



DELANE PATEZ PORTO

**MULTIPLICAÇÃO DE LEVEDURA EM
ESCALA SEMI INDUSTRIAL
PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS
AGRÍCOLAS: CAFÉ**

LAVRAS – MG

2021

DELANE PATEZ PORTO

**MULTIPLICAÇÃO DE LEVEDURA EM ESCALA SEMI
INDUSTRIAL PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS
AGRÍCOLAS: CAFÉ**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do curso
de Ciências Biológicas, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dra. Rosane Freitas Schwan

Orientador

Dra. Nádia Nara Batista

Coorientadora

LAVRAS – MG

2021

DELANE PATEZ PORTO

**MULTIPLICAÇÃO DE LEVEDURA EM ESCALA SEMI
INDUSTRIAL PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS
AGRÍCOLAS: CAFÉ**

**MULTIPLICATION OF YEAST ON A SEMI INDUSTRIAL
SCALE FOR APPLICATION IN AGRICULTURAL PROCESSES:
COFFEE**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do curso
de Ciências Biológicas, para a
obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 19 de abril de 2021.

Dra. Cristina Ferreira Silva E Batista UFLA

MSe. Ana Paula Pereira Bressani UFLA

Prof. Dra. Rosane Freitas Schwan

Orientador

Dra. Nádia Nara Batista

Coorientadora

LAVRAS – MG

2021

AGRADECIMENTOS

A Profa. Rosane, por ter confiado e me dado a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Microbiologia Agrícola, por ser uma excelente professora e pesquisadora.

À Nadia, por ter sido uma coorientadora maravilhosa, muito além do que eu poderia esperar, por ter sido tão paciente e compreensiva, por ter me ensinado tanto e pela disponibilidade.

Ao NEFER, que através de nossas reuniões semanais pude aprender um pouco sobre as linhas de pesquisa de cada um do núcleo, isso contribui muito para a minha formação.

Aos meus pais, principalmente à minha mãe, por ter me ensinado desde muito cedo a valorizar os estudos, por me ansiar a amar o conhecimento, pela confiança, por ter permitido sair tão cedo de casa para correr atrás dos meus sonhos.

Às minhas irmãs, pela amizade e parceria. Especialmente a Carina, por ter sido minha companheira por todos esses anos em Lavras e na Biologia, sempre juntas.

Aos meus amigos (as) Gabriela, Francilene, Eliza e Othon por terem compartilhado tantos momentos durante esses anos de graduação e me dado tanta força e por todos os momentos de felicidade e tristeza que passamos juntas.

Aos professores do Departamento de Biologia, pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida para realização da graduação e concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de biomassa das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684 e *Meyerozyma caribbica* CCMA 1738 em meio de melaço, bem como, sua viabilidade durante o armazenamento. O melaço de cana foi o principal substrato para o crescimento das leveduras e diferentes formulações de meios foram testadas. O crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684 e *Meyerozyma caribbica* CCMA 1738 foi avaliado em diferentes meios. A máxima população microbiana foi obtida com 48 horas e em meios contendo concentração 10% de sólidos solúveis. *T. delbrueckii* e *M. caribbica* tiveram um melhor desenvolvimento no meio contendo água tratada, cloreto de cálcio, ureia e tween, e a *S. cerevisiae* para o meio contendo cloreto de cálcio, fosfato de potássio, tween, ureia e água destilada. Dependendo da composição do meio, o tipo da água poderá influenciar no crescimento microbiano. Sendo assim, o melaço de cana tem potencial para ser utilizado como substrato para a produção de biomassa de levedura, no entanto, as exigências nutricionais de cada levedura devem ser avaliadas para garantir o melhor desenvolvimento microbiano.

Palavras-chave: Leveduras; Melaço; Biomassa; Nutrientes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
2.1. Microrganismos presentes no café	7
2.2. Crescimento microbiano	10
2.3. Fatores que afetam o desenvolvimento dos microrganismos	13
2.4. Melaço como substrato de crescimento microbiano	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Determinação do meio de crescimento.....	16
3.2. Contagem de células totais	18
3.3. Peso seco.....	18
3.4. Análise estatísticas	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais apreciadas internacionalmente. Cerca de 60 países tropicais e subtropicais produzem café como principal produto de exportação (FAO, 2016, SAKIYAMA & FERRÃO, 2015, VIEIRA, 2008). A qualidade do café tem sido valorizada nos últimos anos, dando credibilidade aos cafés especiais, caracterizados por um conjunto de aromas e sabores equilibrados e pela ausência de defeitos. As percepções sensoriais são influenciadas por características genéticas, fatores geográficos, práticas agrícolas e técnicas pós-colheita (BORRELLA, MATAIX & CARRASCO-GALLEGO, 2015).

Os microrganismos presentes durante o processo fermentativo, tais como bactérias, fungos e leveduras, influenciam na qualidade da bebida final. Algumas culturas iniciadoras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* e *Meyerozyma caribbica* tem sido utilizadas durante o processo fermentativo do café devido a sua capacidade de produzir enzimas pectinolíticas e compostos voláteis e não voláteis que irão contribuir com a melhoria das características sensoriais da bebida, (DA SILVA et al., 2021).

Torulaspora delbrueckii é uma espécie que pode ser isolada de diversos ambientes, fato que evidencia sua capacidade de adaptação metabólica. Cepas dessa espécie estão associadas a variados processos de fermentação em alimentos como pão (PACHECO et al., 2012), cacau (PAPALEXANDRATOU et al., 2011), azeitona (KOTZEKIDOU, 1997) e pepino (ETCHELLS et al., 1952), de bebidas como café (RIBEIRO et al., 2017), tequila (Lachance, 1995), mescal (Valdez et al., 2011) e kefir (Loretan, Mostert and Viljoen, 2003).

A *Saccharomyces cerevisiae* é (ALEXOPOULOS, 1996) utilizada em diversos processos fermentativos, como na panificação, cervejaria, fabricação de vinho e café. Seu uso foi possível desde então, devido a sua capacidade de converter rapidamente açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico (MIRANDA, 2015; EVANGELISTA et al., 2014^a; EVANGELISTA et al.,

2014b). Além disso, é considerado organismo modelo para estudos biológicos (OSTERGARD et al., 2000), e estudos fisiológicos sobre os efeitos de diversos tipos de stresse – osmótico, oxidativo, etanol, e ácidos fracos (WILLIAMS, 1996).

A espécie *Meyerozyma caribbica* (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005; KURTZMAN et al., 2010), tendo em conta que, já foi isolada de matéria vegetal em decomposição como bagaço de agave-azul, casca de banana, sorgo e sementes de cacau (N'GUESSAN et al., 2011; PAPALEXANDRATOU et al., 2011; SAUCEDO-LUNA et al., 2011; HANDE et al., 2013). É uma espécie produtora de xilitol (RAO et al., 2007; MICHEL, 2007). Contudo, há ainda pouca informação acerca do metabolismo dessa levedura diante dos carboidratos encontrados em hidrolisados de biomassa lignocelulósica (BAPTISTA, 2018).

Durante a produção de biomassa alguns parâmetros devem ser controlados tais como, temperatura, concentração de oxigênio e disponibilidade de nutrientes. Quando em condições ambientais ótimas, o crescimento microbiano e a taxa de crescimento será máxima. De um modo geral, o aumento de temperatura resulta num aumento da taxa de crescimento ($\Delta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ resulta na duplicação de taxa de crescimento) devido a um aumento da atividade metabólica do microrganismo. A partir de determinada temperatura, o crescimento microbiano é prejudicado e as consequências podem ser letais. Em temperaturas elevadas ocorre a desnaturação das proteínas, como enzimas, transportadores de membrana, hormonas, proteínas estruturais, entre outros, levando à desintegração das membranas lipídicas (NICOLAU, 2014).

O oxigênio é um composto potencialmente letal para os microrganismos pois leva à produção de peróxidos e de radicais livres de oxigênio (ex. O_2) que danificam o funcionamento celular. Alguns microrganismos possuem enzimas (como a superóxido dismutase, a catalase

e a peroxidase) que decompõe os compostos de oxigênio, tornando-os desta forma inócuos para o seu metabolismo (NICOLAU, 2014).

Carbono (açúcar), nitrogênio (aminoácidos, amônia ou íon amônio), micronutrientes tais como vitaminas e minerais são essenciais para o crescimento do microrganismo (FUGELSANG & EDWARDS, 2007). As leveduras metabolizam açúcar para a produção de energia na forma de ATP, e quando este é hidrolisado em ADP (adenosina-5'-difosfato) e Pi (fosfato inorgânico), a energia liberada é acoplada para várias reações e transformações. O metabolismo da glicose segue a via Emben-Meyerhof-Parnas, também conhecida por glicólise (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

Os meios sintéticos, são utilizados para a produção de biomassa em escala laboratorial, pois fornecem nutrientes essenciais para o crescimento do microrganismo. No entanto, quando produção de biomassa atinge escalas maiores a utilização de meio sintéticos se torna inviável sendo necessários a busca por meios alternativos e baratos.

A multiplicação de leveduras requer o estudo de meios de cultivo adequados para manter a viabilidade das cepas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Torulaspota delbrueckii* CCMA 0684 e *Meyerozyma caribbica* CCMA 1738 em meio de melaço e sua viabilidade durante o armazenamento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Microrganismos presentes no café

O café é uma das bebidas mais amplamente distribuídas no mundo e está entre as cinco commodities agrícolas mais comercializadas (FAO, 2009). O café é muito importante, principalmente para a economia de muitos países em desenvolvimento, uma vez que é a bebida mais consumida no mundo

(SOUSA; COSTA, 2015). O café de alta qualidade deve atender aos padrões de higiene, apresentar poucos defeitos, cor e aspecto homogêneos (BORÉM, 2004) e atender aos gostos dos consumidores. Por isto, a qualidade do café é muito importante nas relações comerciais e apresenta enorme influência sobre o preço do produto, sendo crescente a demanda por cafés especiais (BING CHENG et al., 2016).

Estudos sobre a diversidade microbiana em frutos de café são necessários para que se possa selecionar microrganismos específicos durante o processo de fermentação. Estas culturas iniciadoras poderiam atuar na melhoria da qualidade sensorial, reduzir o tempo de processamento e padronizar a qualidade aromática do café obtido a partir de diferentes variedades. Além disso, essas culturas iniciadoras podem agregar valor à bebida sem aumentar substancialmente o custo para os produtores de café (BRESSANI et al., 2018).

A microbiota presente naturalmente no café é diversificada e têm influência direta na qualidade da bebida, tanto pela degradação de compostos presentes nos grãos como pela excreção de metabólitos que difundem para o interior dos grãos (EVANGELISTA et al., 2014b). Os frutos de café servem de substrato para o desenvolvimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, suprindo-os de fontes de carbono e nitrogênio, devido à sua composição química (SILVA et al., 2000). Por isso, é importante conhecer a microbiota dominante no café para determinar qual microrganismo contribui para melhorar a qualidade da bebida final (SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2013; VILELA et al., 2010, EVANGELISTA et al., 2015).

As leveduras possuem grande importância, pois são capazes de produzir enzimas pectinolíticas, que degrada a pectina presente na mucilagem, tanto por via seca e semi-seca. (SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2013; VILELA et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2014a;

EVANGELISTA et al., 2014b; EVANGELISTA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017a; RIBEIRO et al., 2017b; MARTINEZ et al., 2017; BRESSANI et al., 2018). A seleção de microrganismos específicos para culturas iniciadoras são importantes para melhorar a qualidade do processo e a qualidade sensorial da bebida final (SCHWAN; WHEALS, 2003; SILVA et al., 2013).

A seleção de microrganismos específicos para culturas iniciadoras são importantes para melhorar a qualidade do processo e a qualidade sensorial da bebida final (SCHWAN; WHEALS, 2003; SILVA et al., 2013). Portanto, culturas iniciadoras podem ser utilizadas na fermentação do café, podendo melhorar o controle da etapa de fermentação, e melhorar a qualidade sensorial da bebida final, através da produção de ácidos orgânicos e compostos voláteis (EVANGELISTA et al., 2014b).

A *Saccharomyces cerevisiae* foi selecionada por possuir uma alta capacidade de hidrolisar a pectina presente no café, presença de produtos metabólicos desejáveis e capacidade fermentativa (EVANGELISTA et al., 2014a, EVANGELISTA et al., 2014b). Essa levedura apresenta características específicas, como rápido crescimento quando comparada a outras leveduras, capacidade de produzir etanol, suportar variações de temperatura, tolerância a altas concentrações de açúcar (> 55 %) (RUYTERS et al., 2015), sobrevivência em níveis baixos de oxigênio (0,5% de saturação) (STECKELBERG et al., 2001) e bons resultados sensoriais quando inoculadas no café natural e semi-seco (EVANGELISTA et al., 2014a). As linhagens de leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e JP1 apresenta ampla adaptação a ambientes industriais, além de serem excelentes produtoras de etanol (ANTONANGELO, 2012; CHANDEL, 2018; DA SILVA FILHO et al., 2005; HOWELL et al., 2004).

Torulaspora delbrueckii foi selecionada como potencial cultura iniciadora para o café devido a sua habilidade em produzir enzimas pectinolíticas, além de apresentar um ótimo desempenho fermentativo. A

concentração celular da cultura iniciadora deve ser suficiente para garantir a sua sobrevivência durante o processo fermentativo. No café essa concentração varia de 10^5 a 10^7 UFC/g (FREITAS, 2018). *T. delbrueckii* é capaz de consumir diversas fontes de carbono, desde açúcares comuns ao mosto cervejeiro, como glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, bem como outros açúcares: galactose, lactose, rafinose, trealose, manitol, sorbitol, glicerol, melezitose e sorbose (MICHEL et al., 2016a).

A *Meyerozyma caribbica*, foi selecionada por já ter sido identificada nos cafés Arábica e conilon, podendo promover alterações químicas, como degradação da pectina e produção microbiana de ácidos orgânicos, ésteres e outros metabólitos (DE CARVALHO NETO et al., 2017 ; EVANGELISTA et al., 2015 ; HAMDUCHE et al., 2016 ; MARTINS et al., 2020 ; MASOUD et al., 2004). Também é uma cultura inicial promissora para o café Conilon com potencial para aumentar a qualidade da bebida (DA SILVA et al., 2021).

2.2. Crescimento microbiano

Na natureza grande parte da atividade necessária para o aproveitamento da matéria orgânica é realizada por fungos e bactérias produtores de enzimas. Tais microrganismos representam excelente fonte de enzimas devido à facilidade de manipulação genética e a ampla diversidade bioquímica (NEVES et al., 2006). Entre os microrganismos produtores de enzimas as leveduras têm destaque como fonte de biocompostos, entre os quais predominam as proteínas. São microrganismos bastante usados na indústria de alimentos porque a maioria das espécies não apresenta características patogênicas (RODRIGUES & SANT'ANNA, 2001).

As leveduras são compostas principalmente de C, H, O, N, S e P presentes em macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e

lipídios) juntos com íons inorgânicos (K^+ , Mg^{2+} , entre outros) e elementos traço, necessários em pequenas quantidades, e que desempenham papel estrutural e funcional no metabolismo celular. Esses microrganismos também necessitam de fatores de crescimento como vitaminas, purinas e pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos, aminoácidos, ácidos graxos e esteróis. Quando uma espécie de levedura necessita de um fator de crescimento e não ocorre a adição deste fator ao meio de cultura, ocorre um crescimento pobre e diminuição da velocidade dos processos metabólicos (SILVA, 2010).

O crescimento microbiano envolve a multiplicação e o crescimento populacional de uma cultura de células, além do aumento de biomassa produzida por tais microrganismos. A essa variação na massa e na quantidade de culturas produzidas por unidade de tempo, chamamos de taxa de crescimento (LIMA et al., 2016). A duplicação do número de células em um determinado intervalo de tempo é denominada tempo de geração. Cada espécie que se duplica possui um tempo de geração característico, variando de acordo com as condições ambientais e genéticas (LIMA et al., 2016).

A taxa de crescimento e o tempo de geração permitem avaliar a concentração das células ao longo do tempo de incubação e verificar o crescimento celular em função de possíveis alterações das condições ambientais (LIMA et al., 2016; GAVA, 1984). Uma cultura de célula microbiana cresce em sistema fechado e seu desenvolvimento pode ser acompanhado em quatro etapas, são elas:

- Fase de latência (fase lag): fase de adaptação do microrganismo a um novo meio com diferenças ambientais. Nessa etapa não há aumento significativo da população.
- Fase exponencial (fase log): nesta etapa as células estão adaptadas ao meio com excesso de nutrientes e os microrganismos possuem uma taxa de crescimento máxima. Nessa etapa as células iniciam seu processo de divisão

entrando no período de crescimento ou aumento logarítmico, as células crescem rapidamente e a sua massa aumenta exponencialmente.

- Fase estacionária: a partir dessa etapa a quantidade de nutrientes começa a ficar escassa e o crescimento microbiano começa a se estabilizar então o número de células que se dividem fica praticamente igual ao número de células que morrem.
- Fase de morte (declínio): nesta etapa o número de células mortas excede a quantidade de células vivas e ocorre uma perda da capacidade de divisão celular. Ocorre a redução do número de células por morte ou lise.

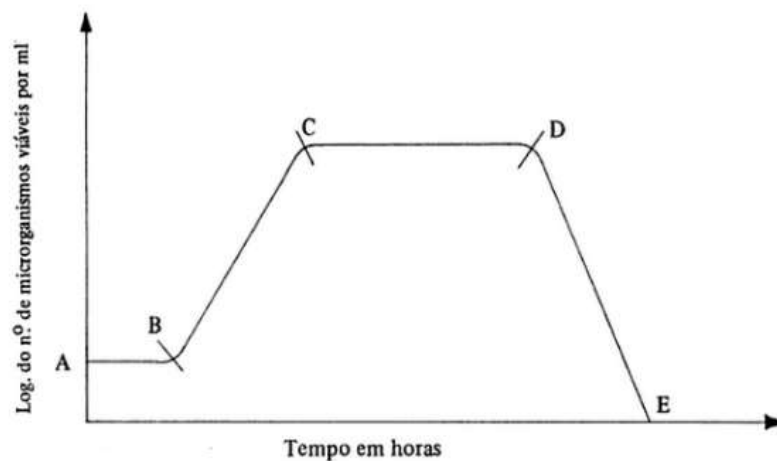


Figura 1: Curva de crescimento microbiano de acordo com cada etapa. A → B: Fase de latência (lag); B → C: Fase exponencial (log); C → D: Fase estacionária e D → E: Fase de morte (declínio). (GAVA, 1984).

2.3. Fatores que afetam o desenvolvimento dos microrganismos.

As leveduras, durante a fermentação alcoólica, podem estar submetidas a uma variedade de fatores físicos, químicos ou biológicos que são referidos como 'estresse' (Figura 2). No entanto, as células de levedura têm mecanismos de resposta ao estresse para as condições industriais de fermentação e tratamento com ácido (REIS et al., 2013).



Figura 2: Fatores estressantes que afetam as células de levedura na produção de etanol e mecanismos comuns de defesa celular (LOPES et al., 2016).

O etanol é um dos principais fatores de estresse que atuam sobre a levedura. O acúmulo de etanol no meio de fermentação inibe o crescimento e a viabilidade dos microrganismos produtores de etanol, causando um efeito tóxico na levedura (STANLEY et al., 2010). Segundo Alves (1996), o etanol foi o primeiro fator a ser reconhecido como um inibidor da fermentação alcoólica. Os fatores que mais influenciam na sensibilidade do microrganismo ao etanol são: a temperatura, a aeração e a composição do meio, agindo direta

ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática, provocando modificações na membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto e ação de algumas enzimas (ATALA, 2004).

Os inibidores afetam as vias metabólicas dos microrganismos durante os bioprocessos, agindo principalmente nas vias da glicólise e no ciclo do ácido cítrico. Assim, levam à diminuição do crescimento celular e à queda da produção do produto de interesse. Isso ocorre devido ao efeito negativo dos inibidores sobre o pH intracelular, inibição de enzimas e processos metabólicos, e a perda da integridade da membrana, entre outros efeitos (ALMEIDA et al., 2007; CASPETA; CASTILLO; NIELSEN, 2015).

A contaminação microbiana ocasiona perdas de rendimento potencial e produção de ácidos orgânicos indesejados (MUTHAIYAN, 2011). As bactérias e leveduras contaminantes competem por micro e macro nutrientes e produzem compostos inibitórios como ácido acético e lático. Esses ácidos têm causado aumento no tempo de fase lag, diminuição na proporção de crescimento, reduzido rendimento em biomassa, e até levado a morte em determinados meios (MAKANJUOLA et al., 1992; THOMAS et al., 2002; ABBOTT et al., 2004; GRAVES et al., 2006; NARENDRANATH et al., 2001; THOMAS et al., 2001).

2.4. Melaço como substrato de crescimento microbiano

O interesse por resíduos ou subprodutos industriais vem aumentando, devido à utilização dos mesmos como substrato para produção de proteína microbiana ou “single cell protein”, um produto com elevado valor nutricional (NAVARRO; SEPÚLVEDA; RUBIO, 2000; EMTIAZI; ETEMADIFAR; TAVASSOLI, 2003; PARASKEVOPOULOU et al., 2003). O melaço é um co-produto da agroindústria, frequentemente utilizado como substrato para a produção de etanol (JIMENEZ; BORJA; MARTÍN, 2004; SANTOS, 2016),

devido à presença de grande quantidade de açúcares fermentescíveis em sua composição, ele constitui uma boa fonte de carbono para o metabolismo microbiano.

O caldo e melação de cana apresentam em sua constituição um alto teor de açúcar, principalmente a sacarose, que corresponde de 70 a 91% das substâncias sólidas solúveis. O caldo conserva todos os nutrientes da cana, porém apresenta algumas deficiências nutricionais como o baixo nível proteico e de fatores de crescimento, mas contêm quantidades de minerais (3% a 59 5% como cinzas) tais como ferro, cálcio, zinco, manganês, cobre, potássio, fósforo e magnésio, adequados ao crescimento microbiano, além de ceras e graxas (0,05 a 0,015%). O melação ainda apresenta esses minerais em excesso e compostos orgânicos que podem inibir o crescimento microbiano como furfurais. É nesse cenário nutricional que os microrganismos devem se desenvolver e por vezes se suplantarem nas contagens celulares, o que suscita a capacidade de crescimento nas limitações apresentadas (MIRANDA, 2015)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CCMA0543, *Torulaspota delbrueckii* CCMA0684 e *Meyerozyma caribbica* CCMA1738 pertencentes à Coleção de Cultura de Microbiologia Agrícola (CCMA, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG) foram utilizadas neste trabalho. Os isolados estavam armazenados a -80 °C e foram reativados em tubos YEPG contendo 9 mL de meio líquido [glicose 20 g L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha), extrato de levedura 10 g L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha) e peptona bacteriológica 10 g L⁻¹ (Himedia, Mumbai, Índia), pH 3,5]. As culturas foram incubadas a 28 °C durante 48 h e depois transferidas para 90 mL de YEPG e incubadas a 28 °C, 150 rpm durante 24 h (BRESSANI, 2017).

3.1. Determinação do meio de crescimento

Os meios de cultura e sua composição utilizados para crescimento dos isolados estão descritos na Tabela 1 e 2. Nos volumes de 20 mL foram adicionados uma alçada da levedura, em seguida os tubos foram levados para BOD de 28 °C por um período de 12 horas. Para iniciar o crescimento foi feita a contagem na câmara de Neubauer passando apenas 10^6 para o volume de 180 mL, incubados a 28°C, 150 rpm por 96 horas.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura com concentração de sólidos solúveis de 10 °Brix.

Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6
Cloreto de cálcio 1,1g/L	Cloreto de cálcio 1,1g/L	Cloreto de Cálcio 1,1g/L	Cloreto de cálcio 1,1g/L	Cloreto de cálcio 1,1g/L	Cloreto de cálcio 1,1g/L
Ureia 2g/L	Ureia 2g/L	Fosfato de potássio 1g/L	Fosfato de potássio 1g/L	Fosfato de potássio 1g/L	Fosfato de potássio 1g/L
Tween 2g/L	Tween 2g/L	Tween 2g/L	Tween 2g/L	Tween 2g/L	Tween 2g/L
Água tratada 200mL	Água destilada 200mL	Sulfato de amônio 2g/L	Sulfato de amônio 2g/L	Ureia 2g/L	Ureia 2g/L
		Água tratada 200mL	Água destilada 200mL	Água tratada 200mL	Água destilada 200mL

Tabela 2. Composição dos meios de cultura com concentração de sólidos solúveis de 15 °Brix.

Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
Cloreto de cálcio 1,1g/L	Cloreto de cálcio 1,1g/L	Cloreto de Cálcio 1,1g/L	Cloreto de cálcio 1,1g/L	Cloreto de cálcio 1,1g/L	Cloreto de cálcio 1,1g/L
Ureia 2g/L	Ureia 2g/L	Fosfato de potássio 1g/L	Fosfato de potássio 1g/L	Fosfato de potássio 1g/L	Fosfato de potássio 1g/L
Tween 2g/L	Tween 2g/L	Tween 2g/L	Tween 2g/L	Tween 2g/L	Tween 2g/L
Água tratada 200mL	Água destilada 200mL	Sulfato de amônio 2g/L	Sulfato de amônio 2g/L	Ureia 2g/L	Ureia 2g/L
		Água tratada 200mL	Água destilada 200mL	Água tratada 200mL	Água destilada 200mL

3.2. Contagem de células totais

Para contagem de células viáveis, 100 µl da amostra foram diluídos em 900 µl de água peptonada (0,1% m/v). Desta solução, 10 µl foram retirados e misturados em 10 µl de azul de metileno (azul de metileno, 0,01% m/v e citrato de sódio, 2% m/v). A contagem foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400x nos períodos de crescimento de 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Foram contadas as células viáveis presentes em 5 dos 25 quadriculados do quadrante central da câmara.

Os dados foram calculados utilizando a seguinte equação:

$$\text{Cel/mL} = \frac{\sum nq \times 25 \times fd \times 10^4}{n}$$

Onde: $\sum nq$ = Soma algébrica do número de células viáveis contadas nos quadriculados

25 = Número total de quadriculados na câmara

fd = Fator de diluição utilizado referente ao preparo da amostra com solução de azul de metileno

10^4 = Constante da câmara que se refere ao inverso do volume do quadrante central utilizado para contagem

n = Número de quadriculados contados, dentre os 25 disponíveis

3.3. Peso seco

A quantidade de biomassa produzida durante a fermentação foi determinada através da secagem do material produzido e determinação do peso seco. Para a determinação do peso seco da biomassa celular, 5 mL da cultura foram centrifugados (7000 rpm / 4 °C / 10 min) em tubos Falcon de

15mL, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado com 5mL de água destilada. A amostra foi centrifugada novamente seguindo o mesmo padrão anterior, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 5mL de água destilada e colocado em placas de Petri. As placas foram colocadas em estufa 105 °C durante 24 h. As mesmas foram pesadas em balança analítica antes e após o procedimento. Foi feito o peso seco no período de 0 horas e 48 horas. Primeiro foi feito o cálculo de umidade através da equação:

$$\text{Umidade} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final}) \times 100}{\text{peso inicial}}$$

A biomassa obtida foi calculada através da equação:

$$X_w (\text{material}) = \frac{\text{Umidade}}{100}$$

3.4. Análises estatísticas

Os dados experimentais foram submetidos ao ANAVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) (FERREIRA, 2008). Para os estudos estatísticos, foi utilizado o software Sisvar.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O melaço é um co-produto da indústria açucareira rico em açúcares e micronutrientes, de fácil manipulação e baixo custo apresentando grande potencial industrial a ser pesquisado (MAZO, 2002; SANTOS 2016). Neste trabalho, o melaço de cana foi utilizado como substrato para a produção de biomassa da *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Meyerozyma caribbica* CCMA 1738 e *Torulasporea delbrueckii* CCMA 0684. O crescimento

microbiano foi avaliado durante 96 horas. O crescimento do microrganismo pode ser dividido em três fase. A fase de latência ocorre nas primeiras horas e envolve a adaptação do microrganismo no meio (RIBÉREAUGAYON et al., 2006). O crescimento exponencial a população atingi a sua concentração máxima sendo muito influenciada pela temperatura (OUGH, 1964), concentração de oxigênio (SABLAYROLLES & BARRE, 1986) e nutrientes (LAFON-LAFOURCADE, 1983; SABLAYROLLES et al. 1996). Todas as leveduras apresentaram crescimento máximo com 48h. A população máxima da *S. cerevisiae* foi alcançada no meio de cultura 6 (Tabela 3) (8,78 Log.UFC.mL⁻¹); *Meyerozyma caribbica* para o meio 1 (9,10 Log.UFC.mL⁻¹) e 3 (9,14 Log.UFC.mL⁻¹); e *Torulaspota delbrueckii* para o meio 1 (9,04 Log.UFC.mL⁻¹). Todos os meios continham concentração de sólidos solúveis de 10°Brix, sendo considerada concentração ideal para produção de biomassa. Os meios com concentração 15 °Brix foram descritas como ideais para produção de etanol (PATARO et al., 2002). O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva a redução em crescimento e perda da viabilidade das células das leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática, além de promover nas perdas no volume das células, que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o exterior e o interior das células (SOUZA, 2009).

A Tabela 4 mostra os valores de biomassa das fermentações no período de 0 horas e 48 horas e a variação da biomassa entre cada tipo de meio. A *Saccharomyces cerevisiae* obteve um aumento na produção de biomassa para o meio 6 (10 °Brix), chegando a 164,98 g, seguidos do meio 1 com 165,87 g em 48 horas. A *Meyerozyma caribbica* obteve um aumento na produção de biomassa para os meios 1 e 3 (10 °Brix), com maior média para o meio 1 chegando a 163,89 g. A *Torulaspota delbrueckii* obteve um aumento na produção de biomassa para o meio 1 (10 °Brix) com 164,43 g. Com bases nos resultados obtidos, podemos observar que houve uma semelhança na produção de biomassa entre as três leveduras para o meio 1 (10 °Brix), podendo está relacionada aos compostos presentes no melaço. Os compostos

inorgânicos encontrados no caldo e melaço de cana são fósforo, enxofre, cálcio, magnésio, potássio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas, sendo todos necessários para suprir as necessidades nutricionais das leveduras durante o processo de fermentação alcoólica industrial, influenciando na multiplicação e crescimento celular e na eficiência de transformação de açúcar em álcool (SANTOS, 2008).

Tabela 3. Contagem celular durante o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* CCMA0543, *Meyerozyma caribbica* CCMA1738 e *Torulaspora delbrueckii* CCMA0684.

		População (Log.UFC.ml ⁻¹)											
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
SC	0	6.95 ^{bA}	6.88 ^{cA}	6.78 ^{bA}	6.70 ^{bA}	6.78 ^{bA}	6.85 ^{cA}	6.85 ^{cA}	6.81 ^{cA}	6.74 ^{bA}	6.78 ^{cA}	6.78 ^{dA}	6.88 ^{cA}
	24	8.48 ^{aA}	8.41 ^{bA}	8.41 ^{aA}	8.41 ^{aA}	8.37 ^{aA}	8.39 ^{bA}	8.52 ^{bA}	8.38 ^{bA}	8.47 ^{aA}	8.33 ^{bA}	8.35 ^{cA}	8.49 ^{bA}
	48	8.70 ^{aB}	8.64 ^{aB}	8.57 ^{aC}	8.47 ^{aC}	8.43 ^{aC}	8.78 ^{aA}	8.57 ^{bC}	8.51 ^{aC}	8.53 ^{aC}	8.44 ^{bC}	8.53 ^{cC}	8.61 ^{bC}
	72	8.64 ^{aA}	8.56 ^{bB}	8.48 ^{aB}	8.50 ^{aB}	8.56 ^{aB}	8.41 ^{bB}	8.73 ^{aA}	8.40 ^{bB}	8.51 ^{aB}	8.64 ^{aA}	8.73 ^{bA}	8.74 ^{aA}
	96	8.61 ^{aC}	8.69 ^{aB}	8.54 ^{aC}	8.47 ^{aC}	8.50 ^{aC}	8.44 ^{bC}	8.66 ^{aB}	8.51 ^{aC}	8.62 ^{aC}	8.66 ^{aB}	8.83 ^{aA}	8.57 ^{bC}
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
MC	0	6.93 ^{cA}	6.85 ^{cA}	6.74 ^{eA}	6.85 ^{dA}	6.85 ^{dA}	6.93 ^{cA}	6.85 ^{eA}	6.81 ^{eA}	6.74 ^{eA}	6.81 ^{cA}	6.65 ^{dA}	6.81 ^{eA}
	24	8.89 ^{bA}	8.76 ^{bC}	8.90 ^{bA}	8.74 ^{bC}	8.70 ^{cC}	8.83 ^{bB}	8.72 ^{dC}	8.62 ^{dD}	8.78 ^{bC}	8.58 ^{bD}	8.74 ^{cC}	8.61 ^{dD}
	48	9.10 ^{aA}	9.06 ^{aB}	9.14 ^{aA}	8.84 ^{aF}	9.01 ^{aC}	8.96 ^{aD}	9.02 ^{aC}	8.95 ^{aD}	8.89 ^{aE}	9.06 ^{aB}	8.91 ^{aE}	9.03 ^{aC}
	72	8.93 ^{bA}	8.82 ^{bB}	8.81 ^{cB}	8.60 ^{cC}	8.96 ^{aA}	8.98 ^{aA}	8.95 ^{bA}	8.88 ^{bB}	8.68 ^{cC}	8.65 ^{bC}	8.85 ^{bB}	8.88 ^{bB}
	96	9.88 ^{bA}	8.75 ^{bC}	8.69 ^{dC}	8.64 ^{cD}	8.81 ^{bB}	8.86 ^{bA}	8.85 ^{cA}	8.79 ^{cB}	8.56 ^{dD}	8.57 ^{bD}	8.69 ^{cC}	8.71 ^{cC}
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
TD	0	6.85 ^{eA}	6.81 ^{eA}	6.78 ^{cA}	6.74 ^{dA}	6.70 ^{dA}	6.78 ^{cA}	6.65 ^{dA}	6.74 ^{dA}	6.70 ^{dA}	6.74 ^{dA}	6.65 ^{dA}	6.81 ^{eA}
	24	8.90 ^{cA}	8.70 ^{cD}	8.76 ^{aC}	8.60 ^{bE}	8.79 ^{bC}	8.88 ^{aA}	8.83 ^{aB}	8.67 ^{bD}	8.69 ^{aD}	8.51 ^{bF}	8.77 ^{aC}	8.69 ^{cD}
	48	9.04 ^{aA}	8.76 ^{bC}	8.80 ^{aC}	8.75 ^{aC}	8.71 ^{cD}	9.93 ^{aB}	8.78 ^{bC}	8.62 ^{bE}	8.69 ^{aD}	8.64 ^{aE}	8.69 ^{bD}	8.79 ^{bC}
	72	8.95 ^{bA}	8.89 ^{aB}	8.80 ^{bG}	8.73 ^{aE}	8.84 ^{aC}	8.91 ^{aB}	8.73 ^{bE}	8.84 ^{aC}	8.52 ^{bF}	8.56 ^{bF}	8.79 ^{aD}	8.90 ^{aB}
	96	8.77 ^{dA}	8.59 ^{dC}	8.48 ^{bD}	8.48 ^{cD}	8.68 ^{cB}	8.67 ^{bB}	8.57 ^{cC}	8.40 ^{cE}	8.29 ^{cE}	8.27 ^{cE}	8.51 ^{cD}	8.56 ^{dC}

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e da mesma letra maiúscula na linha, para cada levedura, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

*SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MC: *Meyerozyma caribbica*; TD: *Torulaspora delbrueckii*

Tabela 4. Variação de peso seco em função do tempo para a *Saccharomyces cerevisiae* CCMA0543, *Meyerozyma caribbica* CCMA1738 e *Torulaspora delbruecki* CCMA0684.

		Peso seco (g)											
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
SC	0	160,56	159,31	157,50	157,95	159,21	158,76	162,99	159,66	159,81	162,8	161,55	164,16
	48	165,87	164,52	161,37	162,45	161,82	164,98	164,16	163,37	162,9	163,53	162,54	165,51
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
MC	0	161,46	161,82	159,57	160,47	157,23	158,85	161,28	159,75	159,84	163,80	159,93	159,03
	48	163,89	163,53	161,1	161,91	158,58	162,90	162,10	161,73	162,67	165,06	163,53	163,26
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
TD	0	158,25	159,30	158,76	158,31	159,39	160,01	157,95	158,85	159,93	160,38	162,18	157,95
	48	164,43	160,83	160,83	160,74	163,98	161,91	162,01	161,82	161,82	161,19	164,52	160,74

*SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MC: *Meyerozyma caribbica*; TD: *Torulaspora delbrueckii*

*Valores do peso seco para cada levedura.

A redução do °Brix foi observada durante o crescimento microbiano (Tabela 5). Em 48 h de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* no meio 6, atingiu 5,76 °Brix com redução de 3,64%. *Meyerozyma caribbica* nos meios 1 e 3 atingiu 6,3 e 5,9 com redução de 3,20% e 4,16% respectivamente; e *Torulasporea delbrueckii* no meio 1 atingiu 6,26 °Brix, com redução de 5,40%. Essa redução na concentração de sólidos solúveis ocorre devido a hidrólise da sacarose que corresponde 70 a 91% das substâncias sólidas solúveis. As três leveduras produzem invertase (β -D frutofuranosidase (EC.3.2.1.26) é uma enzima que hidrolisa a sacarose, originando uma mistura, em quantidades iguais de glicose e frutose (ARAUJO, 2015).

Além da sacarose, outros constituintes dos meios contribuíram com o eficaz desenvolvimento das leveduras, tais como, cloreto de cálcio, fosfato de potássio, uréia, tween e água destilada (meio 6), cloreto de cálcio, ureia, tween e água tratada (meio 1); e cloreto de cálcio, fosfato de potássio, tween, sulfato de amônio e água tratada (meio 3).

O fósforo é um elemento indispensável para a síntese de importantes componentes celulares (CARLILE & WATKINSON, 1994). A adição de fosfatos de cálcio, de sódio, de potássio e de amônio a meios com carência de fósforo pode aumentar acentuadamente o crescimento microbiano (SINGH & TANDON, 1967a, b).

Ureia e sulfato de amônia são fontes de nitrogênio que contribuem para formação de metabólitos. Diversos compostos orgânicos e inorgânicos podem ser utilizados, dentre eles estão: peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, farelo de soja e ureia (CARNEIRO, 2018). Wicherham (1946), utilizando 1.700 linhagens de leveduras, observou que todas as linhagens são capazes de utilizar três fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, uréia e asparagina. No entanto, Jones et al (1981), propõe que as duas são capazes de utilizar ions amônio como única fonte de nitrogênio, embora algumas leveduras requeiram adição de aminoácidos específicos.

Tabela 5. Valores de Brix dos meios dos meios de cultura durante o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* CCMA0543, *Meyerozyma caribbica* CCMA1738 e *Torulaspota delbruecki* CCMA0684.

		Brix											
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
SC	0	9.15 ^{aB}	9.50 ^{aB}	9.05 ^{aB}	9.80 ^{aB}	9.60 ^{aB}	9.40 ^{aB}	14.30 ^{aB}	14.75 ^{aB}	14.30 ^{aB}	14.35 ^{aB}	14.85 ^{aB}	14.75 ^{aB}
	24	7.36 ^{bB}	5.56 ^{aD}	5.56 ^{aD}	5.50 ^{bD}	5.40 ^{bD}	6.16 ^{bC}	7.36 ^{bB}	6.36 ^{cC}	8.30 ^{bA}	7.36 ^{bB}	7.20 ^{bB}	8.00 ^{bA}
	48	5.70 ^{cC}	4.60 ^{bD}	4.86 ^{bD}	5.00 ^{bD}	5.06 ^{bD}	5.76 ^{bC}	6.06 ^{cB}	5.50 ^{dC}	6.66 ^{cA}	6.70 ^{bA}	6.90 ^{bA}	7.36 ^{bA}
	72	4.80 ^{dC}	5.20 ^{bC}	5.00 ^{bC}	5.10 ^{bC}	5.50 ^{bC}	5.16 ^{cC}	7.00 ^{bA}	6.26 ^{cB}	7.30 ^{cA}	6.40 ^{bB}	6.96 ^{bA}	6.46 ^{cB}
	96	5.40 ^{cB}	5.00 ^{bB}	5.30 ^{bB}	5.50 ^{bB}	5.80 ^{bB}	5.30 ^{cB}	7.16 ^{bA}	7.00 ^{bA}	7.16 ^{cA}	6.96 ^{bA}	7.30 ^{bA}	7.00 ^{cA}
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
MC	0	9.50 ^{aA}	9.46 ^{aA}	10.46 ^{aA}	9.70 ^{aA}	9.96 ^{aA}	10.06 ^{aA}	13.40 ^{bB}	14.10 ^{aA}	12.36 ^{aA}	14.66 ^{aA}	13.40 ^{aA}	14.6 ^{aA}
	24	8.80 ^{aA}	8.46 ^{aA}	8.80 ^{aA}	8.86 ^{aA}	8.86 ^{aA}	9.20 ^{aA}	11.80 ^{bB}	13.50 ^{aA}	12.40 ^{aA}	14.06 ^{aA}	12.70 ^{aA}	13.80 ^{aA}
	48	6.30 ^{aA}	5.30 ^{aA}	5.90 ^{aA}	6.40 ^{aA}	6.66 ^{aA}	6.06 ^{aA}	7.66 ^{bB}	10.30 ^{aA}	8.20 ^{aA}	8.56 ^{aA}	8.56 ^{aA}	8.50 ^{aA}
	72	5.46 ^{aA}	5.50 ^{aA}	5.36 ^{aA}	5.16 ^{aA}	5.50 ^{aA}	5.20 ^{aA}	7.86 ^{aA}	7.50 ^{aA}	7.90 ^{aA}	7.56 ^{aA}	8.06 ^A	8.10 ^{aA}
	96	6.46 ^{aA}	6.36 ^{aA}	6.40 ^{aA}	5.96 ^{aA}	6.40 ^{aA}	6.26 ^{aA}	8.50 ^{bB}	8.60 ^{aA}	8.40 ^{aA}	8.66 ^{aA}	8.50 ^{aA}	8.60 ^{aA}
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
TD	0	11.66 ^{aF}	10.90 ^{aH}	11.06 ^{aH}	11.10 ^{aH}	11.30 ^{aG}	10.96 ^{aH}	15.16 ^{aC}	13.40 ^{aE}	15.86 ^{aB}	14.00 ^{aD}	16.20 ^{aA}	13.60 ^{aE}
	24	6.30 ^{bE}	5.70 ^{cF}	6.20 ^{cE}	6.26 ^{bE}	6.40 ^{bE}	5.86 ^{cF}	8.16 ^{cB}	7.66 ^{bC}	8.66 ^{bA}	7.20 ^{cD}	8.70 ^{cA}	7.76 ^{cC}
	48	6.26 ^{bD}	6.10 ^{bD}	6.36 ^{a2D}	6.27 ^{bD}	6.20 ^{cD}	6.16 ^{bD}	8.30 ^{cB}	7.40 ^{cC}	8.80 ^{bA}	7.60 ^{bC}	8.66 ^{cA}	8.30 ^{bB}
	72	6.46 ^{bD}	6.40 ^{bD}	5.36 ^{bD}	6.16 ^{bE}	6.60 ^{bD}	6.26 ^{bE}	9.10 ^{bA}	7.90 ^{bC}	8.76 ^{bB}	7.90 ^{bC}	9.16 ^{bA}	7.90 ^{cC}
	96	6.00 ^{cD}	5.16 ^{dF}	6.60 ^{dF}	5.36 ^{cF}	6.06 ^{cD}	5.70 ^{cE}	8.46 ^{cA}	7.46 ^{cB}	8.76 ^{bA}	6.96 ^{cC}	8.56 ^{cA}	7.36 ^{dB}

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e da mesma letra maiúscula na linha, para cada levedura, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

*SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MC: *Meyerozyma caribbica*; TD: *Torulaspota delbruecki*

A água destilada é uma água sem sais minerais, sem nenhuma substância dissolvida, utilizada em diversos procedimentos laboratoriais. A água tratada é livre de materiais tóxicos e microorganismos, como bactérias, porém contém minerais naturais e produtos químicos (cloro, sulfato de ferro, alumínio, cal, carbonato de sódio, ácido fluorsilícico), utilizados no tratamento para o consumo humano. Nos resultados podemos observar que o melhor meio para a *M. caribbica* e a *T. delbrueckii* foi o meio que tem a água tratada como diluente, podendo indicar que esses microrganismos precisam de certos minerais (cálcio, sódio, magnésio, zinco, silício e o potássio), presentes na água tratada para o crescimento. Segundo Straver et al (1993), substâncias presentes no meio fermentativo, como sais inorgânicos, polieletrólitos, e gomas excretadas por bactérias, contribuem para adesão de células. Diferente da *S. cerevisiae* que teve um melhor crescimento no meio contendo água destilada.

Durante o crescimento microbiano alguns metabólitos são produzidos, tais como, ácidos succínico, láctico, acético e outros, que contribuem com a redução do pH. O decréscimo do pH foi observado após 72 h no meio de crescimento (Tabela 6) para as três leveduras estudadas. O decréscimo do pH ocorreu com 72 horas de crescimento, a *S. cerevisiae* alcançou 4,42, a *M. caribbica* 3,82 e a *T. delbrueckii* atingiu pH de 4,70, essa redução no pH pode estar relacionada com a fase estacionária, que é caracterizada a escassez de nutrientes e a pelo acúmulo de metabólitos liberadas durante a fermentação (FERREIRA, 2019). Dorta (2006) afirma que valores muito baixos de pH no tratamento ácido prejudicam a viabilidade, o brotamento da levedura, a quantidade de biomassa, o rendimento e a produtividade da fermentação, e conseqüentemente acarretam sobra de açúcares ao final da fermentação.

Além disso, o estresse ácido prolongado auxilia para que a célula perca sua capacidade de manter o pH interno e suas atividades fisiológicas, e isto leva à inibição do crescimento e finalmente à morte celular (BRUL; COOTE, 1999). O acúmulo de metabólitos e a redução do pH afeta o crescimento celular, fazendo com que haja uma redução na produção de biomassa dessas leveduras.

Tabela 6. Valores de pH dos meios de cultura durante o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* CCMA0543, *Meyerozyma caribbica* CCMA1738 e *Torulaspora delbruecki* CCMA0684.

		pH											
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
SC	0	4.90 ^{bB}	4.77 ^{bB}	4.47 ^{aD}	4.31 ^{aE}	5.15 ^{aA}	5.01 ^{aA}	4.76 ^{aB}	4.80 ^{aB}	4.34 ^{aE}	4.45 ^{aD}	4.78 ^{aB}	4.65 ^{aC}
	24	4.60 ^{cB}	4.47 ^{dC}	4.23 ^{bD}	4.15 ^{bD}	4.81 ^{bA}	4.74 ^{bA}	4.65 ^{bB}	4.54 ^{bB}	4.28 ^{aD}	4.35 ^{aC}	4.65 ^{bB}	4.45 ^{bC}
	48	4.49 ^{dB}	4.39 ^{dB}	3.80 ^{cC}	3.88 ^{cC}	4.55 ^{cB}	4.73 ^{bA}	4.43 ^{cB}	4.43 ^{cB}	3.94 ^{bC}	3.88 ^{bC}	4.47 ^{cB}	4.44 ^{bB}
	72	4.70 ^{cA}	4.64 ^{cA}	3.85 ^{cD}	3.79 ^{cD}	4.57 ^{cA}	4.42 ^{cB}	4.50 ^{cB}	4.48 ^{cB}	4.03 ^{bC}	3.95 ^{bC}	4.49 ^{cB}	4.45 ^{bB}
	96	5.09 ^{aA}	4.99 ^{aA}	3.86 ^{cE}	3.79 ^{cE}	4.57 ^{cB}	4.46 ^{cC}	4.64 ^{bB}	4.59 ^{bB}	4.05 ^{bD}	3.99 ^{bD}	4.50 ^{cC}	4.49 ^{bC}
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
MC	0	5.34 ^{aA}	5.44 ^{aA}	4.92 ^{aC}	4.92 ^{aC}	5.14 ^{aB}	5.35 ^{aA}	5.21 ^{aB}	5.17 ^{aB}	4.92 ^{aC}	4.92 ^{aC}	5.2 ^{aB}	5.02 ^{bC}
	24	5.13 ^{bA}	5.22 ^{bA}	4.61 ^{bD}	4.61 ^{bD}	4.93 ^{bB}	5.12 ^{bA}	5.21 ^{aA}	5.06 ^{aA}	4.79 ^{bC}	4.89 ^{aB}	5.17 ^{aA}	5.17 ^{aA}
	48	4.01 ^{cC}	4.03 ^{cC}	3.43 ^{dE}	3.50 ^{dE}	4.28 ^{cA}	4.17 ^{dB}	4.11 ^{bB}	4.02 ^{bC}	3.67 ^{cD}	3.78 ^{bD}	4.14 ^{bB}	4.13 ^{cB}
	72	3.82 ^{dD}	3.93 ^{dC}	3.81 ^{cD}	3.74 ^{cD}	4.86 ^{bA}	4.92 ^{cA}	4.03 ^{bB}	3.86 ^{cD}	3.59 ^{cE}	3.67 ^{bE}	4.05 ^{cB}	4.08 ^{cB}
	96	3.82 ^{dC}	3.87 ^{dC}	3.77 ^{cC}	3.77 ^{cC}	4.89 ^{bA}	5.00 ^{cA}	4.07 ^{bB}	3.83 ^{cC}	3.59 ^{cD}	3.68 ^{bD}	3.98 ^{cB}	4.06 ^{cB}
		10°Brix						15°Brix					
	Tempo	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12
TD	0	5.06 ^{aA}	5.02 ^{aA}	4.35 ^{aC}	4.33 ^{aC}	4.56 ^{aB}	4.66 ^{aB}	4.85 ^{aA}	4.91 ^{aA}	4.36 ^{aC}	4.33 ^{aC}	4.67 ^{aB}	4.62 ^{aB}
	24	4.06 ^{dA}	4.03 ^{dA}	3.30 ^{cB}	3.31 ^{bB}	3.97 ^{bA}	4.07 ^{bA}	4.01 ^{bA}	4.07 ^{cA}	3.44 ^{bB}	3.36 ^{cB}	4.04 ^{bA}	4.05 ^{bA}
	48	4.19 ^{dA}	4.14 ^{dA}	3.52 ^{bB}	3.53 ^{bB}	4.09 ^{bA}	4.18 ^{bA}	3.99 ^{bA}	4.07 ^{cA}	3.56 ^{bB}	3.50 ^{cB}	4.06 ^{bA}	4.07 ^{bA}
	72	4.49 ^{cA}	4.35 ^{cA}	3.58 ^{bD}	3.58 ^{bD}	4.39 ^{aA}	4.54 ^{aA}	3.94 ^{bC}	4.19 ^{cB}	3.61 ^{bD}	3.68 ^{bD}	4.12 ^{bB}	3.24 ^{cE}
	96	4.77 ^{bA}	4.62 ^{bA}	3.63 ^{bD}	3.60 ^{bD}	4.66 ^{aA}	4.72 ^{aA}	3.99 ^{bC}	4.42 ^{bB}	3.66 ^{bD}	3.76 ^{bD}	4.23 ^{bB}	4.62 ^{aA}

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e da mesma letra maiúscula na linha, para cada levedura, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

*SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MC: *Meyerozyma caribbica*; TD: *Torulaspora delbrueckii*

5. CONCLUSÃO

O crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Meyerozyma caribbica* CCMA 1738 e *Torulaspota delbrueckii* CCMA 0684 foi avaliado em diferentes meios de cultura. A máxima população microbiana foi obtido com 48 horas e em meios contendo concentração 10% de sólidos solúveis. *T. delbrueckii* e *M. caribbica* teve um melhor desenvolvimento no meio contendo água tratada, cloreto de cálcio, ureia e tween; e *S. cerevisiae* para o meio contendo cloreto de cálcio, fosfato de potássio, tween, ureia e água destilada. Dependendo da composição do meio, o tipo da água poderá influenciar no crescimento microbiano. Sendo assim, o melaço de cana tem potencial para ser utilizado como substrato para a produção de biomassa de levedura, no entanto, as exigências nutricionais de cada levedura devem ser avaliadas para garantir o melhor desenvolvimento microbiano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D.A.; INGLEDEW, W.M. **Buffering capacity of whole corn mash alters concentrations of organic acids required to inhibit growth of *Saccharomyces cerevisiae* and ethanol production.** *Biotechnol Lett*, v.26, p.1313-6, 2004.

ALEXOPOULOS,C.J.; MIMS,C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory *Micology*.** 3ed.New York: John Wiley & Sons, p.272-285, 1996.

ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbio de *Saccharomyces cerevisiae*.** (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA, UNICAMP, 1996.

ANTONANGELO, A. **Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo do polimorfismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae*.** *Aleph*, p. 80 f., 2012.

ARAUJO, M, A, M. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado.** Dissertação. Campo Grande, 2015.

ARSLAN, S. et al. **Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. boulardii with different wall materials by spray drying.** *LWT-Food Science and Technology*, v. 63, n. 1, p. 685-690, 2015.

BAPTISTA, C. W.. **Fermentação de carboidratos por *Meyerozyma Caribbica* em microaerobiose.** 2018.

BASHOLLI-SALIHU, M. et al. **Effect of lyoprotectants on?-glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and**

storage in milk and low pH juices. LWT-Food Science and Technology, v. 57, n. 1, p. 276-282, 2014.

BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S. et al. **Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748.** Drying Technology, v. 31, n. 11, p. 1274-1283, 2013.

BEZERRA, M. S. **Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2006.

BING CHENG, B. et al. **Influence of genotype and environment on coffee quality.** Trends in Food Science & Technology, v. 57, p.20-30, 2016.

BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café.** Lavras: UFLA, 2004, p. 127.

BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café.** Lavras: UFLA, 2008, p. 129-156.

BRESSANI, A. P. P. **Avaliação química e sensorial de café catuaí amarelo fermentado pelo processamento por via seca com inoculação de leveduras.** 2017.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. **The fungi.** San Diego: Academic, 1994. 428p.

CARNEIRO, C. V. G. C. **Prospecção de leveduras para produção de xilitol a partir de hidrolisados de biomassa de cana.** 2018.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. **Efeito de microrganismos na qualidade da bebida do café.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte- MG, Brasil, v. 18, n. 1, p. 21-26, 2000.

CHANDEL, A. K. **Advances in Sugarcane Biorefinery Technologies, Commercialization**, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and ByProducts. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

CHANDRALEKHA, A. et al. **Encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying for extension of shelf life**. *Drying technology*, v. 34, n. 11, p. 1307-1318, 2016.

CHARLES-BERNARD, M. et al. **Interactions between volatile and onvolatile coffee components. 1. Screening of nonvolatile components**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4417-4425, 2005.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento** – Brasília: Conab 2019.

DA SILVA FILHO, E. A. et al. **Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation**. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 10, p. 481–486, 2005.

DA SILVA, B. L et al. **Fermentation of *Coffea canephora* inoculated with yeasts: Microbiological, chemical, and sensory characteristics**. *Food Microbiology*, p. 103786, 2021.

DE CARVALHO NETO, D. P et al. **Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro region**. *Fermentation*, v. 3, n. 1, p. 11, 2017.

DE MELO PEREIRA, G. V. et al. **Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects**. *Food Research International*, v. 75, p. 348-356, 2015.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26**. 2006.

135 p. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. **Functional properties of coffee and coffee byproducts.** Food Research International, v. 46, p. 488-496, 2012.

ESTRADA-BONILLA, G. A.; LOPES, C. M.; DURRER, A.; ALVES, P. R. L.; PASSAGLIA, N.; CARDOSO, E. J. B. N. **Effect of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus dynamics and the bacterial community during composting of sugarcane industry waste.** Systematic and Applied Microbiology. v. 40, p. 308-313, 2017.

EVANGELISTA, S. R et al. **Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation.** International Journal of Food Microbiology, v. 210, p. 102-112, 2015.

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

EVANGELISTA, S. R. et al. **Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process.** Food Microbiology, v. 44, p. 87-95, 2014a.

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

EVANGELISTA, S.R. et al. **Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process.** Food Microbiol. 44, 87–95, 2014b.

FAO. **Agricultural production, primary crops.** 2012.

FERREIRA, D. S. **Determinação do potencial aromático de vinhos espumantes cujos vinhos base foram elaborados com leveduras *Saccharomyces* e *Torulaspota delbrueckii*.** 2019.

FREITAS, V. V. **Avaliação da fermentação do café arábica com uso de culturas starters.** 2018.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N.V.; DAWSON, K.; POWER, R. **Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash.** J Ind Microbiol Biotechnol, v. 33, p. 469-74, 2006.

HAMDOUCHE, Y et al. **Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses.** Food Control, v. 65, p. 112-120, 2016.

HAMMOND, J. R. M. **Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century.** Progress to date. Yeast, v.11, n.16, p.1613-1627, 1995.

HANDE, A.; MAHAJAN, S.; PRABHUNE, A. **Evaluation of ethanol production by a new isolate of yeast during fermentation in synthetic medium and sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate.** Annals of Microbiology, v. 63, p 63-70, 2013.

HOLZAPFEL, W. H. **Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries.** International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 197-212, May 2002.

HOLZAPFEL, W.H. **Use of starter cultures in fermentation on a household scale.** Food Control, 8 (1997), pp. 241–258.

HOWELL, K. S. et al. **Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation.** Letters in Applied Microbiology, v. 38, n. 4, p. 315–320, 2004.

JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. **Alcohol fermentation by yeasts. The effect of environmental and other variables.** Process Biochemistry, n. 1981, p. 42-49.

Kirsop, B. E.; Kurtzman, C. P. *Yeast*. Cambridge University Press, Cambridge. 233 pp. 1988.

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. **Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera Babjeviella, Meyerozyma, Millerozyma, Priceomyces, and Scheffersomyces.** Mycoscience, v. 51, p. 2-14, 2010.

LEE, L. W. et al. **Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship.** Food Chemistry, v. 185, p. 182-191, 2015.

LEE, S; LIN ,S; CHOU, C. **Growth of and Production of γ -decalactone by Sporobolomyces odoratus in Jar Fermentors as Affected by pH, Aeration and Fed Batch Technique.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 80, n. 2, p. 195-199, 1995.

LIMA, E. B, de et al. **Estudo da cinética de crescimento e resistência de microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*) na presença de cisplatina empregando um sistema fluxo-batelada.** Dissertação, 2016.

LOPES, M.L.; PAULILLO, S. C.L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A. LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H.V. **Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry.** Braz J Microbiol. 47, 64-76, 2016.

MAKANJOULA, D.B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D.G. **Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations.** Enzyme Microb Technol, v. 14, p.350-7, 1992.

MARTINEZ, S. J. et al. **Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures.** Food Research International, v. 102, p. 333-340, 2017.

MARTINS, A. L. **História do Café.** São Paulo: Contexto, 2. ed. 2012, 320 p.

MARTINS, P. M. M et al. **Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical compounds and the quality of fermented coffees.** Food Research International, v. 129, p. 108872, 2020.

MASOUD, W et al. **Levedura envolvida na fermentação de *Coffea arabica* na África Oriental determinada por genotipagem e por eletroforese em gel de desnaturação direta.** Levedura, v. 21, n. 7, pág. 549-556, 2004.

MAZO, J. Z. et al. **Detecção de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN em melão de cana-de-açúcar sob fermentação submersa.** Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 20, n. 1, 2002.

MICHEL, M et al. **Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with *Torulaspora delbrueckii* as model.** Yeast, v. 33, n. 4, p. 129-144, 2016a.

MIRANDA, A. R. de. **Aspectos fisiológicos da adaptação de *Lactobacillus vini* à fermentação alcoólica industrial.** 2015.

MOUSA, A. et al. **Evaluation of physiochemical, textural, microbiological and sensory characteristics in set yogurt reinforced by microencapsulated *Bifidobacterium bifidum* F?35.** International journal of food science & technology, v. 49, n. 7, p. 1673-1679, 2014.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. **Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations.** Prog Energy Combustion Sci, v. 37, p.351–370, 2011.

N'GUESSAN, K. F.; BROU, K.; JACQUES, N.; CASAREGOLA, S.; DJE, K. M. **Identification of yeasts during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 99, p. 855-864, 2011.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. **Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium.** *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 26, p. 171-7, 2001.

NEVES, K, C, S; PORTO, A, F; TEIXEIRA, M, F, S. **Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular.** *Acta Amazonica*, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

NICOLAU, P, B. **Microrganismos e crescimento microbiano.** 2014.

NOLASCO JUNIOR, J et al. **Eficiência de processo térmico para mostos a base de caldo de cana e melão na produção de bioetanol.** 2010.

NYKO, D.; GARCIA, J. L. F.; MILANEZ, A. Y.; DUNHAM, F. B. **A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada.** *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, n. 32, p. 5-48, 2010.

PAPALEXANDRATOU, Z.; DE VUYST, L. **Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis.** *FEMS Yeast Research*, v. 11, p. 564-574, 2011.

PEIGHAMBARDOUST, S. H.; TAFTI, A. G; HESARI, J. **Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 22, n. 5, p. 215-224, 2011.

PUERTA, G. I.; ECHEVERRY, J. G. **Fermentación controlada del café: tecnología para agregar valor a la calidad.** *Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé)*, 454, p. 1-12, 2015.

REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; DA SILVA, J. C. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. **Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation.** Braz J Microbiol. v. 44(4), p. 1121–1131, 2013.

RIBEIRO, L. S et al. **Fermentação controlada de café semi-seco (*Coffea arabica*) usando culturas starter: uma perspectiva sensorial.** LWT-Food Science and Technology , v. 82, p. 32-38, 2017.

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

RIBEIRO, L. S. et al. **Controlled fermentation of semi-dry coffee (*Coffea arabica*) using starter cultures: A sensory perspective.** LWT-Food Science and Technology, v. 82, p. 32-38, 2017b.

RODRIGUES, A. N.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. Ciênc. Tecnol. Aliment., 21 (1): 63-66. 2001.

RUYTERS, S. et al. **Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 42, n. 1, p. 39–48, 2015.

SANTOS, Bruno Aparecido da Silva. **Estudo da biodegradação de glicerina em processos de cofermentação com melão de cana-de-açúcar.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2016.

SAKIYAMA, N. S.; FERRÃO, M. A. G. **Botany and Production of coffee.** In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Ed.). **Cocoa and Coffee Fermentations.** CRC Press, Taylor & Francis Group. Florida, EUA, 2015. p. 341-365.

SAUCEDO-LUNA, J.; CASTRO-MONTOYA, A.J.; MARTINEZ-PACHECO, M.M.; SOSA-AGUIRRE, C.R.; CAMPOS-GARCIA, J. **Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic**

residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. v. 38, p. 725-732, 2011.

SCHWAN, R. F.; SILVA, C. F.; BATISTA, L. R. **Coffee fermentation.** In: HUI, Y. H. (Ed.). **Handbook of plant-based fermented food and beverage technology.** Boca Raton: CRC, 2012. p. 677-690.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. **Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee.** In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. (Ed.) **Yeasts in Food.** Behr's Verlag, Hamburg, 2003, p.426-459.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. e AZEVEDO, J. L. **Biociologia: avanços na agricultura e na agroindústria.** 1. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 433p., 2002.

SHAHIDI, F.; HAN, X?Q. **Encapsulation of food ingredients.** **Critical Reviews in Food Science & Nutrition,** v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SILVA, C. F. et al. **Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 29, p. 235-347, 2013.

SILVA, C. F. et al. **Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil.** International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 60, p. 251-260, 2000.

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

SINGH, B.P.; TANDON, R.N. **Phosphorus requirements of certain isolates of *Alternaria tenuis* Autct.** Proceedings of National Academy of Sciences India B, Allahabad, v.37, p.131-134, 1967a.

SINGH, B.P.; TANDON, R.N. **Sulfur and phosphorus requirements of *Alternaria tenuis* Auct. isolated from papaya (*Carica papaya L*) leaf.** Proceedings of National Academy of Sciences India B, Allahabad, v.37, p.199-203, 1967b.

SOUSA, A. G.; COSTA, T. H. M. de. **Usual coffee intake in Brazil: results from the National Dietary Survey 2008–9.** British Journal of Nutrition, v. 113, p. 1615–1620, 2015.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS. P. J.; STANLEY, G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology, v.109, p. 13-24, 2010.

STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.** [s.l: s.n.]. 2001.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. **Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash.** J Appl Microbiol, v. 90, p. 819-28, 2001.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. **Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids.** Appl Environ Microbiol, v.68, p.1616-23, 2002.

Tornai-Lehoczki, J; Péter, G.; Dlačny, D. **CHROMagar *Candida* medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of**

yeast species isolated from salads. Inter. J. of Food Microbiology, (86): 189-200, 2003.

TRAVER, M. H.; KIJNE, J. W.; SMIT, G. **Cause and control of flocculation in yeast.** Trends in Biotechnology, v. 11, p. 228-232, 1993.

VAUGHAN-MARTINI, A.; KURTZMAN, C.P.; MEYER, S. A.; O'NEILL, E. B. **Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov.** FEMS Yeast Research. v. 5, p. 463- 469, 2005.

VILELA, D. M., et al. **Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.).** Food Microbiology, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, 2010.

WICKERHAM, Lynferd J. **Uma avaliação crítica dos testes de assimilação de nitrogênio comumente usados na classificação de leveduras.** Journal of bacteriology, v. 52, n. 3, pág. 293, 1946.

YAO, Y.; GAO, B., ZHANG, M., INYANG M., ZIMMERMAN, A. R. **Effect of biochar amendment on sorption and leaching of nitrate, ammonium and phosphate in a sandy soil.** Chemosphere. v. 89, p. 1467-1471, 2012.