99%	0.0	98.42%	1409	NR_041048.1
Gluconobacter frateurii strain LMG 1365 16S	Gluconobacter frateurii	2329	2329	96%	0.0	97.86%	1347	NR_118193.1
Gluconobacter thailandicus F149-1 = NBRC 100600 16S	Gluconobacter thailandicus F149-1 = NBRC 100600	2370	2370	99%	0.0	97.70%	1409	NR_113920.1
Gluconobacter frateurii strain NBRC 3264 16S	Gluconobacter frateurii	2370	2370	99%	0.0	97.70%	1409	NR_112239.1
Gluconobacter japonicus strain NBRC 3271 16S	Gluconobacter japonicus	2370	2370	99%	0.0	97.70%	1406	NR_041445.1
Gluconobacter japonicus strain LMG 26773 16S	Gluconobacter japonicus	2364	2364	99%	0.0	97.63%	1436	NR_118638.1
Gluconobacter thailandicus F149-1 = NBRC 100600 16S	Gluconobacter thailandicus F149-1 = NBRC 100600	2364	2364	99%	0.0	97.63%	1441	NR_040998.1
Gluconobacter frateurii strain IFO 3264 16S	Gluconobacter frateurii	2364	2364	99%	0.0	97.63%	1476	NR_026224.1
Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 strain LMG 2803 16S	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595	1594	1594	91%	0.0	86.87%	1506	NR_117405.1

Apêndice 4

Tabela de identificação das leveduras

Tabela 5: Planilha de identificação das leveduras com o banco de dados do NCBI.

L1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Meyerozyma carpophila CBS 5256	Meyerozyma carpophila	979	979	0,86	0.0	99.63%	536	NR_152984.1
Meyerozyma caribbica CBS 9966	Meyerozyma caribbica	1027	1027	0,92	0.0	99.30%	642	NR_149348.1
Meyerozyma guilliermondii CBS 2030	Meyerozyma guilliermondii	1022	1022	0,91	0.0	99.29%	565	NR_111247.1
Meyerozyma smithsonii ATCC MYA-4323	Meyerozyma smithsonii	1031	1031	0,96	0.0	97.98%	600	NR_111339.1
Meyerozyma athensensis ATCC MYA-4324	Meyerozyma athensensis	970	970	0,95	0.0	96.29%	592	NR_111340.1
Meyerozyma elateridarum ATCC MYA-4325	Meyerozyma elateridarum	872	872	0,96	0.0	93.07%	615	NR_111350.1
Meyerozyma amylolytica DSM 27310	Meyerozyma amylolytica	889	889	0,99	0.0	92.89%	647	NR_154976.1
Yamadazyma tertentina CBS 12510	Yamadazyma tertentina	569	569	0,68	1E-162	90.93%	626	NR_160050.1
Scheffersomyces shehatae CBS 5813	Scheffersomyces shehatae	551	551	0,68	5E-157	90.26%	562	NR_120021.2
Yamadazyma kitorensis JCM 31005T	Yamadazyma kitorensis	553	553	0,7	1E-157	89.75%	682	NR_156006.1

L2

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pichia kluyveri CBS 188	Pichia kluyveri	713	713	0,91	0.0	97.83%	413	NR_138210.1
Pichia eremophila CBS 7272	Pichia eremophila	658	658	0,88	0.0	96.51%	409	NR_153287.1
Pichia dushanensis CBS 13912	Pichia dushanensis	287	287	0,38	1E-77	96.05%	471	NR_160321.1
Pichia cephalocereana CBS 7273	Pichia cephalocereana	616	616	0,83	1E-176	96.04%	414	NR_153285.1
Pichia kudriavzevii ATCC 6258 ITS region; from synonym TYPE material	Pichia kudriavzevii	281	281	0,39	5E-76	95.48%	470	NR_131315.1
Martiniozyma abietophila NRRL Y-11514	Martiniozyma abietophila	254	323	0,5	1E-67	94.51%	512	NR_161000.1

Saturnispora diversa CBS 4074	Saturnispora diversa	228	228	0,35	7E-60	92.45%	419	NR_119732.1
Pichia nanzhaoensis NYNU 178136	Pichia nanzhaoensis	278	278	0,42	6E-75	92.39%	477	NR_173268.1
Kazachstania heterogenica CBS 2675	Kazachstania heterogenica	233	233	0,36	1E-61	92.17%	746	NR_155230.1
Kazachstania slooffiae CBS 9733	Kazachstania slooffiae	233	233	0,36	1E-61	92.17%	810	NR_155234.1

L4

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pichia kluyveri CBS 188	Pichia kluyveri	713	713	0,91	0.0	97.83%	413	NR_138210.1
Pichia eremophila CBS 7272	Pichia eremophila	658	658	0,88	0.0	96.51%	409	NR_153287.1
Pichia dushanensis CBS 13912	Pichia dushanensis	287	287	0,38	1E-77	96.05%	471	NR_160321.1
Pichia cephalocereana CBS 7273	Pichia cephalocereana	616	616	0,83	1E-176	96.04%	414	NR_153285.1
Pichia kudriavzevii ATCC 6258 ITS region; from synonym TYPE material	Pichia kudriavzevii	281	281	0,39	5E-76	95.48%	470	NR_131315.1
Martiniozyma abietophila NRRL Y-11514	Martiniozyma abietophila	254	323	0,5	1E-67	94.51%	512	NR_161000.1
Saturnispora diversa CBS 4074	Saturnispora diversa	228	228	0,35	7E-60	92.45%	419	NR_119732.1
Pichia nanzhaoensis NYNU 178136	Pichia nanzhaoensis	278	278	0,42	6E-75	92.39%	477	NR_173268.1
Kazachstania heterogenica CBS 2675	Kazachstania heterogenica	233	233	0,36	1E-61	92.17%	746	NR_155230.1
Kazachstania slooffiae CBS 9733	Kazachstania slooffiae	233	233	0,36	1E-61	92.17%	810	NR_155234.1

L5

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Hanseniaspora uvarum CBS 314	Hanseniaspora uvarum	1192	1192	0,9	0.0	98.81%	669	NR_130660.1
Hanseniaspora clermontiae CBS 8821	Hanseniaspora clermontiae	1153	1153	0,9	0.0	97.76%	668	NR_137657.1
Hanseniaspora meyeri CBS 8734	Hanseniaspora meyeri	1147	1147	0,9	0.0	97.62%	668	NR_137655.1
Hanseniaspora pseudoguilliermondii	Hanseniaspora	1266	1266	0,99	0.0	97.57%	758	NR_155181.1

CBS 8772	pseudoguilliermondii								
Hanseniaspora opuntiae CBS 8733	Hanseniaspora opuntiae	1138	1138	0,9	0.0	97.32%	671	NR_137535.1	
Hanseniaspora lachancei CBS 8818	Hanseniaspora lachancei	1138	1138	0,9	0.0	97.32%	670	NR_137656.1	
Hanseniaspora nectarophila CBS 13383	Hanseniaspora nectarophila	1123	1123	0,9	0.0	96.88%	672	NR_138239.1	
Hanseniaspora guilliermondii CBS 465	Hanseniaspora guilliermondii	1112	1112	0,9	0.0	96.58%	672	NR_138192.1	
Hanseniaspora vineae CBS 2171	Hanseniaspora vineae	296	296	0,24	3E-80	96.17%	735	NR_165975.1	
Hanseniaspora osmophila CBS 313	Hanseniaspora osmophila	296	296	0,24	3E-80	96.17%	660	NR_138191.1	

Apêndice 6

Artigo de revisão

Relationship between metabolites produced by microorganisms and the sensory perception of the coffee beverage

Wálaci da Silva Santos¹, Gonçalo Apolinário de Souza Filho¹

¹ *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro*

Abstract

Coffee is capable of producing beverages with a wide variety of flavors and aromas attributed to the metabolites present in the beans, both before and after roasting. These metabolites can be inherent to the plant, or they may be produced by microorganisms during the post-harvest stages. Extensive research has been conducted on the influence of microbiota in mucilage degradation during fruit drying and its subsequent impact on the sensory qualities of coffee. Certain species of yeast and bacteria are known to enhance the taste and aroma of the beverage. In contrast, specific types of bacteria and fungi can adversely affect these qualities. The roasting process is also crucial, as it alters the levels of various existing metabolites and leads to the formation of new compounds.

This review emphasizes the significant microorganisms that affect the sensory profile of coffee and explores the metabolites they produce that contribute to the sensory experience of the final coffee beverage.

1. Introduction

Arabica coffee (*Coffea arabica*), a member of the Rubiaceae family, is native to tropical climates, with its origins on the African continent, more precisely in a region that is now known as Ethiopia (Krug, Carvalho, & Mendes, 1950). The genus *Coffea* comprises over 100 species. Among those, *Coffea arabica* and *Coffea canephora* are cultivated on a large scale globally. Other species, such as *Coffea liberica* and *Coffea excelsa*, are subjects of ongoing research, potentially earmarked for future mass production (Davis et al., 2006). Coffee holds the position of the world's second most traded commodity, surpassed only by oil. Brazil leads globally in both coffee production and exportation, followed by major producers including Vietnam, Colombia, and Indonesia (FAOSTAT, 2020).

The cultivation of Arabica coffee (*Coffea arabica*) encompasses diverse techniques and management practices, varying with the production type. These practices extend from planting to harvesting (Mesquita et al., 2016). The fruit ripeness at harvest critically influences the coffee quality. Different maturation stages yield variations in physicochemical attributes and biochemical profiles, including lipid, sucrose, fatty acid, volatile compound, and chlorogenic acid concentrations. Notably, coffee of superior quality is typically harvested at the “cherry” ripeness stage (Smrke et al., 2015). Cultural practices, including management, pest control, and regional climatic conditions (average temperature, annual rainfall, altitude), significantly impact the final product quality. Additionally, the genetic makeup of the varieties is paramount, as certain cultivars may accumulate more sucrose or chlorogenic acid in ripe fruits. Lastly, the

microbiota associated with the coffee fruit plays a vital role in shaping the sensory characteristics of the coffee (Damatte et al., 2008).

The microbiota associated with coffee fruits can be significantly influenced by environmental factors (Velooso et al., 2020). Key elements such as cultivation temperature, which is affected by altitude and solar radiation exposure, play a crucial role in the development of microbial species (Ferreira et al., 2016). It is generally observed that coffee fruits in higher-altitude regions exhibit a greater microbial diversity, providing a varied and potentially beneficial environment for these microorganisms (Velmourougane, 2016).

This explains the fact that higher quality coffees come from high altitude regions, as the greater diversity of beneficial microorganisms present in coffee fruits causes a greater range of metabolites from the degradation of mucilage in the fermentation process, providing greater complexity aromatic and delicious for a coffee beverage (MARTINS et al., 2020).

The food industry recognizes fermentation as a natural strategy to produce functional foods and beverages with better nutritional value and add value to food by-products (ANNUNZIATA et al., 2020). Microorganisms are pivotal in this process, significantly influencing the chemical composition, sensory qualities, and overall efficiency of fermentation. This contribution is especially notable in the creation of traditional beverages within the industry (BLANCO et al., 2013; REZAEI et al., 2016; VARELA et al., 2009).

The biotechnological alteration of coffee beans through the fermentation process significantly modifies their structural composition. This modification leads to the release of an increased quantity of phenolic compounds, thereby enhancing the

nutritional value of the resulting beverage (RAWEL; KULLING, 2007). Notably, coffee is a major source of chlorogenic acid, a polyphenol that has been identified as a crucial antioxidant in the prevention of cancer and cardiovascular diseases (Gonthier et al., 2003). Additionally, the deliberate induction of fermentation in coffee beans has been shown to elevate the protein content in the coffee beverage, as documented by Bressani et al. (2020a).

Coffee beverages exhibit a range of flavors and aromas influenced by the metabolites present in the beans both before and after roasting. A significant body of research has focused on how the microbiota associated with the coffee fruit impacts the beverage's quality, particularly emphasizing the role of these microorganisms in breaking down the mucilage during the drying process (Vilela et al., 2007). In this way, bacteria, yeasts, and filamentous fungi are pivotal to the quality of coffee. They produce various metabolites that contribute to the sensory profile of the beverage. Some microorganisms generate metabolites that enhance the sensory quality, while others yield detrimental compounds (Evangelista et al., 2014).

Volatile aromatic compounds are chemical substances that give aroma and flavor to foods. Among these compounds, the esters, formed by the bond between an alcohol and an acid, are associated with the primary aromas found in fruits (MOSTAFA et al., 2022). The aromatic composition of coffee is shaped by various metabolic reactions that create volatile compounds. These are detected by our olfactory receptor cells and taste receptors, which differentiate flavors like sweet, salty, sour, bitter, and umami (Gravina, Yep, Khan, 2013). Key precursors of these volatile compounds are furan class molecules, pyrazines, phenols, thiols, and a range of acids, alcohols, aldehydes, esters, pyrroles, ketones, lactones, and pyridines found in unroasted beans. The sensory profile of coffee is largely determined by the metabolites present after roasting (Bressani et al., 2020b; Grosch, 2008). Roasting is crucial as it breaks down sugars and amino acids, forming volatile compounds contributing to coffee's aroma. Water removal from furan molecules triggers isomerization reactions, producing molecules like 2,3-butanedione and 2,3-pentanedione, giving coffee a caramel-like sensory perception (Grosch, 2008). Microorganisms, naturally associated with coffee fruit, inadvertently introduced during the drying and storing of beans or even inoculated during fermentation, influence the final sensory quality of the beverage (Silva et al., 2008). This review will discuss the

primary microorganisms responsible for generating different molecular groups and connect these metabolites to the sensory notes experienced in coffee.

2. Sensory Analysis of Coffee Beverage

The sensory analysis of coffee beverages is a systematic process established by the Specialty Coffee Association of America (SCAA). This protocol is employed to assess and categorize coffee based on various attributes, including aroma, flavor, sweetness, acidity, and others. A panel of expert tasters is responsible for selecting and preparing the samples, subsequently evaluating the beverage using visual, olfactory, and gustatory assessments. Each characteristic is assigned a score ranging from 0 to 10 using a standardized evaluation chart. During this process, tasters often utilize the "flavor wheel," a visual aid designed to assist in categorizing the coffee's attributes. This wheel is segmented into broad categories encompassing aromas like fruity, sweet, floral, chemical, and herbaceous, each with further subdivisions for more precise descriptions, such as "caramel," "honey," or "chocolate" under the "sweet" category. Characteristics like fruity, floral, caramel, chocolate, and dried fruit indicate high-quality coffee, whereas herbal, spicy, chemical and burnt notes typically signify defects arising from errors in the production process (SCAA, 2008).

3. Yeasts

Yeasts have long been utilized as biotransformation agents for molecules across various industrial sectors (Siddiqui et al., 2012). Vilela et al. demonstrated that specific volatiles found in roasted coffee beans, such as 2,3-butanedione and hexanol, originate during the fermentation thermal reaction process (Vilela et al., 2007). Such compounds contribute to a "buttery" sensation in coffee beverages. De Melo Pereira et al. showed that inoculating *Pichia* ferments into the wet coffee fermentation process for 24 hours results in a higher acetaldehydes concentration than spontaneous fermentation. This metabolite imparts a sweet and pungent aroma and flavor to the coffee. Additionally, increased concentrations of isoamyl acetate, isobutyl acetate, and ethyl laurate, which

were not observed in spontaneous fermentation, were noted after roasting the fermented beans. This change adds sensory notes of pineapple, apple, banana, and pear to the coffee. Interestingly, the concentration of 2,3-butanedione, associated with “buttery” and “caramel” sensations, was reduced in beans fermented with *P. ferments* after roasting, indicating that the yeast contributes a fruity flavor to the coffee. This study also noted a progressive increase in ethanol concentration during fermentation, which was not detectable post-roasting (De Melo Pereira et al., 2014, 2015).

The composition of acids produced during fruit fermentation can significantly vary depending on the fermentation process and the genetic variety of coffee plants (Cheng et al., 2016). Research by Bressani et al. (2020) revealed that employing starter cultures from different yeast species in fermentation produces diverse organic compounds. Notably, concentrations of oxalic acid, isobutyric acid, and isovaleric acid were found to increase after 40 hours of fermentation when utilizing the species *Meyerozyma caribbica*, *Torulaspora delbrueckii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. The study also found that the concentration of citric acid rises in fermentations involving *M. caribbica* and *S. cerevisiae*, imparting a sensory perception of citrus fruits in the resulting beverages. In contrast, the concentration of malic acid decreases in the presence of *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, and *Candida Caribbica*.

The use of *Meyerozyma caribbica* (*M. caribbica*) yeast in the coffee fermentation process results in beans that, post-roasting, exhibit a wide array of acids, alcohols, aldehydes, esters, furans, ketones, lactones, pyrazines, and pyrroles. This diversity contributes to a beverage characterized by sweet and floral sensations (Bressani et al., 2020b). Similarly, the use of *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) induces the production of various compounds from the same classes. Differences in proportions of such compounds create beverages with a sensory profile ranging from sour and caramel to sweet and floral. *Candida parapolosis* (*C. parapolosis*) yeast leads to high concentrations of alcohols and aldehydes, such as nonenal, ethyl-decanol, and octenol, imparting a fruity sensory perception to the beverage. Introducing *Torulaspora delbrueckii* (*T. delbrueckii*) in coffee fermentation predominantly enhances the production of furans and ketones, adding a fruity and sweet sensation to the coffee (Bressani et al., 2020a). The application of *Pichia Kluyveri* yeast strains has been shown to increase the production of esters, particularly isoamyl acetate and phenylethyl

acetate, resulting in a fruity sensory profile in the beverage (Wang et al., 2020). *Hanseniaspora uvarum* yeast is known to boost the concentration of alcohols, aldehydes, esters, and acids, contributing to a fruity sensory perception in the beverage (Elhalis et al., 2021). In general, yeasts are recognized for producing metabolites that contribute to forming fruity sensory characteristics in coffee (Table 1).

4. Lactic acid bacteria

The presence of lactic acid-producing bacteria (LAB) in coffee fermentation significantly benefits the beverage's quality. These benefits arise from their role in citrate metabolism, leading to the production of oxaloacetate as a byproduct. Oxaloacetate is a critical component in the pyruvate fermentation pathway, yielding metabolites that impart a desirable acidity to the coffee (Hugenholtz, 1993). Additionally, LABs transform free fatty acids and amino acids into esters and aldehydes, enhancing the coffee's flavor profile. The combination of fructose and arabinose molecules forms xylulose, which, upon degradation, yields pyruvate molecules. LABs convert these pyruvate molecules into lactic acid, diketones, and 2,3-butanedione (Avallone et al., 2000; Snoep et al., 1992). Furthermore, the glucose produced by sucrose breakdown is utilized in the pyruvate fermentation pathway, producing lactic acid, 2,3-butanedione, and diketones. These metabolites accumulate in coffee beans, creating a caramelized sensory experience in the beverage (Fig. 1) (De Melo Pereira et al., 2020).

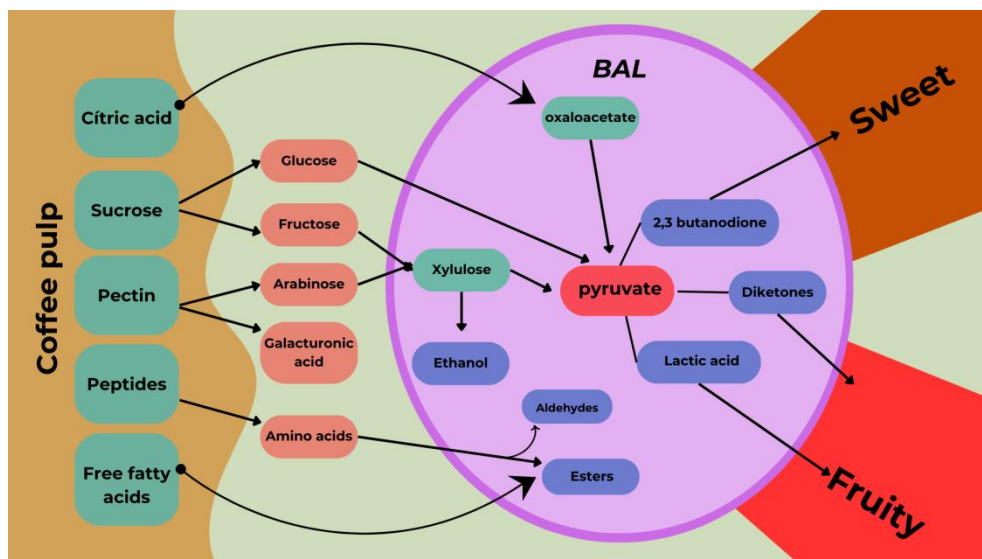


Figure 1: Simplified schematic representation of the main metabolic pathways and metabolites generated by LAB during the natural fermentation of coffee from existing fruit mucilage precursors and the sensory effect added to the beverage.

The bacteria *Oenococcus oeni*, *Streptococcus thermophilus*, and several species of *Lactobacillus* spp. act in the catabolism of amino acids, producing benzaldehyde, acetaldehyde, and 3-methyl-butanol. These compounds impart fruity and chocolate notes to the coffee (Hernandez-Orte et al., 2009; Kranenburg et al., 2002; Ott, Germond, & Chaintreau, 2000). *Lactobacillus* spp. also plays a role in the oxidation of lipids and free fatty acids, forming 2-nonenal, nonal, and decanal. Moreover, they participate in the esterification of alcohols and fatty acids, generating compounds like ethyl acetate, ethyl butanoate, ethyl propionate, and ethyl hexanoate, which contribute to a citrus sensory perception in the coffee (Ayad et al., 1999; Klein et al., 2001; Sgarbi et al., 2013). *Bacillus* spp. bacteria can produce β -damascenone by oxidizing free fatty acids, adding a floral dimension to the coffee's sensory profile (Grosch, 2008).

Overall, LABs are regarded as beneficial microorganisms in coffee fermentation, with their metabolic products significantly contributing to the beverage's fruity and floral sensory perception (Table 1).

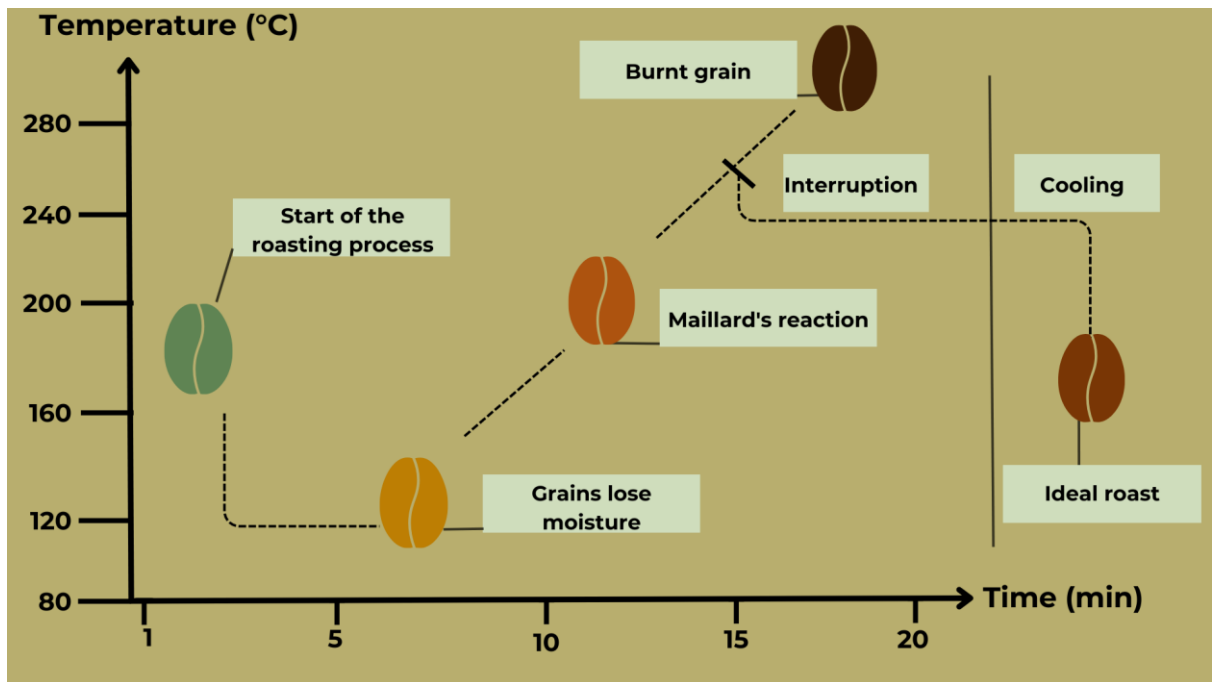


Figure 2: Representation of the coffee bean roasting process of a 500g sample. The grains change color during the time/temperature relationship. The green coffee beans are inserted into the preheated roaster at 180°C, then heat exchange takes place and the beans begin to be roasted at 120°C, when they lose all moisture and reach a temperature between 190°C and 200°C. , the Maillard reaction begins and within 1 or 2 minutes the roasting process must be interrupted so that the beans do not burn. After interruption, the beans must be quickly cooled. The ideal roasting time is approximately 15 minutes.

5. Effects of Roasting on the Metabolic and Sensory Profile of Coffee Beans

Roasting, a critical process in coffee production, involves using specialized roasters powered by gas or electricity. This process starts with green coffee beans, typically with a moisture content of around 12%, and is divided into three distinct phases. Initially, the roaster is preheated to 180°C, and then the green beans are introduced into the roasting drum. This addition of beans causes the temperature to drop to about 70°C due to heat exchange. Subsequently, the beans are heated until they reach 100°C, leading to the loss of accumulated water. In the second stage, the heating continues until it reaches 180°C. At this temperature, the beans expand and emit small popping sounds due to the high internal temperature, causing cellular rupture and the release of volatile compounds through micro-pores in the beans (Yeretzian et al., 2002). This stage is marked by a darkening of reducing sugars and amino acids through a non-enzymatic reaction known as the Maillard Reaction. This reaction leads to the formation of volatile compounds crucial to the coffee's quality, notably furans and 2,3-

pentanedione (Cha, Debnath, & Lee, 2019). The optimal roasting time, ranging from 10 to 15 minutes, is crucial for producing the highest concentrations of these desirable compounds. Overextending the roasting time can lead to carbonization and the formation of pyrroles, imparting a burnt aroma to the coffee. The final stage involves cooling the beans to halt the roasting process (Yeretzian et al., 2002).

Post-roasting, the predominant acids in the beans are citric and malic acids. While certain compounds developed during the beans' growth, such as thiols, are retained after roasting, others, like ethanol compounds, aldehydes, and alcohols, are lost during this stage (Bressani et al., 2020a; De Melo Pereira et al., 2015). Overall, roasting enhances the concentration of acids, esters, furans, pyrazines, pyrroles, and pyrimidines (Fig. 3). In some instances, there is also an increase in specific phenol and ketone compounds (Bressani et al., 2020a).

6.4. Metabolites Detrimental to Coffee Beverage Quality

Certain compounds, when present in high concentrations, can negatively impact the quality of coffee beverages. For instance, chlorogenic acid, a vital antioxidant for coffee quality, can bestow an herbaceous sensory profile on the beverage when overly abundant (Fernandes, Nísia, & Pereira, 2001). Typically, green, medium- or light-roasted coffees exhibit higher levels of chlorogenic acid. Roasting is a crucial method to modulate this compound's concentration in the coffee (Grancieri Debona et al., 2020).

In minor concentrations, acetic acid can impart unique sensory notes to coffee reminiscent of wine or whiskey. However, at elevated levels, it may contribute overly sour tones akin to vinegar or spoiled fruit. Acetic acid production is primarily attributed to bacteria from the genera *Acetobacter*, *Gluconocetobacter*, *Gluconobacter*, and *Enterobacter*, utilizing glucose and citric acid as substrates during fermentation (De Roos & De Vuyst, 2018).

Conversely, certain compounds can adversely affect the sensory quality of coffee, even in low concentrations. Pyrazine compounds, such as 3-Isopropyl-2-methoxypyrazine, 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine, and 2,3-Diethyl-5-methylpyrazine, produced by fungi from the genus *Tolypocladium* or bacteria from *Bacillus* spp. and *Serratia* spp., persist in coffee post-roasting. These compounds are associated with sensory odors of roasted potatoes, nuts, or herbaceous elements (Fadel et al., 2022; Silva-Junior et al., 2018). Geosmin, responsible for the distinct earthy odor found in low-quality coffees, is generated by bacteria such as *Nocardia cumidensis*, *N. fluminea*, *Streptomyces luridiscabiei*, *S. albidoflavus*, and fungi like *Penicillium discolor*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea*, and *Chaetomium* spp., commonly present in soils (Churro et al., 2020). High concentrations of ester compounds such as ethyl 2-methylbutyrate and ethyl 3-methylbutyrate can produce an undesirable rotten fruit odor, indicative of harmful fermentation in green coffee beans (Grosch, 2008). Additionally, the accumulation of butane-1,3-diol is linked to herbaceous and earthy aromas in coffee (Bertrand et al., 2012).

5. Conclusions and perspectives

In 2022, the size of the specialty coffee market in the world was 21.9 million dollars and is estimated to grow 11% per year until 2030. Several factors explain this growing demand, such as the change in preference of consumers who currently like of freshly served coffees, the increase in coffee shops with coffee recipes, the focus on sustainability and the influence of the millennial generation, which has a large share of coffee consumption (GRAND VIEW RESEARSH, 2023).

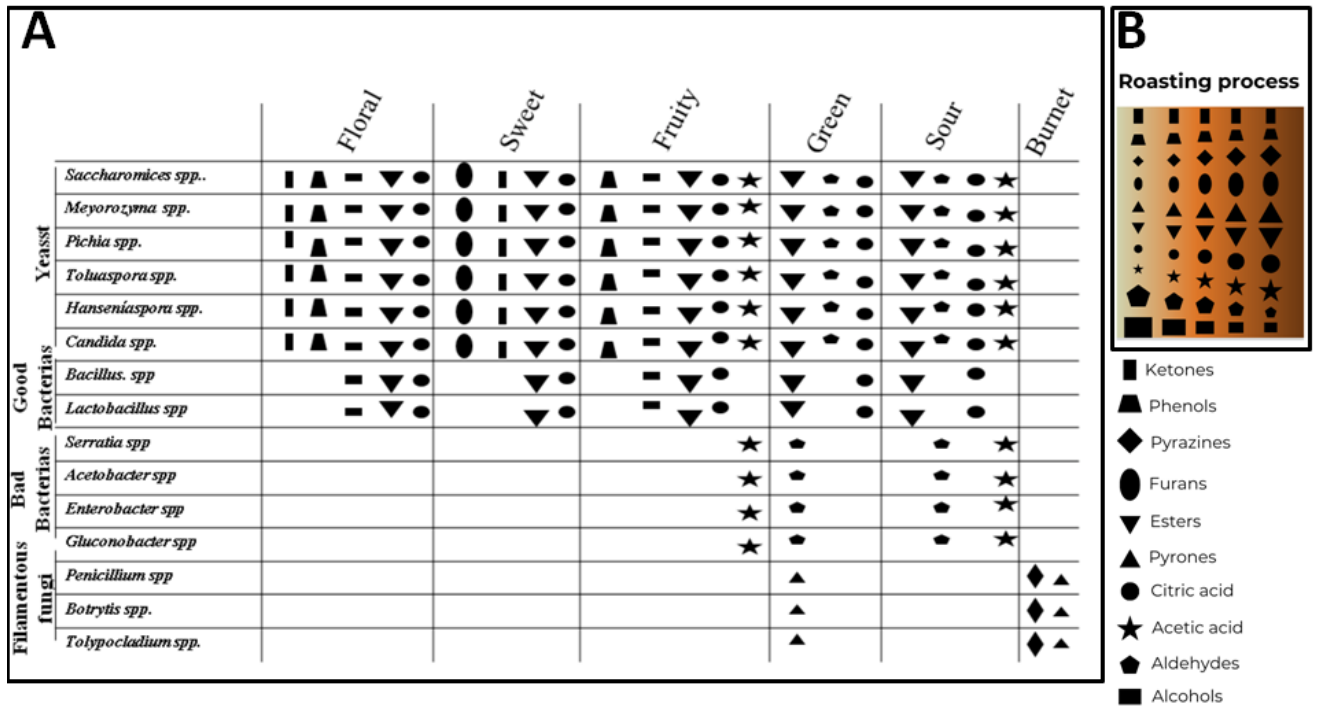


Figure 3: In (A) Different classes of microorganisms produce metabolites that affect sensory perception in the coffee beverage. The composition with several metabolites has a sensorial profile that can vary between floral, sweet, fruity, green, sour or burnt. In (B) The color gradient varying between light green and dark brown characterizes the roasting process. The difference in size of the figures represents the change in the concentration of metabolites.

Cultivation practices, varietal choice, and climate conditions influence the unique aromatic and sensory characteristics of coffee. Crucially, the role of microorganisms in developing coffee's aroma and flavor profile is paramount. Post-harvest management practices by producers are vital to influencing which microorganisms participate in the fruit's fermentation process, thereby affecting the metabolites that contribute to the coffee's sensory attributes. Figure 3 demonstrates the impact of beneficial microorganisms on the coffee's fruity and floral sensory notes, mediated by volatile compounds produced during fermentation, particularly esters and acids. Additionally, it highlights how roasting enhances the concentration of acids, esters, furans, pyrazines, pyrroles, and pyrimidines. In some instances, roasting amplifies specific phenol and ketone compounds, which are crucial for the sweet taste of coffee. Conversely, undesirable metabolites from harmful bacteria and fungi can also alter during roasting, potentially imparting negative sensory qualities to the coffee.

Research on isolating and characterizing the microbiota associated with coffee fruits is vital for developing biotechnological tools. These tools aim to enhance high-quality coffee production and meet the increasing consumer demand. Table 1 lists the primary metabolites produced by microorganisms commonly found in coffee beans and the corresponding sensory profiles they impart to the coffee, depending on their concentration and relative proportions.

Table 1: List of metabolites produced by different classes of microorganisms and the sensory profile attributed to the beverage..

Type of Microorganism	Compound	Chemical class	Sensory class	Reference
Yeasts	2-Methyl-1-butanoic acid	Acids	Chemical	(NOBA et al., 2020)
Yeasts	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	Furans	Sweet	(HAYASHIDA et al., 1999)
Yeasts	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanone	Furans	Spices	(HAYASHIDA et al., 1999)
Yeasts	2,3-Butanedione	Ketones	Sweet	(LIAN; CHAO; ZHAO, 2014)

Yeasts	2,3-Pentanedione	Ketones	Sweet	(SIRIPONG et al., 2020)
Yeasts	2-Hydroxy-3,4-dimethyl-2-cyclopenten-1-one	Ketones	Sweet	(NISHIMURA; MIHARA, 1990)
Bacteria	β -damascenone	Ketones	Sweet, Floral, Fruity	(TANG et al., 2022)
Yeasts	Guaiacol	Phenols	Roast, Chemical	(DONAGHY; KELLY; MCKAY, 1999)
Yeasts	<i>p</i> -Vinilguaiacol	Phenols	Spices	(COGHE et al., 2004)
Yeasts	Vanillin	Phenols	Sweet	(HANSEN et al., 2009)
Bacteria	3-Isopropyl-2-methoxypyrazine	Pyrazines	Roast	(VLASSI et al., 2020)
Bacteria	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine	Pyrazines	Roast	(VLASSI et al., 2020)
Bacteria	2,3-Diethyl-5-methylpyrazine	Pyrazines	Roast	(VLASSI et al., 2020)
Yeasts	Methionol	Sulfur compounds	Musty	(ETSCHMANN et al., 2008)
Yeasts	2-Furfurylthiol	Thiols	Roast	(ZHA et al., 2018)
Yeasts	3-Mercapto-3-methylbutanol	Thiols	Musty	(RONCORONI et al., 2011)
Bacteria	Geosmine	Alcohol	Musty	(CHURRO et al., 2020)
Bacteria	Benzaldehyde	Aldehydes	Fruity	(KUNJAPUR; TARASOVA; PRATHER, 2014)
Bacteria	Alpha-terpinol	Monoterpene	Fruity	(DEMYTTENAE RE, 2001)
Yeasts	Gamma-lactone	Ester	Fruity	(MARELLA et al., 2020)
Yeasts	Acetaldehyde	Aldehydes	Floral	(XU et al., 2019)

Bacteria	Hexanoic Acid	Acids	Fruity	(CHEON et al., 2014)
Bacteria	Phenylacetaldeydo	Aldehyde s	Fruity	(MANZONI et al., 1993)
Bacteria	2 acetyl-pyrazine	Ketones	Roast	(ADAMS; DE KIMPE, 2007)
Bacteria	Isobutyraldehyde	Aldeídos	Roast	(POSPÍŠIL et al., 1994)
Yeasts	Phenols	Phenols	Burned	(HAILE; KANG, 2019)
Yeasts	Furfuryl mercaptan	Furans	Burned	(MANDALIKA et al., 2014)
Yeasts	Ethyl 3-(furfurylthio)propionato	Ethanols	Chemical	(ETSCHMANN et al., 2008)
Yeasts	Ethyl acetate	Ester	Fruity / Fermented	(HOFFMANN et al., 2021)
Yeasts	Isomyl acetate	Ester	Fruity / Fermented	(INOUE et al., 1997)
Fungus	Geosmin	Alcohol	Musty	(LIATO; AÏDER, 2017)
Yeasts	Linalool	Monoterp ene	Spices	(CAO et al., 2017)

The advancement of knowledge regarding the role of microbial-origin metabolites in the sensory quality of coffee beverages indicates the potential for research into the metabolism of bacteria and fungi involved in the process and the specific effects of the compounds they produce on the product's final quality. Such information will allow progress in the controlled fermentation of coffee fruits in the presence of inoculant microorganisms, generating products with superior sensory quality characteristics.

6. References

- ABBOTT, D. W.; BORASTON, A. B. Structural Biology of Pectin Degradation by Enterobacteriaceae. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 301–316, 2008.
- ADAMS, A.; DE KIMPE, N. Formation of pyrazines and 2-acetyl-1-pyrroline by *Bacillus cereus*. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1230–1238, 2007.
- ADHIKARI, A. et al. Effect of Silicate and Phosphate Solubilizing Rhizobacterium *Enterobacter ludwigii* GAK2 on *Oryza sativa* L. under Cadmium Stress. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 118–126, 2020.
- ANNUNZIATA, G. et al. Fermentation of foods and beverages as a tool for increasing availability of bioactive compounds. focus on short-chain fatty acids. **Foods**, v. 9, n. 8, 2020.
- ARTEAGA, J. E. et al. Furfural biotransformation in *Acinetobacter baylyi* ADP1 and *Acinetobacter schindleri* ACE. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 5, p. 1043–1050, 2021.
- ARVAY, E. et al. Engineering *Acinetobacter baylyi* ADP1 for mevalonate production from lignin-derived aromatic compounds. **Metabolic Engineering Communications**, v. 13, n. May 2020, p. e00173, 2021.
- AVALLONE, S. et al. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1308–1311, 2000.
- AYAD, E. H. E. et al. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 725–735, 1999.
- BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine-A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 60–70, 2008.
- BERTRAND, B. et al. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2575–2583, 2012.
- BLANCO, P. et al. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of godello and albariño wines as influenced by *saccharomyces cerevisiae* yeast strains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 11, p. 2849–2857, 2013.
- BRESSANI, A. P. P. et al. Coffee protein profiles during fermentation using different yeast inoculation methods. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, 2020a.
- BRESSANI, A. P. P. et al. Organic acids produced during fermentation and sensory perception in specialty coffee using yeast starter culture. **Food Research International**, v. 128, p. 108773, 2020b.
- CANTERI, M. H. G. et al. Pectin: From raw material to the final product. **Polimeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.
- CAO, X. et al. Enhancing linalool production by engineering oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1641–1644, 2017.

- CARNAÚBA, J. P. et al. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 199–200, 2007.
- CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 20, n. 1–2, p. 1–6, 1963.
- CHA, J.; DEBNATH, T.; LEE, K. G. Analysis of α -dicarbonyl compounds and volatiles formed in Maillard reaction model systems. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8–13, 2019.
- CHEN, P. H.; CHEN, R. Y.; CHOU, J. Y. Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. **Mycobiology**, v. 46, n. 1, p. 33–46, 2018.
- CHEN, S. et al. Inoculation of *Lactobacillus sakei* with *Pichia kluyveri* or *Saccharomyces boulardii* improves flavor compound profiles of salt-free fermented wheat-gluten: Effects from single strain inoculation. **Current Research in Food Science**, v. 6, n. July 2022, 2023.
- CHENG, B. et al. Influence of genotype and environment on coffee quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 57, p. 20–30, 2016.
- CHEON, Y. et al. A biosynthetic pathway for hexanoic acid production in *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Biotechnology**, v. 182–183, n. 1, p. 30–36, 2014.
- CHURRO, C. et al. A novel cyanobacterial geosmin producer, revising *GeoA* distribution and dispersion patterns in Bacteria. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2020.
- COGHE, S. et al. Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 602–608, 2004.
- DA SILVA, B. L. et al. Fermentation of *Coffea canephora* inoculated with yeasts: Microbiological, chemical, and sensory characteristics. **Food Microbiology**, v. 98, n. March, 2021.
- DAMATTA, F. M. et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 19, n. 4, p. 179–211, 2008.
- DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 1–32, 2019.
- DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006.
- DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60–66, 2014.

- DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. **Food Research International**, v. 75, p. 348–356, 2015.
- DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 96–101, 2016.
- DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Lactic acid bacteria: what coffee industry should know? **Current Opinion in Food Science**, v. 31, p. 1–8, 2020.
- DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 115–119, 2018.
- DEMYTTENAERE, J. C. R. Biotransformation of terpenoids by microorganisms. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 25, n. PART F, p. 125–178, 2001.
- DONAGHY, J. A.; KELLY, P. F.; MCKAY, A. Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 453–456, 1999.
- DUKARE, A. S. et al. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 9, p. 1498–1513, 2019.
- EGAMBERDIEVA, D. et al. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2008.
- ELHALIS, H. et al. Microbiological and Chemical Characteristics of Wet Coffee Fermentation Inoculated With *Hansinasporea uvarum* and *Pichia kudriavzevii* and Their Impact on Coffee Sensory Quality. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. August, p. 1–13, 2021.
- ELLIOTT, K. T.; NEIDLE, E. L. *Acinetobacter baylyi* ADP1: Transforming the choice of model organism. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1075–1080, 2011.
- ETSCHMANN, M. M. W. et al. Production of the aroma chemicals 3-(methylthio)-1-propanol and 3-(methylthio)-propylacetate with yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 579–587, 2008.
- EVANGELISTA, S. R. et al. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, v. 61, p. 183–195, 2014.
- FADEL, H. H. M. et al. Optimization of the production of roasted-nutty aroma by a newly isolated fungus *Tolypocladium inflatum* SRH81 and impact of encapsulation on its quality. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, 2022.
- FAOSTAT. **Mundo 1995-2019**.
- FARMER, J. J. et al. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae: Identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n.

5, p. 919–933, 1981.

FERNANDES, S.; NÍSIA, P.; PEREIRA, R. Teores De Polifenóis, Ácido Clorogênico, Cafeína E Proteína Em Café Torrado. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 3, p. 197–199, 2001.

FERREIRA, L. T.; SANTOS, J. Taxa de crescimento do consumo mundial de café de 2% ao ano projeta 208 milhões de sacas até 2030. **Embrapa**, p. 5–6, 2019.

FERREIRA, W. P. M. et al. Effects of the Orientation of the Mountainside, Altitude and Varieties on the Quality of the Coffee Beverage from the “Matas de Minas” Region, Brazilian Southeast. **American Journal of Plant Sciences**, v. 07, n. 08, p. 1291–1303, 2016.

GALDIERI, L. et al. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 14, n. 6, p. 629–638, 2010.

GONTHIER, M. P. et al. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1853–1859, 2003.

GRAND VIEW RESEARSH. Specialty Coffee Market Size & Trends. **Grand View Research**, 2023.

GRAVINA, S. A.; YEP, G. L.; KHAN, M. Human biology of taste. **Annals of Saudi Medicine**, v. 33, n. 3, p. 217–222, 2013.

GROSCH, W. Chemistry III: Volatile Compounds. **Coffee: Recent Developments**, p. 68–89, 2008.

HAILE, M.; KANG, W. H. Antioxidant activity, total polyphenol, flavonoid and tannin contents of fermented green coffee beans with selected yeasts. **Fermentation**, v. 5, n. 1, 2019.

HANSEN, E. H. et al. De novo biosynthesis of Vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker’s yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2765–2774, 2009.

HAYASHIDA, Y. et al. Production of 4-hydroxyfuranones in simple media by fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 6, p. 505–509, 1999.

HERNANDEZ-ORTE, P. et al. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 773–781, 2009.

HOFFMANN, A. et al. Synthesis of ethyl acetate from glucose by *Kluyveromyces marxianus*, *Cyberlindnera jadinii* and *Wickerhamomyces anomalus* depending on the induction mode. **Engineering in Life Sciences**, v. 21, n. 3–4, p. 154–168, 2021.

HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1–3, p. 165–178, 1993.

HUIJIE WU, ET AL. First Report of Bacterial Soft Rot Caused by *Enterobacter mori*

- Affecting Host Watermelon. **Plant Disease**, v. 106, n. 6, p. 1–2, 2018.
- INOUE, Y. et al. Roles of Esterase and Alcohol Acetyltransferase on Production of Isoamyl Acetate in *Hansenula mrakii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 644–649, 1997.
- KLEIN, N. et al. Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 404–411, 2001.
- KRANENBURG, V. et al. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 111–121, 2002.
- KRUG, C. A.; CARVALHO, A.; MENDES, J. E. T. Taxonomia de *Coffea arabica* L. III- *Coffea arabica* L. var. *anormalis*. **Bragantia**, v. 10, n. 11, p. 335–343, 1950.
- KUNJAPUR, A. M.; TARASOVA, Y.; PRATHER, K. L. J. Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of *Escherichia coli*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 33, p. 11644–11654, 2014.
- L. L. ZHANG, ET AL. First Report of Leaf Spot Disease Caused by *Enterobacter mori* on *Canna indica* in China. **Plant Disease**, v. 106, n. 6, p. 1–2, 2018.
- LIAN, J.; CHAO, R.; ZHAO, H. Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R,3R)-butanediol. **Metabolic Engineering**, v. 23, p. 92–99, 2014.
- LIATO, V.; AÏDER, M. Geosmin as a source of the earthy-musty smell in fruits, vegetables and water: Origins, impact on foods and water, and review of the removing techniques. **Chemosphere**, v. 181, p. 9–18, 2017.
- MANDALIKA, A. et al. Integrated biorefinery model based on production of furans using open-ended high yield processes. **Green Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 2480–2489, 2014.
- MANZONI, M. et al. Phenylacetaldehyde by acetic acid bacteria oxidation of 2-phenylethanol. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 4, p. 341–346, 1993.
- MARELLA, E. R. et al. A single-host fermentation process for the production of flavor lactones from non-hydroxylated fatty acids. **Metabolic Engineering**, v. 61, n. August 2019, p. 427–436, 2020.
- MARTINS, P. M. M. et al. Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical compounds and the quality of fermented coffees. **Food Research International**, v. 129, p. 108872, 2020.
- MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 229–234, 2006.
- MASSAWE, G. A.; LIFA, S. J. Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, v.

2, n. 1, p. 41–82, 2010.

MEJÍA-ALVARADO, F. S. et al. Structure and Dynamics of the Gut Bacterial Community Across the Developmental Stages of the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. July, p. 1–11, 2021.

MÉNDEZ-ZAMORA, A. et al. The non-Saccharomyces yeast *Pichia kluyveri* for the production of aromatic volatile compounds in alcoholic fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 8, p. 1–14, 2020.

MESQUITA, C. et al. MANUAL DO CAFÉ Implantação de cafezais. **Belo Horizonte, Emater-Mg**, p. 52, 2016.

MEWA-NGONGANG, M. et al. The Use of *Candida pyralidae* and *Pichia kluyveri* to Control Spoilage Microorganisms of Raw Fruits Used for Beverage Production. **Foods**, v. 8, n. 454, p. 1–14, 2019.

MOSTAFA, S. et al. Floral Scents and Fruit Aromas: Functions, Compositions, Biosynthesis, and Regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. March, p. 1–23, 2022.

NISHIMURA, O.; MIHARA, S. Investigation of 2-Hydroxy-2-Cyclopenten-1-Ones in Roasted Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 1038–1041, 1990.

NOBA, S. et al. Elucidation of the Formation Mechanism of 2-Mercapto-3-Methyl-1-Butanol in Beer. Part II: Identification of the Key Enzymes in Yeast. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 79, n. 1, p. 82–89, 2020.

OLIVERA, M. et al. Diffusible compounds produced by *Hanseniaspora osmophila* and *Gluconobacter cerinus* help to control the causal agents of gray rot and summer bunch rot of table grapes. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, 2021.

OTT, A.; GERMOND, J. E.; CHAINTREAU, A. Origin of acetaldehyde during milk fermentation using ¹³C-labeled precursors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1512–1517, 2000.

POSPÍŠIL, S. et al. Excretion of butyraldehyde, isobutyraldehyde and valeraldehyde by *Streptomyces cinnamonensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 119, n. 1–2, p. 95–98, 1994.

RAMYA, S. L. et al. Detection of carboxylesterase and esterase activity in culturable gut bacterial flora isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), from India and its possible role in indoxacarb degradation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 327–336, 2016.

RANI, N. et al. Development of Zn biofertilizer microbeads encapsulating *Enterobacter ludwigii*-PS10 mediated alginate, starch, poultry waste and its efficacy in *Solanum lycopersicum* growth enhancement. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 240, n. April, p. 124381, 2023.

RAWEL, H. M.; KULLING, S. E. Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 2, n. 4, p. 399–406, 2007.

REICHEMBACH, L. H.; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L. Extraction and characterization of a pectin from coffee (*Coffea arabica* L.) pulp with gelling properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 245, n. June, p. 116473, 2020.

REZAEI, M. N. et al. The impact of yeast fermentation on dough matrix properties. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 96, n. 11, p. 3741–3748, 2016.

RONCORONI, M. et al. The yeast IRC7 gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 926–935, 2011.

S R, S. et al. Microbial ecology and functional coffee fermentation dynamics with *Pichia kudriavzevii*. **Food Microbiology**, v. 105, n. July 2021, p. 104012, 2022.

SANTOS, M. A.; CHALFOUN, S. M.; PIMENTA, C. J. Influence of the wet processing and drying types on chemical and physicochemical composition of coffee (*Coffea arabica* L.). **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 213–218, 2009.

SCAA. Protocolo Para Análise Sensorial De Café. **Scaa Cupping Protocols**, n. December, p. 13, 2008.

SGARBI, E. et al. Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4223–4234, 2013.

SIDDIQUI, M. S. et al. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 2, p. 144–170, 2012.

SILVA-JUNIOR, E. A. et al. Pyrazines from bacteria and ants: Convergent chemistry within an ecological niche. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4–10, 2018.

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

SIRIPONG, W. et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isopentanol (3-Methyl-1-butanol). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 138, n. February, p. 109557, 2020.

SMRKE, S. et al. Differentiation of degrees of ripeness of Catuai and Tipica green coffee by chromatographical and statistical techniques. **Food Chemistry**, v. 174, p. 637–642, 2015.

SNOEP, J. L. et al. Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and α -acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4838–4841, 1992.

TANG, J. et al. Screening of β -damascenone-producing strains in light-flavor Baijiu and its production optimization via response surface methodology. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. November, p. 1–13, 2022.

VAN WYK, N. et al. The Influence of *Pichia kluyveri* Addition on the Aroma Profile of a Kombucha Tea Fermentation. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 1–7, 2023.

VARELA, C. et al. Discovering a chemical basis for differentiating wines made by

- fermentation with “wild” indigenous and inoculated yeasts: Role of yeast volatile compounds. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 15, n. 3, p. 238–248, 2009.
- VELMOUROUGANE, K. Impact of Organic and Conventional Systems of Coffee Farming on Soil Properties and Culturable Microbial Diversity. **Scientifica**, v. 2016, 2016.
- VELOSO, T. G. R. et al. Effects of environmental factors on microbiota of fruits and soil of *Coffea arabica* in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- VICENTE, J. et al. High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1–15, 2021.
- VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 20, n. 8, p. 87–95, 2007.
- VLASSI, A. et al. Volatile Organic Compounds From *Lysobacter capsici* AZ78 as Potential Candidates for Biological Control of Soilborne Plant Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. August, p. 1–11, 2020.
- WANG, C. et al. Coffee flavour modification through controlled fermentations of green coffee beans by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri*: Part I. Effects from individual yeasts. **Food Research International**, v. 136, n. July, 2020.
- WEI, H. et al. Salt-tolerant endophytic bacterium *Enterobacter ludwigii* B30 enhance bermudagrass growth under salt stress by modulating plant physiology and changing rhizosphere and root bacterial community. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. August, p. 1–20, 2022.
- WEST, B. C.; VIJAYAN, H.; SHEKAR, R. *Kluyvera cryocrescens* finger infection: Case report and review of eighteen *Kluyvera* infections in human beings. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 32, n. 3, p. 237–241, 1998.
- XU, X. et al. Unraveling the Mechanisms for Low-Level Acetaldehyde Production during Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces pastorianus* Lager Yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 2020–2027, 2019.
- YERETZIAN, C. et al. From the green bean to the cup of coffee: Investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 2, p. 92–104, 2002.
- YOUSAF, S. et al. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2675–2683, 2011.
- ZHA, M. et al. Generation of 2-Furfurylthiol by Carbon-Sulfur Lyase from the Baijiu Yeast *Saccharomyces cerevisiae* G20. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 9, p. 2114–2120, 2018.
- ZHAO, Y. et al. Gene *sdaB* Is Involved in the Nematocidal Activity of *Enterobacter ludwigii* AA4 Against the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. May, p. 1–18, 2022.

ZHU, B. et al. *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on morus alba L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 2769–2774, 2011.

et al. A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications. **Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering**, v. 59, n. 4, p. 66–74, 2017.

Apêndice 7

Patente

RESUMO

INOCULANTE BIOLÓGICO ANTIFÚNGICO PARA FRUTOS DE CAFÉ

Esta invenção refere-se a uma composição líquida de leveduras dos gêneros *Pichia* sp., *Hanseniaspora* sp. e *Meyerozyma* sp., capazes de antagonizar com fungos filamentosos que colonizam frutos de café e ocasionam prejuízos na produção de café. Tais fungos prejudicam a qualidade da bebida do café e produzem substâncias tóxicas que podem ser maléficas a saúde humana como a Ocratoxina A. O combate a esses fungos ocorre principalmente em grãos armazenados com uso de substâncias químicas. A presente invenção tem como objetivo fornecer um produto biológico aos cafeicultores, a fim de melhorar a qualidade dos frutos e da bebida do café inibindo o crescimento de fungos deletérios que naturalmente crescem nos frutos durante o processo de fermentação, secagem e armazenamento. Esta invenção caracteriza-se pela aplicação da composição com as leveduras por pulverização em frutos de café no processo de secagem ou inoculação da composição em frutos de café submersos no processo de fermentação. A presente invenção não contém elementos tóxicos em sua composição, não agride o meio ambiente, preserva a qualidade nos frutos e agrega valor na bebida do café, aumenta o potencial de mercado para comercialização e protege a saúde alimentar aos consumidores.

RELATÓRIO DESCRITIVO

INOCULANTE BIOLÓGICO ANTIFÚNGICO PARA FRUTOS DE CAFÉ

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se a uma composição biológica para inibir o crescimento de fungos deletérios a qualidade da bebida do café através de pulverização da solução composta por leveduras de espécies dos gêneros *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma*.

Fundamentos da invenção

[002] O crescimento de fungos filamentosos ocasiona prejuízos na produção de café. Esses fungos prejudicam a qualidade da bebida do café e produzem substâncias tóxicas que podem ser maléficas a saúde humana como a Ocratoxina A. O combate a esses fungos já ocorre principalmente em grãos armazenados com uso de substâncias químicas.

[003] A patente 1, pede proteção de uma substância líquida biológica com ação antifúngica, entretanto o mesmo não cita a aplicação em frutos de café e não contém leveduras dos gêneros citados acima em sua composição. O referido documento trata-se de um produto biológico líquido que possuem ação antifúngica a ser aplicado em solos, a fim de controlar a presença de fungos patogênicos dos gêneros *Botrytis*, *Fusarium* e *Phytophthora*. A composição do produto possui como componente principal oósporos de *Pythium oligantrum*, um parasita que ataca e causa morte de fungos. A composição aplicada contém uma solução salina, biomassa de oósporos do micoparasita compreendendo entre 0,05% e 0,10%, estabilizado em sacarose entre 60,0% e 64,5%, diluído em 90% a 95% de água. O número de oósporos por ml deve estar entre 1×10^3 e 2×10^7 . Os osmólitos de *Pythium oligantrum* devem estar estabilizados em um óleo, podendo ser óleo de parafina, óleo mineral, glicerol ou óleo de girassol, na concentração de 79,77% a 99,9% do peso. O parasita é cultivado em meio sólido contendo como fonte de energia grãos e casca de milho. O produto em questão é um antifúngico com atuação contra fungos presentes no solo, porém o pedido não especifica sua aplicação em frutos de café.

[004] A patente 2 utiliza leveduras do gênero *Meyerozyma* para inibir o crescimento de fungos filamentosos, mas não pede proteção dessa atividade em frutos de café. O referido documento trata-se de um pedido de proteção de uma composição biológica

de cepas de leveduras com ação antifúngica para ser aplicada em partes de vegetais que possam ser utilizadas como alimentos. O pedido inclui uma série de espécies de leveduras que possam ser utilizadas na composição. O produto a ser aplicado é um exsudado da composição de uma ou mais leveduras cultivadas em meio de cultura contendo resíduos de alimentos triturados. O sobrenadante desse exsudato deve conter em sua composição em ácido orgânico, uma enzima, um álcool ramificado, um ciclopeptídeo, um aldeído ou uma cetona. O produto aplicado atua em sistema de antagonismo com fungos patógenos de diversas espécies, porém não há descrição para proteção contra fungos do gênero *Aspergillus*, que é um dos principais patógenos em grãos e frutos de café e um dos principais fungos afetados pela nossa composição antifúngica.

[005] A patente 3 refere-se a um produto biológico para produção e melhoria da qualidade de bebida de café, mas não faz menção sobre o combate a fungos e nem utiliza leveduras do gênero *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma*. O referido documento trata-se de um pedido de proteção sobre um produto biológico a base de microrganismos do gênero *Bacillus*, com aplicação em frutos de café submetidos ao processo de fermentação. Os microrganismos utilizados na composição, foram isolado de frutos de café e possuem a capacidade de induzir a síntese de ácido clorogênico, a ser utilizado no processo fermentativo. Característica de composição, modo de aplicação, meio de cultura e formulação do produto não está disponível. Apesar de sua aplicação na cultura de café, não há relatado a utilização de leveduras na composição do produto. Além disso, o pedido de proteção não especifica seu alvo de atuação, que no nosso caso são fungos patógenos e deletérios a qualidade da bebida do café.

[006] O artigo 1 apresenta evidências científicas que leveduras dos gênero *Pichia* e *Hanseniaspora*, são capazes de inibir o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus ochraceus* e a produção de ocratoxina A (OTA) em meio de cultura contendo ágar extrato de malte e ágar café. Entretanto não há relatos neste artigo sobre experimentos em condições de campo.

[007] O artigo 2 refere-se a uma atividade antifúngica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida ethanolica* durante a fermentação de grãos de cacau, entretanto não relata os gêneros *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* e não relata a eficiência dessa atividade em frutos de café.

[008] O surgimento de fungos filamentosos em frutos de café recém-colhidos, torna-se um problema devido as substâncias que esses microrganismos são capazes de

produzir, inclusive substâncias tóxicas como ocratoxina A (OTA). Esses compostos agregados aos frutos do café nos processos de fermentação, secagem e armazenamento, ocasiona baixa qualidade da bebida e menor valor de mercado.

[009] A presente invenção foi realizada tendo em vista as circunstâncias acima e tem como objetivo fornecer um produto biológico aos cafeicultores, para que possam aplicar em suas produções a fim de melhorar a qualidade fruto e da bebida do café, inibindo o crescimento de fungos deletérios, que naturalmente crescem nos frutos durante o processo de secagem. A presente invenção não contém elementos tóxicos em sua composição, não agride o meio ambiente, agrega ganho de qualidade nos frutos e na bebida do café, representando aumento de valor de mercado para comercialização e proteção a saúde dos consumidores.

Patente1: CR 20190231 A

Patente 2: WO 2021/050927 A2

Patente 3: CN 115161224 A

Artigo 1: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.015>

Artigo 2: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.002>

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 apresenta um teste *in vitro* de antagonismo microbiano entre as leveduras dos gêneros *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* versus os fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides*.

A Figura 2 apresenta um teste *in vitro* do crescimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides* em frutos de café previamente tratados com as leveduras dos *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma*.

A Figura 3 apresenta a disposição do primeiro experimento com frutos em condição de campo.

A Figura 4 apresenta a distribuição dos frutos por área contaminada de acordo com os tratamentos e o controle referente ao resultado do experimento da figura 3 após 20 dias.

A Figura 5 apresenta os gráficos referentes ao resultado do experimento da Figura 3 após 20 dias.

A Figura 6 apresenta a disposição das bandejas em sala de cultivo com condições controladas para favorecer o crescimento de fungos no frutos de café.

A Figura 7 apresenta a disposição de frutos de café em bandejas plásticas e o crescimento fúngico após 15 dias de incubação.

A Figura 8 apresenta distribuição dos frutos por área contaminada de acordo com os tratamentos e o controle referente ao resultado do experimento da Figura 6

A Figura 9 apresenta os gráficos referentes ao resultado do experimento da Figura 6.

Descrição da invenção

[0010] A presente invenção refere-se a uma composição líquida de leveduras dos gêneros *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma*, capazes de antagonizar com fungos filamentosos que colonizam frutos de café em estágio de amadurecimento avançado e permanecem até os estágios de secagem e armazenamento. Tais fungos produzem moléculas que resultam em sabor desagradável na bebida do café, como altas concentrações de ácido acético, ácido clorogênico, pirazinas e pirróis.

[0011] As leveduras utilizadas nessa composição foram isoladas do processo fermentativo de frutos do cafeeiro e as colônias foram cultivadas em meio de cultura YEPG (15g/l de ágar, 20g/l de glicose, 10g/l de peptona e 10g/l de extrato de levedura). Essas colônias foram submetidas a procedimentos de extração de DNA, PCR e sequenciamento Sanger, que revelou três espécies diferentes de leveduras.

[0012] Com base na literatura, realizamos o primeiro teste demonstrado na Figura 1 para avaliar a capacidade de tais leveduras antagonizarem com fungos provenientes de grãos armazenados e conhecidamente prejudiciais. As leveduras foram cultivadas em meio YEPG líquido (20g/l de glicose, 10g/l de peptona e 10g/l de extrato de levedura). Os fungos utilizados foram *Aspergillus niger* CF49 e *Fusarium verticillioides*. Após o tempo de crescimento do fungo, foi coletado um disco de meio contendo esporos e hifas fúngicas e foi adicionado em um recipiente previamente esterilizado contendo água destilada estéril. O experimento foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura PDA, onde foram pipetados 10 ml de solução de esporos de cada fungo, na concentração de 1×10^4 cel/ml, nas extremidades das placas e um alinha horizontal no meio da placa com gotas de 10 ml na concentração de 1×10^7 /ml e

mantidas á 28°C por 7 dias. Nessa condição, é notado na Figura 1 que os discos dos fungos cultivados foram menores nas placas com a presença das leveduras e nos casos dos tratamentos com *Hanseniaspora* e *Meyerozyma*, observa-se uma menor densidade de esporos do fungo *Aspergillus* próximo a linha disposta de leveduras.

[0013] Na Figura 2 demonstramos a realização de um novo ensaio *in vitro* usando placas de petri e meio ágar-água, um meio de cultura sem nutrientes, utilizado para posicionar e sustentar os frutos de café que foram previamente esterilizados com solução de hipoclorito de sódio e álcool 70% e posteriormente lavados com água destilada. Essa esterilização garante que os únicos microrganismos presentes no fruto foram os selecionados e adicionados artificialmente. Na condição de controle, os frutos esterilizados não receberam nenhuma inoculação de fungos ou leveduras, nas condições FV foram inoculados 10 ml de esporos do fungo *Fusarium verticillioides*, na concentração de 1×10^4 esporos/ml. Na condição AN, foram inoculados 10 ml de esporos do fungo *Aspergillus niger* na concentração de 1×10^4 esporos/ml. Nas condições de tratamento FVMC e ANMC, pulverizamos 10 ml da solução de levedura do gênero *Meyerozyma* na concentração de 1×10^7 cel/ml antes de pulverizar as soluções de esporos dos fungos. Observamos na Figura 2 que os frutos em condição de controle permaneceram sem contaminação, demonstrando que o processo de esterilização foi eficiente. Observamos que nas condições FV1 e FV3, houve um crescimento parcial dos fungos na parte inferior dos frutos que está em contato com o meio e na condição FV2 houve um crescimento em toda superfície dos frutos. Observando as condições MCFV1 e MCFV3, concluímos que houve uma redução significativa da área de contaminação dos frutos se comparados a FV2 e na condição MCFV3 houve uma redução total da área contaminada, sugerindo que a levedura do gênero *Meyerozyma* possui considerável antagonismo contra o fungo colonizador *Fusarium verticillioides*. Ainda na Figura 2, observamos que na condição AN1, AN2 e AN3 os frutos foram fortemente afetados pela inoculação do fungo, entretanto as condições MCAN1, MCAN2 e MCAN3, percebemos uma forte atuação da levedura aplicada, inibindo completamente o crescimento fúngico nos frutos e demonstrando que a levedura do gênero *Meyerozyma* possui forte antagonismo contra o fungo *Aspergillus niger*, que é um dos principais fungos contaminantes do processo de secagem e armazenamento de frutos de café.

[0014] A partir dos resultados obtidos *in vitro* realizamos os experimentos em condições de campo para avaliar o desempenho dos microrganismos. Na Figura 3 observamos a disposição do experimento utilizando porções de 1 kg de frutos de café

maduros separados por hastes de bambu em uma estufa de secagem com chão de secagem pavimentado comumente utilizado na secagem de frutos de café e que em dias ensolarados atingem a temperatura média superior a 35°C. Tais frutos não passaram pelo processo de esterilização e nem por inoculação artificial de fungos indesejáveis, para que os microrganismos característicos do ambiente pudessem se desenvolver. Nas condições de tratamento foram pulverizados 100 ml de solução com as leveduras dos gêneros *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* na concentração de 1×10^9 cél/ml. Na condição de controle foram pulverizados 100 ml de água fervida e resfriada a temperatura ambiente.

[0015] Após vinte dias de experimento os frutos de cada porção foram avaliados quanto à área de superfície contaminada e acondicionados em beakers de vidro para pesagem e comparação visual, observado na Figura 4. Consideramos cinco níveis de contaminação: 1- Fruto totalmente livre de contaminação; 2- fruto com 1% a 30% de área contaminada; 3- fruto com 31% a 60% de área contaminada; 4- fruto com 61% a 90% de área contaminada; 5 – fruto com 90% a 100% de área contaminada. Podemos observar de modo evidente que o número de frutos de classificação 1, foi superior em todos os tratamentos com as leveduras. O número de frutos contaminados com classificação 2 e 3 que indicam uma área contaminada dos frutos entre 1% e 60% foi similar entre todos as condições de tratamento e controle. Todavia o número de frutos das classificações 4 e 5, que indicam área contaminada dos frutos superior a 60% foi significativamente menor em relação a condição de controle. Esses dados são estatisticamente apresentados nos gráficos elaborados pelo software Prism e dispostos na Figura 5.

[0016] A fim de avaliar se a alta temperatura da estufa de secagem tenha afetado o crescimento dos fungos indesejáveis, causando um resultado falso positivo da nossa composição, repetimos o experimento em condições de temperatura controlada, para favorecer o crescimento de fungos. Na Figura 6 podemos observar amostras de 1 kg de frutos de café dispostos em bandejas. Nessa condição, os frutos de café foram colhidos e jogados ao chão e lavados com água não fervida/filtrada. As bandejas cobertas com plástico filme e foram dispostas em sala de cultivo a 23°C, como pode ser observado na Figura 6. Nas condições de tratamento com as leveduras foram pulverizados 100 ml de solução contendo 1×10^9 cél/ml de cada levedura dos gêneros *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* e uma mistura de 33,3 ml de cada uma das leveduras formando um tratamento que nomeamos Mix de leveduras. Na condição controle foi pulverizado 100 ml água destilada. Não houve inoculação de esporos

fúngicos e nem esterilização dos frutos, para que os microrganismos de origem ambiental pudessem se desenvolver. A temperatura da sala manteve a umidade alta e o plástico filme causou abafamento nas bandejas favorecendo o crescimento dos fungos que, rapidamente se desenvolveram.

[0017] Após 15 dias, analisamos o experimento dividindo os frutos em três classes: 1 – 0% a 20% de área contaminada na superfície dos frutos; 2- 21% a 60% de área contaminada na superfície dos frutos. E 3- 61% a 100% de área contaminada na superfície dos frutos. Os frutos foram separados em beakers de vidro, como pode ser observados na Figura 8 e posteriormente pesados. Nesta situação, observamos na Figura 8 que a quantidade de frutos contaminados pelos fungos naturalmente presentes nas amostras de café, foi superior nas condições de inoculação das leveduras dos gêneros *Pichia*, e *Meyerozyma* quando comparados a condição controle sugerindo que as condições criadas favoreceram o crescimento dos fungos e dificultaram o desempenho das leveduras. Entretanto nas condições de tratamento com a levedura do gênero *Hanseniaspora* e Mix de leveduras, houve uma significativa inibição do crescimento dos fungos. Essa comparação pode ser observada nos gráficos da Figura 9, onde o número de frutos altamente contaminados na condição de tratamento com o Mix de leveduras ter apresentado um número menor que a condição controle, o tratamento com a levedura do gênero *Hanseniaspora* é expressivamente menor que as demais, mesmo nas condições de favorecimento do crescimento fúngico, sugerindo uma forte atuação inibitória levedura diante dos fungos que se desenvolvem nos frutos de café.

Exemplos de concretizações da invenção

[0018] A COMPOSIÇÃO - Preferência da presença de três espécies diferentes dos gêneros *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* cultivadas em laboratório, em becker de vidro esterilizado, vedados com manta de algodão, utilizando meio de cultura contendo extrato de levedura, glicose e peptona e agitado em incubadora à 30°C, até atingir 1×10^9 cél/ml e posteriormente centrifugado.

[0019] NA APLICAÇÃO NO PROCESSO DE SECAGEM – Para pequenas produções, preferência por utilização de pulverizadores manuais de 5l a 20l, para grandes produções preferência de utilização de pulverizadores motorizados. Em ambas as situações diluindo o produto em água filtrada na proporção 1:10 e aplicando nos frutos de café expostos em terreiro de secagem pavimentado ou suspenso, na proporção de 1l de produto para 100kg de frutos.

[0020] NA APLICAÇÃO EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO INDUZIDA – Preferência de aplicação do produto com a composição citada em [0018], em frutos de café na proporção 1:100, sendo 1l de produto para 100 kg de frutos, no processo de fermentação aberta; fermentação submergida; maceração carbônica; maceração semi-carbônica ou dupla fermentação.

DESENHOS

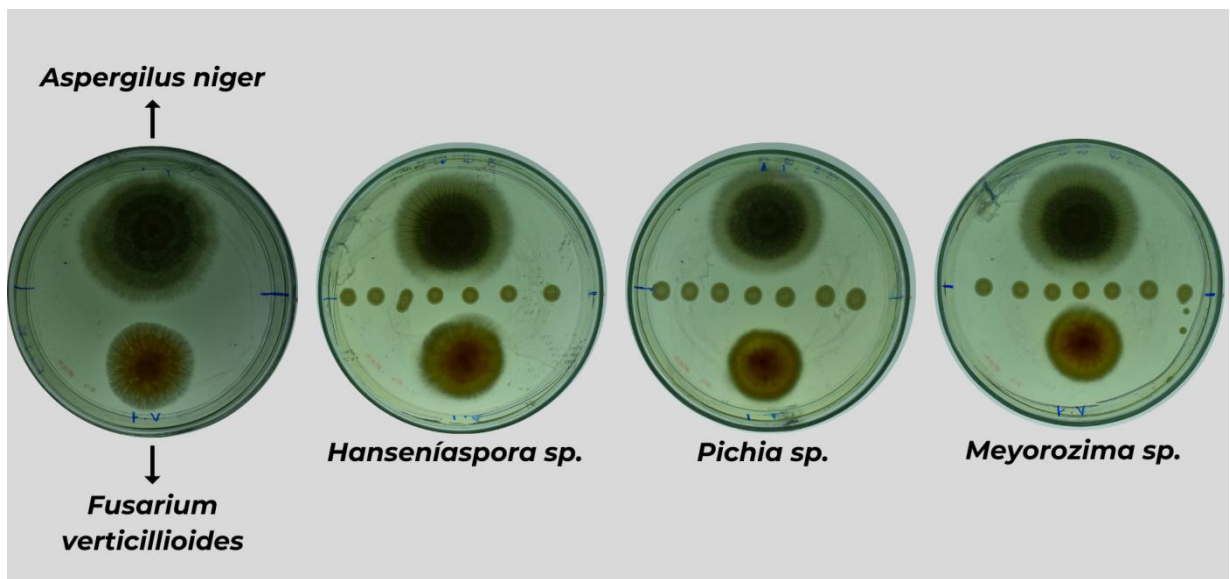


Figura 1

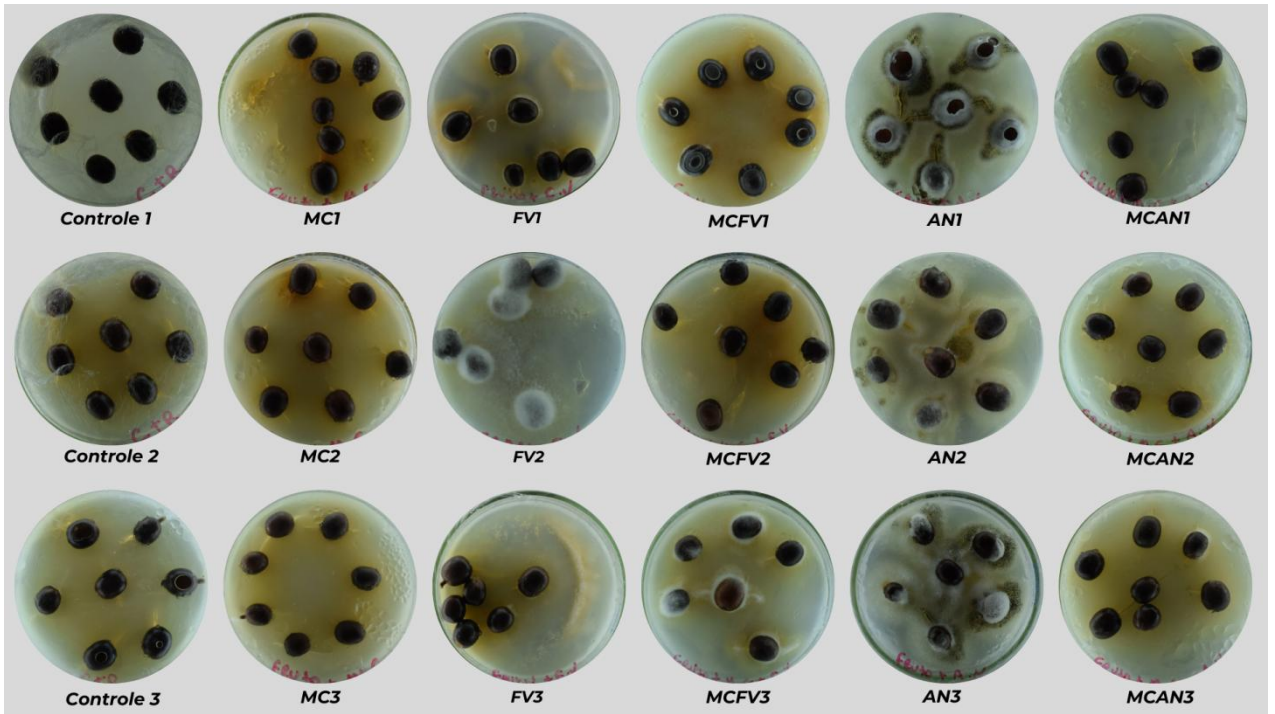


Figura 2

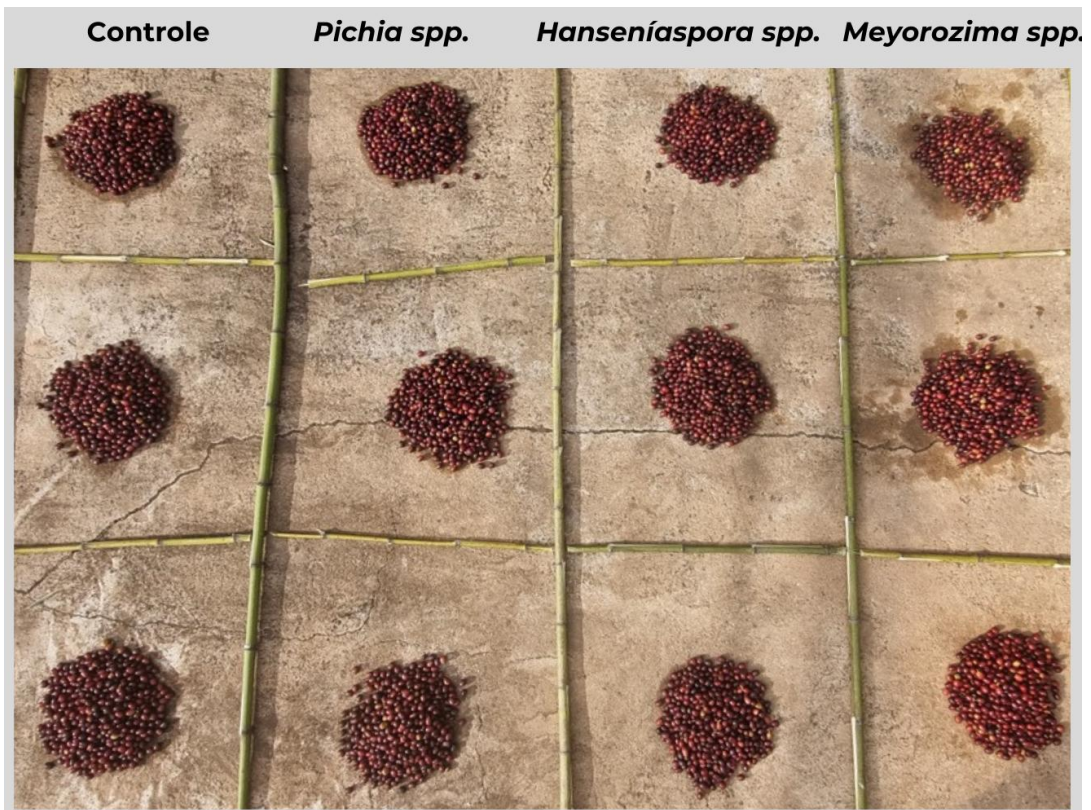


Figura 3

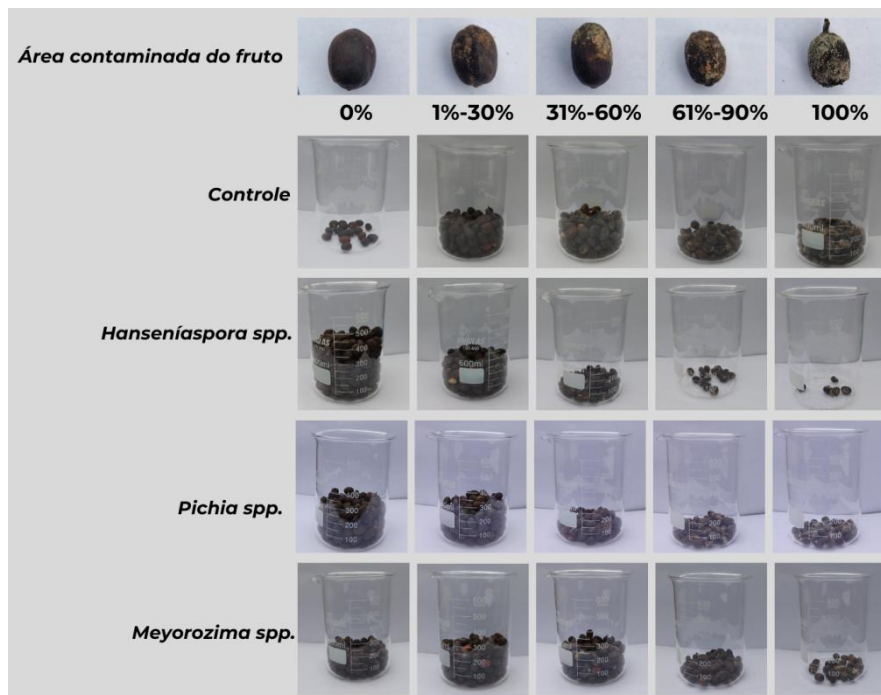


Figura 4

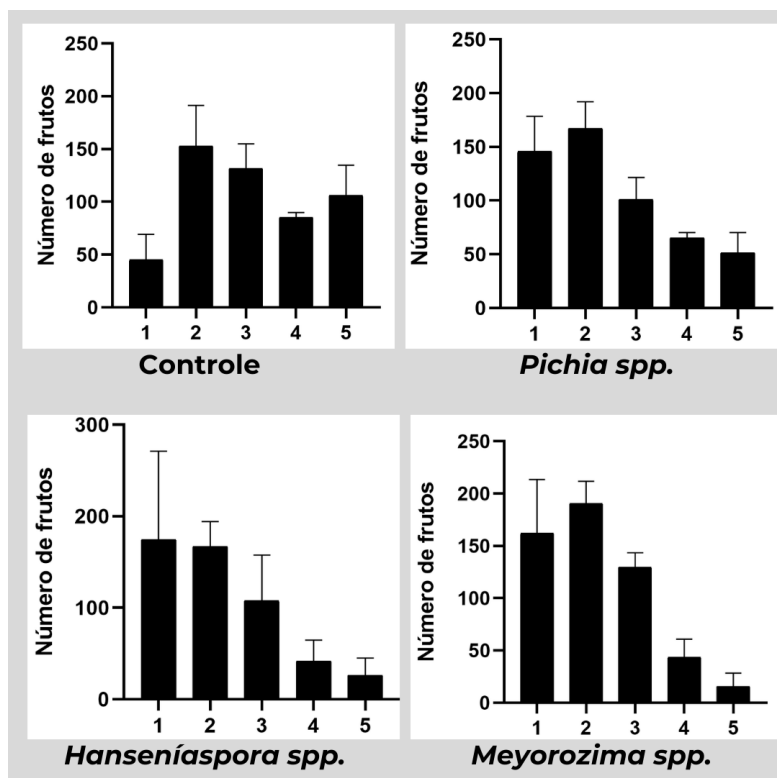


Figura 5



Figura 6

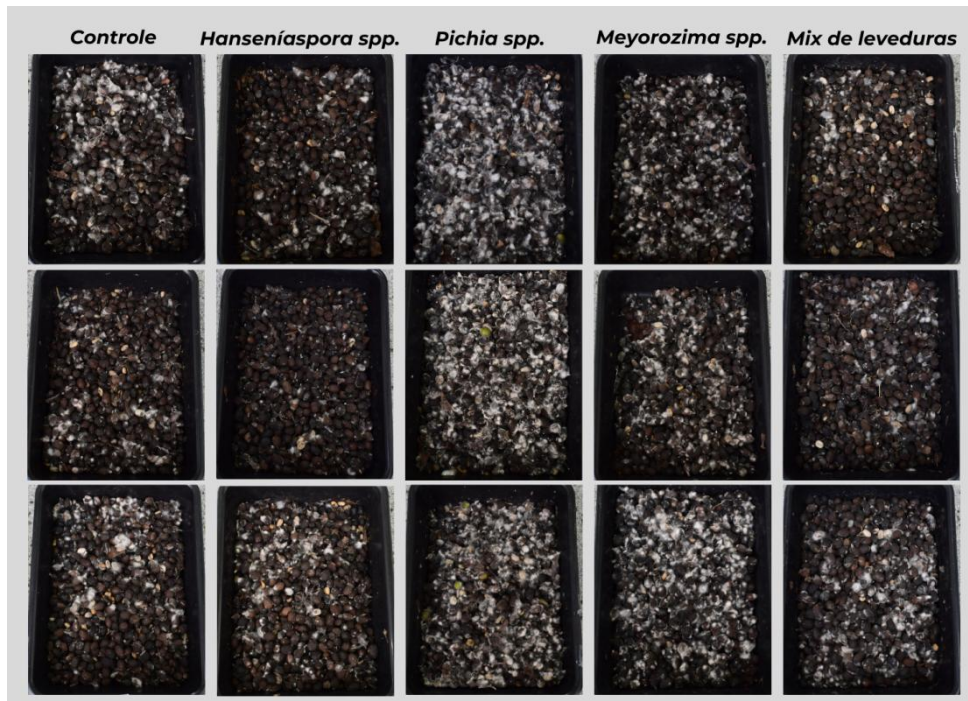


Figura 7

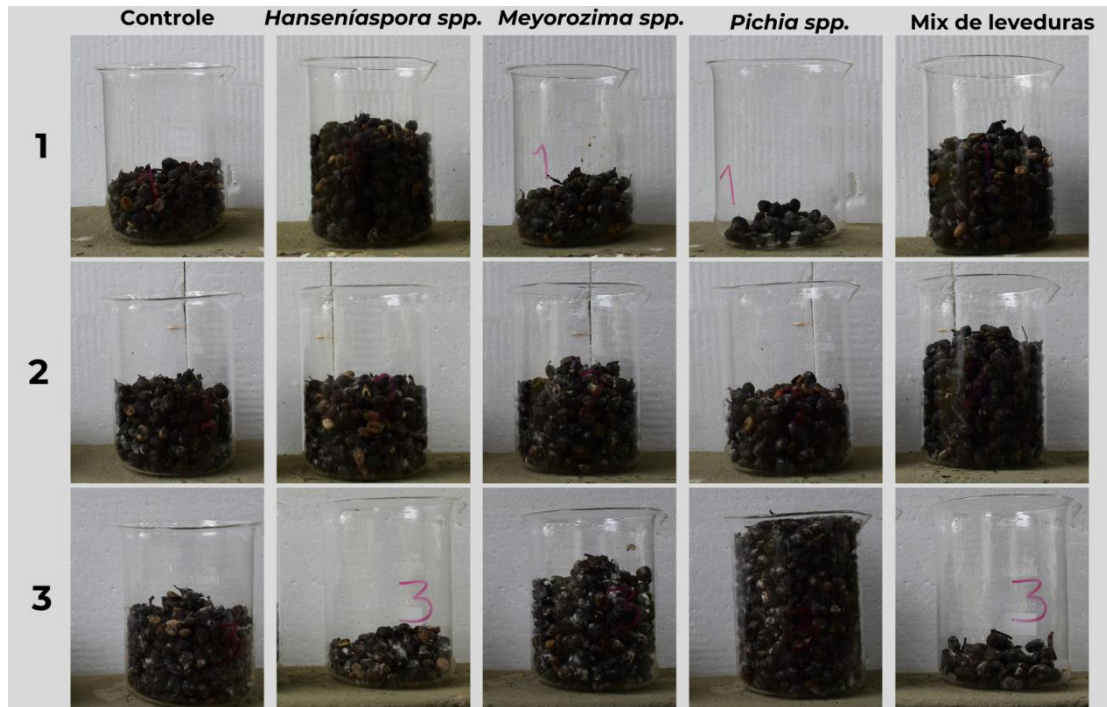


Figura 8

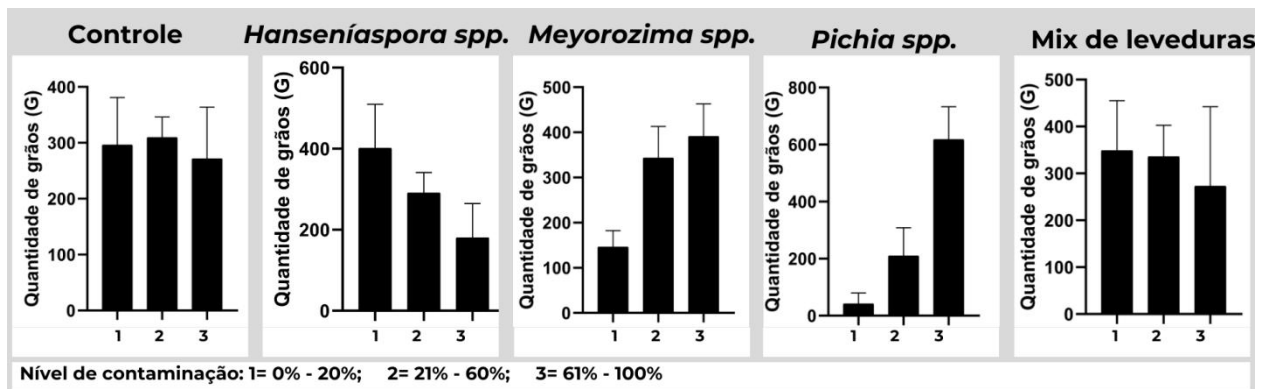


Figura 9

REIVINDICAÇÕES

- 01- Composição biológica caracterizada por possuir as levedura do gênero *Meyorozima sp.*, *Hanseniaspora sp.* e *Pichia sp* cultivada em meio de cultura e suspensa em água, como antifúngico. (reivindicação independente de produto)
- 02- Uso da composição biológica caracterizada por possuir as levedura do gênero *Meyorozima sp.*, *Hanseniaspora sp.* e *Pichia sp* em frutos de café com finalidade de inibição do crescimento de fungos deletérios a qualidade do grão e da bebida. (reivindicação independente de processo)
- 03- Uso da composição biológica de acordo com a reivindicação 01, caracterizada pelo cultivo em meio de cultura tendo como composição: Extrato de levedura, peptona de carne e uma fonte de açúcar.
- 04- Cultivo das leveduras dos gêneros *Meyorozima sp.*, *Hanseniaspora sp.* e *Pichia sp*, caracterizada pela reivindicação 03, tendo como fonte de açúcar: glicose, galactose, frutose, manose, sacarose, lactose e pectina.
- 05- Uso da composição biológica de acordo com a reivindicação 02, caracterizada por aplicação através de pulverização.
- 06- Aplicação da composição biológica, de acordo com a reivindicação 05, caracterizado pelo uso de pulverizador elétrico, manual ou motorizado.
- 07- Aplicação da composição biológica de acordo com a reivindicação 02, caracterizado pela aplicação direta em frutos de café maduros, recém-colhidos ou ainda no cafeeiro.
- 08- Aplicação da composição biológica, de acordo com a reivindicação 07, caracterizado pela aplicação em frutos dispostos em terreiros suspensos, terreiros pavimentados ou secadores elétricos.
- 09- Uso da composição biológica de acordo com a reivindicação 02, caracterizada por inoculação em recipientes com frutos de café submersos.
- 10- Aplicação da composição biológica, de acordo com a reivindicação 09, caracterizado pelo uso de recipiente(s) constituído(s) de material metálico, madeira ou plástico.
- 11- Aplicação da composição biológica, de acordo com a reivindicação 09, caracterizado pela inoculação da composição em processos fermentativos de frutos de café.
- 12- Aplicação da composição biológica, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela inoculação em processos de fermentação aberta; fermentação submergida; maceração carbônica; maceração semi-carbônica ou dupla fermentação.
- 13- Composição biológica de acordo com a reivindicação 01, tendo como espécies: *Meyerozyma amylolytica*; *Meyerozyma athensensis*; *Meyerozyma caribbica*; *Meyerozyma carpophila*;

Meyerozyma elateridarum; *Meyerozyma guilliermondii*; *Meyerozyma neustonensis*; *Meyerozyma smithsonii*; *Hanseniaspora clermontiae*; *Hanseniaspora gamundiae*; *Hanseniaspora guilliermondii*; *Hanseniaspora lachancei* *Hanseniaspora meyeri*; *Hanseniaspora occidentalis*; *Hanseniaspora opuntiae*; *Hanseniaspora osmophila*; *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*; *Hanseniaspora uvarum*; *Hanseniaspora valbyensis*; *Hanseniaspora vineae*; *Pichia barkeri*; *Pichia cactophila*; *Pichia cecembensis*; *Pichia cephalocereana*; *Pichia deserticola*; *Pichia eremophila*; *Pichia exigua*; *Pichia fermentans*; *Pichia galeiformis*; *Pichia garciniae*; *Pichia gijzeniarum*; *Pichia heedii*; *Pichia kluyveri*; *Pichia kudriavzevii*; *Pichia megalospora*; *Pichia membranifaciens*; *Pichia methanothermo*; *Pichia myanmarensis*; *Pichia nakasei*; *Pichia nanzhaoensis*; *Pichia nongkratonensis*; *Pichia norvegensis* *Pichia occidentalis*; *Pichia paraexigua*; *Pichia porticicola*; *Pichia pseudocactophila*; *Pichia punctispora*; *Pichia rarassimilans*; *Pichia scaptomyzae*; *Pichia scutulata*; *Pichia sporocuriosa*; *Pichia terricola*; *Pichia uvarum* .

- 14- Uso da composição biológico de acordo com a reivindicação 02, caracterizada pelo combate a fungos deletérios a qualidade da bebida, sendo estes pertencentes aos gêneros: *Zygorhynchus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Cladosporium*