



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611411-3 A2**

(22) Data de Depósito: 24/05/2006
(43) Data da Publicação: 08/09/2010
(RPI 2070)



(51) *Int.Cl.:*
A23F 5/02

(54) Título: **MÉTODO DE TRATAMENTO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE SOB REGULAÇÃO DE pH**

(30) Prioridade Unionista: 25/05/2005 JP 2005-153118

(73) Titular(es): SUNTORY LIMITED

(72) Inventor(es): HIDEKO YOMO, TOSHIHARU NAKAJIMA

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT JP2006310352 de 24/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/126587 de 30/11/2006

(57) Resumo: MÉTODO DE TRATAMENTO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE SOB REGULAÇÃO DE PH. A presente invenção refere-se a um método de tratamento de grãos de café verde por meio do qual a contaminação com as bactérias, que produzem o ácido acético, possa ser evitada durante a fermentação dos grãos de café verde com um microorganismo e um novo e favorável sabor possa ser conferido a uma bebida de café. Esse objetivo pode ser alcançado por um método de tratamento de grãos de café verde o qual compreende a etapa de fermentação de fermentar o material a ser assimilado ao colocá-lo em contato com um microorganismo para o tratamento de fermentação e a seguir o suprimento do componente fermentado, assim formado, aos grãos de café verde, em que o material a ser assimilado é contatado com o micro-organismo para o tratamento de fermentação dentro de um pH tal qual o da inibição do crescimento das bactérias capazes de formar o ácido acético.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO DE TRATAMENTO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE, GRÃOS DE CAFÉ VERDE, GRÃOS DE CAFÉ TORRADOS E BEBIDA DE CAFÉ**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a um método de tratar os grãos de café verde compreendendo uma etapa de fermentação para realizar a fermentação botando uma substância nutritiva e um microrganismo de fermentação em contato um com o outro, e depois suprimindo os componentes fermentados assim formados para os grãos de café verde.

10 ANTECEDENTES DA TÉCNICA

 A seguir forneceu-se uma descrição resumida das etapas para a fabricação de uma bebida de café. Primeiro, são removidas as porções da casca e da polpa do café cereja (uma cereja originária de uma planta da família das Rubiáceas chamada "cafeeiro") e os grãos de café verde são isolados (etapa de refinamento). Os grãos de café verde resultantes são torrados, pelo que são obtidos os grãos de café torrados (etapa de torrefação). Os componentes que são a base da característica de sabor e aroma do café (referidos abaixo como "componentes de sabor e aroma de café") são gerados nessa etapa de torrefação. Os grãos de café torrados são então triturados, e um extrato con-

15 tendo os componentes de sabor e aroma de café que foram extraídos usando água fervendo ou os similares, é fornecido como uma bebida de café.

 A demanda por bebida de café como bebida de preferência atualmente está crescendo, e as preferências dos consumidores por bebidas de café estão também se diversificando. Uma variedade de melhoramentos no

25 sabor e aroma do café é necessária.

 O método para melhorar sabor e aroma do café, a fim de atender as demandas de tais consumidores, envolve implementar um tratamento de fermentação em que os grãos de café verde, os microrganismos (levedo ou os similares), e a substância a ser metabolizada usando os microrganismos entram em contato uns com os outros. Os álcoois e ésteres produzidos

30 pela fermentação dos microrganismos são absorvidos pelos grãos de café verde, que são separados, recuperados e torrados. As bebidas de café são

fabricadas usando esses grãos de café torrados como uma matéria prima (veja Documento de Patente 1).

No método revelado no Documento de Patente 1 acima descrito, aromas únicos que são chamados "aromas de bebida fermentada", e que resultam de álcoois, ésteres e outros compostos, são atribuídos aos grãos de café verde após a fermentação. A bebida de café obtida depois de torrar esses grãos de café verde, tem consistência de sabor encorpado (exibindo riqueza, prazer de beber e sabor total) além do aroma fermentado mencionado acima, permitindo que uma bebida de café seja preparada com sabor e aroma novos e favoráveis.

Documento de Patente 1 Pedido de Patente Internacional Aberto à inspeção Pública Nº WO2005/029969A1

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Problemas que a Invenção Pretende Resolver

Entretanto, problemas de contaminação, devido a bactérias ou os similares que vivem no café cereja, surgiram nesse método quando foi implementado o tratamento de fermentação usando microorganismos. Particularmente, quando contaminado pela bactéria que tem a capacidade de produzir ácido acético (por exemplo, bactéria de ácido acético) os grãos de café verde absorverão o ácido acético produzido pela bactéria de contaminação, e a qualidade de sabor e aroma da bebida do café, obtido dos grãos de café torrado, podem cair significativamente.

A presente invenção foi delineada à luz desses problemas e provê um método de tratar grãos de café verde que pode evitar a contaminação pela produção da bactéria de ácido acético, quando executando um tratamento de fermentação em grãos de café verde usando microorganismos, e que podem conferir sabor e aroma novos e adequados para uma bebida de café.

Meios para Solucionar os Problemas

A primeira configuração característica da presente invenção é um método de tratar os grãos de café verde, compreendendo uma etapa de fermentação, colocando uma substância nutritiva e um microorganismo de

fermentação em contato um com o outro, e depois suprindo os componentes fermentados assim formados para os grãos do café verde, em que na etapa de fermentação, a substância nutritiva e o microorganismo de fermentação são colocados em contato um com o outro em uma faixa de pH para inibir o

5 crescimento de microorganismos produtores de ácido acético.

Os grãos (sementes) de café verde estão presentes na parte mais interna do café cereja e têm a propriedade de absorver água na preparação da germinação. Certos tipos de microorganismos são bem conhecidos por desgastarem (fermentarem) compostos orgânicos (substância nutritiva) e

10 produzir álcoois, ácidos orgânicos, ésteres e outros compostos (referidos abaixo como "componentes fermentados"). Esses microorganismos são tipificados pelo levedo e os similares.

Dessa maneira, quando a fermentação é executada usando esses tipos de microorganismos (microorganismos de fermentação) na presença de substância nutritiva, os componentes fermentados que são produzidos

15 serão absorvidos pelos grãos juntamente com a água. Em consequência, os grãos de café verde resultantes são torrados, pelo que os grãos torrados do café podem ser obtidos tendo novos componentes de sabor e aroma, que se originam dos componentes fermentados produzidos pela fermentação em

20 adição aos componentes de sabor e aroma convencionais do café, gerados na etapa de torrefação, e novos e favoráveis sabor e aroma são conferidos à bebida de café resultando de realizar a extração desses grãos de café torrados.

Portanto, de acordo com a primeira configuração característica

25 da presente invenção, na etapa de fermentação, a substância nutritiva e o microorganismo de fermentação entram em contato um com o outro em uma faixa de pH (referida abaixo como o "pH inibidor de crescimento") para inibir o crescimento do ácido acético que produz os microorganismos (referido abaixo como "ácido acético que produz bactérias"), e dessa maneira a pro-

30 dução de ácido acético durante a fermentação pode ser limitada. A eficácia da utilização da substância nutritiva, através da fermentação do microorganismo, aumentará até o ponto em que a substância nutritiva, devido ao ácido

acético que produz a bactéria, é minimizada, e o volume de produção dos componentes fermentados, que conferem sabor e aroma novos e favoráveis à bebida de café, pode ser aumentada. Em consequência, a quantidade de componentes fermentados pode ser aumentada em relação aos grãos de café obtidos na técnica anterior mencionada acima, a quantidade de ácido acético será relativamente baixa, e os grãos de café verde de maior qualidade podem ser obtidos.

Em uma segunda configuração característica da presente invenção, os grãos de café verde estão pelo menos em um estado que fica entre o estado de isolamento do café cereja ou um estado de estar dentro do café cereja.

De acordo com a segunda configuração característica da presente invenção, quando a etapa de fermentação é realizada quando os grãos de café verde tiverem sido submetidos a um tratamento de refinamento ou os similares, e estão em um estado de isolamento do café cereja, como no Exemplo 1, que é descrito daqui em diante, outro tipo de fruta ou suco de fruta pode ser usado como substância nutritiva, e a sequência de quando a substância nutritiva o microorganismo de fermentação e os grãos de café entram em contato uns com os outros, pode ser mudada de forma apropriada, e outros tipos de montagem podem ser selecionados, por exemplo. Alternativamente, quando a etapa de fermentação é executada quando os grãos de café verde estão dentro do café cereja, como nos Exemplos 2 até 4, a fermentação devido aos microorganismos ocorre em um estado em que os grãos de café verde e a polpa do café, que é a substância nutritiva, estão próximos uns dos outros. Os álcoois, ésteres e outros componentes fermentados que são gerados pela fermentação podem, dessa forma, ser mais prontamente transferidos para os grãos de café verde.

Em uma terceira configuração característica da presente invenção, o pH é pH 2.4 a 4.7.

Ajustando o pH de 2.4 para 4.7, de acordo com a terceira configuração característica da presente invenção, permite que o crescimento de bactérias que produzem o ácido acético seja limitado, e o crescimento de

microorganismos de fermentação seja promovido.

A quarta configuração característica da presente invenção compreende uma etapa de regulagem do pH, usando um agente de regulagem de pH e regulando o pH para dentro da faixa mencionada acima.

5 O método de tratar os grãos de café verde, de acordo com a quarta configuração característica da presente invenção, compreende uma etapa de regulagem do pH. Um agente de regulagem do pH é usado nesta etapa, pelo que o pH, quando posto em contato com o microorganismo e a substância nutritiva, um com o outro, pode prontamente regular o pH inibidor
10 do crescimento. A etapa de regulagem do pH pode ser implementada em diversos aspectos, como está claro a partir das descrições nos exemplos descritos daqui em diante. Por exemplo, uma suspensão em que um microorganismo de fermentação é suspenso em uma concentração pequena, em um volume de água relativamente grande (por exemplo, uma quantidade
15 correspondente a aproximadamente o mesmo peso que o café cereja) é preparada, o agente de regulagem do pH é adicionado à suspensão, e o pH da suspensão é regulado para o pH inibidor de crescimento. Em seguida, o café cereja para ser fermentado é posto em contato sendo embebido dentro da suspensão e depois removido, após o que a etapa de fermentação pode
20 ser implementada (a substância nutritiva primária neste exemplo é a polpa do café cereja).

Alternativamente, quando o café cereja é imerso em uma tonel de água e as impurezas são removidas na etapa de refinamento, que envolve lavar com água para separar e refinar os grãos do café verde do café cereja, o tonel de água é preparado de modo que o agente de regulagem do
25 pH é adicionado de antemão e o tonel regulado para o pH inibidor de crescimento. O café cereja colhido e o microorganismo de fermentação podem ser adicionados nesse tonel de água, e a etapa de fermentação pode ser implementada (a substância nutritiva primária neste exemplo é a polpa do
30 café cereja).

Em uma quinta configuração característica da presente invenção, o agente de regulagem do pH é pelo menos um dentre ácido láctico e

ácido fosfórico.

De acordo com a quinta configuração característica da presente invenção, pelo menos um ácido lático ou ácido fosfórico é usado como o agente de regulagem do pH. O pH do líquido de fermentação é diminuído para um pH capaz de inibir o crescimento da bactéria produtor de ácido acético (o pH inibidor de crescimento). O fato de que pelo menos o ácido lático ou o ácido fosfórico ser particularmente eficaz para a inibição do crescimento do ácido acético que produz a bactéria, e não ter nenhum efeito adverso sobre a qualidade dos grãos do café verde depois da fermentação, foi inicialmente descoberto em consequência da pesquisa meticulosa feita pelos inventores da presente. O ácido lático e o ácido fosfórico são também econômicos e podem ser prontamente obtidos. Os compostos são usados como aditivos alimentares e, dessa maneira, são seguros e não fazem mal ao corpo.

Em uma sexta configuração característica da presente invenção, o microorganismo de fermentação é de pelo menos um tipo selecionado dentro o grupo composto de levedo, bactéria de ácido lático e Deuteromicota.

No método de tratamento de grãos de café de acordo com a sexta configuração característica da presente invenção, pelo menos um tipo selecionado dentre o grupo composto de levedo, bactéria de ácido lático e Deuteromicota é usado como microorganismo de fermentação. Esses microorganismos são prontamente obtidos e facilmente manuseados devido à capacidade de aplicar métodos gerais de cultura, armazenamento e os similares.

Em uma sétima configuração característica da presente invenção, o levedo é um levedo de fermentação de vinho.

No método de tratar grãos de café verde de acordo com a sétima configuração característica da presente invenção, um levedo de fermentação de vinho é usado como microorganismo de fermentação. Um aroma fermentado característico pode ser portanto conferido para os grãos de café verde. Usando esses grãos de café verde como uma matéria-prima, a bebida de café pode ser combinada tendo um aroma preparado com cheiro de

fruta e um sabor encorpado, além do sabor e aroma convencionais gerados na etapa de torrefação.

Em uma oitava configuração característica da presente invenção, a Deutoromycota pertence ao gênero Geotrichum.

5 No método de tratar os grãos de café verde de acordo com a oitava configuração característica da presente invenção, o tratamento de fermentação é executado usando, por exemplo, Geotrichum candidum, Geotrichum rectangulatum ou Geotrichum klebahnii como a Deutoromycota pertencente ao gênero Geotrichum. Novos componentes de sabor e aroma
10 (componentes fermentados) podem ser conferidos para os grãos de café verde, de acordo com o presente método. Usando como uma matéria prima os grãos de café verde usando os microorganismos mencionados acima em particular, uma bebida de café pode ser obtida provendo um sabor de encorpada e tendo um aroma de éster e cheiro de fruta saborosos (em que o cheiro de álcool é limitado) equilibrados com os sabores e aromas do café convencional gerados na etapa de torrefação.
15

Em uma nona configuração característica da presente invenção, a Deuteromycota pertencente ao gênero Geotrichum sp., SAM2421 (depósito internacional número FERM BP-10300), uma variante do mesmo, ou um transformante do mesmo.
20

25 No método de tratar grãos de café verde de acordo com a nona configuração característica da presente invenção, Geotrichum sp. SAM2421 (depósito internacional número FERM BP-10300) ("SAM2421") é usada. SAM2421 é um novo microorganismo que foi separado do café cereja pelos presentes inventores. O microorganismo foi aceito no Depositório do Organismo de Patente Internacional do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Avançadas (#6 Chuo 1-1-1 Tsukuba-shi-higashi Ibaraki-ken Japão) em 22 de março de 2005. Pelo uso de SAM 2421, novos componentes de sabor e aroma (componentes fermentados) são conferidos para os grãos de café verde, e uma bebida de café pode ser obtida tendo um aroma estérico mais rico
30 e com cheiro de fruta e provendo um sabor de encorpado. SAM2421, variante do mesmo, ou transformante do mesmo pode ser usado conforme apro-

priado na presente invenção. As variantes incluem, por exemplo, cepas em que as mutações são artificialmente induzidas (que são tratadas com radiação e agentes mutagênicos), enquanto os transformantes incluem, por exemplo, SAM2421 ou variantes do mesmo dentro dos quais genes exóticos foram introduzidos. As cepas que têm melhor capacidade de fermentação (ou que têm outras características, tais como manuseio fácil) podem ser separadas dessas variantes e desses transformantes e colocados em uso.

Na décima configuração característica da presente invenção, a substância nutritiva é suco de fruta ou polpa de café.

De acordo com a décima configuração característica da presente invenção, suco de uva, suco de pêra, suco de maçã ou outro suco pode ser utilizado quando usar suco de fruta como substância nutritiva. A polpa de café (as porções que contêm açúcar e outros nutrientes) é um subproduto obtido na etapa de refinamento para obter os grãos de café verde do café cereja. A polpa de café é usualmente destruída, mas pode ser utilizada eficazmente como uma substância nutritiva na presente invenção. A preparação de substância nutritiva estrangeira é portanto desnecessária, e as preocupações a respeito do aumento de custo da matéria prima são também aliviados.

A décima primeira configuração característica da presente invenção são os grãos de café verde obtidos usando o método de tratar os grãos de café verde de acordo com a primeira ou segunda configuração característica.

Os grãos de café verde de acordo com a décima primeira configuração característica da presente invenção contêm componentes fermentados que conferem sabor e aroma novos e favoráveis para uma bebida de café.

A décima segunda configuração característica da presente invenção são grãos de café verde, torrados de acordo com a décima primeira configuração característica.

Os grãos de café torrados de acordo com a décima segunda configuração característica da presente invenção contêm novos componen-

tes de sabor e aroma originados dos componentes fermentados produzidos pela fermentação junto com os componentes de sabor e aroma de café convencional gerados na etapa de torrefação.

5 A décima terceira configuração característica da presente invenção é uma bebida de café usando os grãos de café torrados de acordo com a décima segunda configuração característica como uma matéria prima.

A bebida de café de acordo com a décima terceira configuração característica da presente invenção tem sabor e aroma novos e favoráveis originados dos componentes fermentados produzidos pela fermentação junto com o sabor e aroma de café convencional.

MELHOR MANEIRA DE REALIZAR A INVENÇÃO

Modalidades da presente invenção serão descrita abaixo.

Modalidades

(Café cereja)

15 "Café cereja" na presente invenção se refere aos frutos do cafeeiro. A estrutura geral de um café cereja é composta de grãos de café verde (sementes), polpa (as porções contendo açúcar e outros nutrientes) e uma casca externa. Para ser mais específico, os grãos de café verde estão presentes na parte mais interna e são envolvidos pela camada de prata, pergaminho (parchment), a polpa, e outra camada externa. Arábica, robusta, libérica e outros podem ser usados tão apropriados quanto à variedade de café. A área de produção pode ser Brasil, Etiópia, Vietnã, Guatemala ou outro local conforme apropriado, mas a área de produção não é particularmente limitada. Cafés cereja secos ou não-secos podem ser usados na presente modalidade. As proporções em peso por frutos, onde grão de café verde é 1, são 6:4:1 de café cereja (não-secos): café cereja seco: grão de café verde.

(Grãos de café verde)

Dois tipos de formatos, isto é, "Natural" e Lavado", são bem-conhecidos pela etapa de refinamento para isolar os grãos de café verde do café cereja.

"Natural" é um método para obter grãos de café verde em que as porções secas são retiradas do café cereja após a colheita, e a camada

externa, polpa, pergaminho, camada de prata e similares são removidos.

"Lavado" é um método para obter grãos de café verde em que o café cereja é mergulhado em um tonel de água após a colheita, impurezas são removidas, e a camada externa e a polpa são removidas usando uma máquina de remoção de polpa, após o qual o café cereja é imerso em água, e materiais glutinosos são dissolvidos e removidos. As porções secas são então retiradas após lavar com água, e o pergaminho e a camada de prata são removidos.

As operações da etapa "Natural" são simples, mas este formato é primeiramente aplicado em regiões que têm um clima seco. Por outro lado, etapa de refinamento "Lavada" é primeiramente aplicada em regiões que têm pancadas de chuva freqüentes. Um ou dois grãos de café são extraídos de um café cereja.

(Substância Nutritiva)

Exemplos da substância nutritiva usada na etapa de fermentação na presente invenção incluem polpa de fruta, sucos de fruta, açúcares, grãos e meios de cultura, mas a substância nutritiva é preferencialmente suco de fruta ou polpa de café. Entretanto, por motivo de conveniência, "polpa de café" na presente invenção refere-se a todas as porções do café cereja (ambas seca e não-seca) a não ser grãos de café verde e a camada externa.

A polpa de café que é usada pode ser aquela do café cereja que não foi submetida a uma etapa de refinamento (uma faca ou similar também pode ser usada para danificar a superfície e expor parcialmente a polpa, se necessário), ou, alternativamente, a polpa obtida pode ser usada quando da separação dos grãos de café verde na etapa de refinamento. A polpa de café pode ser seca ou não-seca. Não apenas a polpa de café, mas polpa de uva, polpa de cereja, polpa de pêssago, ou outra polpa de fruta pode ser usada conforme a necessidade. A polpa de café, bem como estas polpas de fruta, pode ser usada sozinha ou em qualquer combinação desejada.

Suco de fruta (por exemplo, uva, pêssago, ou maçã), açúcares (por exemplo, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos da cana-de-açúcar, batatas-doce ou outras plantas), grãos (por exemplo, "wort" resul-

tante da glicosilação de malte), e meios de cultura podem ser dados como exemplos de substâncias nutritivas a não ser as polpas de fruta acima mencionadas, mas a substância nutritiva não é particularmente limitada contanto que o material possa ser metabolizado pelo microorganismo. A polpa de café, bem como estas substâncias nutritivas, podem ser usadas sozinhas ou em qualquer combinação desejada.

(Métodos de Exposição da Polpa de Café).

Quando o café cereja é usado diretamente e a polpa de café dentro é empregada como a substância nutritiva, um método para exposição da polpa de café em pelo menos uma parte da superfície do café cereja é ideal para aumentar a taxa de fermentação.

O método para expor a polpa de café pode envolver dano no café cereja colhido usando uma lâmina afiada ou similar, ou o café cereja pode ser submetido à pressão usando um aparelho de separação de grãos ou similar de modo que aberturas sejam cortadas na camada externa, mas o dano não deve se estender aos grãos do café verde. Uma máquina de descascamento ou similar também pode ser usada de modo que apenas a camada externa do café cereja seja descascada, e a polpa seja exposta. As operações descritas acima para exposição da polpa não são particularmente necessárias quando o café cereja é acidentalmente danificado e pelo menos parte da polpa exposta durante a colheita. As operações descritas acima para exposição da polpa também não são particularmente necessárias quando a polpa de café, obtida quando da separação dos grãos de café verde na etapa de refinamento, é usada, e fermentação é executada com os grãos de café verde adicionados separadamente.

(Microorganismo para fermentação)

O microorganismo para fermentação usado na presente invenção não é particularmente limitado, contanto que o microorganismo seja capaz de metabolizar (fermentar) substâncias nutritivas tais como aquelas descritas acima no pH de inibição de crescimento (isto é, o microorganismo é resistente ao ácido).

Levedura, bactérias de ácido láctico, e *Deuteromycota* são exem-

plos específicos de microorganismo. Estes microorganismos podem ser idealmente usados por serem facilmente adquiridos e manuseáveis.

Quanto à levedura, leveduras para fermentação tais como leveduras para fermentação de vinho e leveduras para fermentação de cerveja, que têm uma história de uso em produtos alimentícios, podem ser idealmente usadas da perspectiva de segurança alimentar. A levedura para fermentação de vinho usada pode ser, por exemplo, a cepa Lalvin L2323 (referida abaixo como L2323, obtida de Sceti Company) ou a cepa CK S102 (referida abaixo como S102, obtida de Bio Springer), que são leveduras secas comerciais. L2323 é usualmente usada para fermentar vinho tinto, e S102 é usualmente usado para fermentar vinhos rosé. Um aroma fermentado característico pode ser adicionado quando tais leveduras forem usadas.

Bactérias bem-conhecidas usadas na fabricação de leite fermentado, bebidas de bactérias de ácido láctico, queijo de leite fermentado e outros produtos podem ser aplicadas como as bactérias do ácido láctico. Bactérias do ácido láctico do *genus Lactobacillus* são um exemplo perfeito.

Exemplos de *Deuteromycota* incluem membros do *genus Geotrichum*, por exemplo, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum rectangulatum*, *Geotrichum klebahnii* e, mais preferencialmente, *Geotrichum sp.* SAM2421 (número de depósito internacional FERM BP-10300), ou variantes e transformadores dos mesmos.

Exemplos de fontes das quais os microorganismos pertencentes ao *genus Geotrichum* podem ser isolados incluem solo, plantas, ar, fibra, madeira, poeira doméstica, ração animal, rios, ensilagem, alimento, fruta, grão, fertilizante, resíduos de fábricas, composto, excremento e o canal alimentar, mas cereja (café cereja) é preferível.

Exemplos do método de isolamento incluem agitar o café cereja em água esterilizada, cultivar o sobrenadante aplicado em um meio de agar contendo antibióticos apropriados e isolar as colônias que são produzidas, mas os microorganismos também podem ser comprados diretamente de uma instalação de armazenamento de fungo apropriada ou similar.

Variantes na presente invenção incluem cepas que têm muta-

ções espontâneas e cepas obtidas por mutações artificialmente induzidas (usando tratamentos com radiação, mutagênese ou similar) em que a sequência base de DNA mudou com relação ao *Geotrichum sp.* SAM2421 tipo selvagem (número de depósito internacional FERM BP-10300)).

5 (1) Mutação espontânea

Mutação que ocorre quando o microorganismo está crescendo naturalmente em um ambiente normal são chamadas "mutações espontâneas". Acredita-se que as principais causas de mutações espontâneas sejam erros durante a replicação do DNA e mutagênese endógena (análogos de nucleotídeos) (Maki, "Spontaneous Mutations and Repair Mechanisms", Saibo Kagaku (Cell Technology), Vol. 13, nº 8, pp. 663-672, 1994).

(2) Mutação artificial

2.1 Tratamentos usando radiação e mutagêneses

DNA é danificado por luz ultravioleta, raios X e outros tratamentos de radiação, ou por tratamento com mutagênese artificial tal como agentes de alquilação. Este dano é reparado com mutações durante o processo de reparo do DNA.

2.2 Usando métodos de PCR (reação de cadeia polimerase)

Devido ao fato que a PCR amplifica o DNA dentro de um tubo de teste, parte do mecanismo para inibir a mutação dentro da célula estará faltando, e a alta frequência de mutação pode ser induzida. Pela combinação de PCR e o método de misturação de gene (Stemmer, "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling", Nature Vol. 370, pp. 389-391, Aug. 1994), o acúmulo de mutações de dano pode ser evitado, e uma pluralidade de mutações vantajosas pode acumular nos genes.

2.3 Uso de mutantes

A taxa de ocorrência de mutações espontâneas é mantida a um nível extremamente baixo em quase todos os organismos devido a um mecanismo para inibir a mutação. O mecanismo para inibir mutação tem uma pluralidade de estágios envolvendo a participação de 10 ou mais tipos de genes. Mutações ocorrem a uma frequência alta em indivíduos em que um ou uma pluralidade destes genes é destruído. Estes indivíduos são, portanto,

chamados "mutantes". Estes genes são chamados "genes mutantes" (Maki, "Spontaneous Mutations and Repair Mechanism", Saibo Kagaku (Cell Technology), Vol. 13 nº 8, pp. 663-672, 1994; Horst et al., "Escherichia coli mutator genes", Trends in Microbiology Vol. 7 nº 1, pp. 29-36, Jan. 1999).

5 "Transformadores" na presente invenção se referem a cepas em que genes de outro tipo de organismo (genes estrangeiros) são introduzidos artificialmente em novos microorganismos (*Geotrichum* sp. SAM2421 (número de depósito internacional FERM BP-10300)) ou variantes do mesmo. O processo de fabricação envolve, por exemplo, integrar genes estrangeiros
10 em um vetor de expressão apropriado e introduzir o vetor de expressão usando um método de eletroporação, um método de fosfato de cálcio, um método de lipossoma, um método de dextrano DEAE, ou outro método bem-conhecido.

Quando usando um microorganismo seco, re-hidratação pode
15 ser executada de acordo com o método apropriado para cada caso. Por exemplo, quando usando levedura seca, a levedura pode ser usada após ser molhada por 20 a 30 minutos em água aquecida de 37 a 41°C.

A quantidade de microorganismo a ser usada na presente invenção não é particularmente limitada contanto que o efeito de sabor e aroma
20 adicionado seja obtido, mas a quantidade deve ser ajustada enquanto leva em consideração o tempo e custo de cultivo. Quantidades apropriadas por [unidade] peso de grãos de café verde são, por exemplo, $1,0 \times 10^8$ células/g a $1,0 \times 10^{10}$ células/g para levedura e bactérias de ácido láctico, e 1,0 mg/g a 10 mg/g para *Deuteromycota*.

25 (Microorganismos que produzem ácido acético)

Exemplos de microorganismos que produzem ácido acético (bactérias que produzem ácido acético) na presente invenção incluem bactérias de ácido acético do *genus Gluconacetobacter* e o *genus Acetobacter* que tem a habilidade de oxidar álcoois, mas microorganismos que produzem
30 ácido acético na presente invenção não são limitados e também incluem microorganismos capazes de produzir primeiramente ácido acético, mas também outros ácidos orgânicos (por exemplo, ácido cítrico, ácido succínico e

ácido málico), álcoois e vários outros compostos orgânicos.

(Etapa de regulagem de pH)

5 A faixa de pH que é capaz de inibir o crescimento de microorganismos que produzem ácido acético quando colocam o microorganismo para fermentação em contato com a substância nutritiva na etapa de fermentação da presente invenção é preferencialmente pH 2 a 5, com pH 2,4 a 4,7 sendo particularmente preferível. Portanto, o pH é preferencialmente regulado usando um agente de regulagem de pH quando o ambiente em que se coloca a substância nutritiva e o microorganismo para fermentação em contato um com o outro não está dentro desta faixa de pH.

10 Exemplos de agentes de regulagem de pH incluem ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico fosfórico, e outros ácidos, mas ácido láctico ou ácido fosfórico é preferível. Outros agentes de regulagem podem envolver o uso de sais destes ácidos ou de soluções tampões contendo esses ácidos e seus sais.

15 A etapa de regulagem de pH pode ser implementada antes ou depois da substância nutritiva e o microorganismo para fermentação serem colocados em contato um com o outro. A etapa de regulagem de pH é preferencialmente implementada antes da substância nutritiva e o microorganismo para fermentação serem colocados em contato um com o outro, pelo qual a etapa de fermentação pode ser iniciada em um estado em que o crescimento de bactérias de contaminação é limitado quando da iniciação de contato entre a substância nutritiva e o microorganismo para fermentação.

(Etapa de Fermentação)

25 1. Método para colocar o microorganismo e a substância nutritiva em contato

Exemplos de métodos para colocar o microorganismo e a substância nutritiva em contato na etapa de fermentação da presente invenção são dados abaixo.

30 (a) Método direto

O método direto envolve colocar o microorganismo em contato direto com a substância nutritiva na presença dos grãos de café verde. Con-

tato direto e fermentação são implementados quando, por exemplo, uma suspensão, que tem o microorganismo para fermentação suspenso em água que foi regulado ao pH de inibição de crescimento usando uma faca ou similar e uma parte da polpa do café foi exposta (ou alternativamente, em uma
5 mistura de grãos de café verde e polpa de café obtidos quando da separação dos grãos de café verde na etapa de refinamento). Alternativamente, uma suspensão é preparada, em que o microorganismo para fermentação é suspenso em uma pequena concentração em uma quantidade relativamente grande de água (por exemplo, uma quantidade correspondendo a aproxima-
10 damente o mesmo peso do café cereja), o agente de regulação do pH é adicionado à suspensão, e o pH da suspensão é regulado ao pH de inibição de crescimento. O café cereja a ser fermentado é então imerso na e removido da suspensão e depois colocado em contato [com o microorganismo para fermentação], após tal fermentação ser executada.

15 Particularmente quando a fermentação é executada usando café cereja no qual parte da polpa é exposta, o microorganismo infiltra facilmente o café cereja das porções expostas. Os açúcares metabolizados e similares são localizados na polpa em altas concentrações, e, portanto, fermentação prossegue eficazmente, e os grãos de café verde estão presentes bem per-
20 to, permitindo os álcoois, ésteres, e outros componentes fermentados produzidos pela fermentação serem rapidamente transferidos para os grãos de café verde. Fermentação também pode ser executada com uma quantidade apropriada de água quando usando café cereja seco (ou polpa de café seca).

25 (b) Método indireto

O método indireto envolve preparar um tonel para fermentação provido com um líquido para fermentação que é regulado ao pH de inibição de crescimento usando o agente de regulação de pH. Os grãos de café verde, a substância nutritiva e o microorganismo para fermentação são adicionados à solução para fermentação, e o microorganismo para fermentação é
30 colocado em contato com a substância nutritiva que dissolve no líquido para fermentação. Por exemplo, microorganismo para fermentação e o café cere-

ja, em que a superfície foi danificada usando uma faca ou similar e a parte da polpa do café foi exposta (ou, alternativamente, uma mistura de grãos de café verde e polpa de café obtidos quando da separação dos grãos de café verde na etapa de refinamento), são adicionados ao líquido para fermentação que já foi regulado ao pH de inibição de crescimento, e a fermentação e executada. A polpa é exposta neste instante, e, portanto, os açúcares e similares na polpa serão facilmente dissolvidos no líquido para fermentação, e fermentação pelo microorganismo para fermentação será facilitada.

A fim de evitar a contaminação com bactérias (incluindo as bactérias que produzem ácido acético) na etapa de fermentação da presente invenção, a fermentação pode também ser realizada ao controlar as condições tais como temperatura, concentração de dióxido de carbono, e os similares individualmente ou em qualquer combinação apropriada de modo a limitar o crescimento de bactérias de contaminação. Por exemplo, a fermentação pode ser realizada em um ambiente de baixa temperatura de 15 a 30°C, ou a concentração de dióxido de carbono (ou a concentração de oxigênio) pode ser elevada e a fermentação implementada sob condições mais anaeróbicas (ou mais aeróbicas).

A etapa de fermentação da presente invenção pode também ser realizada usando o equipamento ou aparelhos (por exemplo, tonéis, tanques, e recipientes de temperatura constante) que permitem o controle automático e/ou manual das condições de fermentação acima mencionadas (por exemplo, o tipo e quantidade (o número inicial de células) de microorganismo usado, o tipo e quantidade (concentração) da substância nutritiva, a temperatura, a umidade, o pH, a concentração de oxigênio ou dióxido de carbono, e o tempo de fermentação).

O tempo requerido para a etapa de fermentação não é limitado, mas deve ser apropriadamente selecionado de acordo com o tipo e a resistência do flavorizante e do aroma adicionados ou de acordo com o microorganismo e a substância nutritiva. A depleção da substância nutritiva pode também ser usada como uma indicação para a finalização da etapa de fermentação.

A etapa de fermentação pode ser finalizada ao implementar esterilização por calor, "lavada", secagem a sol, separação da substância nutritiva e dos grãos de café verde, torrefação, ou outros tratamentos sozinhos ou em qualquer combinação desejada. Ao usar, por exemplo, um secador, a
5 secagem é realizada a 50 até 60°C por aproximadamente 1 a 3 dias, pelo que a fermentação pode ser finalizada.

Os microorganismos (dois ou mais tipos de microorganismos podem ser selecionados e usados simultaneamente) e as condições de fermentação são todos apropriadamente selecionados e combinados como de-
10 sejado na presente invenção, pelo que uma variedade de flavorizantes e aromas pode ser adicionada aos grãos de café verde.

3. Etapa de fermentação exemplificativa

Um exemplo de fermentação usando café cereja será agora descrito.

15 A presente invenção pode compreender a realização da etapa de fermentação durante a etapa de refinamento dos grãos de café cereja.

A etapa "natural" envolve, por exemplo, a colheita do café cereja, colocando o café cereja em contato com o microorganismo de fermentação usando o método direto acima descrito, realizando a fermentação e a
20 seguir a secagem.

A etapa "lavada" envolve, por exemplo, a colheita do café cereja, a imersão do café cereja em um tonel de água e a remoção de impurezas ao usar um agente de ajuste de pH apropriado para ajustar o pH da água no tonel ao pH de inibição de crescimento, usando o método direto descrito a-
25 cima para adicionar o microorganismo de fermentação e o café cereja ao tonel de água (tonel de fermentação), e a realização da fermentação.

A presente invenção pode também compreender a realização da fermentação usando o método direto para expor a polpa quando o café cereja ainda está vivo na árvore antes da colheita.

30 Após a etapa de fermentação ter sido finalizada, o microorganismo de fermentação é lavado e separado do café cereja usando água ou o similar, após o que a polpa é removida de acordo com uma etapa de refina-

mento normal, a cereja é descascada, e os grãos de café verde são separados. A polpa pode ser também removida com o microorganismo de fermentação ainda fixado.

Os grãos de café verde que foram, assim, separados podem ser
5 torrados usando métodos normais. Os grãos de café torrados podem ser obtidos tendo uma variedade de graus diferentes de torrefação (de torrefação leve a italiana).

Os grãos de café torrados resultantes são moídos e embebidos em água, a qual é a seguir extraída através de filtração por material de filtra-
10 ção. O líquido resultante pode ser provido como café regular para o consumo ou pode ser usado como uma matéria-prima industrial para café instantâneo, extratos de café, café enlatado, ou similares.

A presente invenção será descrita em mais detalhes abaixo usando exemplos, mas a presente invenção não está limitada a estes exem-
15 plos.

Exemplo 1

Os efeitos da adição de ácido láctico foram investigados ao usar mosto (a matéria-prima líquida para fermentar o vinho) como a substância nutritiva.

20 Uma solução concentrada de uvas vermelhas chilenas foi diluída em água em um frasco cônico tendo um volume de 2000 ml, e 1000 g de um mosto vermelho tendo uma gravidade específica de 1.084 (15°C) foram adicionados. O pH do mosto vermelho resultante líquido foi 5,0. O pH alcançou 4,0 quando uma quantidade de 730 ppm de ácido láctico foi adicionada a este
25 líquido (amostra 1). Um mosto vermelho líquido ao qual o ácido láctico não foi adicionado foi preparado como um controle (exemplo comparativo 1).

Geotrichum sp. SAM2421 (número de depósito internacional FERM BP-10300; "SAM2421") tendo um peso seco de 0,1 g foi usado como o microorganismo de fermentação e foi re-hidratado e adicionado de acordo
30 com os métodos padrão. 300 g de grãos de café verde (Santos NO. 2, feitos no Brasil) foram a seguir adicionados, e a mistura foi deixada descansar e fermentar por 72 horas a 23°C.

As observações do líquido de fermentação após 72 horas mostraram que, na amostra (amostra 1) à qual o ácido láctico foi adicionado, o crescimento de organismos diferentes de SAM2421 não foi aparente, e o líquido de fermentação apresentou um aroma favorável.

5 Por outro lado, o crescimento de microorganismos que se imaginava serem bactérias de contaminação foi visto na fase final de fermentação da amostra (exemplo comparativo 1) obtida pelo mesmo método, exceto pelo fato de que o ácido láctico não foi adicionado. Um odor levemente ácido foi reconhecido em adição ao aroma fermentado favorável.

10 O sobrenadante do líquido de fermentação resultante foi a seguir mostrado e submetido à análise de componente. Visto que as bactérias que produzem o ácido acético são representativas das bactérias de contaminação que têm efeitos adversos na qualidade dos grãos de café, a concentração do ácido acético no sobrenadante foi analisada usando a cromatografia
15 líquida, e uma determinação foi feita em relação a quando as bactérias que produzem o ácido acético estavam sendo desenvolvidas ou não (isto é, um julgamento foi feito em relação a quando a quantidade de produção de ácido acético e a concentração de ácido acético aumentaram durante o crescimento das bactérias que produzem o ácido acético). Além disso, o ácido pirúvico,
20 o qual é um componente fermentado, foi usado como um marcador para determinar a qualidade do crescimento de SAM2421. A concentração de ácido pirúvico no sobrenadante foi medida e avaliada usando cromatografia líquida (isto é, um julgamento foi feito em relação a quando a quantidade de produção de ácido pirúvico e a concentração de ácido pirúvico aumentaram duran-
25 te o crescimento de SAM2421).

O aparelho usado para a cromatografia líquida foi um aparelho do tipo HPLC feito por Shimadzu Corporation. Um pacote Shim SCR-102H foi usado como a coluna, e a detecção foi realizada usando um detector de condutividade elétrica CDD-6A. A temperatura do forno da coluna foi de
30 40°C, e a reação e a eluição foram realizadas usando um tampão Tris contendo ácido p-toluenossulfônico. A quantificação foi realizada usando uma curva de calibração absoluta. Os resultados da cromatografia líquida são

mostrados nas tabelas 1 e 2 abaixo.

Tabela 1

Composto	Amostra 1	Exemplo comparativo 1
Ácido acético (ppm)	1100	1945

Tabela 2

Composto	Amostra 1	Exemplo comparativo 1
Ácido pirúvico (ppm)	95	31

5 A amostra à qual o ácido láctico foi adicionado, portanto, tinha uma concentração mais baixa de ácido acético e uma concentração mais alta de ácido pirúvico do que a do exemplo comparativo. Em outras palavras, foi visto que o crescimento de bactérias de contaminação é limitado, e o crescimento e a fermentação de microorganismos adicionados intencionalmente (microorganismos de fermentação) são promovidos pela adição do

10 ácido láctico ao líquido de fermentação.

Os grãos de café torrados foram avaliados a seguir. Os grãos de café verde foram recuperados do líquido de fermentação após a fermentação e descartados. Os sólidos foram a seguir lavados e, desse modo, removidos usando uma quantidade equivalente de água deionizada, e aproximadamente 300 g de grãos de café verde foram obtidos, 100 g dos grãos de café verde resultantes foram torrados ao pressionar o botão de torrefação profunda em um torrefator de grãos de café doméstico completamente automático (um CRPA-100 feito por Tortoise Co., Ltd.). O tempo de torrefação foi de aproximadamente 25 minutos. Uma avaliação sensorial foi a seguir

15 realizada nos grãos de café torrados por um painel de cinco especialistas na avaliação do café. 30 g dos grãos de café torrados tanto da amostra 1 como do exemplo comparativo 1 foram colocados em vidros de amostragem especializados em sua forma original não moída, e os vidros foram cobertos. As coberturas foram removidas no momento da avaliação sensorial, e uma avaliação foi feita quanto a dois tipos de aroma, isto é, um aroma estérico e um

20 aroma de ácido acético. As avaliações foram feitas em incrementos de 0,5 usando cinco níveis: fraco (1), um pouco fraco (2), moderado (3), um pouco

25

forte (4), e forte (5). Os resultados, os quais são expressos como os valores médios das cinco avaliações, são mostrados na tabela 3. Os grãos de café torrados da amostra 1 tinham um aroma mais favorável do que aquele do exemplo comparativo 1.

5 Tabela 3

Avaliação		Amostra 1	Exemplo Comparativo 1
Aroma	Aroma Estérico	3,8	3,5
	Odor de ácido acético	3,5	4,0

Os extratos de café foram preparados usando os grãos de café torrados da amostra 1 e o exemplo comparativo 1. Os grãos de café torrados foram finamente moídos. 100 g de água quente foram adicionados e agitados com 12 g de grãos moídos. O café que flutuava no topo foi removido, e uma avaliação sensorial foi realizada no fluido sobrenadante de acordo com um método de teste de bebida aromatizada padrão. A avaliação sensorial foi realizada por um painel de cinco especialistas de café. Existiam quatro categorias de avaliação: aroma (aroma estérico e aroma fermentado) e sabor (corpo e acidez). A avaliação foi de extremamente fraco (1) a extremamente forte (5) em incrementos de 0,1. Os resultados, os quais são expressos como os valores médios das cinco avaliações, são mostrados na tabela 4. O extrato de café do exemplo 1 tinha um aroma e um sabor mais favoráveis do que aqueles do exemplo comparativo 1.

Tabela 4

Avaliação		Amostra 1	Exemplo Comparativo 1
Aroma	Aroma Estérico	4,0	3,5
	Aroma Fermentado	4,2	3,1
Sabor	Corpo	4,0	3,5
	Acidez	2,2	3,5

20 Exemplo 2

Uma investigação foi realizada sobre os efeitos da adição de ácido láctico ao usar o café cereja. 1000 g de café cereja (cultivados no distrito de Okinawa) foram introduzidos em um frasco cônico tendo um volume de 5000 ml, e 1000 ml de água foram adicionados. O pH neste ponto era de 5,5. Uma quantidade de 3000 ppm de ácido láctico foi adicionada à mistura

resultante, e o pH foi ajustado a 2,6 (amostra 2). Uma mistura à qual o ácido láctico não foi adicionado foi preparada como um controle (exemplo comparativo 2).

5 *Geotrichum* sp. SAM2421 (número de depósito internacional FERM BP-10300) tendo um peso seco de 1 g foi usado como o microorganismo de fermentação e foi re-hidratado e adicionado de acordo com métodos padrão. A mistura foi deixada repousar e fermentar por 72 horas a 23°C. As observações do líquido de fermentação após 72 horas mostrou que, na amostra (amostra 2) à qual o ácido láctico foi adicionado, o crescimento de
10 organismos que não SAM2421 não era aparente, e que o líquido de fermentação apresentava um aroma favorável.

Por outro lado, o crescimento de microorganismos que se pensava serem bactérias de contaminação foi visto na fase final de fermentação da amostra (exemplo comparativo 2) obtida pelo mesmo método, exceto pelo
15 fato de que o ácido láctico não foi adicionado. Um sabor levemente ácido foi reconhecido em adição ao aroma fermentado favorável.

O sobrenadante do líquido de fermentação resultante foi a seguir amostrado por um período suplementar (a 24 horas, 48 horas, e 72 horas) e submetido à análise do componente.

20 Visto que as bactérias que produzem ácido acético são representativas das bactérias de contaminação que têm efeitos adversos sobre a qualidade dos grãos de café, como no exemplo 1, a concentração do ácido acético no sobrenadante foi analisada usando a cromatografia líquida, e uma determinação foi feita em relação a quando as bactérias que produzem o
25 ácido acético estavam sendo desenvolvidas. Além disso, o ácido pirúvico, o qual é um componente fermentado, foi usado como um marcador para a determinação da qualidade do crescimento de SAM2421. A concentração do ácido pirúvico no sobrenadante foi medida e avaliada usando cromatografia líquida.

30 O aparelho usado para a análise da cromatografia líquida foi um aparelho do tipo HPLC feito pela corporação Shimadzu. Um pacote Shim SCR-102H foi usado como a coluna, e a detecção foi realizada usando um

detector de condutividade elétrica CDD-6A. A temperatura do forno da coluna foi de 40°C, e a reação e a eluição foram realizadas usando um tampão Tris contendo ácido p-toluenossulfônico. A quantificação foi realizada usando uma curva de calibração absoluta. Os resultados da cromatografia líquida

5 são mostrados nas tabelas 5 e 6 abaixo.

Tabela 5

Tempo de Fermentação	Concentração de ácido acético (ppm)	
	Amostra 2	Exemplo Comparativo 2
24 horas	50	171
48 horas	296	599
72 horas	1877	3372

Tabela 6

Tempo de Fermentação	Concentração de ácido pirúvico (ppm)	
	Amostra 2	Exemplo Comparativo 2
24 horas	21	6
48 horas	55	16
72 horas	61	35

A amostra à qual o ácido láctico foi adicionado, portanto, tinha uma concentração mais baixa de ácido acético e uma concentração mais

10 alta de ácido pirúvico do que o exemplo comparativo. Em outras palavras, foi visto que o crescimento de bactérias de contaminação é limitado, e o crescimento e fermentação de microorganismos adicionados intencionalmente (microorganismos de fermentação) são promovidos pela adição de ácido láctico ao líquido de fermentação.

15 Os grãos de café torrados foram avaliados a seguir. O café cereja foi recuperado do líquido de fermentação após a fermentação, descartados e a seguir secados por 48 horas a 55 °C usando um secador. A polpa e a pele foram a seguir removidos usando uma máquina de fazer polpa, e aproximadamente 250 g de grãos de café verde foram obtidos. 100 g dos

20 grãos de café verde resultantes foram torrados ao pressionar o botão de torrefação profunda em um torrefator de grãos de café doméstico completamente automático (um CRPA-100 feito por Tortoise Co., Ltd.). O tempo de torrefação foi de aproximadamente 25 minutos.

Uma avaliação sensorial foi a seguir realizada nos grãos de café torrados por um painel de cinco especialistas na avaliação do café. 30 g dos grãos de café torrados tanto da amostra 2 como do exemplo comparativo 2 foram colocados em vidros de amostragem especializados em sua forma original não moída, e os vidros foram cobertos. As coberturas foram removidas no momento da avaliação sensorial, e uma avaliação foi feita quanto a dois tipos de aroma, isto é, um aroma estérico e um odor de ácido acético. As avaliações foram feitas em incrementos de 0,5 usando cinco níveis: fraco (1), um pouco fraco (2), moderado (3), um pouco forte (4), e forte (5). Os resultados, os quais são expressos como os valores médios das cinco avaliações, são mostrados na tabela 7. Os grãos de café torrados da amostra 2 tinham um aroma mais favorável do que aquele do exemplo comparativo 2.

Tabela 7

Avaliação		Amostra 2	Exemplo Comparativo 2
Aroma	Aroma Estérico	4,0	3,8
	Odor de ácido acético	3,2	3,8

Os extratos de café foram preparados usando os grãos de café torrados da amostra 2 e o exemplo comparativo 2. Os grãos de café torrados foram finamente moídos. 100 g de água quente foram adicionados a e agitados com 12 g de grãos moídos. O café que flutuava no topo foi removido, e uma avaliação sensorial foi realizada no fluido sobrenadante de acordo com um método de teste de bebida aromatizada padrão. A avaliação sensorial foi realizada por um painel de cinco especialistas de café. Existiam quatro categorias de avaliação: aroma (aroma estérico e aroma fermentado) e sabor (corpo e acidez). A avaliação foi de extremamente fraco (1) a extremamente forte (5) em incrementos de 0,1. Os resultados, os quais são expressos como os valores médios das cinco avaliações, são mostrados na tabela 8. O extrato de café do exemplo 2 tinha um aroma e um sabor mais favoráveis do que aqueles do exemplo comparativo 2.

Tabela 8

Avaliação		Amostra 2	Exemplo Comparativo 2
Aroma	Aroma Estérico	4,2	3,5
	Aroma Fermentado	4,5	3,3
Sabor	Corpo	4,5	3,5
	Acidez	2,2	4,0

Exemplo 3

O efeito da adição de ácido láctico foi verificado ao usar café cereja congelado desenvolvido no México. Uma levedura de vinho seco comercial foi usada como o microorganismo de fermentação e foi fermentada usando o método direto. 15 g da levedura de vinho seco (Lalvin L2323, adquirida de Sceti Company), foram reidratados, ativados, e a seguir inoculados em 1000 ml de água. A seguir, 1 kg do café cereja mexicano descongelado foi adicionado e trazido em contato com a levedura. O café cereja foi a seguir separado da solução de fermentação usando um coador movido para uma garrafa tendo um volume de 2 L, e deixado repousar. A fermentação foi realizada por três dias. Uma mistura (amostra 3), na qual 3000 mg do ácido láctico foram adicionados à solução de fermentação (1 l), foi adicionada como um lote experimental para a verificação [o efeito de] da adição de ácido láctico. O pH da solução de fermentação após a adição do café cereja foi de 5,8 na mistura à qual o ácido láctico não foi adicionado (exemplo comparativo 3) e de 4,7 na mistura à qual 3000 ppm de ácido láctico foram adicionados (amostra 3).

A quantidade de ácido láctico contida na polpa do café cereja obtido no exemplo comparativo 3 e a amostra 3 no final da fermentação foram avaliados.

A polpa foi removida do café cereja (3 a 5 pedaços) obtido no exemplo comparativo 3 e a amostra 3 após a fermentação foi finalizada. O suco espremido da polpa foi diluído em água por um fator de 20, e uma solução de suco de fruta diluído foi preparada. A concentração (ppm) de ácido acético na solução de suco de fruta diluído foi a seguir medida usando cromatografia líquida.

O aparelho usado para a análise da cromatografia líquida foi um

aparelho do tipo HPLC feito por Shimadzu Corporation. Um pacote Shim SCR-102H foi usado como a coluna, e a detecção foi realizada usando um detector de condutividade elétrica CDD-6A. A temperatura do forno da coluna foi 40 °C, e a reação e a eluição foram realizadas usando um tampão Tris contendo ácido p-toluenossulfônico. A quantificação foi realizada usando uma curva de calibração absoluta.

Tabela 9

Composição	Exemplo Comparativo 3	Amostra 3
Ácido acético (ppm)	12710	1267

A quantidade de produção do ácido acético e a quantidade de ácido acético contidas na polpa irão aumentar quando as bactérias que produzem ácido acético (representativas das bactérias de contaminação que têm efeitos adversos sobre a qualidade dos grãos de café) se desenvolverem dentro do café cereja. Como um resultado, a concentração de ácido acético no suco irá aumentar. A concentração de ácido acético na polpa do exemplo comparativo 3 foi extremamente alta em comparação à concentração de ácido acético na polpa da amostra 3. Pode-se ver, portanto, que o crescimento de bactérias que produzem o ácido acético é inibido na amostra 3 neste exemplo, de forma mais apropriada.

Os grãos de café torrados foram avaliados a seguir. Uma máquina de fazer polpa foi usada para remover a polpa e a pele do café cereja descrito acima após a fermentação, e aproximadamente 250 g de grãos de café verde foram obtidos. 100 g dos grãos de café verde resultantes foram torrados ao pressionar o botão de torrefação profunda em um torrefator de grãos de café doméstico completamente automático (um CRPA-100 feito por Tortoise Co., Ltd.). O tempo de torrefação foi de aproximadamente 25 minutos. Uma avaliação sensorial foi a seguir realizada nos grãos de café torrados por um painel de cinco especialistas na avaliação do café. 30 g dos grãos de café torrados tanto da amostra 3 como do exemplo comparativo 3 foram colocados em vidros de amostragem especializados em sua forma original não moída, e os vidros foram cobertos. As coberturas foram removidas no momento da avaliação sensorial, e uma avaliação foi feita quanto a dois tipos

- de aroma, isto é, um aroma estérico e um odor de ácido acético. As avaliações foram feitas em incrementos de 0,5 usando cinco níveis: fraco (1), um pouco fraco (2), moderado (3), um pouco forte (4), e forte (5). Os resultados, os quais são expressos como os valores médios das cinco avaliações, são mostrados na tabela 10. Os grãos de café torrados da amostra 3 tinham um aroma mais favorável do que aquele do exemplo comparativo 3.

Tabela 10

Avaliação	Exemplo Comparativo 3	Amostra 3
Aroma Estérico	3,0	3,8
Odor de ácido acético	4,5	3,5

- Os extratos de café foram preparados usando os grãos de café torrados do exemplo comparativo 3 e da amostra 3. Os grãos de café torrados foram finamente moídos. 100 g de água quente foram adicionados a e agitados com 12 g de grãos moídos. O café que flutuava no topo foi removido, e uma avaliação sensorial foi realizada no fluido sobrenadante de acordo com um método de teste de bebida aromatizada padrão. A avaliação sensorial foi realizada por um painel de cinco especialistas de café. Existiam quatro categorias de avaliação: aroma (aroma estérico e aroma fermentado) e sabor (corpo e acidez). A avaliação foi de extremamente fraco (1) a extremamente forte (5) em incrementos de 0,1. Os resultados, os quais são expressos como os valores médios das cinco avaliações, são mostrados na tabela 11. O extrato de café da amostra 3 tinha um aroma e um sabor mais favoráveis do que aqueles do exemplo comparativo 3.

Tabela 11

Avaliação	Exemplo Comparativo 3	Amostra 3
Aroma Estérico	3,2	3,8
Aroma Fermentado	3,5	4,5
Corpo	3,0	3,5
Acidez	4,5	3,5

Exemplo 4

- Uma investigação foi realizada sobre os efeitos da adição de ácido fosfórico ao usar o café cereja. 1000 g de café cereja (cultivados no distrito de Okinawa) foram introduzidos em um frasco cônico tendo um volu-

me de 3000 ml, e 1000 ml de água foram adicionados. O pH neste ponto era de 5,5. Uma quantidade de 3000 ppm de ácido fosfórico foi adicionada à mistura resultante, e o pH foi ajustado a 2,4 (amostra 4). Uma mistura à qual o ácido fosfórico não foi adicionado foi preparada como um controle (exemplo comparativo 4).

Geotrichum sp. IAM12700 (adquirido do Institute of Molecular and Cellular Biosciences na Universidade de Tóquio; "IAM12700") tendo um peso seco de 1 g foi usado como o microorganismo de fermentação e foi reidratado e adicionado de acordo com métodos padrão. A mistura foi deixada repousar e fermentar por 72 horas a 23 °C. As observações do líquido de fermentação após 72 horas mostraram que, na amostra (amostra 2) à qual o ácido fosfórico foi adicionado, o crescimento de organismos que não IAM12700 não era aparente, e que o líquido de fermentação apresentava um aroma favorável.

Por outro lado, o crescimento de microorganismos que se pensava serem bactérias de contaminação foi visto na fase final de fermentação da amostra (exemplo comparativo 4) obtida pelo mesmo método, exceto pelo fato de que o ácido fosfórico não foi adicionado. Um sabor levemente ácido foi reconhecido em adição ao aroma fermentado favorável.

O sobrenadante do líquido de fermentação resultante foi a seguir amostrado, e a composição final do líquido foi analisada. Visto que as bactérias que produzem ácido acético são representativas das bactérias de contaminação que têm efeitos adversos sobre a qualidade dos grãos de café, como no exemplo 1, as concentrações do ácido fosfórico e do ácido acético no sobrenadante foram analisadas usando a cromatografia líquida, e uma determinação foi feita em relação a quando as bactérias que produzem o ácido acético estavam sendo desenvolvidas.

O aparelho usado para a análise da cromatografia líquida foi um aparelho do tipo HPLC feito pela corporação Shimadzu. Um pacote Shim SCR-102H foi usado como a coluna, e a detecção foi realizada usando um detector de condutividade elétrica CDD-6A. A temperatura do forno da coluna foi de 40 °C, e a reação e a eluição foram realizadas usando um tampão

Tris contendo ácido p-toluenossulfônico. A quantificação foi realizada usando uma curva de calibração absoluta. Os resultados da cromatografia líquida são mostrados na tabela 12.

Tabela 12

Composto	Exemplo Comparativo 4	Amostra 4
Ácido fosfórico (ppm)	351	1666
Ácido acético (ppm)	1827	1079

- 5 Pode-se ver, portanto, que o crescimento de bactérias de contaminação foi limitado na amostra (amostra 4) à qual o ácido fosfórico foi adicionado, e que a concentração de ácido acético foi menor (isto é, a quantidade de produção de ácido acético foi menor) na amostra 4 do que no exemplo comparativo 4.
- 10 Os grãos de café torrados foram avaliados a seguir. O café cereja foi recuperado do líquido de fermentação após a fermentação, descartado, e a seguir seco por 48 horas a 55 °C usando um secador. A polpa e a pele foram a seguir removidos usando uma máquina de fazer polpa, e aproximadamente 250 g de grãos de café verde foram obtidos. 100 g dos grãos de
- 15 café verde resultantes foram torrados ao pressionar o botão de torrefação profunda em um torrefator de grãos de café doméstico completamente automático (um CRPA-100 feito por Tortoise Co., Ltd.). O tempo de torrefação foi de aproximadamente 25 minutos. Uma avaliação sensorial foi a seguir realizada nos grãos de café torrados por um painel de cinco especialistas na
- 20 avaliação do café. 30 g dos grãos de café torrados tanto do exemplo comparativo 4 como da amostra 4 foram colocados em vidros de amostragem especializados em sua forma original não moída, e os vidros foram cobertos. As coberturas foram removidas no momento da avaliação sensorial, e uma avaliação foi feita quanto a dois tipos de aroma, isto é, um aroma estérico e
- 25 um odor de ácido acético. As avaliações foram feitas em incrementos de 0,5 usando cinco níveis: fraco (1), um pouco fraco (2), moderado (3), um pouco forte (4), e forte (5). Os resultados, os quais são expressos como os valores médios das cinco avaliações, são mostrados na tabela 13. Os grãos de café torrados da amostra 4 tinham um aroma mais favorável do que aquele do

exemplo comparativo 4.

Tabela 13

Avaliação	Exemplo Comparativo 4	Amostra 4
Aroma Estérico	3,5	3,8
Odor de ácido acético	4,0	3,5

Os extratos de café foram preparados usando os grãos de café torrados do exemplo comparativo 4 e da amostra 4. Os grãos de café torrados foram finamente moídos. 100 g de água quente foram adicionados a e agitados com 12 g de grãos moídos. O café que flutuava no topo foi removido, e uma avaliação sensorial foi realizada no fluido sobrenadante de acordo com um método de teste de bebida aromatizada padrão. A avaliação sensorial foi realizada por um painel de cinco especialistas de café. Existiam quatro categorias de avaliação: aroma (aroma estérico e aroma fermentado) e sabor (corpo e acidez). A avaliação foi de extremamente fraco (1) a extremamente forte (5) em incrementos de 0,1. Os resultados, os quais são expressos como os valores médios das cinco avaliações, são mostrados na tabela 14. O extrato de café da amostra 4 tinha um aroma e um sabor mais favoráveis do que aqueles do exemplo comparativo 4.

Tabela 14

Avaliação	Exemplo Comparativo 4	Amostra 4
Aroma Estérico	3,5	4,5
Aroma Fermentado	3,0	3,0
Corpo	2,0	3,5
Acidez	4,0	3,5

Aplicabilidade Industrial

A presente invenção é extremamente útil como o início de operações para o processamento do café cereja, por exemplo, para o refinamento e a torrefação, assim como para as operações para a fabricação de bebidas de café nas quais uma variedade de produtos (café regular, café instantâneo, café enlatado, aroma de café, e os similares) é fabricada após a torrefação dos grãos de café verde tratados usando a presente invenção. A presente invenção também contribui para o desenvolvimento adicional de tais indústrias.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento de grãos de café verde, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 uma etapa de fermentação para a realização da fermentação ao colocar uma substância nutritiva e um microorganismo de fermentação em contato um com o outro e a seguir suprir os componentes de fermentação assim formados aos grãos de café verde, em que

10 na etapa de fermentação, a substância nutritiva e o microorganismo de fermentação são colocados em contato um com o outro em uma faixa de pH para a inibição do crescimento de microorganismos que produzem o ácido acético.

15 2. Método de tratamento de grãos de café verde de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os grãos de café verde estão em pelo menos um estado dentre um estado de isolamento do café cereja ou um estado de estar dentro do café cereja.

3. Método de tratamento de grãos de café verde de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o pH é pH 2,4 a 4,7.

20 4. Método de tratamento de grãos de café verde de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de regulação de pH para o uso de um agente de regulação de pH e regulação do pH a uma faixa dentro daquela mencionada acima.

5. Método de tratamento de grãos de café verde de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o agente de regulação de pH é pelo menos um dentre ácido láctico e ácido fosfórico.

25 6. Método de tratamento de grãos de café verde de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o microorganismo de fermentação é de pelo menos um tipo selecionado dentre o grupo composto de levedura, bactérias do ácido láctico e *Deuteromycota*.

30 7. Método de tratamento de grãos de café verde de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a levedura é uma levedura de fermentação do vinho.

8. Método de tratamento de grãos de café verde de acordo com

a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a *Deuteromycota* pertence ao gênero *Geotrichum*.

5 9. Método de tratamento de grãos de café verde de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a *Deuteromycota* pertencente ao gênero *Geotrichum* é *Geotrichum sp.* SAM2421 (número do depósito internacional FERM BP-10300), uma variante da mesma, ou uma transformante da mesma.

10 10. Método de tratamento de grãos de café verde de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a substância nutritiva é suco de fruta ou polpa de café.

11. Grãos de café verde, caracterizados pelo fato de que são obtidos usando o método de tratamento de grãos de café verde como definido na reivindicação 1 ou 2.

15 12. Grãos de café torrados, caracterizados pelo fato de que são resultantes da torrefação dos grãos de café verde como definidos na reivindicação 11.

13. Bebida de café, caracterizada pelo fato de que é obtida usando os grãos de café torrados como definidos na reivindicação 12, como uma matéria-prima.

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO DE TRATAMENTO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE, GRÃOS DE CAFÉ VERDE, GRÃOS DE CAFÉ TORRADOS E BEBIDA DE CAFÉ"**.

- 5 A presente invenção refere-se a um método de tratamento de grãos de café verde por meio do qual a contaminação com as bactérias, que produzem o ácido acético, possa ser evitada durante a fermentação dos grãos de café verde com um microorganismo e um novo e favorável sabor possa ser conferido a uma bebida de café. Esse objetivo pode ser alcançado
- 10 por um método de tratamento de grãos de café verde o qual compreende a etapa de fermentação de fermentar o material a ser assimilado ao colocá-lo em contato com um microorganismo para o tratamento de fermentação e a seguir o suprimento do componente fermentado, assim formado, aos grãos de café verde, em que o material a ser assimilado é contatado com o micro-
- 15 organismo para o tratamento de fermentação dentro de um pH tal qual o da inibição do crescimento das bactérias capazes de formar o ácido acético.

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO DE TRATAMENTO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE SOB REGULAÇÃO DE pH".

A presente invenção refere-se a um método de tratamento de grãos de café verde por meio do qual a contaminação com as bactérias, que produzem o ácido acético, possa ser evitada durante a fermentação dos grãos de café verde com um microorganismo e um novo e favorável sabor possa ser conferido a uma bebida de café. Esse objetivo pode ser alcançado por um método de tratamento de grãos de café verde o qual compreende a etapa de fermentação de fermentar o material a ser assimilado ao colocá-lo em contato com um microorganismo para o tratamento de fermentação e a seguir o suprimento do componente fermentado, assim formado, aos grãos de café verde, em que o material a ser assimilado é contatado com o microorganismo para o tratamento de fermentação dentro de um pH tal qual o da inibição do crescimento das bactérias capazes de formar o ácido acético.