



PÂMELA MYNSEN MACHADO MARTINS

**Influence of altitude on the microbiota and on the sensorial
and chemical quality of fermented coffee (*Coffea arabica* L.)
from Serra do Caparaó, ES region**

LAVRAS – MG

2019

PÂMELA MYNSEN MACHADO MARTINS

**Influence of altitude on the microbiota and on the sensorial and chemical quality of
fermented coffee (*Coffea arabica* L.) from Serra do Caparaó, ES region
Influência da altitude na microbiota e na qualidade sensorial e química de cafés
fermentados (*Coffea arabica* L.) da Serra do Caparaó, região do Espírito Santo**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

Prof.^a Dr.^a Rosane Freitas Schwan

Orientadora

Dr.^a Maria Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel

Dr.^a Nádia Nara Batista

Coorientadoras

LAVRAS – MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Martins, Pâmela Mynsen Machado.

Influence of altitude on the microbiota and on the sensorial and chemical quality of fermented coffee (*Coffea arabica* L.) from Serra do Caparaó, ES region / Pâmela Mynsen Machado Martins. - 2019.

71 p. : il.

Orientador(a): Rosane Freitas Schwan.

Coorientador(a): Nadia Nara Batista, Maria Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Catuaí Vermelho. 2. Raman spectroscopy. 3. Molecular analysis. I. Schwan, Rosane Freitas. II. Batista, Nadia Nara. III.

PÂMELA MYNSEN MACHADO MARTINS

**Influence of altitude on the microbiota and on the sensorial and chemical quality of
fermented coffee (*Coffea arabica* L.) from Serra do Caparaó, ES region
Influência da altitude na microbiota e na qualidade sensorial e química de cafés
fermentados (*Coffea arabica* L.) da Serra do Caparaó, região do Espírito Santo**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 10 de Julho de 2019

Dr^a. Rosane Freitas Schwan UFLA

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dr^a Angélica Cristina de Souza UFLA

Dr. Diego Egídio Ribeiro SYNGENTA

Prof^a. Dr^a. Rosane Freitas Schwan

Orientadora

LAVRAS-MG

2019

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força e coragem para concluir mais uma etapa e por sempre iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, Paulo e Daniela, por sempre me apoiarem independente das dificuldades. E a toda minha família, por estarem sempre presentes.

Ao Dr. Saulo pelo companheirismo, carinho, incentivo e paciência durante esta etapa e por todos os auxílios, correções e ideias para escrita deste trabalho.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Rosane Schwan, pelas oportunidades e conhecimentos adquiridos ao longo desses anos, pela atenção, carinho, compreensão e confiança.

À Dr^a. Maria Gabriela pela coorientação, auxílio, correções, pelos finais de semana trabalhando, pelos conselhos, paciência e atenção para que eu aprendesse e entendesse cada detalhe das análises e por toda amizade e risadas ao longo desses anos.

À Dr^a. Nádia, pela coorientação e correções.

À Dr^a. Luciana, por todo conhecimento compartilhado, pelo apoio e pelas dicas e principalmente pela sua amizade, por deixar o ambiente mais calmo, mais tranquilo e por me deixar sempre mais confiante.

À Dr^a. Angélica por estar sempre disposta a ajudar, pela companhia e amizade.

À Prof. Dr^a. Jenaina Soares pelos diversos testes, pesquisas, auxílios, ajudas, correções e disposição na elaboração deste trabalho.

À Iara que durante a sua iniciação científica esteve sempre disposta a me ajudar, pela contribuição para execução deste trabalho, pela companhia nos almoços e pelas risadas.

À Marcela pela sua amizade, risadas e por estar sempre disposta a ajudar.

À Ivani, Rose, Cidinha e Januzia por deixarem o ambiente sempre agradável, pelas conversas, risadas e companhia.

À Syngenta, ao Dr. Diego e ao José Naves pelo auxílio na execução da análise sensorial.

Ao Prof. Dr. João Batista Pavesi pela coleta das amostras e realização do experimento.

À FAPEMIG, CNPq e CAPES pela bolsa de estudo e apoio financeiro.

Às minhas companheiras de casa, Rebeca e Rafaela, pela amizade, risadas e por me incentivarem nos estudos.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho e que eu tive a honra de conhecer e trabalhar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As variações no perfil sensorial do café produzidos uma mesma região são evidentes. A microbiota e a qualidade dos grãos são influenciadas por diversos fatores ambientais como temperatura, precipitação de chuva, vento, exposição ao sol, tipo de solo e topografia. Além disso, existem os fatores climáticos que estão relacionados com a mudança de altitude, como a pressão atmosférica, temperatura, oxigênio e CO₂. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da altitude (800, 1000, 1200 e 1400 m) de plantio dos frutos de café sob a microbiota presente e como estes dois fatores podem influenciar na qualidade química e sensorial da bebida final de cafés fermentados cultivados na Serra do Caparaó, Espírito Santo, Brasil. Frutos maduros foram coletados nas diferentes altitudes, selecionados manualmente e fermentados em biorreatores localizados a 1200 m de altitude. Dois processamentos foram realizados em triplicata, café descascado e natural e fermentados por 72 h. Os grãos foram secos ao sol em terreiros suspensos até atingir 11-12% de umidade. Em relação à análise microbiológica, a contagem populacional de bactérias e leveduras foi realizada a partir do plaqueamento em superfície. Os isolados foram agrupados e identificados a partir das técnicas de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI-TOF) e sequenciamento da região ribossomal usando primers específicos para cada grupo microbiano. A composição química foi avaliada pela espectroscopia Raman e a análise sensorial foi realizada utilizando Temporal Dominance of Sensations (TDS). Houve diferença significativa na contagem populacional dos microrganismos estudados entre as altitudes e entre os processamentos. A composição química e a percepção sensorial da bebida também foram influenciadas pela altitude e pelo processamento. O café cultivado na altitude de 1400 m foi o mais apropriado para ambos os processamentos. As altitudes de 800 e 1200 m foram mais eficientes no café descascado e a 1000 m no café natural. A altitude é um fator que influencia a composição química dos grãos, a microbiota presente naturalmente no fruto e, conseqüentemente, a percepção sensorial dos cafés fermentados.

Palavras-chave: Análise sensorial. Espectroscopia Raman. Catuaí Vermelho.

ABSTRACT

The variations in the sensorial profile of coffee produced in different countries or regions are notorious. The microbiota and grain quality are influenced by several environmental factors such as temperature, rainfall, wind, sun exposure, soil type and topography. Besides that, there are climatic factors associated to the change of altitude, such as atmospheric pressure, temperature, oxygen and CO₂. The objective of this work was to evaluate the influence of coffee fruits cultivated at different altitudes (800, 1000, 1200, 1400 m) on the microbiota and how these two factors may influence the chemical and sensorial quality of the final beverage of fermented coffees (*Coffea arabica* L.) grown in Serra do Caparaó, Espírito Santo, Brazil. Mature fruits were collected at different altitudes, manually selected and fermented in bioreactors located at an altitude of 1200 m. Pulped and natural processes were performed in triplicate and fermented by 72 h. The grains were sun-dried on suspended terraces until reaching 11-12% moisture. For microbiological analysis, the population count of bacteria and yeasts was performed from surface plating. The isolates were grouped and identified from the ionization and desorption techniques assisted by matrix - flight time (MALDI-TOF) and sequencing of the ribosomal region using specific primers for each microbial group. The chemical compositions were evaluated by Raman spectroscopy and the sensorial analysis was realized using the Temporal Dominance of Sensations (TDS) methodology. There was a significant difference in the population count of the microorganisms studied between the altitudes and between processing. The chemical composition and sensory perceptions of the beverage were also influenced by altitude and processing. The coffee cultivated at an altitude of 1400 m was the most appropriate in both processes. Altitudes of 800 and 1200 m were more efficient in pulped coffee and 1000 m in natural coffee. Altitude is a factor that influences the chemical composition of the grain, the natural microbiota presents in the fruit and, consequently, the sensorial perception of the fermented coffees.

Keywords: Sensory analysis. Raman spectroscopy. Catuaí Vermelho.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Café	12
2.2 Composição química do fruto do café	13
2.3 Processamento do café	16
2.3.1 Via seca	17
2.3.2 Via semi-seca	18
2.3.3 Via úmida	18
2.4 Fermentação do fruto do café	18
2.5 Microbiota presente no fruto do café	20
2.6 A influência dos fatores ambientais	21
2.6.1 Conceito de <i>terroir</i>	25
2.8 Análises de compostos químicos	26
2.8.1 Espectroscopia Raman	27
REFERÊNCIAS	29
SEGUNDA PARTE	37
Artigo 1 Effects that the altitude causes in the microbiota, chemical composition and quality of Arabica coffee (<i>Coffea arabica</i> L.)	37

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais apreciadas e aceitas por diversos países no mundo. O café arábica (*Coffea arabica* L.) é a espécie mais cultivada, uma vez que este apresenta melhor qualidade, proporcionando uma bebida de maior valor comercial (BERTRAND et al., 2003). Os cafés especiais são caracterizados por obter no mínimo 80 pontos na escala de classificação de cafés especiais da Specialty Coffee Association (SCA) e por não apresentarem qualquer tipo de defeito na bebida (LINGLE, 2011). Este setor representa aproximadamente 12% do mercado internacional e possui o valor de venda que pode variar entre 30% a 40% a mais em relação ao café tradicional. Em alguns casos, pode até ultrapassar os 100% (BRAZIL SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION - BSCA, 2017).

Existem diferentes tipos de processamento do café e independente do tipo, a fermentação é um processo natural que ocorre nos grãos de café com o intuito de diminuir o teor de açúcar presente nos mesmos e como resultado gerar compostos voláteis e não voláteis que contribuem para melhoria do sabor e aroma da bebida, tais como sabores cítricos, frutado e adocicado (SILVA et al., 2013; LEE, 2015).

Uma alternativa do processo de fermentação é a utilização de fermentações conduzidas em biorreatores para induzir a condição de anaerobiose e então ocorrer a ação dos microrganismos anaeróbicos presente nos grãos de café (LEE, 2015). Esta fermentação ocorre naturalmente a partir da degradação da mucilagem presente ao redor dos grãos (AGATE; BHAT, 1966). Durante a fermentação espontânea do café ocorrem diferentes processos bioquímicos no qual as enzimas produzidas pelas bactérias e leveduras presentes principalmente no mesocarpo degradam os açúcares, proteínas e lipídeos e os convertem em ácidos, álcoois, cetonas e ésteres (VAUGHN et al., 1958; FRANK et al., 1965, PUERTA 2013). Este processo permite a formação de diferentes compostos orgânicos, no qual podem agregar valor ao produto (SILVA, 2015).

São evidentes as variações no perfil sensorial do café produzidos em regiões com características distintas, tais como em Mata de Minas (SILVEIRA et al., 2016) e nas

regiões da Costa Rica (AVELINO et al., 2005). Isto ocorre devido a alguns fatores como topografia, manejo, solo, clima e a própria planta (FAGAN et al., 2011). Estes aspectos determinam o conceito de *terroir* no qual cada região pode ser representada como um território, onde diferentes graus de variabilidade, tais como clima e solo, influenciam tanto a planta quanto as características finais do produto (GOULET; MORLAT, 2011).

O clima adequado para cultivar a planta do café depende da latitude e da altura acima do nível do mar (WINTGENS, 2009). Em relação ao *Coffea arabica*, a temperatura ideal é entre 18-22 °C com precipitação anual entre 1400-2000 mm e umidade relativa próxima a 60% (DESCROIX et al., 2009). Esta relação ocorre porque a mudança da latitude e da altitude está relacionada diretamente com alguns fatores climáticos, como a redução da temperatura e pressão devido ao aumento da altitude (KÖRNER, 2007; DESCROIX et al., 2009). Além disso, a qualidade dos grãos também é influenciada pela precipitação, vento, exposição ao sol e tipo de solo. Temperaturas muito baixas (< 15 °C) retardam o amadurecimento dos frutos, enquanto ambientes muito quentes (> 30 °C) propiciam uma maturação acelerada. Ambos os extremos geram efeitos negativos na estrutura dos frutos e no sabor da bebida (DECAZY et al., 2003; AVELINO et al., 2005; RODRIGUES, 2009; WINTGENS, 2009).

Além da temperatura, outros fatores climáticos estão relacionados com a altitude, como a pressão atmosférica total e a pressão parcial dos gases atmosféricos, como O₂ e CO₂. A redução desses fatores implica em um impacto significativo nas plantas e nos microrganismos (KÖRNER, 2007). Esta microbiota presente nos frutos do café é representada por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A diversidade microbiana varia de acordo com as propriedades físicas e químicas dos frutos e do método de processamento (SILVA et al., 2000; VILELA et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2015).

Além disso, a diversidade microbiana é modificada por fatores, tais como teor de nutrientes, pH e disponibilidade de água (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2003) existentes na região em que a planta foi cultivada. A qualidade da bebida é influenciada por esses microrganismos, por isso é importante conhecer e estudar a microbiota predominante nos grãos do café (VILELA et al., 2010).

Os efeitos ambientais sobre a qualidade do café é um fenômeno complexo e está sendo cada vez mais discutido. Os microrganismos possuem uma forte influência na qualidade sensorial e podem ter um papel importante quando correlacionados com o termo *terroir*. Estudos têm sido realizados relacionando a altitude de plantio com a qualidade da bebida (AVELINO et al., 2005; BERTRAND et al., 2012; SILVEIRA et al., 2016). Porém, não há estudos que relacione a microbiota presente no café cultivado em diferentes altitudes, com a qualidade da bebida. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da altitude de plantio dos frutos de café sob a microbiota presente e como estes dois fatores podem influenciar na qualidade química e sensorial da bebida final de cafés fermentados cultivados na Serra do Caparaó (22° 28' 5" S, 45° 0' 12" O), Espírito Santo, Brasil.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Café

A palavra café era conhecida como *Quahweh*, de origem arábica e hoje sua popularidade já é vista em vários países (MURTHY; NAIDU, 2012). O café pertence à família da Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. Do ponto de vista econômico, as espécies mais importantes são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* L. No Brasil, as principais cultivares de café arábica é Mundo Novo, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo (SAKIYAMA; FERRÃO, 2015). O seu cultivo localiza-se principalmente nos trópicos uma vez que não ficam expostos ao frio intenso e em altas altitudes para evitar temperaturas muito elevadas (SCHWAN; WHEALS, 2003).

Devido à sua grande importância econômica, a Organização Internacional do Café (ICO) foi criada em 1963, em Londres, com o objetivo de auxiliar países exportadores e importadores do café. A Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) foi fundada em 1973 para representar as indústrias de torrefação e moagem de café de todo o país. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café. A sua participação na exportação corresponde a 33,48%, seguido pelo Vietnã com 18,23% e Colômbia com 11,10% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2015).

Em janeiro de 2019, as exportações mundiais de café totalizaram 11,06 milhões de sacas (184.314 toneladas) o que representa um aumento de 2,6% em relação a janeiro de 2018 (ICO, 2019). Na safra brasileira de 2019, estima-se que a produção de café deverá alcançar de 50,48 milhões a 54,48 milhões de sacas beneficiadas. Estima-se para café Arábica e café Conilon uma produção média de 37,14 milhões e 15,35 milhões de sacas, respectivamente. Os dois maiores estados produtores de café são Minas Gerais e Espírito Santo, com uma estimativa média de 27,05 milhões e 13,61 milhões de sacas, respectivamente (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019).

A espécie *Coffea arabica* representa a maior parte da bebida de café consumida no mundo, pois é considerada superior em relação a suas propriedades sensoriais quando comparado ao *Coffea canéfora* (BERTRAND et al., 2003). Neste contexto, a importância econômica da bebida tem crescido devido ao aumento do número de consumidores interessados em cafés especiais. Este setor representa aproximadamente 12% do mercado internacional. Alguns desses cafés possuem o valor de venda que pode variar entre 30% a 40% a mais em relação ao café tradicional. Em alguns casos, pode até ultrapassar os 100% (BRAZIL SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION - BSCA, 2017).

Estudos realizados pela Associação Brasileira de Indústrias de Café (ABIC, 2017) mostram que aproximadamente 81% dos consumidores compram o café em pó, 18% o grão torrado e 0,9% as cápsulas. Em domicílios, o crescimento do consumo de cafés em grão torrado tem superado a média. O surgimento das cápsulas gerou um interesse por parte dos consumidores por cafés de maior qualidade.

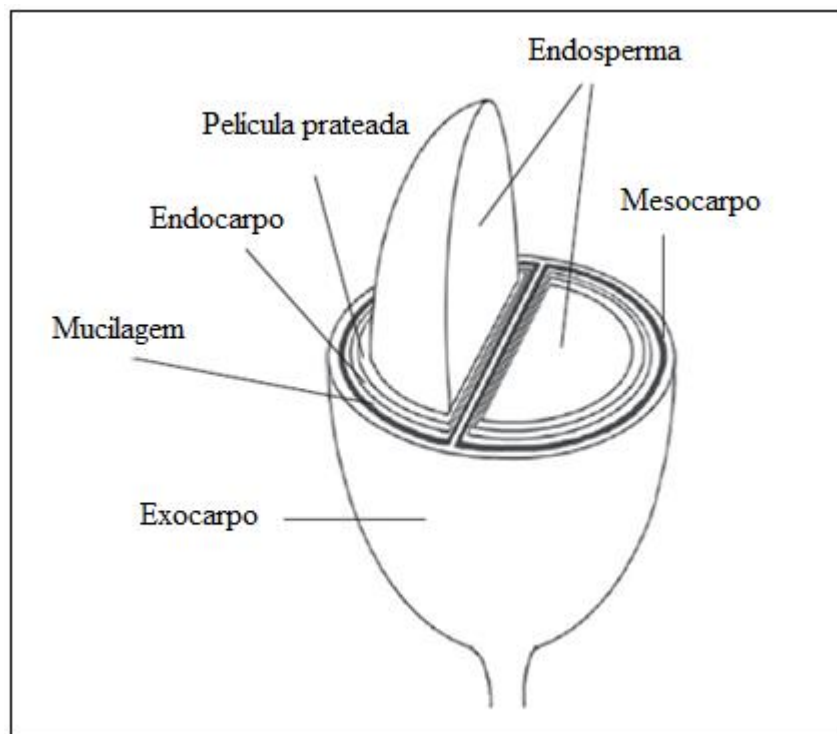
A avaliação da qualidade do café é realizada a partir de análises sensoriais que determinam sabores e aromas formados a partir de componentes químicos presentes no grão formados durante o processo de torra (BOREM et al., 2008). Uma metodologia que pode ser utilizada é o Temporal Dominance of Sensations (TDS) cuja sensorial é baseada em respostas aos estímulos gerados por impulsos nervosos ao cérebro, que são interpretados através das sensações (DI MONACO et al., 2014).

2.2 Composição química do fruto do café

Compreender os fenômenos fisiológicos, químicos, físicos e bioquímicos que ocorrem durante a pós-colheita do café é importante para a produção de cafés especiais. Para isto é importante conhecer a anatomia e composição do fruto e da semente. Durante o desenvolvimento do fruto acontecem várias mudanças que determinam as características da semente quando madura. As principais reservas depositadas que contribuem para a qualidade do café são carboidratos, lipídeos, proteínas e minerais (BOREM, 2008).

O fruto do café é uma drupa com pericarpo dividido em uma camada externa denominada exocarpo (casca), seguido do mesocarpo (mucilagem) e endocarpo (pergaminho) (Figura 1). Quando o fruto está maduro, o exocarpo é vermelho ou amarelo (SCHWAN; FLEET, 2014). A semente do café é formada pelo espermoderma, endosperma e embrião. O espermoderma é o envoltório mais externo da semente. Já o endosperma é o principal tecido de reserva (BOREM, 2008).

Figura 1 - Camadas do fruto do café.



Fonte: adaptado de NARITA; INOUE (2014).

O mesocarpo é rico em carboidratos, proteínas e minerais. Possuem quantidades significativas de taninos, pectina, açúcares redutores e não redutores, ácido clorogênico e cafeína (MURTHY; NAIDU, 2012). Além disso, apresentam em sua composição água, açúcares, substâncias pécnicas, lipídeos e proteínas. Dentre esses componentes um dos mais importantes são as substâncias pécnicas (ARUNGA, 1982). As substâncias pécnicas degradam-se a partir de pectinases como as protopectinases e as poligalacturonases que são produzidas por muitas bactérias, leveduras e fungos. A partir da degradação das substâncias pécnicas é produzido ácido galacturônico, ramnose, galactose, arabinose, xilose e outros compostos como acetato e metanol (PUERTA, 2013).

A quantidade de água e o conteúdo do mesocarpo diminuem com o aumento da altitude da região onde é cultivado. Regiões mais altas produzem cafés com maior quantidade de mucilagem seca (BOREM, 2008). A composição química pode variar de acordo com a localização geográfica e a cultivar. Uma pesquisa realizada por Tolessa et al., (2017) relatou a influência da altitude na composição do café na Etiópia (8 ° 67' N e 37 ° 07' L). Foram selecionadas duas faixas de altitudes: alta (1950-2100 m) e média (1600-1680 m). O maior teor de cafeína (17,9 g kg⁻¹) e ácido clorogênico (46,5 g kg⁻¹) foram obtidos em altitude média enquanto os menores teores foram encontrados em alta altitude (14,5 g kg⁻¹ e 40,5 g kg⁻¹, respectivamente).

Regiões da Costa Rica (entre 1020 e 1250 m acima do nível do mar) e Santa María de Dota (entre 1550 e 1780 m acima do nível do mar) também foram caracterizadas em relação à composição química dos grãos. Cafeína, trigonelina, sacarose e ácidos clorogênicos apresentaram diferenças significativas para essas regiões. Em relação ao seu peso seco, os grãos de Santa María de Dota apresentaram teores de cafeína (1,37%), trigonelina (0,92%) e ácido clorogênico (8,24%) superiores aos da Costa Rica (1,24%, 0,72%, 7,75%, respectivamente). Entretanto, sacarose obteve menor teor nos cafés de Santa María de Dota (8,06%) em relação à Costa Rica (8,20%) (AVELINO, 2005).

Outra pesquisa realizada por Ribeiro et al. (2016) obtiveram valores mais altos de trigonelina, independentemente do tipo de processamento, em cafés cultivados acima de 1200 m e com notas sensoriais de 90 pontos. Em cafés naturais com notas sensoriais inferiores a 85 pontos e cultivados abaixo de 1200 m foram encontrados os menores valores de trigonelina.

No endosperma, os compostos químicos presentes podem ser classificados em insolúveis e solúveis em água. A fração insolúvel é representada pelos polissacarídeos celulose, hemicelulose e lignina, além de lipídeos, proteínas e minerais. A solúvel é constituída pela cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos, ácidos carboxílicos, algumas proteínas e minerais (FELDMAN; RYDER; KUNG, 1969). Dentre os carboidratos de baixo peso molecular a sacarose é o mais importante presente no café cru (ROGERS et al., 1999). As proteínas e lipídeos compõem a segunda classe mais abundante (CLIFFORD, 1975).

Ácido clorogênico, cafeína e trigonelina são considerados bioativos, ou seja, são compostos que possuem efeito sobre um organismo vivo, tecido ou célula. Estes são caracterizados por possuir propriedades benéficas à saúde do ser humano (SVILAAS et al., 2004). Estes compostos são precursores de compostos voláteis que contribuem para o sabor e o aroma do grão torrado, portanto são importantes para a qualidade sensorial (FARAH et al., 2006).

Uma série de alterações na composição química dos grãos de café é provocada pelo processo de torra uma vez que os compostos são degradados ou modificados (ALVES et al., 2010). Durante esta etapa, ocorre a reação de Maillard, uma reação química entre um aminoácido ou proteína e um açúcar redutor (LÓPEZ-GALILEA, 2006). Este processo resulta no desenvolvimento característico do aroma, sabor e cor pela combinação de centenas de compostos químicos (CASTILLO et al., 2002). Por exemplo, proteínas e aminoácidos são fundamentais para conversão dos açúcares redutores em precursores de aromas durante a reação de Maillard. Os triacilgliceróis são os principais responsáveis pelos aromas no café. Ácido clorogênico e cafeína são responsáveis pelo amargor (FLAMENT, 2002).

2.3 Processamento do café

Assim como mencionado no tópico anterior, a composição química do fruto exerce influencia nas etapas do processamento devido as diferentes variações nas quantidades de compostos químicos presentes no grão.

Após a colheita, o café pode conter frutos verdes, maduros, secos, terra, folhas, ramos, galhos e pedras e a proporção desses constituintes dependerá do sistema e dos cuidados devidamente aplicados nesse processo. A abanação é utilizada com o objetivo de separar as impurezas mais leves, como as folhas e os gravetos, dos frutos. O café é lavado e assim ocorre uma separação por diferença de densidade, onde os frutos verdes e cerejas são mais densos e afundam enquanto os menos densos boiam, devido à má formação do fruto ou por ação de insetos, conhecidos como bóia (BORÉM, 2008).

Após essa etapa, ocorrerá o processamento do café que pode ser realizado por três métodos distintos: via seca ou natural, via semi-seca e via úmida (BRANDO; BRANDO, 2015). A forma com que o café é processado é um dos aspectos que influenciam na característica final da bebida, devido à variação de compostos como a sacarose, o ácido clorogênico e a trigonelina (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010). Além disso, os compostos voláteis também podem variar com o tipo de processamento (GONZALEZ-RIOS et al., 2007).

2.3.1 Via seca

O processamento seco ou natural é geralmente utilizado em países com chuvas escassas e longos períodos de estiagem e sol sendo o método mais antigo e mais utilizado no Brasil e na Etiópia. Este método mantém o fruto inteiro, onde os grãos de café são colhidos, separados e espalhados em terreiro, durante um período de 10 a 25 dias para secagem ao sol. Durante este processo, ocorre uma fermentação microbiana natural, onde há produção de enzimas que modificam a polpa e a mucilagem, influenciando na qualidade do café (SILVA et al., 2000).

Durante o seu processamento, são observadas algumas modificações que confere características distintas às outras vias. O exocarpo fica escuro durante a secagem, formando o conhecido café coco. A produção de café natural é mais utilizada em regiões tropicais onde ocorre uma estação seca mais característica durante o período de colheita (BORÉM, 2008).

2.3.2 Via semi-seca

O processamento intermediário entre o natural e o úmido é chamado de semi-seco. Nesse processo o café tem as suas estruturas removidas e assim deixa de ser natural. O exocarpo (casca) e o mesocarpo (mucilagem) são removidos, ou apenas a casca, e o processo de fermentação e de secagem ocorrem em terreiros, sem a utilização de tanques de fermentação (VILELA et al., 2010). O café produzido por esse método é conhecido no Brasil como “Cereja descascado” ou CD. O objetivo é ir além do processo seco e separar mecanicamente o café cereja do verde e assim melhorar a qualidade. Além disso, reduz o tempo de secagem e espaço utilizado no terreiro (BRANDO; BRANDO, 2015).

2.3.3 Via úmida

O processamento pela via úmida é comum na Colômbia, América Central e Hawaí (SILVA, 2015). A casca e a polpa são removidas mecanicamente e a mucilagem fica aderida ao grão. O café descascado é transferido para tanques com água onde ocorre a fermentação por 6 à 72h, o qual depende da temperatura ambiente. Durante esta etapa a mucilagem é degradada e solubilizada. Os grãos de café são removidos do tanque e levados para terreiros para secagem ao sol (EVANGELISTA et al., 2015).

Até os anos de 1980 este processamento manteve-se praticamente o mesmo. Apenas nos últimos anos tem sofrido mudanças uma vez que este método gera uma grande quantidade água residuária do café. Novas tecnologias têm sido estudadas para que se utilize menos água e conseqüentemente gere um menor dano ao ambiente (BRANDO; BRANDO, 2015).

2.4 Fermentação do fruto do café

Independente do seu processamento, a fermentação do café é um processo natural que ocorre nos grãos para retirada da mucilagem e conseqüentemente para a diminuição do teor de água presente no mesmo (SILVA et al., 2013). Este processo é caracterizado por ser uma fermentação semissólida, batelada simples, com ou sem agitação. Uma

alternativa é a utilização de fermentações conduzidas em biorreatores com indução de anaerobiose pela ação dos microrganismos naturalmente presente com o objetivo de produzir bebidas com aromas e sabores especiais, como doces, cítricos e frutados no qual agregam valor ao produto. Para isso é preciso realizar o controle da temperatura, da qualidade da água, dos fatores físico-químicos como pH e grau Brix, o tempo de processamento, dentre outros (LEE, 2015).

A etapa de fermentação ocorre naturalmente a partir da degradação da mucilagem presente ao redor dos grãos uma vez que este apresenta elevada quantidade de substâncias pécticas (AGATE; BHAT, 1966). No início das pesquisas, a literatura sugeriu que a degradação dessas substâncias pécticas ocorria a partir de enzimas pectolíticas produzidas pelo próprio fruto, mas hoje se conclui que essas enzimas não são suficientes e que a ação microbiana também se faz necessária (VAUGHN et al., 1958; FRANK et al., 1965). Essas substâncias são degradadas pelas pectinases, enzimas produzidas por bactérias e leveduras. Sua degradação produz ácido galacturônico, ramnose, galactose, arabinose e metanol.

Diferentes processos bioquímicos ocorrem durante a fermentação espontânea do café no qual as enzimas produzidas pelas bactérias e leveduras presentes no mesocarpo degradam os açúcares, proteínas e lipídeos e os convertem em álcoois, ácidos, ésteres e cetonas (Figura 2). As substâncias formadas alteram as características como o aroma, cor, pH e a composição do mesocarpo (PUERTA, 2013).

Figura 2 - Processos bioquímicos que ocorrem na fermentação do café.

Processos bioquímicos	Compostos do substrato	Produtos gerados
<ul style="list-style-type: none"> • Fermentação alcoólica • Fermentação láctica e heteroláctica • Degradação de lipídeos • Outras fermentações • Acetificação • Hidrólise enzimática 	<ul style="list-style-type: none"> • Água • Açúcares • Proteínas • Lipídeos • Ácidos • Substâncias pécticas • Minerais • Bactérias • Leveduras • Enzimas 	<ul style="list-style-type: none"> • Álcool, CO₂, energia • Ácido láctico e ácido acético • Ácidos graxos e ésteres • Ácido galacturônico • Voláteis, cetonas, aldeídos, ésteres e ácidos

Fonte: Adaptado de PUERTA; ECHEVERRY (2015).

Portanto, os microrganismos presente naturalmente no grão metabolizam esses açúcares existentes no mesocarpo produzindo ácidos orgânicos que afetam as características sensoriais da bebida final (SILVA, 2015). Durante este processo, a ação dos microrganismos varia de acordo com as espécies presentes, além das diferentes propriedades químicas e físicas do mesocarpo e fatores externos como temperatura e disponibilidade de oxigênio (SCHWAN; WHEALS, 2003).

Os frutos e grãos do café possuem uma grande diversidade microbiana que influenciam na qualidade da bebida, por isso é importante conhecer a microbiota predominante no café (VILELA et al., 2010).

2.5 Microbiota presente no fruto do café

A microbiota presente nos frutos do café inclui bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SILVA et al., 2000). As espécies de microrganismos bem como sua população e permanência durante o processo de fermentação está diretamente correlacionada ao seu processamento (SILVA et al., 2000; VILELA et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2015). Como dito anteriormente, os processamentos podem ser realizados através da via seca ou natural, via semi-seca e via úmida (BRANDO; BRANDO, 2015).

No processamento natural, Silva et al. (2000), avaliaram a diversidade da população dos microrganismos presente no café (*Coffea arabica*) em 15 diferentes fazendas da região do Sul de Minas. O estudo foi realizado com a variedade Mundo Novo durante um período de dois anos. A população de bactérias foi maior, seguido pelos fungos filamentosos e posteriormente leveduras. A microbiota foi composta por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e os gêneros mais comuns foram *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Bacillus* e *Cellulomonas*. Dentre os fungos, obteve destaque *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*. Já as leveduras apresentaram um aumento durante a fermentação e os gêneros mais comuns foram *Pichia*, *Candida*, *Arxula* e *Saccharomycopsis*.

Vilela, et al. (2010) avaliaram os microrganismos presentes no café (*Coffea arabica*) semi-seco da variedade Bourbon no sul de Minas Gerais. As bactérias predominantes foram *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae*. Já as leveduras dominantes foram *Picchia anomala*, *Torulaspota delbrueckii* e *Rhodotorula mucilaginosa*. O gênero mais encontrado entre os fungos foi *Aspergillus*.

Outro estudo sobre a avaliação microbiana processada por via úmida, no qual o café despulpado foi fermentado em tanques de concreto com água foi realizado por Evangelista et al. (2015). Os autores avaliaram a microbiota do café, em duas regiões distintas de Minas Gerais usando a variedade Acaia. As leveduras dominantes foram *Meyerozyma caribbica*, *Hanseniaspora uvarum* e *Torulaspota delbrueckii*. As bactérias encontradas foram *Staphylococcus warneri*, *Erwinia persicina*, *Enterobacter asburiae* e *Leuconostoc mesenteroides*.

Em geral, cafés naturais possuem maior população microbiana quando comparado aos cafés despolpados devido ao maior tempo de fermentação (SILVA, 2015). No início das fermentações em cafés naturais, a microbiota predominante é composta pelas bactérias devido à alta atividade de água (~ 9) e pH (~ 6.5) (SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2008). À medida que estes têm o seu valor reduzido o crescimento das leveduras é estimulado. Em cafés despolpados há o predomínio de leveduras sobre as bactérias (VELMOUROUGANE, 2012).

Além disso, os fatores ambientais de onde os cafés estão sendo cultivados, como por exemplo, a temperatura, umidade, pressão e a população presente naturalmente naquele solo também são importantes uma vez que influenciam na qualidade da bebida (VILELA et al., 2010).

2.6 A influência dos fatores ambientais

As áreas referentes à cafeicultura situam-se entre as latitudes 22' N e 26' S. Há seis fatores básicos para selecionar um local apropriado para a cafeicultura: topografia, temperatura, intensidade da luz do sol, disponibilidade de água, vento e tipo de solo (DESCROIX et al., 2009).

O clima adequado para cultivar a planta do café depende da latitude e da altura acima do nível do mar (WINTGENS, 2009). A região da Serra do Caparaó, no Espírito Santo, possui um clima tropical de altitude, com verão chuvoso e inverno seco, portanto, possui um grande potencial para produção de cafés especiais uma vez que há muitos cafeicultores que foram campeões em concursos de café. Nos últimos cinco anos produtores dessa região receberam o prêmio “Coffee of the Year” quatro vezes, em: 2014, 2015, 2016 e 2018. Em 2018 o vencedor foi o café arábica Forquilha do Rio, produzido na região do Caparaó (ABIC, 2018). A elevação da altitude está relacionada com a qualidade da bebida devido à redução da temperatura. A cada 100 m há uma diminuição de 0.6 °C na temperatura. Altas temperaturas e sensibilidade ao frio variam de acordo com as espécies. Em relação ao *Coffea arabica*, a temperatura média ideal é 18 °C durante a noite e 22 °C durante o dia. Os extremos tolerados são 15 °C e 25-30 °C. A precipitação anual ideal é entre 1400 e 2000 mm e a umidade relativa próxima a 60% (DESCROIX et al., 2009).

Baixas temperaturas retardam o amadurecimento dos frutos favorecendo a ocorrência de maiores alterações químicas nos grãos e maior acúmulo de açúcares, aminoácidos e ácidos, o que contribui para uma bebida melhor (VAAST et al., 2006). Ambientes quentes e úmidos propiciam uma maturação acelerada e conseqüentemente gera um efeito negativo na estrutura dos frutos e no sabor. Grãos produzidos em altitudes mais elevadas são mais densos e duros e por isso são mais apreciados. Cafés cultivados em altitudes mais elevadas desenvolvem maior acidez, sabor e aroma. Guatemala, El Salvador, Costa Rica, México e Honduras são países produtores de cafés lavados e estes são classificados de acordo com a altitude (WINTGENS, 2009).

Além da temperatura, outros fatores climáticos estão relacionados diretamente com a altitude. Quanto maior a altitude menor a pressão atmosférica total e menor a pressão parcial dos gases atmosféricos, como O₂ e CO₂. Essa redução implica em um impacto significativo nas plantas, nos microrganismos e na respiração dos animais (KÖRNER, 2007). Como já mencionado, os microrganismos presentes no grão influenciam na qualidade da bebida, portanto é importante estudar a relação do seu crescimento com o ambiente em que se encontram (VILELA et al., 2010).

Neste contexto, o crescimento microbiano bem como a sua atividade metabólica também é diretamente afetado pela altitude bem como pelos fatores abióticos tais como

temperatura, oxigênio, acidez e alcalinidade do ambiente. Além disso, em uma comunidade microbiana, a diversidade e abundância dos microrganismos são controladas pelos nutrientes e disponibilidade de água existente naquele determinado ambiente (MADIGAN et al., 2019).

Os microrganismos são capazes de crescer em determinadas faixas de temperaturas sendo classificados em psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos. Este é o fator mais importante que afeta o seu crescimento e sobrevivência (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2003).

Além disso, as diferentes espécies de microrganismos requerem uma temperatura máxima, mínima e ótima de crescimento que pode variar amplamente (FARREL; ROSE, 1967). *Leuconostoc* sp. são mesófilos com temperatura ótima entre 18 °C e 25 °C, mas algumas espécies são capazes de crescer em temperaturas menores que 10 °C. *Streptococcus thermophilus* possui temperatura ótima entre 40 °C e 42 °C, mas possuem uma tolerância térmica acima de 60 °C. A maioria dos *Lactobacillus* sp. são mesófilos, mas há espécies psicrófilas e termófilas. As bactérias do ácido acético (BAA) são mesófilas com temperatura de crescimento ótima entre 25 °C e 30 °C (HUTKINS, 2008).

Em relação ao oxigênio, os microrganismos variam em relação à sua necessidade ou tolerância. Muitos devem, e outros são capazes, de viver na ausência de O₂ (DAWES; SUTHERLAND, 1976). Microrganismos aeróbios são aqueles que requerem oxigênio para seus processos metabólicos geradores de energia e os anaeróbios são aqueles que não podem utilizar oxigênio para essa finalidade. Aqueles que são capazes de usar processos respiratórios ou de fermentação, dependendo da disponibilidade de oxigênio no meio, são chamados de facultativos (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2003).

As BAL crescem em condições anaeróbicas, mas também podem crescer na presença de oxigênio, portanto estes são classificados como anaeróbios aerotolerantes (KHALID, 2011). Outro exemplo são as leveduras. Estas, na presença de altas concentrações de oxigênio crescem eficientemente em diferentes açúcares originando novas células durante o processo. Porém, em condições anóxicas, as leveduras passam a realizar um metabolismo fermentativo. Este processo resulta em uma quantidade significativa de álcool e CO₂ e uma baixa produção de células. A fermentação da glicose é inibida pelo O₂ porque a respiração gera muito mais energia por molécula de glicose

do que a fermentação (WALKER, 1998). Muitas leveduras são facultativas e possuem a capacidade de fermentar, porém algumas leveduras, como a *Rhodotorula* sp. são estritamente aeróbias e não são fermentativas (GOLDMAN; LORRENCE, 2015).

A alcalinidade, neutralidade ou acidez de uma solução é expressa em potencial hidrogeniônico (pH). Os valores variam entre 0 e 14, no qual a neutralidade corresponde ao pH 7. A maioria dos ambientes naturais possuem valores de pH entre 4 e 9. O crescimento de cada microrganismo é possível em determinadas faixas e este geralmente possui um pH ótimo. Os microrganismos são classificados em acidófilos, neutrófilos ou alcalifílicos. Outro fator importante é a disponibilidade de água que não depende apenas de quão seco ou úmido ele pode ser, mas sim em função da concentração de solutos como açúcares, sais e substâncias dissolvidas na própria água (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2003). Os gêneros das bactérias do ácido lático (BAL) são capazes de crescer em elevadas concentrações de sal e possuem tolerância ácida ou alcalina (KHALID, 2011).

Estudos têm sido realizados relacionando a altitude com a qualidade da bebida. Avelino et al., (2005) avaliaram a qualidade de cafés de dois *terroirs* com altitudes diferentes da Costa Rica, Orosi (1020 a 1250 m) e Santa María de Dota (1150 a 1780 m). A qualidade do café nessas regiões mostrou-se dependente do *terroir*, altitude e exposição ao declive. Os cafés de Santa María de Dota obtiveram notas de chocolate, o que foi mais evidente em maiores altitudes.

Outro estudo avaliou os atributos sensoriais sob o efeito da altitude, cor dos frutos e declividade na região de Matas de Minas. Foram observadas as cores da variedade Catuaí (amarelo e vermelho), duas faces de exposição ao sol (Noroeste e Sudeste) e quatro diferentes altitudes (<700 m; $700 \leq x \leq 825$ m, $825 < x < 950$ m e ≥ 950 m). O Catuaí Amarelo produziu cafés com melhor qualidade sensorial em maiores altitudes. Os cafés da face Noroeste produziram cafés melhores também em altitudes mais altas. A altitude foi o fator que mais interferiu na qualidade dos cafés da região de Matas de Minas (Silveira et al., 2016).

Rodrigues et al., (2009) analisou a composição isotópica do grão de café verde para obter a discriminação de origem geográfica entre 68 amostras de 20 diferentes origens geográficas distribuídas na América Central, Pacífico, América do Sul, África, Ásia e Oceania. As diferenças observadas na composição isotópica das amostras de café verde

foram principalmente explicadas pelos valores de altitudes e precipitação relacionados às diferentes localizações geográficas.

Estudos realizados na Costa Rica com a variedade caturra mostraram que a altitude teve efeito significativo na composição bioquímica dos grãos. A concentração de ácido clorogênico e ácidos graxos aumentaram com o aumento da altitude (BERTRAND et al., 2006). Posteriormente, estudo realizado na Ilha Reunion identificou que durante o desenvolvimento da semente, a temperatura média do ar influenciou diretamente no perfil sensorial da bebida. Atributos como acidez, frutado e qualidade do sabor foram correlacionados aos cafés produzidos em microclimas mais frios. Os cafés cultivados em temperaturas mais elevadas tiveram baixa qualidade aromática, menor acidez e caráter terroso e verde (BERTRAND et al., 2012).

Joët et al., (2010) quantificaram as principais mudanças nos componentes químicos da semente de café, sendo eles lipídeos, ácido clorogênico, açúcares e cafeína, causados no processamento úmido em amplas variações climáticas. Lipídeos, açúcares e ácido clorogênico não foram influenciados pelo clima, porém a glicose foi positivamente afetada pela altitude. A concentração deste monossacarídeo é importante para ação dos microrganismos durante a fermentação do café.

2.6.1 Conceito de *terroir*

A palavra *terroir* surgiu em 1229 com origem no latim popular “territorium” sendo uma modificação linguística de formas mais antigas (ROBERT, 1985). O conceito de *terroir* designa que cada região pode ser representada como um território onde diferentes graus de variabilidade influenciam tanto a planta quanto as características finais do produto (GOULET; MORLAT, 2011). Como mencionado no tópico anterior, essas variações geográficas e abióticas podem afetar no perfil sensorial do café, portanto o café é um produto de *terroir* (ALVES et al., 2011). (GOULET; MORLAT, 2011).

O termo *terroir* é tradicionalmente associado ao vinho, porém se tornou importante na comercialização de cafés de origem única para os consumidores. Varejistas e torradores de café alegam que cafés com origem única, ou seja, cultivados em microclimas únicos e em boas condições de solo, produzem perfis de sabor distintos que os diferenciam dos convencionais (WILSON et al., 2012).

A diferenciação de cafés com base na definição de *terroir* possibilita determinar áreas potenciais para a produção de cafés especiais. Além disso, permite descrever características específicas do café de determinadas regiões (SILVA, 2014). A definição e caracterização dos *terroirs* é uma alternativa para aprimorar o acesso dos mercados externos aos diferentes tipos de cafés produzidos em uma dada região, contribuindo para uma maior valorização dos produtos brasileiros, assim como ocorre com os vinhos (GOULET; MORLAT, 2011).

Um estudo realizado por Wilson et al (2012) utilizou a análise de regressão hedônica para avaliar os prêmios de preço para os agricultores, gerados pelos atributos de origem dos cafés certificados no Cup of Excellence da América Central. Embora o maior impacto dos prêmios seja a classificação concedida pelos provadores, os fatores geográficos como a altitude da fazenda, país de origem e a sub-região de origem teve efeitos significativos nos prêmios.

Outro estudo caracterizou e delimitou *terroirs* de produção de café no município de Araponga, MG em quatro lavouras com variação de altitudes de 770 m a 1270 m. Neste trabalho, foi possível identificar *terroirs* para cafeicultura de montanha o que permitiu distinguir os cafés em relação aos locais de produção. Neste município foi observado mais de um *terroir* caracterizado por dois locais que se diferem pela altitude (SILVA, 2014^b).

O conceito de *terroir* tem sido pouco explorado em relação à cultura do café e com isso, muitos fatores ainda não foram bem definidos em relação à qualidade química e sensorial da bebida. Além disso, como abordado nos tópicos anteriores, os microrganismos também possuem forte influência na sua qualidade e podem ter um papel importante quando correlacionados com o termo *terroir*.

2.8 Análises de compostos químicos

Os alimentos possuem uma matriz química no qual cada alimento pode ser considerado uma mistura complexa que contém inúmeros metabólitos amplamente variáveis em relação à sua concentração e propriedades químicas. Abordagens modernas em relação à análise de alimentos são necessárias para compreender esses

diferentes aspectos químicos que estão relacionados à composição original de cada alimento (CIFUENTES, 2012).

As técnicas mais utilizadas na análise da composição química são a cromatografia líquida de alta intensidade, cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (JESZKA-SKOWRON; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; GRZEŚKOWIAK, 2015). Separações baseadas em cromatografia líquida são uma das mais utilizadas, porém a cromatografia gasosa também exerce um papel importante na análise de alimentos porque a partir dela é possível analisar as frações voláteis e/ou os ácidos graxos presentes nos alimentos (GOLAY, et al., 2009). Em relação aos métodos cromatográficos é importante considerar que essas técnicas requerem laboratórios e equipamentos com pessoas altamente treinadas, portanto o seu custo é elevado (NOLVACHAI; MARRIOTT, 2017).

Já as técnicas espectroscópicas são embasadas no princípio de que os átomos e moléculas podem interagir com a radiação eletromagnética. A partir delas, é possível obter informações quantitativas, qualitativas ou físico-químicas dos compostos analisados. A informação obtida é fornecida através do comprimento de onda ou frequência detectada no espectro de energia absorvido ou emitido. Estas técnicas são utilizadas na análise de alimentos porque são rápidas, medem diretamente os seus constituintes, não usam reagentes ou solventes tóxicos e não são destrutivas (DUFOUR, 2011). Neste contexto, a espectroscopia Raman é uma técnica alternativa que pode ser utilizada na análise dos compostos químicos presentes no grão de café. Esta técnica e suas vantagens serão explicitadas no próximo tópico.

2.8.1 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica alternativa que proporciona informações químicas de determinado material. Esta, acoplada a métodos quimiométricos, permite comparar diferentes tratamentos (LUNA; DE GOIS, 2018). O Raman é uma área da espectroscopia vibracional no qual a amostra é exposta a um feixe de radiação eletromagnética, como um *laser*. O espectro de modos vibratórios ativos na espectroscopia Raman nas moléculas da amostra é obtido a partir da análise dos fótons espalhados inelasticamente (LI-CHAN, 1996; BAETEN; DARDANNE, 2002). Esta

análise possui uma diversidade de aplicações e alto conteúdo de informações relativo à estrutura molecular, por isso criou-se o interesse em diversas áreas como, por exemplo, ciências dos alimentos e biológicas. Através desta técnica é possível analisar proteínas, lipídeos, carboidratos, pigmentos, microrganismos, materiais de embalagens, dentre outros (LI-CHAN, 1996).

Há diferentes métodos para fornecer informações estruturais de amostras biológicas e a espectroscopia Raman é uma delas. Esta é importante para determinar informações estruturais de amostras sólidas e de soluções aquosas. Os espectros Raman fornecem um alto conteúdo de informações de estruturas moleculares de vários compostos a partir de bandas de transições vibracionais fundamentais. Esta técnica é utilizada na análise de alimentos e suas vantagens são: geralmente não exigir pré-tratamento de amostras; ser um método não destrutivo; baixo custo e por necessitar de pequenas quantidades de amostras (HERRERO, 2008; BOYACI et al., 2015). Com isto, permite análises qualitativas, quantitativas e estruturais (HERRERO, 2008).

Um estudo recente na literatura caracterizou o pergaminho do café por espectroscopia Raman (IRIONDO-DEHOND et al., 2019). As bandas encontradas foram atribuídas aos álcoois acrílicos, álcoois alifáticos, ésteres ou éteres de estiramento de CO, lignina e celulose. Outro estudo utilizou a espectroscopia Raman combinada com a análise de componentes principais (PCA) para discriminação entre as duas espécies de café, Arábica e Robusta, com base no conteúdo de lipídeos e ácido clorogênico. Os espectros mostraram diferentes composições de ácido clorogênico e lipídeos quando comparados o café verde Robusta e Arábica. Foi observada uma separação com 93% em relação à variação total do espectro (EL-ABASSY; DONFACK, MATERNY, 2011).

Keidel et al., (2010) classificou os grãos de café verde com base no seu conteúdo específico de kahweol a partir da espectroscopia Raman com transformada de Fourier. Foram utilizadas duas espécies, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* L., de diferentes origens, Ásia, África e América do Sul. A quantidade de kahweol pode ser determinada quantitativamente por meio da análise de componentes dos espectros, produzindo um índice de kahweol espectral, sendo proporcional ao conteúdo no grão. A distinção é possível, uma vez que os valores são maiores e menores que 10 para os cafés Arábica e Robusta, respectivamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição química e a qualidade dos grãos de café são influenciadas por diversos fatores climáticos e estes estão relacionados com a altitude, como temperatura, pressão, oxigênio, gás carbônico, precipitação de chuva e exposição ao sol. Esses fatores também influenciam na microbiota presente naturalmente no fruto do café. O conhecimento sobre o impacto que os microrganismos podem causar na qualidade da bebida é de extrema importância. Por meio da técnica MALDI-TOF e do sequenciamento molecular é possível agrupar e identificar microrganismos presente durante as etapas de processamento dos grãos de café. A espectroscopia Raman é uma técnica que permite analisar e comparar a composição química dos grãos cultivados em diferentes altitudes. Por fim, a análise sensorial Temporal Dominance Sensations (TDS) permite identificar os atributos mais significativos presente em cada tratamento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes altitudes na microbiota epifítica do café, composição química e qualidade da bebida cultivada na Serra do Caparaó (28 '5 "S, 45 ° 0'12 "W), Espírito Santo, Brasil.

REFERÊNCIAS

- AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. **Applied microbiology**, v. 14, n. 2, p. 256-260, 1966.
- ALVES, R. C., ALMEIDA, I. M., CASAL, S., OLIVEIRA, M. B. P.. Isoflavones in coffee: Influence of species, roast degree, and brewing method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3002–3007, 2010.
- ALVES, H. M. R., VOLPATO, M. M. L., VIEIRA, T. G. C., BORÉM, F. M., BARBOSA, J. N. Características ambientais e qualidade das bebidas dos cafés do estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p. 18-29, mar/abr. 2011.
- ARUNGA, R. O. Coffee. In: ROSE, A. H. (Ed.). **Economic microbiology: fermented foods**. Amsterdam: Elsevier, 1982. p. 259-279.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Exportação mundial do café**. São Paulo, 2015. Disponível em: <

<http://abic.com.br/estatisticas/exportacoes/exportacao-mundial/>>. Acesso em: 12 mar. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Café capixaba é eleito melhor do Brasil durante evento em Minas Gerais**. São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://abic.com.br/cafe-capixaba-e-eleito-melhor-do-brasil-durante-evento-em-minas-gerais/>>. Acesso em: 05 jun. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Tendências do mercado de cafés em 2017**. São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://abic.com.br/src/uploads/2018/05/2017.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2019.

AVELINO, J., BARBOZA, B., ARAYA, J. C., FONSECA, C., DAVRIEUX, F., GUYOT, B., CILAS, C. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa Maria de Dota. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85:1869-1876, 2005.

MADIGAN, M. T., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H., SATTLEY, W. M., STAHL, D. A. **Brock Biology of Microorganisms**. Global Edition. Ed: Pearson, 2019.

BERTRAND, B., GUYOT, B., ANTHONY, F., LASHERMES, P. Impact of the Coffea canephora gene introgression on beverage quality of C. arabica. **Theoretical and applied Genetics**, 107(3), 387–394, 2003.

BERTRAND, B., VAAST, P., ALPIZAR, E., ETIENNE, H., DAVRIEUX, F., CHARMETANT, P. (2006). Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of Arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America. **Tree Physiology**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1239-1248, Sept. 2006.

BERTRAND, B., BOULANGER, R., DUSSERT, S., RIBEYRE, F., BERTHIOT, L., DESCROIX, F., JOËT, T. (2012). Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food chemistry**, London, v. 135, n. 4, p. 2575-2583, July 2012.

BOYACI, I. H., TEMİZ, H. T., GENİŞ, H. E., SOYKUT, E. A., YAZGAN, N. N., GÜVEN, B., ŞEKER, F. C. D.. Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis. **Rsc Advances**, v. 5, n. 70, p. 56606-56624, 2015.

BOREM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: Ed. UFLA, 2008.

BRANDO, C. H. J.; BRANDO, M. F. P. Methods of coffee fermentation and drying. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Ed.). **Cocoa and Coffee Fermentations**. Florida, EUA: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2015, p. 341-365.

BRAZIL SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION - BSCA. O que são cafés especiais. Disponível em: < <http://bsca.com.br/cafes-especiais.php>>. Acesso em: 12 mar. 2019.

CASTILLO, DEL. M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effects of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 698–703, 2002.

CIFUENTES, A. Food analysis: present, future, and foodomics. **ISRN Analytical Chemistry**, London, v. 2012, p. 1-16, Oct. 2012.

DAWES, I. W., SUTHERLAND, I. W. *Microbial physiology*. **Blackwell Scientific**, 1976.

FLAMENT, Ivon; BESSIÈRE-THOMAS, Yvonne. **Coffee flavor chemistry**. John Wiley & Sons, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: primeiro levantamento da safra de 2017. Disponível em: <file:///C:/Users/Pamela/Downloads/BoletimZCafeZjaneiroZ2019_1%20(1).pdf>. Acesso em: 12 mar. 2019.

CLIFFORD, M. N. The composition of green and roasted coffee beans. **Process Biochemistry (UK)**, 1975.

DECAZY, F., AVELINO, J., GUYOT, B., PERRIOT, J. J., PINEDA, C., CILAS, C.. Quality of different honduran coffees in relation to several environments. **Journal of Food Science**, 68:2356-2361, 2003.

DESCROIX, F.; SNOECK, J. Environmental factors suitable for coffee cultivation. **Coffee: growing, processing, sustainable production**. A guidebook for growers, processors, traders and researchers, p. 168-181, 2009.

DI MONACO, R., SU, C., MASI, P., CAVELLA, S.. Temporal Dominance of Sensations: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, p. 104-112, 2014.

DUARTE, G. S.; PEREIRA, A. A.; FARAH, A.. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 851-855, 2010.

DUFOUR, Eric. Recent advances in the analysis of dairy product quality using methods based on the interactions of light with matter. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 2, p. 153-165, 2011.

EL-ABASSY, R. M.; DONFACK, P.; MATERNY, A.. Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1443-1448, 2011.

EVANGELISTA, S. R., MIGUEL, M. G. D. C. P., SILVA, C. F., PINHEIRO, A. C. M., SCHWAN, R. F.. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. **International journal of food microbiology**, v. 210, p. 102-112, 2015.

FAGAN, E. B., DE SOUZA, C. H. E., PEREIRA, N. M. B., MACHADO, V. J.. Efeito do tempo de formação do grão de café (*Coffea* sp) na qualidade da bebida. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 5, p. 729-738, 2011.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-36, jan./mar. 2006.

FARRELL, Judith; ROSE, Anthony. Temperature effects on microorganisms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 101-120, 1967.

FELDMAN, R. S.; RYDER, W. S.; KUNG, J. T. Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 733-739, 1969.

FRANK, H. A.; LUM, N. A.; CRUZ, Amy S. D. Bacteria responsible for mucilage-layer decomposition in Kona coffee cherries. **Applied microbiology**, v. 13, n. 2, p. 201-207, 1965.

GOLDMAN, E.; Green, L. H. Practical handbook of microbiology. **CRC press**, 2015.

GOLAY, P. A., GIUFFRIDA, F., DIONISI, F., DESTAILLATS, F.. STREAMLINED methods for the resolution and quantification of fatty acids including trans fatty acid isomers in food products by gas chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 5, p. 1301-1309, 2009.

GONZALEZ-RIOS, O., SUAREZ-QUIROZ, M. L., BOULANGER, R., BAREL, M., GUYOT, B., GUIRAUD, J. P., SCHORR-GALINDO, S. Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20(3-4), 289-296, 2007.

GOULET, E.; MORLAT, R. The use of surveys among wine growers in vineyards of the middleLoire Valley (France), in relation to terroir studies. **Land Use Policy**, v. 28, n. 4, p. 770-782, 2011.

HERRERO, Ana M. Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1642-1651, 2008.

HUTKINS, R. W. Microbiology and technology of fermented foods (Vol. 22). **John Wiley & Sons**, 2008.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO. (2019). Coffee market report. < <http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-0219-e.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2019.

IRIONDO-DEHOND, A., GARCÍA, N. A., FERNANDEZ-GOMEZ, B., GUISANTES-BATAN, E., ESCOBAR, F. V., BLANCH, G. P., DEL CASTILLO, M. D. Validation

of coffee by-products as novel food ingredients. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 51, p. 194-204, 2019.

JESZKA-SKOWRON, M.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 1, p. 19-31, 2015.

JOËT, T., LAFFARGUE, A., DESCROIX, F., DOULBEAU, S., BERTRAND, B., DUSSERT, S. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. **Food chemistry**, v. 118, n. 3, p. 693-701, 2010.

KEIDEL, A., VON STETTEN, D., RODRIGUES, C., MAGUAS, C., HILDEBRANDT, P. Discrimination of green Arabica and Robusta coffee beans by Raman spectroscopy. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11187-11192, 2010.

KHALID K. An overview of lactic acid bacteria. **International journal of Biosciences**.1(3):1-3, 2011.

KÖRNER, Christian. The use of 'altitude' in ecological research. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 11, p. 569-574, 2007.

LEE, L. W., CHEONG, M. W., CURRAN, P., YU, B., LIU, S. Q. Coffee fermentation and flavor—An intricate and delicate relationship. **Food chemistry**, v. 185, p. 182-191, 2015.

LI-CHAN, E. C. Y. The applications of Raman spectroscopy in food science. **Trends in Food Science and Technology**, Kidlington, v. 7, n. 11, p. 361-370, Nov. 1996.

LINGLE, T. R. The coffee cupper's handbook: systematic guide to the sensory evaluation of coffee's flavor. 4. ed. Long Beach: **Specialty Coffee Association of America**, 2011. 66 p.

LÓPEZ-GALILEA, I., FOURNIER, N., CID, C., GUICHARD, E. Changes in headspace volatile concentrations of coffee brews caused by the roasting process and the brewing procedure. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8560-8566, 2006.

LUNA, Aderval S.; DE GOIS, Jefferson S. Application of Chemometric Methods Coupled With Vibrational Spectroscopy for the Discrimination of Plant Cultivars and to Predict Physicochemical Properties Using R. In: **Comprehensive Analytical Chemistry**. Elsevier. p. 165-194, 2018.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. (Eds.). Microbial physiology. **John Wiley & Sons**, 2003.

- MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. **Resources, Conservation and recycling**, v. 66, p. 45-58, 2012.
- PUERTA, G. I.; ECHEVERRY, J. G. Fermentación controlada del café: Tecnología para agregar valor a la calidad. **Avances Técnicos/Cenicafé**, 2015.
- PUERTA, G. I. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. **Avances Técnicos/Cenicafé**, 402, 2013.
- RIBEIRO, D. E., BOREM, F. M., CIRILLO, M. A., PRADO, M. V. B., FERRAZ, V. P., ALVES, H. M. R., TAVEIRA, J. D. S. Interaction of genotype, environment and processing in the chemical composition expression and sensorial quality of Arabica coffee. **African Journal of Agricultural Research**, 2016.
- RODRIGUES, C. I., MAIA, R., MIRANDA, M., RIBEIRINHO, M., NOGUEIRA, J. M. F., MÁGUAS, C. Stable isotope analysis for green coffee bean: a possible method for geographic origin discrimination. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 5, p. 463-471, 2009.
- ROGERS, W. J., MICHAUX, S., BASTIN, M., BUCHELI, P. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, v. 149, n. 2, p. 115-123, 1999.
- SAKIYAMA, N. S.; FERRÃO, M. A. G. Botany and production of coffee. In: SCHWAN, R.F., FLEET, G.H. (Ed.). **Cocoa and coffee fermentations**. Boca Raton: CRC, 2014. p. 341-365.
- SCHWAN, ROSANE FREITAS; WHEALS, ALAN E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: **Yeasts in food**. 2003. p. 429-449.
- SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. **Cocoa and coffee fermentations**. Boca Raton: CRC, 2014.
- SILVA, C. F., VILELA, D. M., DE SOUZA CORDEIRO, C., DUARTE, W. F., DIAS, D. R., SCHWAN, R. F. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 235-247, 2013.
- SILVA, C. F. Microbial Activity during coffee fermentation. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Ed.). **Cocoa and Coffee Fermentations**. Florida, EUA: CRC Press, Taylor & Francis Group. p. 397-430, 2015.
- SILVA, C. F., SCHWAN, R. F., DIAS, E. S., WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 251-260, 2000.

SILVA, C. F., BATISTA, L. R., ABREU, L. M., DIAS, E. S., SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food microbiology**, v. 25, n. 8, p. 951-957, 2008.

SILVA, S. D. A., QUEIROZ, D. M. D., PINTO, F. D. A. D. C., SANTOS, N. T. Characterization and delimitation of the terroir coffee in plantations in the municipal district of Araponga, Minas Gerais, Brazil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 18-26, 2014.

SILVEIRA, A. D. S., PINHEIRO, A. C. T., FERREIRA, W. P. M., SILVA, L. J. D., RUFINO, J. L. D. S., SAKIYAMA, N. S. Sensory analysis of specialty coffee from different environmental conditions in the region of Matas de Minas, Minas Gerais, Brazil. **Revista Ceres**, v. 63, n. 4, p. 436-443, 2016.

SVILAAS, A., SAKHI, A. K., ANDERSEN, L. F., SVILAAS, T., STROM, E. C., JACOBS JR, D. R., BLOMHOFF, R. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 134, n. 3, p. 562-567, Mar. 2004.

TOLESSA, K., D'HEER, J., DUCHATEAU, L., BOECKX, P. Influence of growing altitude, shade and harvest period on quality and biochemical composition of Ethiopian specialty coffee. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97(9), 2849-2857, 2017.

VAUGHN, R. H., DECAMARGO, R., FALANGHE, H., MELLOAYRES, G., SERZEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. In: **Food Technology**. SUITE 300 221 N LASALLE ST, CHICAGO, IL 60601-1291: INST FOOD TECHNOLOGIST. p. 57-57, 1958.

VAAST, P., BERTRAND, B., PERRIOT, J. J., GUYOT, B., GENARD, M. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86:197-204, 2006.

VELMOUROUGANE, Kulandaivelu. Impact of natural fermentation on physicochemical, microbiological and cup quality characteristics of Arabica and Robusta coffee. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 83, n. 2, p. 233-239, 2013.

VILELA, D. M., PEREIRA, G. V. D. M., SILVA, C. F., BATISTA, L. R., SCHWAN, R. F. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, Londres, v.27, n. 8, p. 128-135, dez. 2010.

WALKER, G. M. Yeast physiology and biotechnology. **John Wiley & Sons**, 1998.

WILSON, B. R., CONLEY, J. F., HARRIS, T. M., LAFONE, F. New terrains of taste: Spatial analysis of price premiums for single origin coffees in Central America. **Applied Geography**, v. 35, n. 1-2, p. 499-507, 2012.

WINTGENS, J. N. Factors influencing the quality of green coffee. **Coffee: growing, processing, sustainable production. A guidebook for growers, processors, traders and researchers**, p. 797-817, 2009.

SEGUNDA PARTE

Artigo 1 Impact of altitude on the microbiota, chemical composition and sensorial quality of fermented coffees (*Coffea arabica* L.)

Elaborado de acordo com as normas do periódico: Food Research International

Abstract

The economic value of the coffee beverage has increased due to the number of consumers interested in specialty coffee. The fermentative process might be used to intensify or produce aromas and special flavors, as sweet, citric and fruity, which increases the value of the final product. Coffee quality is influenced by some factors such as microbial diversity and environmental factors. The objective of this work was to evaluate the influence of different altitudes on the epiphytic microbiota of the coffee beans and on sensorial and chemical quality of coffees grown at 800, 1000, 1200 and 1400 m in Serra do Caparaó, Espírito Santo, Brazil. Mature fruits were manually selected and transferred to bioreactors located at an altitude of 1200 m. Pulped and natural processes were performed in triplicate and fermented by 72 h. The grains were sun-dried on suspended terraces until reaching 11-12% moisture. For microbiological analysis the population counts of mesophilic bacteria, lactic bacteria and yeasts were performed from the surface plating. The isolates were grouped and identified from the Ionization and Laser Desorption techniques by Matrix - Flight Time (MALDI-TOF) and sequencing of the ribosomal region using specific primers for each microbial group. The chemical composition of the green grains was evaluated by Raman spectroscopy, and the sensory analysis of the roasted grains was performed using Temporal Dominance of Sensations (TDS). There was a significant difference in the population count of the microorganisms studied between the altitudes and between processing. The chemical composition and sensory perceptions of the beverage were also influenced by altitude and processing. The coffee cultivated at an altitude of 1400 m was the most appropriate in both processes. Altitudes of 800 and 1200 m were more efficient in pulped coffee and 1000 m in natural coffee. Altitude is a factor that influences the chemical composition of the grain, the natural microbiota present in the fruit and, consequently, the sensorial perception of the fermented coffees.

Keywords: Molecular analysis. Raman spectroscopy. Sensory analysis. Fermentation. Catuaí Vermelho. Chlorogenic acid.

1. Introduction

The coffee belongs to the family Rubiaceae, genus *Coffea* and the most important species are *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* L. (Sakiyama & Ferrão, 2015). *Coffea arabica* is the most consumed species in the world because it is considered superior in relation to the sensorial properties (Bertrand et al., 2003). The consumption of specialty coffees has been increasing significantly and as a consequence an economic increase of the final product is also observed (BSCA, 2019).

The coffee fermentation occurs naturally through the degradation of the mucilage present around the grains (Agate & Bhat, 1966). In this step, the epiphytic

microorganisms naturally present in the coffee, metabolize these sugars producing compounds, such as organic acids, that directly affect their characteristics (Silva, 2015). There is a diversity of microorganisms (bacteria, yeasts and filamentous fungi) presents during the coffee processing and may vary according to different factors: fruit composition, processing method used and regional characteristics such as temperature, oxygen and altitude (Silva et al., 2000; Vilela et al., 2010).

The most common bacteria genera present during coffee fermentation are *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* and *Weissella* and yeasts are *Pichia*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Kluyveromyces* and *Hanseniaspora* (Silva et al., 2008; Vilela et al., 2010).

Besides that, there are variations in the sensory profile of coffees produced in the same region (Avelino et al., 2005). These changes can be observed from the sensory analysis that allows to measure human responses to food. The qualitative aspects of a particular product include appearance, aroma, texture and flavor (Murray; Delahunty & Baxter, 2001). A technique that is used to evaluate the sensory profile is the Temporal Dominance of Sensations (TDS) (Evangelista et al., 2015; Ribeiro et al., 2017), whose sensorial perception is based on responses to the stimulus generated by nerve impulses to the brain, which are interpreted thought sensations (Di monaco et al., 2014).

Although it is known that cultivation at high altitudes of *Coffea arabica* positively affects the final quality of the beverage (Bertrand et al., 2006; Wilson et al., 2012), there is little quantitative data describing the influence of climatic conditions on the chemical composition of the grain, especially from easy-to-use spectroscopic techniques.

Raman spectroscopy supplies chemical information on a material, such as proteins, lipids, carbohydrates, pigments, microorganisms, among others (Li-chan, 1996). This technique, coupled with chemometric methods, allows comparing different coffee treatments (Luna & Gois, 2018; Luna et al., 2019), Robusta and Arabica discrimination (Keidel et al., 2010; (El-Abassy; Donfack & Materny, 2011), coffee storage (Abreu et al., 2019), among others (Iriundo-Dehond et al., 2019; Figueiredo et al., 2019). The major advantages are requires small portions of samples, is a non-destructive method, fast and does not require pre-treatment of samples (Herrero, 2008). To perform the identification of the environmental effects in the coffee fermentation

process, the main chemical compounds present in the beans, such as chlorogenic acid and fatty acids (Clifford, 1975), are promising in analysis by Raman spectroscopy.

Environmental effects on coffee quality are a complex phenomenon that needs to be more studied. Studies have been executed relating the altitude to the quality of the beverage (Avelino et al., 2005; Bertrand et al., 2012). However, there are no studies that relate the microbiota present in coffee grown at different altitudes, with the quality of the beverage. In the present study, our aim was to evaluate the influence of different altitudes on the microbiota and on sensorial and chemical quality of fermented coffee (*Coffea arabica* L.) in Serra do Caparaó, Espírito Santo, Brazil.

2. Material and methods

2.1 Harvest and coffee processing

Coffee (*C. arabica* L.), Catuaí vermelho variety cultivated at four different altitudes (800, 1000, 1200 and 1400 m) were collected mechanically on a farm located in Serra do Caparaó (22° 28' 5" S, 45° 0' 12" W), Espírito Santo, Brazil. Two processes were performed, in the first the coffee was mechanically pulped without immersion in water (pulped coffee) and in the second process the coffee was fermented with the peel (natural coffee). For both treatments 20 kg of mature fruits were manually selected and transferred to bioreactors located at an altitude of 1200 m due to the infrastructure of the farm. The fermentation was performed in triplicate. The coffee temperature was measured during the fermentation process and every 24 h, each content of the bioreactor was homogenized manually. The fermentation ended after 72 h for both process and this was determined by the temperature stabilization. After fermentation, the coffee beans were sun-dried on suspended terraces until reaching 11–12% moisture. Approximately 200 g of samples were removed at 0, 24, 48 and 72 h of fermentation and during drying at 204 and 408 h for pulped coffee and at 336 and 672 h for natural coffee. The samples were placed in sterile plastic bags, transferred to the Microbial Fermentation Laboratory of the Federal University of Lavras and stored at -20 °C.

2.2 Microbiological analysis

2.2.1 Population count

Coffee samples (10 g) were added to flasks and homogenized with 90 ml peptone water (1 g L⁻¹ bacteriological peptone, Himedia) in an Orbital Shaker (100 rpm - 20 min) and ten-fold dilutions were prepared (Ribeiro et al., 2018). Mesophilic bacteria and lactic acid bacteria were enumerated and isolated on Nutrient Agar [in g L⁻¹: 28 (Himedia)] and on MRS Agar [g g⁻¹: 68.2 (Himedia)], respectively. Both media for bacterial enumeration were supplemented with 0.4 mg/ml nystatin to inhibit of fungi filaments and yeasts. The plates were incubated at 28 and 37 °C for 48 h, respectively. Yeasts were enumerated and isolated on YEPG agar (in g L⁻¹: yeast extract 10 (Himedia), glucose 20 (Dinamica), peptone 20 (Himedia), agar 20 (Himedia) at pH 3.5 for inhibition of bacteria. Plates were incubated at 28 °C for 48h. Morphological characteristics were evaluated for each morphotype and the square root of the number of colonies that were counted was purified (Vilela et al., 2010). The phenotypic characterization was evaluated by microscope and the bacterial colonies were performed using Gram staining (Holt et al., 1994). Purified isolates were stored in the same broth culture media used for plating at -80 °C containing 20% glycerol (w/w).

2.2.2 Analysis of protein profile: MALDI-TOF MS

Microbial identification and statistical clustering of the isolates were evaluated by MALDI-TOF MS microflex LT spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Bacteria and yeast were isolated from coffee in the 24 h fermentation time, this was chosen based on the literature (Silva et al., 2008; Vilela et al., 2010). Four hundred ninety four isolates were grown for 18 h on plates using specific culture medium for each taxonomic group. For bacteria, a cell mass from the culture plate was added a tube containing 6 µL of an organic solution (ethanol/acetonitrile/trifluoroacetic acid (10%), 1:1:1). For yeast, a cell mass was added a tube containing 6 µL of 25% formic acid in water (v/v). Both samples were vortexed for 30 s and just yeasts were sonicated for 5 min. The supernatant (1 µL) was added onto the MALDI-TOF stainless steel plate. When the samples were almost dried, it was added and gently mixed, 1 µL of the matrix solution a-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) previously prepared to a final concentration of 10 mg CHCA/ml of organic solution. Samples were dried at room temperature and analyzed by MALDI-TOF MS. Each isolate was analyzed in triplicate

for measure the quality and reproducibility of the spectra. Calibration was performed with the strain *Escherichia coli* K12 as described by Lima-Neto et al., 2014. *E. coli* were grown for 18h in Luria-Bertani agar medium (LB) and incubated at 37 °C for 18 h. The mass spectra were processed with the MALDI Biotyper 3.0 software (Bruker Daltonics) (Lima-Neto et al., 2014).

2.2.3 DNA extraction from isolates

Isolates that were not possible to be identified using this technique (score <1.7) and representative strains from each cluster performed by MALDI-TOF were submitted for molecular analyses. DNA extraction from isolates were performed according to Cocolin; Bisson; Mills, 2000. The samples were PCR-amplified and analyzed in 1% agarose gel. DNA was quantified by using the Nanodrop Instrument. The final samples were stored at -20°C until further use (Evangelista et al., 2014^a).

2.2.4 Molecular identification

A total of 52 yeasts and 109 bacteria were subjected to internal transcribed spacer (ITS) region gene sequencing and 16S rRNA gene, respectively. The amplification of the ITS region was amplified using the primers ITS1 and ITS4 (Nielsen et al., 2007) and the 16S rRNA gene using the primer 27F and 1512R (Devereux & Willis, 1995). The PCR products were sent for sequencing to the Myleus Facility (MG, BRA). The sequences were compared to the GenBank database using the Basic Local Alignment Tool (BLAST) program (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) for the identification of isolates.

2.3 Raman spectroscopy

To analyze the chemical compounds, the green grains of all altitudes were analyzed by Raman spectroscopy technique. The analysis was performed according to El-Abassy; Donfack & Materny, 2011, (2011), with modifications. For sample preparation, a coffee bean from each sample was cut into 20 µm slices with a microtome and fixed on a glass plate. Raman measurements were carried out with a LabRAM HR Evolution

spectrometer, and by using as excitation a 532 nm laser line, maintaining the power at the sample lower than 2 mW to avoid sample heating and degradation. The laser was focused on the sample using a microscope setup equipped with a 100x objective, in backscattering configuration, and an 1800 grooves/mm diffraction grating, and entrance slit width of 150 μm . The full spectral range (1000–3200 cm^{-1}) was recorded with 5 accumulations of 20 s to achieve a good signal to noise ratio. In total, a minimum of three replicates of each sample were arbitrarily selected and investigated in the same way. For better visualization of the peaks and with the aim of decreasing the fluorescence, the removal of the baseline was performed by subtracting linear baselines among the frequencies of 1000 and 1200 cm^{-1} (first interval), 1200 and 1500 cm^{-1} (second interval), 1500 and 1800 cm^{-1} (third interval), 1800 and 2270 cm^{-1} (fourth interval), 2270 and 2550 cm^{-1} (fifth interval), 2550 and 2760 cm^{-1} (sixth interval) and 2760 and 3070 cm^{-1} (seventh interval). Spectral recording and pre-processing were obtained using commercial software LabSpec.

2.4 Sensory analysis – Temporal Dominance of Sensations (TDS)

Coffee samples (pulped and natural) from each altitude (800 m, 1000 m, 1200 m and 1400 m) were prepared according to the Specialty Coffee Association of America (SCA, 2013). The coffee (100 g) was roasted in a roaster (Probatino) and ground in an electric mill (Pinhalense). The ratio was 8.25 g of coffee per 150 ml of water. A panel of three trained coffee experts with Q-Grader Coffee Certificates evaluated the samples. The first sensory evaluation was done to identify the attributes in relation to fragrance, aroma and flavor. The eight most cited attributes in each step were selected for the evaluations in the Temporal Dominance of Sensations (TDS) according to Pineau et al. (2009), with modifications. Four stages were evaluated separately: fragrance, aroma and flavor at temperatures of 55° C and 35° C. Samples were coded with three digits and evaluated in three replicates for 20 s each. The tasters were trained to use the software (SensoMaker, version 1.8) and procedures for data acquisition.

To correlate Raman data with sensory analysis was developed an index denominated degree of predominance of the attribute (DPA). The DPA was calculated by integrating the curve region above the line of significance.

2.5 Statistical analysis

The experiment was carried out in randomized design. A 4×2 factorial arrangement of treatment was used to analyze the results of population counting. Four altitudes (800, 1000, 1200 and 1400 m) and two processes (pulped and natural coffee). The means were compared using a Scott-Knott test. Data were analyzed using software SISVAR (Ferreira, 2014), under model:

$$X = \mu + A_j + P_k + A \times P_{jk} + e_{jk}$$

where, μ =global mean; A_j = altitudes effect ($j = 800 \text{ m}, 1000 \text{ m}, 1200 \text{ m}, 1400 \text{ m}$); P_k = process effect ($k = \text{pulped coffee, natural coffee}$); $A \times P_{jk}$ = effect of interaction between altitudes and process; e_{jk} = experimental error. Significance was defined at $p < 0.05$ level.

Raman spectroscopy was analyzed by Principal Component Analysis (PCA) using SensoMaker software (Nunes & Pinheiro, 2012). PCA was performed in the full Raman spectral range ($1000\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$) and in the regions corresponding to chlorogenic acid (1000 cm^{-1} at 1750 cm^{-1}) and fatty acids (2700 cm^{-1} at 3050 cm^{-1}), separately.

For TDS the data collection consisted of selecting the most dominant fragrance, aroma and flavor profile of the coffee felt at that time using Sensomaker Software (Nunes & Pinheiro, 2012) and plotting as TDS curves showing the percentage of subjects which selected the attribute as dominant at a specific time (Pineau et al., 2009).

3. Results and discussion

3.1 Fermentation

The initial and final mean temperature of the bioreactor was $18 \text{ }^\circ\text{C}$ and $24.5 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. The drying time was 408 h for the pulped coffee and 672 h for the natural coffee, which was expected due to presence of coffee peel. The pulped coffee reduces the amount of water and pulp present and consequently diminishes the drying time (Brando & Brando, 2015).

3.2 Quantification and characterization of microbial population

The mesophilic bacteria, lactic acid bacteria and yeasts population found during the fermentation (0, 24, 48 and 72 h) and drying coffee (204 and 408 h for pulped coffee and 336 and 672 h for natural coffee) at four different altitudes (800, 1000, 1200 and 1400 m) was quantified by plating (Table. 1).

Table 1. Means of main effect and p value of the influence of altitude (A) and process (P) and its interactions on populations counting (log cells/g) by plating.

Mesophilic bacteria														SEM ^C	p value		
Altitude (m)	Fermentation time (h)								Drying time				Altitude (A)		Process (P)	A x P	
	0	24	48	72	0	24	48	72	M ^a	F ^b	M ^a	F ^b					
	Pulped process				Natural process				Pulped process		Natural process						
800	7.3cG	5.8bD	5.4aC	6.0bE	6.8dF	7.2dG	7.8dH	9.3cI	4.0cB	2.0aA	6.8cF	4.1cB	0.03	<0.01	<0.01	<0.01	
1000	6.0aD	6.5cF	5.6bD	4.6aC	6.7cG	6.2cE	6.6aG	9.4cI	3.6bB	2.0aA	7.1dH	2.0aA	0.03				
1200	7.7dF	5.5aC	6.3cE	6.0bD	5.1bB	5.5bC	7.6cF	7.7bG	2.0aA	2.0aA	6.0bD	2.0aA	0.03				
1400	6.8bI	5.5aF	7.5dK	6.0bG	4.7aD	5.2aE	7.1bJ	6.5aH	2.0aA	2.0aA	4.3aC	3.9bB	0.03				
Lactic acid bacteria														SEM ^C	P value		
Altitude (m)	Fermentation time (h)								Drying time				Altitude (A)		Process (P)	A x P	
	0	24	48	72	0	24	48	72	M ^a	F ^b	M ^a	F ^b					
	Pulped process				Natural process				Pulped process		Natural process						
800	7.2cH	5.7bF	5.7bF	5.5bE	7.5dI	7.1dG	9.1dJ	9.5dK	4.2cC	2.0aA	4.9bD	3.9bB	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	
1000	6.9bG	6.3cI	5.1aF	4.5aC	6.5cJ	6.2cH	7.2aK	8.5cL	3.6aB	2.0aA	4.9bE	4.8dD	0.02				
1200	4.6aE	5.2aG	6.4cI	5.8cH	4.5bD	4.3aC	7.4bJ	7.8bK	3.5aB	2.0aA	5.1dF	4.6cE	0.02				
1400	4.6aD	5.2aG	6.3cI	5.8cH	2.0aA	4.9bF	7.8cK	6.5aJ	4.0bC	2.0aA	4.7aE	3.5aB	0.02				
Yeasts														SEM ^C	P value		
Altitude (m)	Fermentation time (h)								Drying time				Altitude (A)		Process (P)	A x P	
	0	24	48	72	0	24	48	72	M ^a	F ^b	M ^a	F ^b					
	Pulped process				Natural process				Pulped process		Natural process						
800	2.0aA	4.1bB	4.2cC	4.6cD	2.0aA	4.0bB	4.6aD	5.5bG	5.3dF	4.2cC	5.1aE	2.0aA	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	
1000	2.0aA	2.0aA	3.6bB	3.9bC	2.0aA	4.2cD	4.6aE	5.4aG	4.6cE	3.9bC	5.3bF	2.0aA	0.02				
1200	2.0aA	2.0aA	3.6bC	3.9bD	2.0aA	4.5dF	5.4cG	6.5cI	4.0aE	3.5aB	5.6cH	2.0aA	0.02				
1400	2.0aA	2.0aA	2.0aA	3.6aC	2.0aA	3.5aB	4.8bE	5.6dF	4.3bD	3.5aB	5.6cF	2.0aA	0.02				

Data are presented as mean. a-d for each column, mean values with different lowercase letters are significant at $p < 0.05$ by Scott-Knott test. A-L for each row, mean values with different capital letters are significant at $p < 0.05$ by Scott-Knott test.

^a Medium drying time (204 h for pulped coffee and 336 h for natural coffee)

^b Final drying time (408 h for pulped coffee and 672 h for natural coffee)

^c Standard error of the means

There was a significant difference in the population count of the microorganisms studied between the altitudes and between processing. For mesophilic bacteria at the beginning of fermentation (0 h) this difference reached until 2 log CFU / g. For all altitudes, during the fermentation there was a decline of counts in pulped coffee and an increase in counts of natural coffee until 72 h (Table 1). This behavior can be explained by the microbial activity and its permanence during fermentation process, which is ruled by free sugars and amino acids concentration present in the grains (Silva, 2015). In the pulped coffee the peel was removed before the start of the fermentation and consequently the amount of sugars and amino acids was greatly reduced. In the natural coffee, which the peel is not removed, was possible to observe significant difference compared to pulped coffee and this difference reached until 4.8 log CFU / g (Table 1).

Besides that, in 72 h of fermentation there was a significant difference in the altitude of 1000 m for pulped coffee and in the altitudes of 1200 and 1400 for natural coffee. During drying phase the population count decreased in both processing (Table 1) because at this stage the grain loses weight until reaching 12% of humidity and, consequently, the environment is not favorable for the growth of microorganisms (Brando & Brando, 2015).

For lactic acid bacteria at the beginning of fermentation (0 h) there was no significant difference in the population count between the altitudes 1200 and 1400 for pulped coffee. In natural coffee there was a significant difference between all altitudes. During fermentation there was a decrease in the microbiota for the pulped coffee at altitudes of 800 and 1000 m while at 1200 and 1400 m an increase was observed. However, in natural coffee, there was an increase in counting at all altitudes (Table 1). This increase in lactic acid bacteria count can be attributed to the low oxygen conditions developed by the fermentation process (Silva, 2015).

Yeasts were not detected at the fermentation beginning (0 h) by the methodology used but showed an increase in the population during the fermentative process (24 to 72 h) (Table 1). The possible explanation is the reduction of water activity and pH due to acids production creating a favorable environment for the yeast growth (Agate & Bhat, 1996; Silva et al., 2000). During drying, there was a decrease in counting in all treatments, but at the end, the population found was on average 2 times higher in the

pulped coffee (Table 1). This may have occurred due to the shorter drying time in this processing.

In a comparison between the population of bacteria and yeast, the bacterial population was higher at the beginning of fermentation, probably due to high-water activity favoring its development (Silva et al., 2000). The population count at the fermentation end (72 h) was significantly higher at natural coffee in all treatments, ranging from 0.5 to 4.8 log CFU / g, which was expected as coffee cherries had more substrate (pulp and mucilage) available for microbial development (Borem, 2008). The maximum of microbial population counting was reached at different time in all treatments analyzed here. Microbial growth and metabolic activity may have been directly affected by altitude and abiotic factors such as temperature, oxygen, acidity and alkalinity of the environment. Therefore, the altitude at which the plant is cultivated may influence the total population and their permanence during the fermentation process.

3.3 Protein profile and molecular identification analysis

The isolates identified by sequencing and abundance of each microorganism are shown in Table 2.

Table 2. Bacteria and yeasts populations present in the natural and pulped coffee at 24 h of fermentation, identified using MALDI-TOF and sequencing. Scale is shown in the end of the table.

Species identified	Log CFU / g ^a	Accession number*	Natural coffee				Pulped coffee			
			800m	1000m	1200m	1400m	800m	1000m	1200m	1400m
Mesophilic bacteria										
Total Population (log CFU per g)^b			7.2	6.2	5.5	5.2	5.8	6.5	5.5	5.5
<i>Acinetobacter pittii</i>	4.00	MK396586.1		■				■		
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	4.00	MK431777.1						■		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3.00	MF156917.1				■				
<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	4.00	n.s			■					
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	5.00	n.s	■							
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5.38	MK382407.1	■		■	■				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4.00	HQ400625.1							■	
<i>Enterobacter cloacae</i>	5.48	CP026536.1	■	■						
<i>Erwinia persicina</i>	4.30	MK737277.1							■	■
<i>Gluconobacter cerinus</i>	4.54	n.s							■	
<i>Lactococcus lactis</i>	6.16	n.s	■							
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7.25	MK418634.1	■	■		■	■	■	■	■
<i>Lysinimonas soli</i>	4.86	NR109464.1			■	■				
<i>Microbacterium foliorum</i>	4.64	MK356413.1	■			■				
<i>Microbacterium testaceum</i>	5.30	MK920173.1			■					
<i>Micrococcus lactis</i>	4.00	KF387682.1						■		
<i>Micrococcus luteus</i>	5.92	n.s	■							
<i>Moraxella osloensis</i>	4.60	MK456466.1		■				■		
<i>Pantoea agglomerans</i>	5.63	CP034474.1	■	■	■	■			■	■
<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	4.04	MH482344.1				■				■
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	4.85	MH464584.1			■					■
<i>Serratia marcescens</i>	4.08	MK459492.1				■		■	■	
<i>Sphingomonas desiccabilis</i>	4.07	n.s				■		■		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5.94	MH158256.1	■				■			
<i>Tatumella terreus</i>	4.00	n.s						■	■	

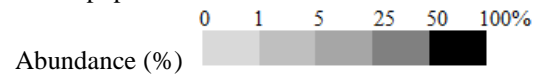
Species identified	Log CFU / g	Accession number*	Natural coffee				Pulped coffee			
			800m	1000m	1200m	1400m	800m	1000m	1200m	1400m
Mesophilic bacteria										
Total Population (log CFU per g)^b			7.2	6.2	5.5	5.2	5.8	6.5	5.5	5.5
<i>Weissella paramesenteroides</i>	5.54	MK396543.1								
<i>Xanthomonas oryzae</i>	3.00	CP033187.3								
Species identified	Log CFU / g	Accession number*	Natural coffee				Pulped coffee			
			800m	1000m	1200m	1400m	800m	1000m	1200m	1400m
Acid lactic bacteria										
Total Population (log CFU per g)^b			7.1	6.2	4.3	4.9	5.7	6.3	5.2	5.2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7.19	MK418634.1								
<i>Weissella paramesenteroides</i>	5.94	MK396543.1								
Species identified	Log CFU / g	Accession number*	Natural coffee				Pulped coffee			
			800m	1000m	1200m	1400m	800m	1000m	1200m	1400m
Yeasts										
Total Population (log CFU per g)^b			4.0	4.2	4.5	3.5	4.1	< 2.0	< 2.0	< 2.0
<i>Candida saopaulonensis</i>	2.00	FJ515172.1								
<i>Candida railenensis</i>	2.90	KM384075.1								
<i>Cryptococcus flavescens</i>	2.78	n.s								
<i>Cryptococcus randhawai</i>	2.30	JQ993379.1								
<i>Cystofilobasidium ferigula</i>	4.51	KY495755.1								
<i>Debaryomyces hansenii</i>	2.30	MH595408.1								
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	3.68	MH333237.1								
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	2.30	MG554647.1								
<i>Meyerozyma caribbica</i>	3.83	MH988779.1								
<i>Pichia kluyveri</i>	3.33	MG757422.1								
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3.61	MG836629.1								

Species identified	Log CFU per g	Accession number*	Natural coffee				Pulped coffee				
			800m	1000m	1200m	1400m	800m	1000m	1200m	1400m	
Yeasts											
Total Population (log CFU per g)^b			4.0	4.2	4.5	3.5	4.1	< 2.0	< 2.0	< 2.0	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	3.81	MK156302.1									

*Database accession number of Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); n.s.: not sequenced, identified by MALDI-TOF with a score above 2.000

^aTotal count of the microorganism in all treatments

^bTotal population count at each altitude



All identified strains by sequencing and MALDI-TOF were deposited in Culture Collection of Agricultural Microbiology (CCMA). Twenty-seven species of mesophilic bacteria belonging to twenty-two genera were identified. Some species were identified only in natural coffee: *Acinetobacter pittii*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter sulfonivorans*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Lactococcus lactis*, *Lysinimonas soli*, *Microbacterium foliorum*, *Microbacterium testaceum*, *Micrococcus luteus*, *Xanthomonas oryzae* and others only in pulped coffee: *Acinetobacter radioresistens*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia persicina*, *Gluconobacter cerinus*, *Micrococcus lactis* and *Tatumella terrea*. Twice as many species were identified in the natural coffee (Table 2), which was already expected due to the removal of the microorganisms present in the coffee peel during the pulped coffee processing.

The highest diversity of mesophilic bacteria genera identified in natural and pulped coffee was at 1400 m and 1200 m, respectively (Table 2). The mesophilic bacteria identified with greater abundance in both processes were *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella paramesenteroides* and *Pantoea agglomerans*. These microorganisms have already been described in the literature as commonly found in natural and pulped coffee (Vilela et al., 2010; Velmourougane, 2013; Evangelista et al., 2014^{a,b}). *Pantoea agglomerans* is a Gram-negative bacterium belonging to the family Enterobacteriaceae that may be isolated from plants as well as from soil (Johnson et al., 2000). *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella paramesenteroides* are lactic acid bacteria but they also may growth in a medium for mesophilic bacteria. Both species are from the Leuconostocaceae family and usually found in coffee (Schillinger et al., 2008; Vilela et al., 2000).

Two species of lactic acid bacteria were identified in both processes *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella paramesenteroides* (Table 2). The presence of LAB not only contributed to pH value decrease during fermentation but may also inhibit the presence of undesirable bacteria and favor yeast growth (Massawe & Lifa, 2010). Furthermore, under specific conditions they may perform alternative pathways of pyruvate use and consequently produce compounds which contribute to fruity and buttery aromas (Von wright & Axelsson, 2012). *Leuconostoc mesenteroides* was present in all treatments and processing used, with more than 50% of abundance.

Leuconostoc sp. and *Weissella* sp. were also the most abundant genera found in a farm located 800 m in Taiwan and in this study the authors suggested that altitude and climate may affect the distribution of lactic acid bacteria (Leong et al., 2014).

The identified yeasts belonging to ten different genera, of which twelve species was identified (Table 2). In each processing there was also a difference between the identified species and their population at different altitudes (Table 2). The greatest diversity of yeasts found in natural coffee and in the pulped coffee was 1000 m and 800 m, respectively (Table 2). Yeasts are considered important for the performance of fermentation and for the development of flavors and aromas on the final beverage (Ribeiro et al., 2017; Martins et al., 2019). In both processes evaluated in this study the species found in greatest abundance were *Cystofilobasidium ferigula*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Meyerozyma caribbica*. These yeasts are often found in coffee and influence the quality of the final beverage (Vilela et al., 2010; Evangelista et al., 2014^b; de Carvalho Neto et al., 2017).

In this study, the difference in the microorganism species founded at different altitudes, as well as their abundance, might be attributed to some climatic factors such as temperature and oxygen that are directly related to the altitude at which the coffee is grown. Every 100 m higher, there is a decrease of 0.6 ° C in temperature (Descroix et al., 2009). In addition, the higher the altitude, the lower the total atmospheric pressure and the partial pressure of the atmospheric gases, such as O₂ and CO₂. This reduction implies a significant impact on the microorganisms (Körner, 2007).

3.4 Raman spectroscopy

The Raman spectra of green coffee grains are show in Figure 1.

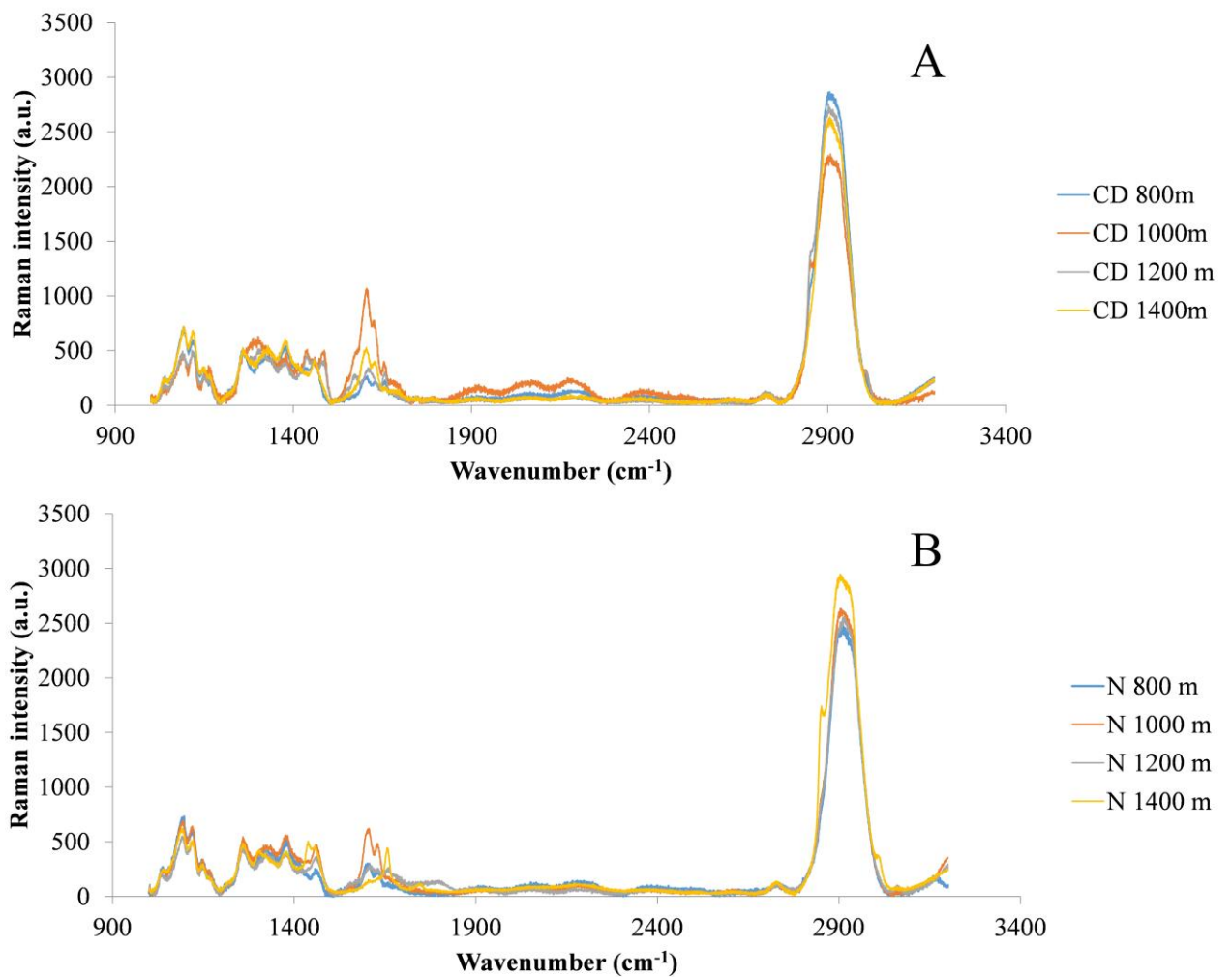


Figure 1. Raman spectra of green coffee grains at different altitudes in the pulped (A) and natural process (B), respectively.

The main spectra bands observed in the region between 1100 cm^{-1} and 1800 cm^{-1} are considered the fingerprint region because it provides the main information on the chemical composition of coffee beans. In this spectral range, the bands 1605 cm^{-1} and 1630 cm^{-1} are attributed to chlorogenic acid (CGA), more specifically to the phenyl ring and the elastic vibrations $C = C$, respectively. The molecular structure of CGA consists of an ester of caffeic acid and quinic acid (Biswas et al., 2007). This is considered one of the main constituents of the grain (Feldman; Ryder & Kung, 1969).

Chlorogenic acid has antioxidant activity and it is believed that its presence in the diet can increase cellular defense and help prevent oxidation damage in cellular components (Sato et al., 2011). In addition, they are important for sensory quality

because they are precursors of volatile compounds that contribute to the taste and aroma of the beverage (Farah et al., 2006). The higher intensity of CGA was found in the pulped and natural coffee at 800 and 1400 m, respectively (Fig. 1).

Bands at 2900 cm^{-1} can also be observed. These occur due to the symmetrical and asymmetric vibrations of CH_2 present in the lipids. Therefore, these can be attributed to the presence of fatty acids (FA) in the grain, and as well can be used as markers to detect the presence of these compounds in the coffee bean (El-Abassy; Donfack & Materny, 2011). The higher intensity of FA was found at 1000 m for pulped and natural coffee (Fig. 1). Fatty acids such as palmitic, stearic and arachidic are potential discriminators of the sensory quality of specialty coffees. However, unsaturated fatty acids like oleic, linolenic and linoleic can be related to lower body, flavor and acidity of the beverage (Figueiredo et al., 2015).

According to Figure 1, in each processing, the Raman spectra varied in relation the different altitudes in the spectral range of CGA and fatty acids. Principal component analysis was applied to evaluate differences in altitudes and processing and is shown in Figure 2.

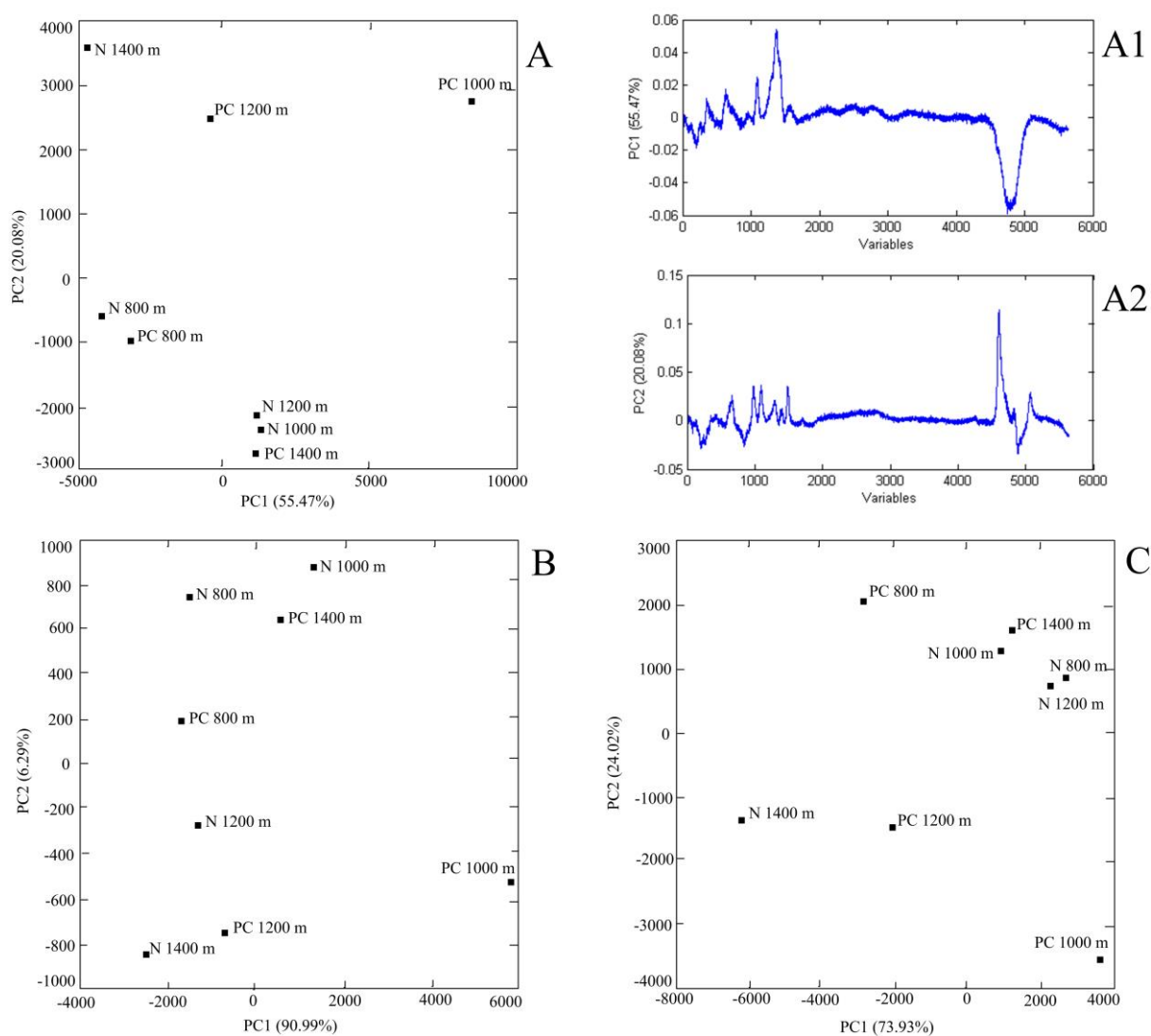


Figure 2. Score plot for the first two PCs of green coffee grains based on total spectrum (A); Raman variables loading of a PC1 (A1) and PC2 (A2) and score plot for the green coffee grains based on chlorogenic acid (B) and fatty acids content (C). *PC = pulped coffee *N = natural coffee

First, PCA was applied in the total spectral region (1000 cm^{-1} at 3200 cm^{-1}) and the results can be seen in Figure 2A. This same region has also been used to explore the spectroscopic differences between the Arabica and Robusta species (Rubayiza & Meurens, 2005; Keidel et al., 2010). According to this statistical analysis, each main component was characterized by the scaling coefficient, so the dispersion graphs can be used to interpret the differences and similarities between the samples. Similar samples tend to be grouped in relation to the components used.

According to Fig. 2A the main components responded to 76.27% of the total spectral variation in green coffee, being explained by PC1 and PC2 at 55.47% and 20.08%, respectively. There are high correlations in relation to the chemical composition of the grain between samples: N 1000 m, N 1200 m and PC 1400 m; N 800 m and PC 800 m; N 1400 m and PC 1200 m. This is due to the acute angles formed between them and consequently because they are present in the same quadrant. The PC 1000 m sample was the most discrepant and it was not possible to correlate with the other treatments. This may have occurred because it was the treatment that obtained the highest intensity in the region of CGA and lower intensity for fatty acids.

This result was confirmed by the PCA loading graph that shows the relationship among a main component and the original variables. Observing this graphic, it is possible to identify which variables are responsible for the observed differences in the samples. The variable with large positive or negative amplitude has a high importance for the component being considered. Therefore, according to the results of the Raman variables represented by PC1 (Fig. 2 A1) and PC2 (Fig. 2 A2) it was possible to observe that the region of the spectra corresponding to chlorogenic acid (1000 cm^{-1} at 1750 cm^{-1}) as well as that of fatty acids (2700 cm^{-1} at 3050 cm^{-1}) are responsible for the differences between the treatments. The change in the content of these compounds present in the green bean from altitude variation and processing is notorious. Therefore, according to Figures 2B and 2C, PCA analyzes were performed in the region corresponding to chlorogenic acid (1000 cm^{-1} at 1750 cm^{-1}) and fatty acids (2700 cm^{-1} at 3050 cm^{-1}), separately (El-Abassy; Donfack & Materny, 2011).

According to Fig. 2B the main components responded to 97.28% of the spectral variation in the region of chlorogenic acid being explained by PC1 and PC2 at 90.99% and 6.29%, respectively. Correlations can be observed between samples: N 1000 m and PC 1400 m; N 800 m and PC 800 m; PC 1200 m, N 1200 m and N 1400 m. The PC 1000 m treatment was also the most discrepant. This may have occurred because it had intensity in the CGA region on average 3 times higher than the other treatments.

In Fig. 2C the major components responded to 97.95% of the spectral variation in the fatty acids region. The PC1 explained 73.93% while the PC2, 24.02%. Among the treatments, the correlations observed were: N 800 m, N 1000 m, N 1200 m and PC 1400 m; PC 1200 m and N 1400 m. It was not possible to correlate the PC 1000 m and PC

800 m samples, being the most discrepant in relation to the fatty acids. In relation to the other treatments, PC 1000 m and PC 800 m obtained an average intensity of 1.2 higher and lower, respectively. Therefore, Raman spectra are sensitive to the properties of chlorogenic acid as well as lipid content.

The relation among the concentrations of chlorogenic acid and fatty acids present in the samples were analyzed (Figure 3).

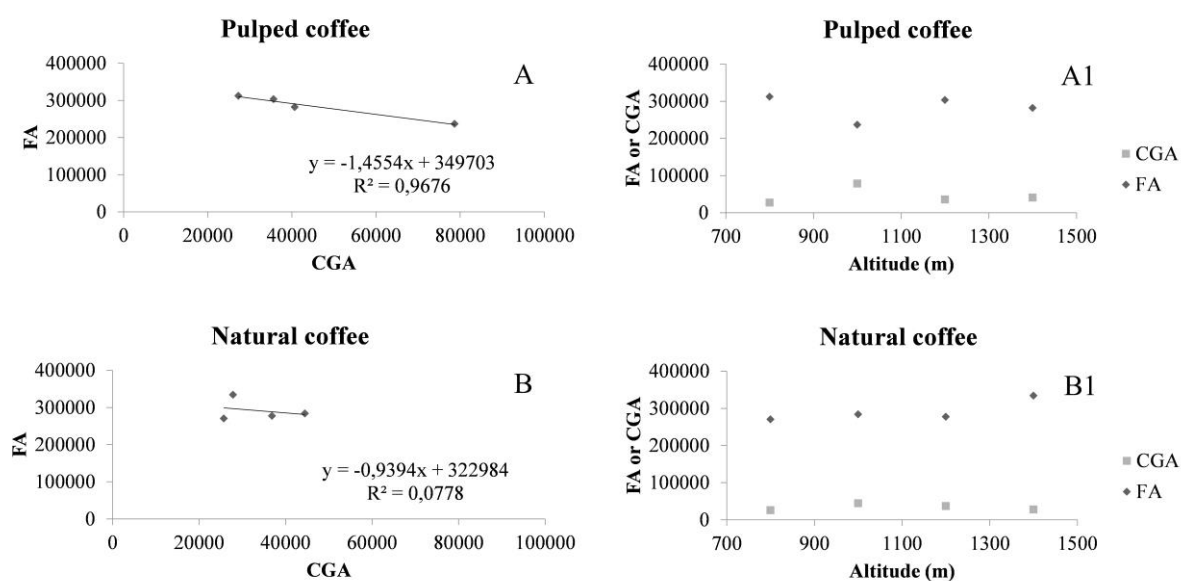


Figure 3. Scatter plot between areas of chlorogenic acid and fatty acid for pulped (A) and natural (B) coffee and the relationship between these acids and altitudes on pulped (A1) and natural coffee (B1).

In the pulped coffee, there was a negative linear correlation between chlorogenic acid and fatty acids (Fig. 3A). In other words, as the concentration of chlorogenic acid in the sample increases, the concentration of fatty acids decreases. Another analysis was performed in relation to the altitudes (Fig. 3A1) and confirmed this result. At a certain altitude, as the chlorogenic acid increases, the fatty acid decreases, and as the chlorogenic acid decreases the fatty acid increases.

From another side, the concentration of these acids in the pulped coffee was the opposite. However, this tendency could not be observed in natural coffee (Fig. 3B). The correlation between the altitudes was low and consequently there was no correlation between the data (Fig 3 B1). This can be explained by the fact that in the pulped coffee

the peel was removed and, consequently, the sample becomes more homogeneous. Chlorogenic acids and fatty acids are mainly found in coffee seeds (Borem, 2008). Their concentration depends on the species, variety (Martín et al., 2001) and on the environmental conditions which the plant was cultivated (Avelino et al., 2005).

3.5 Sensory analysis

The temporal dominance of sensations (TDS) is a descriptive sensory method. This analysis consists of evaluating which sensations are dominant over time (Labbe et al., 2009) therefore the dominant sensations in coffee were given in relation to the fragrance, aroma and flavor of the beverage. These categories were chosen because they belong to the sensorial evaluation of specialty coffee, adopted by SCA (Lingle, 2011).

The fragrance is an attribute analyzed with the coffee powder still dry and are shown in Figure 4.

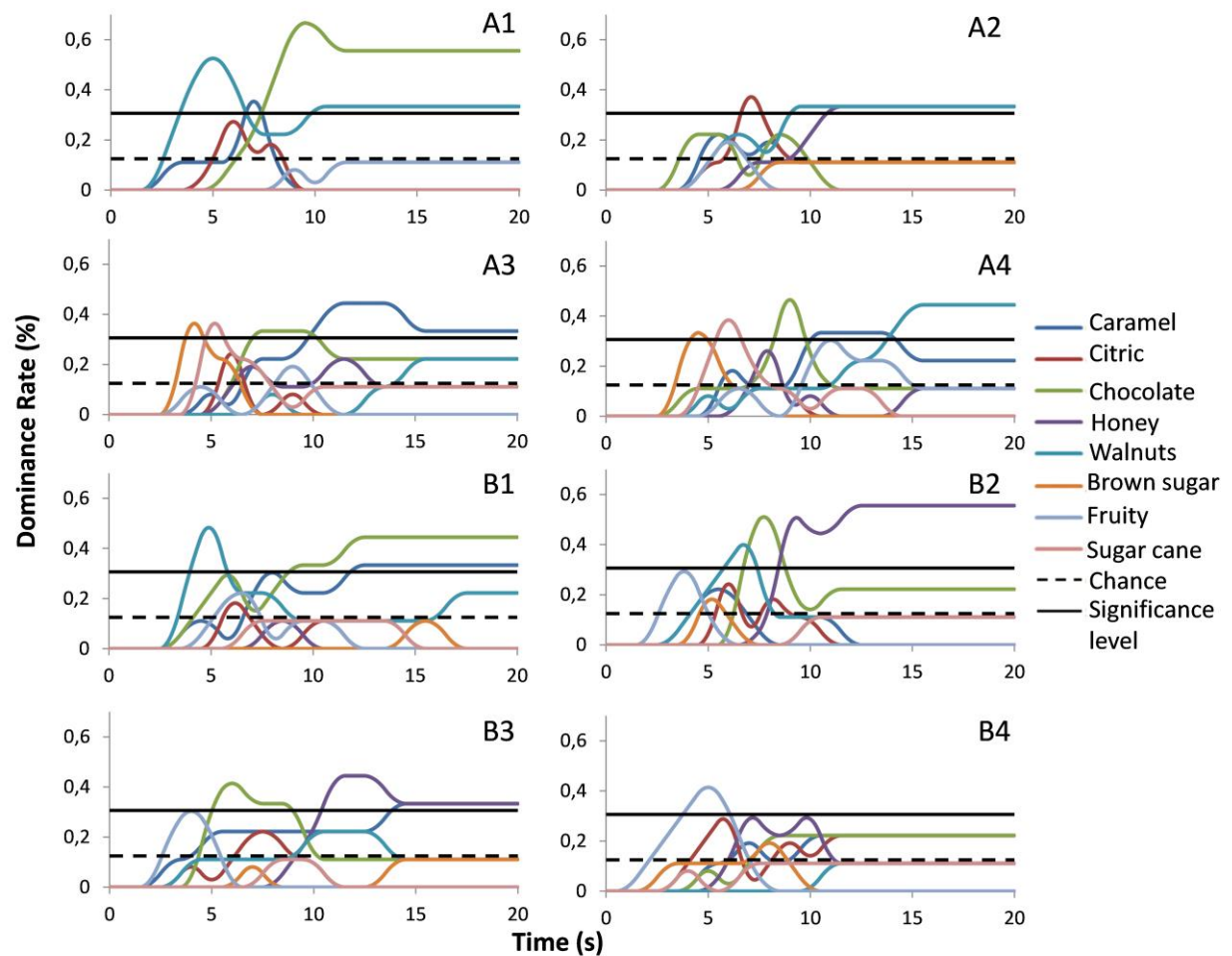


Figure 4. Temporal dominance of sensations (TDS) curves of the coffee fragrance on pulped coffee (A) and natural coffee (B). Both at the altitudes of 800 m (1), 1000 m (2), 1200 m (3) and 1400 m (4).

In the pulped coffee, the greatest diversity of attributes above the line of significance was at 1400 m (Fig. 4 A4). The attributes were brown sugar (from 4 to 5 s), sugar cane (from 5.3 to 6.5 s), chocolate (from 8.2 to 9.8 s), caramel (from 10 to 14 s) and walnuts (from 13.8 to 20 s). In natural coffee it was at 1000 m (Fig. 4 B2) with the attributes: walnuts (from 5.8 to 7.3 s), chocolate (from 6.7 to 8.7 s) and honey (from 8.4 to 20 s).

The infusion allowed the analysis of the aromas and the attributes analyzed are shown in Figure 5.

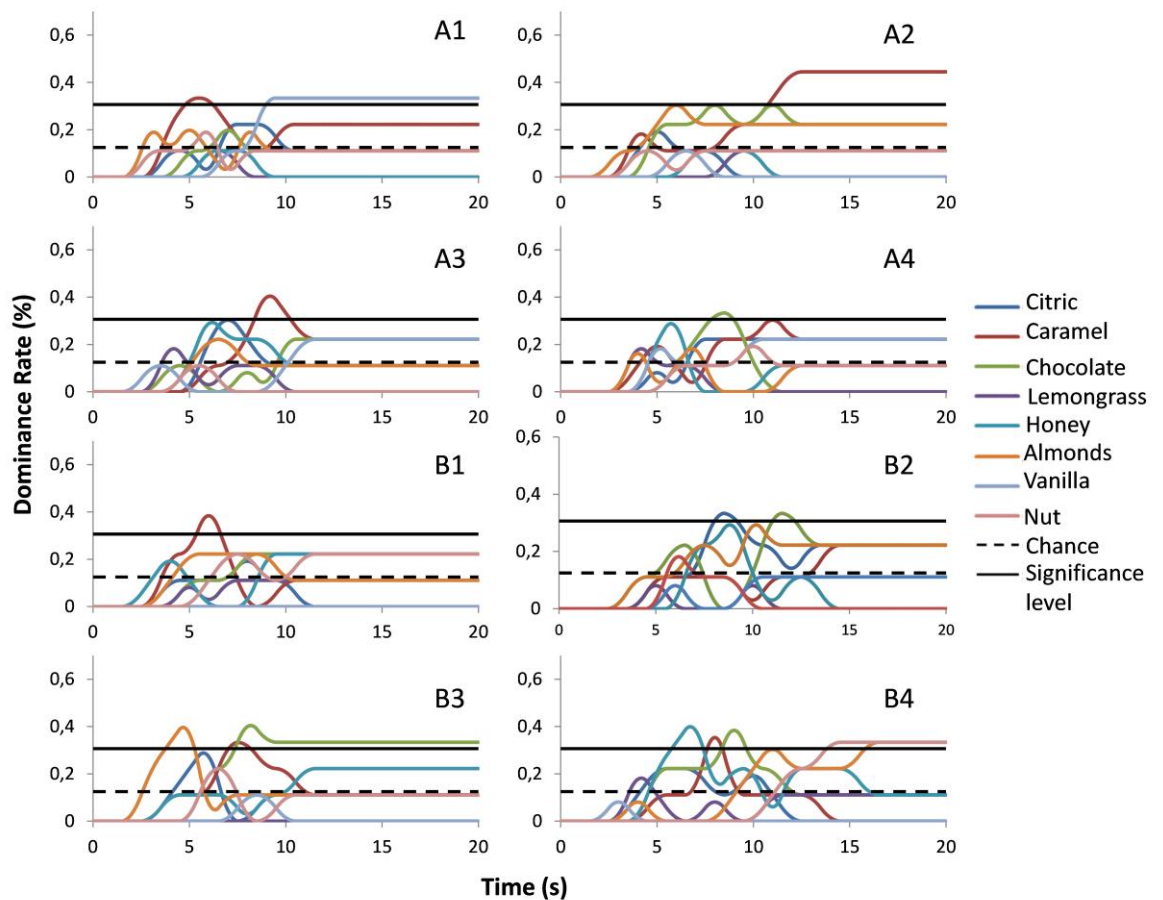


Figure 5. Temporal dominance of sensations (TDS) curves of the coffee aroma on pulped coffee (A) and natural coffee (B). Both at the altitudes of 800 m (1), 1000 m (2), 1200 m (3) and 1400 m (4).

In the pulped coffee the greatest diversity of aromas was at 800 m (Fig. 5 A1) with caramel (from 4.8 to 6.1 s) and vanilla (from 9 to 20 s). In the natural coffee it was at 1400 m (Fig. 5 B4) were honey (from 5.8 to 7.3 s), caramel (from 7.6 to 8.3 s), chocolate (from 8.3 to 9.6 s), nuts (from 13.9 to 20 s) and almonds (from 16 to 20 s).

Chlorogenic acid is precursor of volatile compounds that contribute to the aroma of the beverage (Farah et al., 2006). Observing Figure 6, it was possible to observe the relation between the chlorogenic acid identified in the Raman and the caramel attribute, since this was the most significant attribute in most treatments.

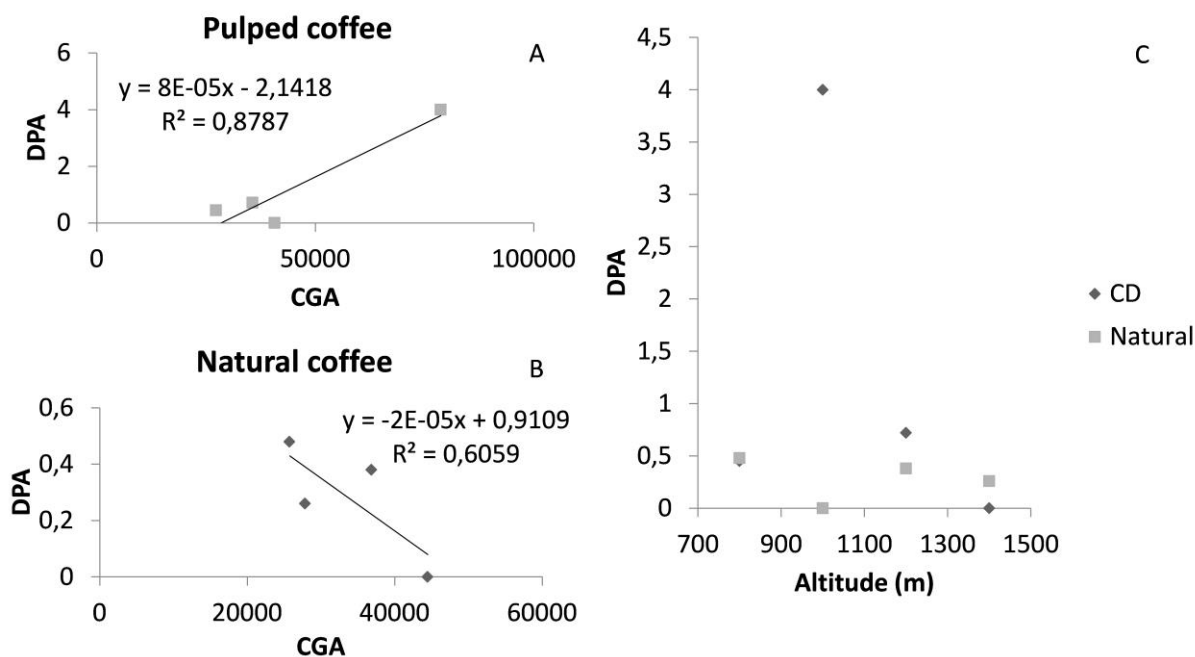


Figure 6. Scatter plot between the areas of chlorogenic acid peaks obtained by Raman spectroscopy and the degree of predominance of the attribute (column A) and the relationship between the altitude and the degree of predominance of the attribute (B).

In the pulped coffee the linear correlation was positive and in the natural coffee the linear correlation was negative (Fig. 6A). In pulped coffee, as the concentration of CGA increased, the degree of predominance of the caramel also increased. To natural coffee the opposite occurred. Therefore, it might be that the processing type influenced this relation. At the same altitude the degree of predominance of the attribute was nearby, except in the pulped coffee at 1000 m (Fig. 6B). The same results was observed in the PCA analyzes (Fig. 2) of the total spectrum (Fig. 2A), the chlorogenic acid region (Fig. 2B) and the fatty acid region (Fig. 2C).

The attributes analyzed for flavor at 55 °C is shown in Figure 7.

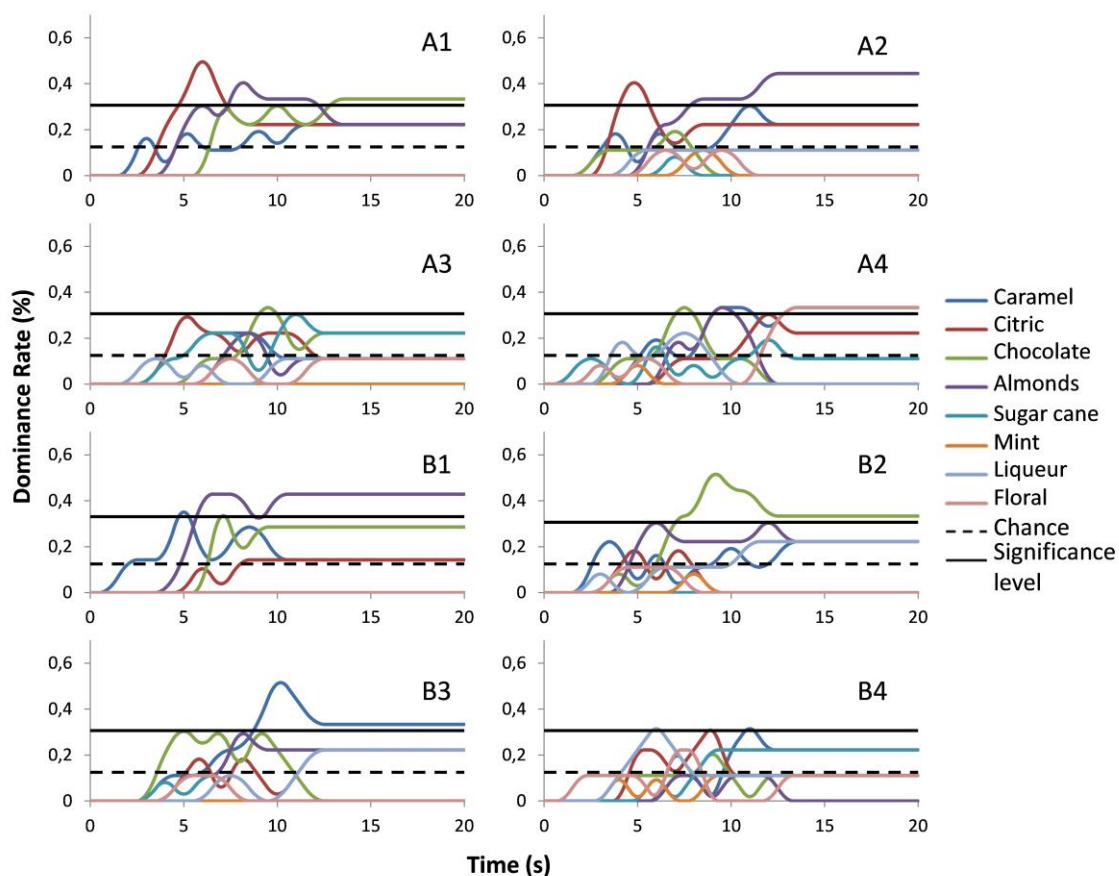


Figure 7. Temporal dominance of sensations (TDS) curves of the coffee flavor at 55°C on pulped coffee (A) and natural coffee (B). Both at the altitudes of 800 m (1), 1000 m (2), 1200 m (3) and 1400 m (4).

In the pulped coffee the altitude of 1400 m (Fig. 7 A4) obtained greater abundance of significant attributes: chocolate (from 5.7 to 6.1 s), almonds (from 9.1 to 7.9 s), caramel (from 9.1 to 11.1 s) and floral (from 12.8 to 20 s). In natural coffee it was also in 1400 m (Fig. 7 B4) with liqueur (from 5.7 to 6.1 s), citric (from 8.8 to 8.9 s) and caramel (from 10.8 to 11.1).

For flavor, the temperature of 35 °C was also analyzed (Figure 8).

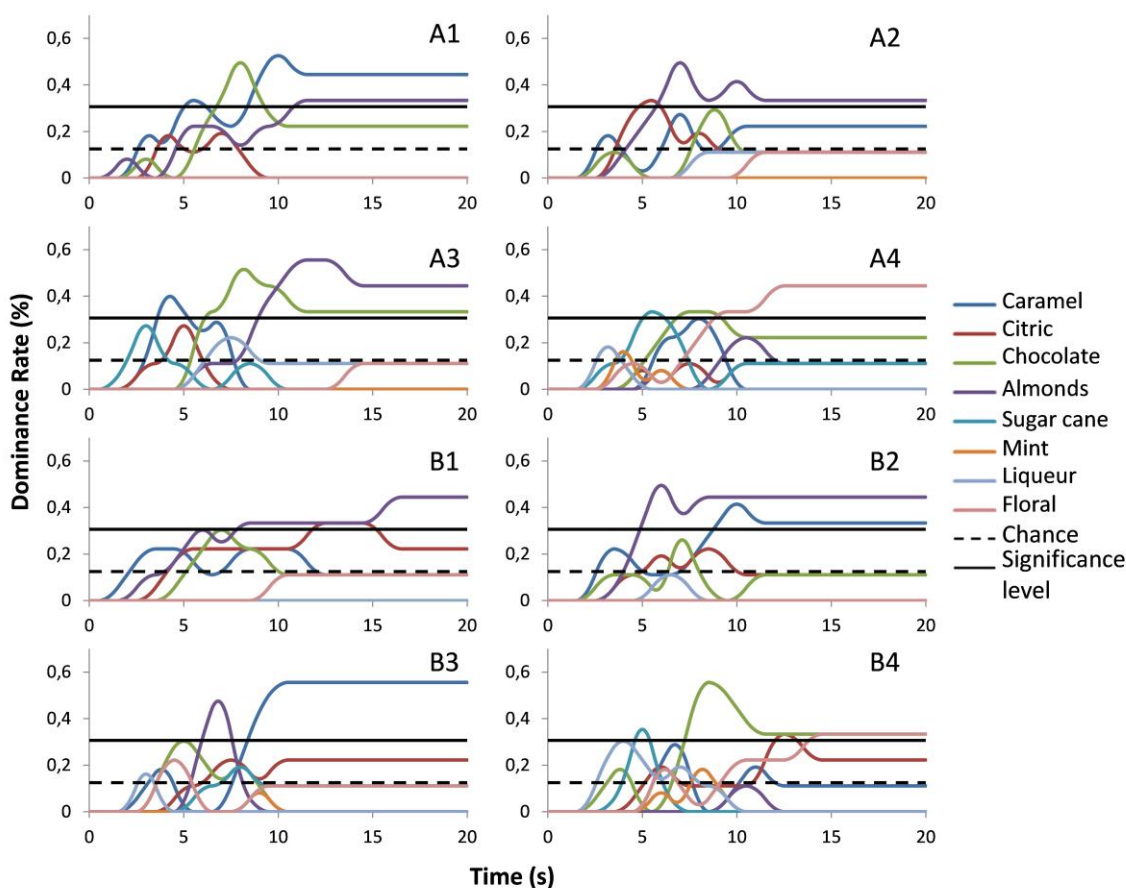


Figure 8. Temporal dominance of sensations (TDS) curves of the coffee flavor at 35°C on pulped coffee (A) and natural coffee (B). Both at the altitudes of 800 m (1), 1000 m (2), 1200 m (3) and 1400 m (4).

In the pulped coffee three altitudes obtained the most significant attributes: 800 m with caramel, chocolate and almonds (Fig. 8 A1); 1200 m with caramel, chocolate and almonds (Fig. 8 A3) and 1400 m with sugar cane, chocolate and floral (Fig. 8 A4). In the natural coffee it was an altitude of 1400 m (Fig. 8 B4) with sugar cane (from 4.6 to 5.4 s), chocolate (from 7.2 to 20 s), citric (from 12.1 to 13.1 s) and floral (from 13.9 to 20 s).

It was possible to observe that between the temperatures of 55 ° C and 35 ° C the sensorial perception between the same treatments has changed. Only in the pulped coffee and the altitude of 1000 m the significant attributes were the same, but in different intensities and times. In the other treatments the attributes varied, and it was possible to observe that in the temperature of 35 ° C there was a greater abundance in

the sensorial perception of the beverage. This change in temperature might induce sensory changes and consequently alter responses in final beverage. This is because the change in temperature modifies the balance of bitter and sweet properties. In coffee, the sweetness increased, and bitterness decreased in the beverage at high temperatures (Zellner et al., 1988). However, in a complex beverage such as coffee, when the temperature drops, it is possible to better distinguish the different attributes present in the cup. The change in sensory perception between processing and between altitudes was notorious. There are studies that showed this relation between altitude and the sensorial analysis of the beverage (Avelino et al. 2005; Bertrand et al., 2012).

4. Conclusion

The coffee cultivated at an altitude of 1400 m was the most appropriate in both processes. Altitudes of 800 and 1200 m were more efficient in pulped coffee and 1000 m in natural coffee. The altitude influenced the chemical composition of the grain, the natural microbiota present in the fruit and, consequently, the conduction of the fermentation and the sensorial perception of the fermented coffees.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support, as well as Fazenda Forquilha do Rio (ES, Brazil), where the fermentations were performed.

References

Abreu, G. F., Borém, F. M., Oliveira, L. F. C., Almeida, M. R., & Alves, A. P. C. (2019). Raman spectroscopy: A new strategy for monitoring the quality of green coffee beans during storage. *Food chemistry*, 287, 241-248.

Agate, A. D., & Bhat, J. V. (1966). Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. *Appl. Environ. Microbiol.*, *14*(2), 256-260.

Avelino, J., Barboza, B., Araya, J. C., Fonseca, C., Davrieux, F., Guyot, B., & Cilas, C. (2005). Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(11), 1869-1876.

Bertrand, B., Guyot, B., Anthony, F., & Lashermes, P. (2003). Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theoretical and Applied Genetics*, *107*(3), 387-394.

Bertrand, B., Vaast, P., Alpizar, E., Etienne, H., Davrieux, F., & Charmetant, P. (2006). Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of Arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America. *Tree physiology*, *26*(9), 1239-1248.

Bertrand, B., Boulanger, R., Dussert, S., Ribeyre, F., Berthiot, L., Descroix, F., & Joët, T. (2012). Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food chemistry*, *135*(4), 2575-2583.

Biswas, N., Kapoor, S., Mahal, H. S., & Mukherjee, T. (2007). Adsorption of CGA on colloidal silver particles: DFT and SERS study. *Chemical Physics Letters*, *444*(4-6), 338-345.

Borém, F. M. (2008). Pós-colheita do café. Lavras: *Ed. UFLA*, *1*, 631.

Brando, C. H. J.; Brando, M. F. P. Methods of coffee fermentation and drying. In: Schwan, R. F.; Fleet, G. H. (Ed.). *Cocoa and Coffee Fermentations*. Florida, EUA: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2015, p. 341-365.

BRAZIL SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION - SCA. O que são cafés especiais. Disponível em: < <http://bsca.com.br/cafes-especiais.php>>. Acesso em: 12 mar. 2019.

Clifford, M. N. (1975). The composition of green and roasted coffee beans. *Process Biochemistry (UK)*.

Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS microbiology letters*, *189*(1), 81-87.

de Carvalho Neto, D., de Melo Pereira, G., Tanobe, V., Thomaz Soccol, V., G da Silva, B., Rodrigues, C., & Soccol, C. (2017). Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro region. *Fermentation*, *3*(1), 11.

Devereux, R., & Willis, S. G. (1995). Amplification of ribosomal RNA sequences. In *Molecular microbial ecology manual* (pp. 277-287). Springer, Dordrecht.

- Descroix, F., & Snoeck, J. (2009). Environmental factors suitable for coffee cultivation. *Coffee: growing, processing, sustainable production. A guidebook for growers, processors, traders and researchers*, 168-181.
- Di Monaco, R., Su, C., Masi, P., & Cavella, S. (2014). Temporal dominance of sensations: A review. *Trends in food science & technology*, 38(2), 104-112.
- El-Abassy, R. M., Donfack, P., & Materny, A. (2011). Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis. *Food Chemistry*, 126(3), 1443-1448.
- Evangelista, S. R., Silva, C. F., da Cruz Miguel, M. G. P., de Souza Cordeiro, C., Pinheiro, A. C. M., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2014)^a. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*, 61, 183-195.
- Evangelista, S. R., Miguel, M. G. D. C. P., de Souza Cordeiro, C., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2014)^b. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food microbiology*, 44, 87-95.
- Evangelista, S. R., Miguel, M. G. D. C. P., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International journal of food microbiology*, 210, 102-112.
- Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian journal of plant physiology*, 18(1), 23-36.
- Feldman, R. S., Ryder, W. S., & Kung, J. T. (1969). Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(4), 733-739.
- Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e agrotecnologia*, 38(2), 109-112.
- Figueiredo, L. P., Borém, F. M., Almeida, M. R., de Oliveira, L. F. C., de Carvalho Alves, A. P., dos Santos, C. M., & Rios, P. A. (2019). Raman spectroscopy for the differentiation of Arabic coffee genotypes. *Food chemistry*, 288, 262-267.
- Figueiredo, L. P., Borem, F. M., Ribeiro, F. C., Giomo, G. S., da Silva Taveira, J. H., & Malta, M. R. (2015). Fatty acid profiles and parameters of quality of specialty coffees produced in different Brazilian regions. *African journal of agricultural research*, 10(35), 3484-3493.
- HOLT, J.G. (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth ed. W. & Wilkins, Baltimore.

- Herrero, A. M. (2008). Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review. *Food chemistry*, *107*(4), 1642-1651.
- Iriondo-DeHond, A., Garcia, N. A., Fernandez-Gomez, B., Guisantes-Batan, E., Escobar, F. V., Blanch, G. P., & del Castillo, M. D. (2019). Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *51*, 194-204.
- Johnson, K. B., Stockwell, V. O., Sawyer, T. L., & Sugar, D. (2000). Assessment of environmental factors influencing growth and spread of *Pantoea agglomerans* on and among blossoms of pear and apple. *Phytopathology*, *90*(11), 1285-1294.
- Keidel, A., von Stetten, D., Rodrigues, C., Maguas, C., & Hildebrandt, P. (2010). Discrimination of green Arabica and Robusta coffee beans by Raman spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(21), 11187-11192.
- Körner, C. (2007). The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in ecology & evolution*, *22*(11), 569-574.
- Labbe, D., Schlich, P., Pineau, N., Gilbert, F., & Martin, N. (2009). Temporal dominance of sensations and sensory profiling: A comparative study. *Food Quality and Preference*, *20*(3), 216-221.
- Leong, K. H., Chen, Y. S., Pan, S. F., Chen, J. J., Wu, H. C., Chang, Y. C., & Yanagida, F. (2014). Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan. *Current microbiology*, *68*(4), 440-447.
- Li-Chan, E. C. Y. (1996). The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(7), 361-370.
- Lima-Neto, R., Santos, C., Lima, N., Sampaio, P., Pais, C., & Neves, R. P. (2014). Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. *Brazilian Journal of Microbiology*, *45*(2), 515-522.
- Lingle, T. R. (2011). *The coffee cupper's handbook: a systematic guide to the sensory evaluation of coffee's flavor*. Long Beach California: Specialty Coffee Association of America.
- Luna, A. S., & de Gois, J. S. (2018). Application of Chemometric Methods Coupled With Vibrational Spectroscopy for the Discrimination of Plant Cultivars and to Predict Physicochemical Properties Using R. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 80, pp. 165-194). Elsevier.
- Luna, A. S., da Silva, A. P., da Silva, C. S., Lima, I. C., & de Gois, J. S. (2019). Chemometric methods for classification of clonal varieties of green coffee using Raman spectroscopy and direct sample analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, *76*, 44-50.

- Martín, M. J., Pablos, F., González, A. G., Valdenebro, M. S., & León-Camacho, M. (2001). Fatty acid profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation. *Talanta*, *54*(2), 291-297.
- Martins, P. M. M., Ribeiro, L. S., da Cruz Pedrozo Miguel, M. G., Evangelista, S. R., & Schwan, R. F. (2019). Production of coffee (*Coffea arabica*) inoculated with yeasts: impact on quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Massawe, G. A., & Lifa, S. J. (2010). Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, *2*(1), 41-82.
- Murray, J. M., Delahunty, C. M., & Baxter, I. A. (2001). Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food research international*, *34*(6), 461-471.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzappel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International journal of food microbiology*, *114*(2), 168-186.
- NUNES, C. A.; PINHEIRO, A.C.M. Sensomarker free user-friendly interface for sensory analysis. Available at: www.ufla.br/sensomaker. Accessed at: 18.06.16, 2012.
- Pineau, N., Schlich, P., Cordelle, S., Mathonnière, C., Issanchou, S., Imbert, A., & Köster, E. (2009). Temporal Dominance of Sensations: Construction of the TDS curves and comparison with time–intensity. *Food Quality and Preference*, *20*(6), 450-455.
- Ribeiro, L. S., Ribeiro, D. E., Evangelista, S. R., Miguel, M. G. D. C. P., Pinheiro, A. C. M., Borém, F. M., & Schwan, R. F. (2017). Controlled fermentation of semi-dry coffee (*Coffea arabica*) using starter cultures: A sensory perspective. *LWT-Food Science and Technology*, *82*, 32-38.
- Ribeiro, L. S., Evangelista, S. R., Miguel, M. G. D. C. P., van Mullem, J., Silva, C. F., & Schwan, R. F. (2018). Microbiological and chemical-sensory characteristics of three coffee varieties processed by wet fermentation. *Annals of microbiology*, *68*(10), 705-716.
- Rubayiza, A. B., & Meurens, M. (2005). Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(12), 4654-4659.
- Sakiyama, N. S., & Ferrão, M. A. G. (2015). Botany and production of coffee. *Cocoa and Coffee Fermentation*. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 341-365.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., ... & Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International journal of pharmaceutics*, *403*(1-2), 136-138.

Schillinger, U., Boehringer, B., Wallbaum, S., Caroline, L., Gonfa, A., Huch, M., ... & Franz, C. M. (2008). A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. *FEMS microbiology letters*, 286(2), 222-226.

Silva, C. F., Schwan, R. F., Dias, E. S., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International journal of food microbiology*, 60(2-3), 251-260.

Silva, C. F. (2015). Microbial Activity during coffee fermentation. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Ed.). *Cocoa and Coffee Fermentations*. Florida, EUA: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2015, p. 397-430.

Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food microbiology*, 25(8), 951-957.

Velmourougane, K. (2013). Impact of natural fermentation on physicochemical, microbiological and cup quality characteristics of Arabica and Robusta coffee. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 83(2), 233-239.

Vilela, D. M., Pereira, G. V. D. M., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food microbiology*, 27(8), 1128-1135.

Von Wright, A., & Axelsson, L. (2012). Lactic acid bacteria: an introduction. *Lahtinen, S., Ouweland, AC, Salminen, S., von Wright, A.: Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. 4th edition, CRC Press, Boca Raton.*

Wilson, B. R., Conley, J. F., Harris, T. M., & Lafone, F. (2012). New terrains of taste: Spatial analysis of price premiums for single origin coffees in Central America. *Applied Geography*, 35(1-2), 499-507.

Zellner, D. A., Stewart, W. F., Rozin, P., & Brown, J. M. (1988). Effect of temperature and expectations on liking for beverages. *Physiology & behavior*, 44(1), 61-68.