

UEA

UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

DAIANA RODRIGUES TORRES

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS (SINGLE CELL
PROTEIN) UTILIZANDO MANIPUEIRA E HIDROLISADO DA CASCA DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta Crantz*).**

MANAUS
2014

DAIANA RODRIGUES TORRES

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS (SINGLE CELL
PROTEIN) UTILIZANDO MANIPUEIRA E HIDROLISADO DA CASCA DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta Crantz*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr. Érica Simplício de Souza
Co-Orientador: Prof^o. Dr. João Vicente Braga de Souza

**MANAUS
2014**

DAIANA RODRIGUES TORRES

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS (SINGLE CELL
PROTEIN) UTILIZANDO MANIPUEIRA E HIDROLISADO DA CASCA DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta Crantz*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

AVALIADOR 1

AVALIADOR 2

AVALIADOR 3

**MANAUS
2014**

*A vocês que, muitas vezes,
renunciaram aos seus sonhos para
que eu pudesse realizar o meu,
partilho a alegria deste momento,
meus pais: Fátima e Alberto Torres.*

AGRADECIMENTOS

Em especial à grande família: Meus pais, Fátima e Alberto, pela educação que me foi dada, pela dedicação, pelo amor e pela confiança que sempre depositaram em mim. Vocês são minhas fontes de inspiração e forças. Meus irmãos: Ramon, Ramilton, Suzana, Ailton, Yasmim e Ângelo, por partilharem de suas vidas comigo, pelo respeito, carinho e amizade. E também pelas “Trolagens” de cada dia. Meus sobrinhos: Ícaro, Safira, Aila e Ágatha, pelo sorriso lindo que recebo gratuitamente a cada chegada, e que me fazem esquecer tudo. Obrigada por tornarem a minha vida mais feliz!

Aos meus orientadores, DSc. Érica Simplício de Souza e DSc. João Vicente Braga de Souza, por terem aceitado a orientação de minha dissertação, pela paciência, disponibilidade, motivação e confiança. Por terem me auxiliado a continuar trilhando este caminho e à oportunidade de trabalhar com vocês, manifesto meu agradecimento e estima.

À MSc. Hilma Couto, por me acompanhar nos passos iniciais da vida acadêmica e pela amizade conquistada.

Às DSc. Sônia Maria da S. Carvalho e Ormezinda Celeste C. Fernandes, e ao DSc. Luiz Antônio de Oliveira, por aceitarem compor as bancas de qualificação e de defesa, pelas sugestões e análises significativas.

Aos micomaníacos do Laboratório de Micologia do INPA (técnicos, IC's, mestrados, doutorandos) pela companhia, ajudas oportunas, pela troca de experiências, pelos almoços, pelos trabalhos e pelas brincadeiras: Ana Cortez, Ana Karla, Amaury, Diego Fernando, Diego Rayan, Eliana (D. Lili), Genciana, Jéssica, João Neto, Luciana, Michele, Thaís, Ralyvan, Roberto, Silviane, Socorro, Sr. Raimundo, Sr. Rosalvo.

Às companheiras do PPG – MBT/UEA: Gabrielly, Janaína, Juliana, Laila, Luana e Weena, pela companhia nas disciplinas, pelos momentos alegres e infelizes compartilhados durante esses dois anos de mestrado.

Àquelas que caminham junto a mim na vida acadêmica e pessoal: Débora Moura e Rochelly Mesquita, obrigada pela amizade.

À coordenação e secretaria do PPG – MBT/UEA, Prof^o. Dr. Cleiton Fantin e Bervely Franklin, pela solicitude sempre que necessário.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia – INPA e à Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

Ao CNPQ e FAPEAM pelo apoio financeiro.

E todos aqueles que participaram e contribuíram de alguma forma na realização desta dissertação.

Muito obrigada!

RESUMO

O interesse em obter alimentos de alto valor comercial e a baixo custo tem levado pesquisadores a buscarem novas fontes alimentícias capazes de satisfazer as necessidades nutricionais. E com esta finalidade, tem sido estudada, há algumas décadas, a produção de Single Cell Protein (SCP). Dentre as vantagens apresentadas na produção da SCP, a versatilidade de substratos utilizados na obtenção da biomassa microbiana tem chamado atenção. Assim, os resíduos agroindustriais, substratos de baixo custo e rico nutricionalmente para o crescimento de microrganismos, surgem como uma forma de reduzir os custos de produção da SCP. Tendo a disponibilidade local de resíduos provenientes do processamento da mandioca na região, o presente trabalho teve como finalidade investigar a produção de biomassa de leveduras amazônicas (single cell protein) utilizando manipueira e hidrolisado hemicelulósico da casca de mandioca em bioprocessos submersos. Na realização deste trabalho foram investigadas 20 leveduras de origem ambiental, não toxigênicas, pertencentes à coleção de microrganismos do INPA. Essas foram submetidas à bioprocessos submersos utilizando manipueira e hidrolisado hemicelulósico como substrato, ao final do processo foi quantificada a produção de biomassa celular, o microrganismo e o substrato mais adequado foram investigados, por meio de estudo cinético. O estudo cinético foi realizado com o conjunto levedura/substrato que apresentou as melhores características de crescimento nos ensaios de screening. Os ensaios foram realizados em períodos de 24h até 120h (24h, 48h, 72h, 96h e 120h), para avaliação do tempo ideal para maior produção de biomassa. Ao final de cada ensaio foram analisadas as características de pH, Brix, glicose, densidade óptica e biomassa seca para identificação do melhor tempo de processo. Por fim, a biomassa obtida foi quantificada quanto aos teores de proteínas totais. Também foi realizado, a partir de um delineamento experimental, a otimização do processo de obtenção do hidrolisado para avaliar a influência do tempo de hidrólise e da concentração de ácido sulfúrico (H_2SO_4) necessárias para a obtenção de um hidrolisado com maiores concentrações de açúcares. O planejamento fatorial utilizado foi do tipo 2^2 mais pontos axiais. O microrganismo utilizado para avaliação da produção de biomassa foi a levedura *Rhodotorula sp.* (LMM 4375), pertencente à coleção de culturas microbiológicas do INPA. A levedura selecionada foi submetida à bioprocessos, por 96 horas, 100rpm, com concentração celular de 1×10^4 cel/mL, sendo quantificado ao início e término de cada processo o °brix do substrato e ao final do bioprocessos a biomassa obtida foi quantificada. Nos ensaios de screening, o isolado *Rhodotorula* LMM 4375, apresentou a maior concentração celular ($9,64 \times 10^7 \pm 1,58 \times 10^7$) quando utilizado o hidrolisado da casca de mandioca como substrato. No estudo cinético da cepa selecionada, o isolado *Rhodotorula* LMM 4375 apresentou suas maiores produtividades e conversão de nutriente/biomassa entre 48-96 h. Quando avaliado o teor de proteínas presente na biomassa obtida, o isolado *Rhodotorula* LMM 4375 apresentou teor igual a 23% de proteínas. O planejamento fatorial possibilitou análise da superfície de resposta demonstrando as concentrações ótimas para a máxima produção do Brix do hidrolisado: Tempo de hidrólise de 9,5 minutos e Razão 0,2g H_2SO_4 /g de casca de mandioca e para produção da biomassa: Tempo de hidrólise de 19,5 minutos e Razão 0,14g H_2SO_4 /g de casca de mandioca. Assim, pode-se observar o potencial de uso do hidrolisado da casca de mandioca como substrato para a produção de biomassa de leveduras e também o potencial da cepa LMM 4375, como fonte geradora de single cell protein.

Palavras-chave: Single cell protein, leveduras, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

The interest in obtaining food of high commercial value and low cost has led researchers to seek new food sources capable of satisfying the nutritional needs. And for this purpose, have been studied for decades, the production of Single Cell Protein (SCP). Among the advantages presented in the production of SCP, the versatility of substrates used in the preparation of the microbial biomass has drawn attention. Thus, agroindustrial waste, low cost substrates and nutritionally rich for the growth of microorganisms appear as a way to reduce the production costs of the SCP. Since the local availability of waste from the processing of cassava in the region, this study aimed to investigate the biomass of Amazonian yeasts (single cell protein) using cassava and hemicellulosic hydrolyzate of cassava peel in submerged bioprocess. In this work 20 yeast to environmental, non- toxigenic, belonging to the collection of microorganisms of INPA were investigated. These were subjected to submerged bioprocess using cassava and hemicellulosic hydrolyzate as the substrate, the end of the process was measured to produce cell biomass, microorganism and the appropriate substrate were investigated by means of kinetic study. The kinetic study was performed with the whole yeast/substrate apresentarou the best growth characteristics in screening assays. Assays were performed in periods of 24h to 120h (24h, 48h, 72h, 96h and 120h) to assess the ideal for higher biomass production time. At the end of each trial were analyzed characteristic pH, Brix, glucose, optical density and dry biomass to identify the best process time. Finally, the biomass obtained was quantified for the levels of total protein. It was also tealizado from an experimental design, optimization of the process for obtaining the hydrolyzate evaluate the influence of hydrolysis time and the concentration of sulfuric acid (H_2SO_4) is necessary to obtain a hydrolyzate with higher concentrations of sugars. The experimental design used was more like 2^2 axial points. The microorganism used for evaluation of biomass production was the yeast *Rhodotorula* sp. (LMM 4375), belonging to the collection of microbiological cultures INPA. The selected yeast underwent bioprocess, for 96 hours, 100 rpm, with cell concentration 1×10^4 cel/mL, being measured at the beginning and end of each procedure the °Brix of the substrate and the end of the bioprocess biomass obtained was quantified. In screening tests, the isolated *Rhodotorula* LMM 4375, showed the highest cell concentration ($9.64 \times 10^7 \pm 1.58 \times 10^7$) when using the hydrolyzate of cassava peel as substrate. Kinetic study of the selected strain, isolated *Rhodotorula* LMM 4375 presented the highest yield and conversion of nutrient/biomass between 48-96 h. When evaluated on the content of this biomass obtained proteins, isolated *Rhodotorula* LMM 4375 presented content equal to 23 % of proteínas. The factorial design allowed analysis of the response surface showing the optimal concentrations for maximum production of the hydrolyzate Brix: Time hydrolysis ratio of 9.5 minutes and 0.2 g H_2SO_4 /g of cassava peel and biomass production: Time hydrolysis ratio of 19.5 minutes and 0.14 g H_2SO_4 /g of cassava peel. Thus, one can observe the potential use of the peel the cassava hydrolyzate as a substrate for the production of yeast biomass and also the LMM protencial strain 4375, as a source of single cell protein.

Keywords: Single cell protein, yeast, agroinduztriais waste.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Composição química da manipueira e do hidrolisado da casca de mandioca	36
Tabela 2 – pH observado a cada 24 horas nos bioprocessos realizados utilizando os isolados pertencentes a coleção do INPA e como substrato manipueira ou hidrolisado da casca de mandioca em processo submerso	38
Tabela 3 – Variação da concentração de açúcares solúveis nos substratos durante as 72h de fermentação.....	38
Tabela 4 – Produtividade (Px) e conversão de nutriente/biomassa (Yx/s) durante o bioensaio realizado com os isolados Rhodotorula LMM 4375 e S. cerevisiae S.C.1 utilizando como substrato o hidrolisado da casca de	41
Tabela 5 – Teores de nitrogênio total e proteínas da biomassa obtida	42

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Delineamento experimental para otimização do hidrolisado da casca de mandioca	51
Tabela 2 – Influência do tempo de hidrólise e razão gH ₂ SO ₄ /gcasca de mandioca no °Brix inicial do hidrolisado e da biomassa final em experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial 2 ² + pontos axiais	53
Tabela 3 – Efeito das variáveis testadas para a produção de brix do hidrolisado e de biomassa obtida, calculados a partir dos dados apresentados na tabela 1.....	53
Tabela 4 – Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para o °Brix do hidrolisado	54
Tabela 5 – Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para produção de biomassa	54
Tabela 6 – Parametros ideais para obtenção de hidrolisados de diversos resíduos agroindustriais, determinados por diferentes	57

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Concentração de células dos isolados de *C. tropicalis*, *Rhodotorula* sp., *Geotrichum* sp. e *S. cerevisiae*, utilizando como substrato manipueira ou hidrolisado da casca de mandioca em processo submerso, duração de 72h.....37

Figura 2. Estudo cinético (120h) realizado com os isolados *Rhodotorula* sp. LMM 4375 e *S. cerevisiae* S.C.1, utilizando como substrato o hidrolisado da casca de mandioca.....40

CAPÍTULO II

Figura 1 – Efeito do tempo de hidrólise e da razão $\text{gH}_2\text{SO}_4/\text{gcasca}$ de mandioca no °Brix do hidrolisado55

Figura 2 - Efeito do tempo de hidrólise e da razão $\text{gH}_2\text{SO}_4/\text{gcasca}$ de mandioca na biomassa obtida.....56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Single Cell Protein (SCP)	14
2.1.1 Leveduras utilizadas para a produção de SCP.....	15
2.1.2 Substratos	17
2.1.2.1 Manipueira	18
2.1.2.2 Hidrolisado hemicelulósico	19
2.2.2 Fatores físico-químicos relacionados à produção de SCP em fermentação submersa..	21
2.2.3 Composição química da SCP	21
3. OBJETIVO	23
3.1 Geral.....	23
3.2 Específicos.....	23
4. REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO I.....	30
ARTIGO I: Seleção de leveduras para produção de single cell protein usando manipueira e hidrolisado da casca de mandioca (<i>Manihot esculenta Crantz</i>) como substrato.....	31
CAPÍTULO II.....	48
ARTIGO II: Obtenção de hidrolisado da casca de mandioca para produção de single cell protein por <i>Rhodotorula</i> LMM 4375.....	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60

1. INTRODUÇÃO

O advento da preocupação com o acréscimo na demanda por alimentos e consequentemente a elevação dos custos de alimentos proteicos como carnes, laticínios e ovos em países em desenvolvimento, vem despertando o interesse de pesquisadores a buscarem novas fontes alimentícias não convencionais, capazes de satisfazer as necessidades nutricionais. Países em desenvolvimento como o Brasil, que possuem o setor primário de produção como base de sua economia e problemas populacionais como a desnutrição e a fome, tem interesse em obter alimentos mais baratos e/ou alternativos (ALBUQUERQUE, 2003). Visando este interesse, tem-se promovido o uso de resíduos agroindustriais que possam ser utilizados na obtenção de alimentos com alto teor proteico e de baixo custo. O que é possível, através da bioconversão destes resíduos que além de enriquecê-los nutricionalmente ainda produzem metabólitos que podem ser usados como insumos na indústria alimentícia e farmacêutica.

A fim de se obter alimentos com alto teor proteico e de baixo custo tem-se investigado há algumas décadas a produção de “Single Cell Protein” (SCP), que é o termo utilizado para designar células microbianas crescidas em cultura de massa e colhidas para utilização como proteína, fontes de alimentos ou rações para animais, que segundo Ferreira et. al. (2009), é uma fonte não convencional alternativa, podendo substituir proteínas convencionais de alto custo, como a carne.

Vários métodos vêm sendo empregados esperando-se obter um bioprocesso adequado para a produção de SCP, nesses métodos tem-se utilizado substratos obtidos a partir de vários resíduos agroindustriais. Segundo Suhet (2011), o uso desses resíduos pode ser justificado pelo fato destes serem fontes alternativas de carbono orgânico de baixo valor comercial e por sua disponibilidade local. Outro fator importante do uso de subprodutos da agroindústria no processo de obtenção de SCP é o fato de que durante a industrialização dos produtos agropecuários, são gerados resíduos líquidos e sólidos que se não forem tratados de forma adequada poderão causar forte impacto ambiental. Logo, a bioconversão de subprodutos agroindustriais para obtenção de SCP, além de ser uma alternativa de destinação adequada para estes resíduos pode ainda diminuir os custos na obtenção de proteínas unicelulares.

Desta forma, vários estudos têm sido realizados utilizando-se da bioconversão de

substratos obtidos a partir de vários resíduos da agroindústria, a fim de se obter fontes alternativas de carbono e energia, que possam reduzir os custos de produção e se obter biomassa microbiana de boa qualidade. Dentre os vários trabalhos encontrados na literatura podem ser citados os trabalhos realizados com o soro de queijo ou de leite (PARASKEVOPOULOU et al., 2003), material celulósico de origem vegetal (DIAZ et. al., 2003), melão e a vinhaça da cana de açúcar (ALTAF et. al. 2005), resíduos industriais de frutas (VENDRUSCOLO et. al., 2007), entre outros.

No Estado do Amazonas dentre as cultivares agrícolas produzidas, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) tem sua produção em destaque. Segundo dados do IBGE, o cultivo da mandioca é o mais expressivo, representando 23,8% da produção agrícola em 2010. O processamento da mandioca para a produção da farinha de mandioca gera resíduos sólidos e líquidos não esgotados e que necessitam de descarte adequado ou que podem ser empregados na obtenção de produtos de valor agregado. Tendo a disponibilidade destes resíduos na região, o presente trabalho teve como finalidade obter um bioprocesso adequado para a obtenção de biomassa de leveduras de valor proteico, a partir de substratos obtido da manipueira e hidrolisado da casca de mandioca em bioprocessos submerso.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Single cell Protein

Em 1966 o termo Single Cell Protein (SCP) foi criado no Instituto de Tecnologia de Massachusetts para descrever o uso de microrganismos como alimento, e o termo proteína unicelular tem sido utilizado de forma universal para designar as células cultivadas para a alimentação humana e animal (SUHET e FIOREZE, 2011; GIBRIEL et al., 1981).

A SCP tem sido objeto de vários estudos por representar uma opção para prevenir a insuficiência proteica e energética, principalmente em países em desenvolvimento, além de poder também ser utilizada para fornecer características desejáveis aos alimentos, como sabor, formação de espuma, retenção de água e de gordura, textura e outras (LITCHFIELD, 1983). Segundo Ferreira et. al. (2009), o uso de Single Cell Protein apresenta vantagens como: o seu rápido crescimento; a capacidade de usar uma variedade de substratos; o alto rendimento de biomassa; pode ser manipulado geneticamente para aumento de rendimento e melhora na composição, e, finalmente, não necessita de grandes áreas para a sua produção. Quando são utilizadas leveduras para a obtenção de Single Cell Protein, a biomassa produzida ainda pode ser utilizada na indústria de alimentos para produzir concentrados e isolados proteicos de levedura, mantendo suas propriedades funcionais e valores nutritivos. Vendrusculo (2005) citando Villas Boas e Espósito (2000) destaca também a vantagem da produção de SCP ser independente de efeitos climáticos e ambientais. Todas estas vantagens tem despertado o interesse de pesquisadores em viabilizar a produção de SCP.

Diante de todas estas vantagens, o custo da produção de SCP ainda é um fator limitante. Este custo pode ser representado por cerca 40 a 60% pela fonte de carbono utilizada no processo (VENDRUSCULO, 2005; VILLAS BOAS E ESPÓSITO, 2000), o que tem levado pesquisadores a buscarem fontes alternativas de carbono com maior disponibilidade e economicamente viável. Estas fontes alternativas têm sido buscadas em resíduos agroindustriais ou subprodutos lignocelulósicos como substrato para o crescimento de microrganismos. Esses substratos são utilizados por apresentarem alto conteúdo de açúcares que atuam como fonte de carbono e energia (KURBANOGLU, 2001).

Além dos açúcares outros nutrientes como o nitrogênio, fósforo e vitaminas são

necessários para o crescimento celular. Estes nutrientes devem ser mantidos em proporções adequadas para não afetar as condições de cultivo, como no caso da relação C:N, onde a proporção aproximada de 10:1 deve ser mantida para que o acúmulo de substâncias de reserva seja minimizado e a síntese proteica favorecida, contribuindo para que a composição da SCP não seja afetada pelas condições de cultivo (VENDRUSCULO, 2005; LITCHFIELD, 1983).

Desta forma, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de se obter bioprocessos que utilizem fontes alternativas de carbono e energia, a partir dos mais variados substratos e microrganismos, que possam reduzir o custo de produção e se obter SCP de boa qualidade.

2.1.1. Leveduras utilizadas para a produção de SCP.

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, caracteristicamente esféricos ou ovais. São amplamente distribuídos na natureza e se multiplicam por fissão binária ou por brotamento. Estes microrganismos são capazes de crescimento anaeróbio facultativo, pois podem utilizar oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons. Se for dado oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar carboidratos formando dióxido de carbono e água; na ausência de oxigênio, elas fermentam o carboidrato através de uma determinada via metabólica produzindo outros metabólitos (BRAGA, 2009 citando PINCUS et.al, 2007).

As leveduras possuem destaque na produção de proteína unicelular, pois a biomassa produzida por estas pode ser utilizada tanto integralmente quanto apenas alguns de seus compostos. Além de produtoras de proteínas as leveduras podem também ser utilizadas na alimentação humana devido aos teores adequados de vitaminas do complexo B. A produção de biomassa de leveduras como fonte de proteínas tem grande potencial econômico, principalmente considerando-se que pode substituir as tradicionais fontes de proteína utilizadas em rações animais, que apresentam um custo mais elevado. Tal biomassa caracteriza-se por poder apresentar elevado teor protéico, sendo mencionado, por exemplo, para *Candida utilis*, até 59,8% de proteína em relação ao peso seco utilizando-se glicose como fonte de carbono, além de conter aminoácidos essenciais e vitaminas (GÉLINAS e BARRETTE, 2007).

Um importante produto industrial derivado de *S. cerevisiae*, cujas células são ricas em proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas e sais minerais e apresenta níveis negligenciáveis de triglicerídeos é o extrato de levedura que tem importantes aplicações na indústria alimentícia e na de fermentações industriais, servindo como componente do meio de fermentação. Outras leveduras dos gêneros *Torulopsis* e *Candida* são capazes de crescer em melaço ou em licor sulfítico, subprodutos da fabricação de açúcar e da indústria de papel, respectivamente e são utilizadas para o tratamento destes resíduos industriais. A biomassa microbiana formada pode ser subsequentemente, utilizada como fonte de proteína para alimentação animal. Considerando ainda o potencial biotecnológico das leveduras, microrganismos dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Candida* são capazes de fermentar diferentes açúcares a etanol (PEREIRA Jr., 2008).

Dalmau et. al. (2000) verificaram que uma linhagem de *Candida rugosa* foi capaz de se desenvolver em meio contendo glicerol como fonte de carbono, de modo que para a concentração de glicerol de 2 g.L⁻¹ foram produzidos 1,25 g.L⁻¹ de biomassa, sendo que com glicose como fonte de carbono foram obtidos 0,97 g.L⁻¹ de biomassa. Quanto à utilização de glicerina como fonte de carbono na produção de biomassa, Tríboli et. al. (1994), utilizando meio de cultivo sintético contendo glicerol P.A. como principal fonte de carbono, durante o cultivo de *Candida utilis*, obteve uma produção de 480 g de levedura seca por kg de glicerol consumido.

Cazetta et. al. (2005), utilizando uma cepa da levedura *Rhodotorula mucilagenosa* e melaço de cana a 10% como substrato, obteve produção de biomassa com concentração de 0,68 g/L de proteínas totais. Apesar do resultado obtido por Cazetta, a biomassa de leveduras do gênero *Rhodotorula* tem sido estudada por vários autores devido o potencial de produção de carotenoides. Estes carotenóides apresentam atividade pró-vitamínica-A, aplicação industrial (pigmentos, farmacêutica, química e de produção de alimentos e de rações) e atividade anticarcinogênica (SQUINA; MERCADANTE, 2003). Devido o potencial para produção industrial, a obtenção de biomassa de leveduras do gênero *Rhodotorula* tem se destacado atualmente, tendo vantagens sobre outros gêneros por apresentar taxa de crescimento elevada e ainda utilizar substratos de baixo custo (MALISORN; SUNTORNSUK, 2008).

Ainda que muitos trabalhos tenham sido realizados a cerca da obtenção de biomassa de leveduras para a produção de proteína unicelular, ainda não se obteve o aguardado sucesso

devido a razões econômicas, políticas e psicológicas, mas espera-se que a produção de biomassa como fonte de proteínas seja capaz de diminuir a demanda mundial de proteínas, ajudando a resolver o problema da fome no futuro (MORAES, 2002).

2.1.2. Substratos

A escolha do substrato para a produção de biomassa proteica deve ser elaborada a fim de se obter um meio de cultivo de menor custo, visto que o custo dos ingredientes utilizados no meio de cultivo está diretamente ligado ao valor do produto final. Em cultivos industriais, a contribuição das matérias primas no custo da produção final pode variar de 5 até 50% (como na produção de etanol). A meta do processo fermentativo é sempre a redução do custo total através do aumento do rendimento e da utilização de ingredientes com menor custo no processo (DEMAIN e DAVIES, 1999; ROEPCKE, 2007).

Visando a redução de custos e o aumento no rendimento do processo de obtenção de biomassa microbiana, o uso de resíduos ou subprodutos agroindustriais como substratos para a produção de proteína microbiana ou “single cell protein”, vem ganhando forte interesse devido ao elevado valor nutricional desses produtos (CAZETTA e CELLIGOI, 2005). Esses resíduos possuem como características principais, açúcares redutores, materiais fibrosos e diversos nutrientes essenciais para o desenvolvimento de microrganismos, além de apresentarem baixo custo (VENDRUSCOLO et. al., 2009; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

Os resíduos agroindustriais se apresentam como matérias-primas ricas, do ponto de vista da produção de proteína unicelular, porém muitas vezes não são aproveitados, mas descartados diretamente no ambiente, onde causam sério impacto. O aproveitamento biotecnológico desses resíduos, além de diminuir o teor de poluentes, é responsável pela produção de um alimento com excelente perfil nutricional aumentando, com isto, seu valor agregado (SABRA, 2004).

Como substratos tem sido utilizado diversos subprodutos agroindustriais para a produção de SCP, estes resíduos têm sido aplicados devido a fatores como a disponibilidade local e por favorecerem uma fonte alternativa de baixo valor comercial. Entre os subprodutos mais abundantes, podem ser citados: o soro de queijo ou de leite (PARASKEVOPOULOU et.

al., 2003), e os resíduos da produção do glutamato (ZHENG et. al., 2005), material celulósico de origem vegetal (DIAZ et. al., 2003). Também merecem realce o melaço e a vinhaça de cana-de-açúcar, que podem ser empregados para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos de interesse industrial (ALTAF et. al., 2005) por muitos microrganismos como leveduras, algas, fungos e bactérias (ARNOLD; KNAPP; JOHNSON, 2000; ANUPAMA e RAVINDRA, 2000). Também se tem registros do uso de resíduos como cereais (GIBRIEL et. al., 1981), mandioca (DAUBRESSE et. al., 1987) e resíduos industriais de frutas (VENDRUSCOLO et. al., 2007).

2.1.2.1. Manipueira

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é destacada por Chiste e Cohen (2011), como importante produto da agricultura familiar no norte e nordeste do Brasil, onde números expressivos de indivíduos do meio rural vivem da produção e processamento da farinha e outros produtos, constituindo atividades de baixo investimento e fácil comercialização. Com perspectivas de crescimento em todo o mundo (ZISKA et. al., 2009), o segmento industrial da mandioca opera processos geradores de subprodutos com elevadas cargas orgânicas e grandes vazões (CAMPOS et. al., 2006).

A manipueira é gerada no processo de fabricação de farinha, pela prensagem da massa ralada da mandioca. Apresenta composição rica em nutrientes como carboidratos e minerais. Além dos nutrientes, a manipueira apresenta em sua composição, glicosídeos cianogênicos, como a linamarina (CASSONE e CEREDA, 2011). A linamarina é capaz de gerar ácido cianídrico por hidrólise, pois quando o tecido vegetal é dilacerado, a linamarina é hidrolisada por uma enzima glicosidase, denominada linamarase. Essa clivagem produz glicose e hidroxinitrila. Essa última substância, quando catalisada por uma liase, transforma-se espontaneamente em HCN e nas cetonas correspondente. Embora essa reação não possa ocorrer na planta, enzimas presentes no trato digestivo dos animais e seres humanos possuem a capacidade de efetivá-la, podendo advir sintomas de intoxicação, dependendo da quantidade e tipo de alimento ingerido (CAGNON et.al., 2002; CEREDA, 2003; LIMA, 2010).

Devido ao alto teor de matéria orgânica (chegando até 100g DQO L-1) e também à toxicidade pela presença da linamarina, enzimaticamente hidrolisável a cianeto, a manipueira,

quando disposta de forma inadequada, pode reduzir a disponibilidade de oxigênio em cursos d'água causando danos aos organismos aeróbios existentes nesse ambiente, além de apresentar riscos ao meio ambiente e também à saúde pública pela sua toxicidade. Há também um prejuízo econômico, visto que grande quantidade de amido, produto com grande valor agregado, está sendo descartada (DEL BIANCHI, 1998; BARANA, 2000; CEREDA, 2000; BUENO & DEL BIANCHI, 2012).

Diante destas características presentes na manipueira, tem-se realizado vários estudos empregando a manipueira em diferentes processos que a partir da biotransformação possam ser capazes de aproveitar este resíduo, conferindo-lhe valor agregado e diminuindo os possíveis impactos ao ambiente causados pelo descarte incorreto deste subproduto agrícola. Assim, tem-se registro da aplicação da manipueira em estudos agrícolas relacionados à fertilidade do solo, isto porque a manipueira é um resíduo não esgotado e quando aplicado ao solo observa-se um acréscimo nas concentrações de elementos no solo, porém o acompanhamento da aplicação faz-se necessário devido à predominância de íon potássio que implica diretamente no desequilíbrio dos cátions básicos do solo (FIORETTO, 2001).

A manipueira também foi utilizada por Barros et. al., (2008), na produção de biossurfactantes (subproduto metabólico de bactérias, fungos e leveduras, que permitem o refino de petróleo) que desenvolveram um processo para aproveitar a água derivada da prensagem de mandioca. Leonel e Cereda (1995) empregaram a manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Já Ponte (1992), utilizou a manipueira como defensivo agrícola testado como nematicida e inseticida, revelando eficiência e notável economicidade e ainda sem os riscos de toxidez dos produtos comerciais.

Apesar das propostas baseadas em pesquisas realizadas por diversos autores, com o objetivo de agregar valor à manipueira como subproduto e diminuir a poluição ambiental, a manipueira ainda continua sem uso industrial.

2.1.2.2. Hidrolisado Hemicelulósico de material lignocelulósico.

As hemiceluloses são o segundo mais abundante polissacarídeo. Consistem em polímeros de açúcar flexíveis que compõem cerca de 20 a 40% do peso seco da biomassa e que caracteristicamente atuam como um elo entre a celulose e a lignina. Conformam-se como

correntes que reúnem microfibrilas de celulose ou funcionam como um revestimento deslizante para impedir o contato direto entre as microfibrilas. Assim como a celulose, possuem ligações do tipo β 1-4 que tem resíduos de D-glicose. No entanto, possuem cadeias laterais curtas compostas por pentoses e hexoses (TAIZ e ZEIGER, 2004; SQUMA et. al., 2009). As frações de hemicelulose incluem arabinas, galactanas, mananas e xilanas. Logo, os constituintes que são caracterizados como monômeros de hemiceluloses são as pentoses D-xilose e L-arabinose, hexoses como a D-galactose, D-glicose e D-manose, ácidos urônicos, 4-O-metilglucurônico e galacturônico, assim como radicais acetila (HUBER, IBORRA, CORLX, 2006).

Devido à forte interação entre a hemicelulose e a lignina, que forma uma barreira física em torno do material celulósico presente na estrutura vegetal, o material deve ser tratado de forma a quebrar a estrutura formada pela lignina e hidrolisar a hemicelulose e celulose, liberando açúcares fermentescíveis (CAMASSOLA, DILLON, 2009), para que então possa ser utilizado em bioprocessos. De acordo com Wei et. al. (2009), esta etapa chamada de pré-tratamento do material lignocelulósico, pode envolver métodos físicos, químicos, biológicos e até mesmo operações para limpar e reduzir o tamanho da matéria-prima, promovendo a separação da celulose, hemicelulose e lignina.

Dentre as técnicas de hidrólise utilizadas para a separação das frações do material lignocelulósico, pode-se destacar a explosão a vapor, a hidrólise enzimática, os tratamentos hidrotérmicos e a explosão da fibra por amônia - AFEX, a utilização de hidrólise com ácido diluído e a utilização de peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente como métodos de obtenção de produtos de interesse industrial a partir da biomassa vegetal (MOSIER et. al., 2005; SÁNCHEZ e CODORNA, 2008).

De todos os pré-tratamentos, o tratamento químico, utilizando hidrólise com ácido diluído (ácido sulfúrico 0,5 – 1,5%, em temperaturas em torno de 160 °C) tem sido favorecido para aplicação industrial, por que alcança razoáveis rendimentos de açúcares provenientes da hemicelulose e quando comparada com a hidrólise com ácido sulfúrico concentrado é mais barata (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; CANILHA et.al., 2010), além de gerar menor quantidade de produtos de degradação (5-hidroximetilfurfural e furfural), que são tóxicos aos microrganismos e causa menos problemas de corrosão nos tanques de hidrólise e tubulações (VAN WALSUM; SHI, 2004).

2.2.2. Fatores físico-químicos relacionados à produção da SCP em SbF.

A fermentação submersa (SbF) é um processo que disponibiliza os nutrientes para o micro-organismo em meio líquido. Nutrientes como peptonas, açúcares e substâncias complexas (vitaminas e íons) são dissolvidos em água ou mesmo em soluções tampões. Essas fermentações devem ser mantidas em agitação constante para ideal aeração e disponibilidade de nutrientes (FERNANDES et. al., 2007; FARINAS et. al., 2011).

Na SbF a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo de substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, tem-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação do produto/substrato (MITCHELL, et. al., 2000; SINGHANIA et.al., 2010).

Outra vantagem desse tipo de cultivo é possibilitar o aproveitamento de resíduos agroindustriais como melaço de soja, melaço de cana, vinhaça de soja entre outros, permitindo o desenvolvimento de um processo ecologicamente correto e atrativo do ponto de vista do custo-benefício (RUBELL, 2006).

2.2.3. Composição química da SCP.

Estudos recentes procuram utilizar microorganismos e seus derivados, em forma ativa ou inativa, como fontes de nutriente para ração de animais, pois além de atuarem como nutrientes da dieta ainda potencializam a sua ação como pronutriente, probiótico e imunoestimulante (GATESOUBE, 2007). No caso da biomassa de leveduras, esta pode ser utilizada tanto integralmente quanto apenas alguns de seus componentes como o extrato e parede celular.

Segundo Silva (2009), a levedura seca contém alto teor de proteína e é rica em vitaminas do complexo B, minerais e fibra dietética, além de possuir grande diversidade de aminoácidos, principalmente lisina. Entre as substâncias que compõem a levedura, destacam-se os componentes da parede celular, como glicana, manana e quitina. Entretanto, a qualidade das leveduras pode variar de acordo com o processo a que são submetidas.

Em termos percentuais, a levedura seca possui teor de proteína bruta entre 30 e 45%, composta por nitrogênio total, consistindo em cerca de 80% dos aminoácidos totais, 12% de ácidos nucleicos e 8% de amônia (VALADARES FILHO et. al., 2010). Possui também alta concentração de vitaminas do complexo B, como B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina (YAMADA et. al., 2003) e ainda possuem em sua composição 20 a 40% de carboidratos, que provém, na sua grande maioria da parede celular, que é composta de β -glucanos e mananos (BARBALHO, 2005).

Já o extrato de leveduras contém cerca de 40% de aminoácidos livres, 5 a 7% de nucleotídeos, além de peptídeos, minerais e vitaminas solúveis em água. Os aminoácidos predominantes são o ácido glutâmico e o aspártico, os quais contribuem para o uso do extrato de leveduras como flavorizante e inositol (SILVA, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar a produção de biomassa (*single cell protein*) de leveduras amazônicas utilizando manipueira e hidrolisado hemicelulósico em bioprocesso submerso.

3.2. Específicos

- Investigar as características da manipueira e do hidrolisado da casca de mandioca;
- Selecionar linhagens de leveduras e substrato para produção de biomassa (*single cell protein*);
- Investigar os parâmetros fermentativos em estudo cinético das linhagens selecionadas;
- Estudar as características da biomassa obtida com as linhagens selecionadas;
- Determinar as condições de obtenção do hidrolisado da casca de mandioca para produção de Single Cell Protein.

4. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P.M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã.** Florianópolis. 2003. 103p. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina.
- ALTAF, M. D.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V.; REDDY, G. **Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract – optimization by RSM.** *Process Biochemistry*, London, v.41, n.2, p.465-472, Feb. 2005.
- ANAPUMA; RAVINDRA, P. **Value-added food: Single cell protein.** *Biotechnology Advances*. V.18. p.459-479. 2000.
- ARNOLD, J. L.; KNAPP, J. S.; JOHNSON, C. L. **The use of yeast to reduce the polluting potential of silage effluent.** *Water Research*, New York, v.34, n.15, p.3699-3708, 2000.
- BARANA, A.C.; **Avaliação de Tratamento de Manipueira em Biodigestores Fase Acidogênica e Metanogênica,** Botucatu. 2000. 95p. (Tese de Doutorado). UNESP/Faculdade de Ciências Agrônomicas.
- BARBALHO, R. **Levedura inativa como microingrediente de ação profilática na alimentação de aves e suínos.** *Guia avicultura industrial*, v. 6, n. 1135, p.40-46, 2005.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. **Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.28, n.4, p.979-985, out.-dez, 2008.
- BRAGA, A. R. C. **Viabilização da utilização de co-produtos da agroindústria na Produção de β -galactosidase.** Rio Grande. 2009. (Dissertação) Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BUENO, G. F.; DEL BIANCHI, V. L. **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PARALISAÇÃO DA AERAÇÃO NO TRATAMENTO BIOLÓGICO AERÓBIO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA INDÚSTRIA DE FARINHA DE MANDIOCA.** *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.14, n.3, p.211-217, 2012
- CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. In Cd-rom. Série: Cultura de tuberosas amiláceas latinoamericanas. Vol.2 – **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas.** Fundação Cargill. Ago/2002.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.), **Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*.** *Industrial Crops and Products*, v.29 p. 642–647, 2009.

CAMPOS, A. T.; DAGA, J.; RODRIGUES, E. E.; FRANZENER, G.; SUGUY, M. M.; SYPPERRECK, V. I. G. **Tratamento de águas residuárias de fecularia por meio de lagoas de estabilização.** *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v.26, n.1, p.235-242, 2006.

CANILHA, L.; CARVALHO, W. ; FELIPE, M. G. A. ; ALMEIDA E SILVA, J.B. ; GIULIETTI, M. **Ethanol production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitis*.** *Applied Biotechnology*, n. 161, p.84-92, 2010.

CASSONI, V.; CEREDA, M. P. **Avaliação do processo de fermentação acética da manipueira.** *Rev. Eng. na Agricultura*, Botucatu, v.26, n.4, p. 101-113, 2011.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M.A.P.C. **Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria.** *Ciências Exatas e Tecnológicas*, v.26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CEREDA, M. P. **Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca.** IN: Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo, Fundação Cargill, 2000, v.4, p.13-37.

CHISTE R. C.; COHEN K. O. **Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi.** *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.70, n.1, p. 41-46, 2011.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. **Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 657-663, 2000.

DAUBRESSE, P. NTIBASHIRWA, S.; GHEYSEN, A; MEYER, J. A. **A process for protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation in rural conditions.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.29, p.962-68, 1987. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260290807>

DEL BIANCHI, V.L. **Balço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo.** Botucatu. 1998. 118p. (Tese de Doutorado). UNESP/Faculdade de Ciências Agrônômicas.

DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** 2.ed. AMS Press: Washington, 1999. 830 p.

DIAZ, M. J.; EUGENIO, M. E.; JIMÉNEZ, L.; MADEJÓN, E.; CABRERA, F. **Modelling vinasse/ cotton waste ratio incubation for optimum composting.** *Chemical Engineering Journal*, Lausanne, v.93, n.3, p.233-240, 2003.

FARINAS, C. S.; SCARPELINI, L. M.; MIRANDA, E. A.; BERTUCCI NETO, V. **Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*.** *Brazilian Journal Chemical Engineering*, v.28, n.1, p.17-26, 2011.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. **Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media.** *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.44, n.1, p.8-13, 2007.

FERREIRA, L. F. R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial da cana-de-açúcar por fungos.** Piracicaba. 2009. 134p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FIORETTO, R. A. **Uso direto da Manipueira em Fertirrigação.** Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Fundação Cargill. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca, v. 4, 2001.

GATESOUBE, F. J. **Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development.** *Aquaculture*. v.267, p.20-30, 2007.

GÉLINAS, P.; BARRETTE, J. **Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation.** *Bioresour. Technol.* v.98, n.5, p.1138-1143, 2007.

GIBRIEL, A. Y.; MAHMOUD, R. M.; GOMA, M.; ABOU-ZEID, M. **Production of Single Cell Protein From Cereal by-Products.** *Agricultural Wastes*, v.3, p.229-40, 1981. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-4607\(81\)90030-5](http://dx.doi.org/10.1016/0141-4607(81)90030-5)

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, K. G.; FAAIJ, A. P. C. **Ethanol from lignocellulosic biomass: techno – economic performance in short-middle and long-termk.** *Biomass & Bioenergy*. v.28, p.389-410, 2005.

HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A. **Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering.** *Chemical Reviews*, v.106, n.9, p.4044-4098, 2006.

KURBANOGLU, E. B. **Production of single-cell protein from ram horn hydrolysate.** *Turkish Journal of Biology*, v.25, p.371-377, 2001.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.** *Sci. Agric.*, Piracicaba, v.52, n.2. p.299-304, 1995.

LIMA, R.A. **Tratamento de efluentes líquidos de unidades produtoras de farinha de mandioca.** Dissertação (desenvolvimento de processos ambientais), universidade católica de Pernambuco, Recife, 2010.

LITCHFIELD, J.H. **Single-cell proteins.** *Science*, 1983, vol.219, p.740-746, 1983.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. **Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing.** *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v.68, p.61-138, 2000.

MORAES, I. O. **Produção de micro-organismos**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e enzimáticos*. v. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., p. 199-217, 2002.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass**. *Science Direct*, v. 96, p. 673-686, 2005.

PARASKEVOPOULOU, A.; ATHANASIADIS, I.; KANELLAKI, M.; BEKATOROU, A.; BLEKAS, G.; KIOSSEOGLU, V. **Functional properties of single cell protein produced by Kefir microflora**. *Food Research International*, Barking, v.36, n.5, p.431-438, 2003.

PEREIRA Jr., N. **Tecnologia de bioprocessos**. PEREIRA Jr, N. (editor-autor).; BON, E. P. da S.; FERRARA, M. A. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.: il. – (Séries em Biotecnologia, v. 1).

PINCUS, D. H.; ORENGA, S.; CHATELLIER, S. **Yeast identification – past, present, and future methods**. *Medical Mycology*, v.45, p.97-121, 2007.

PONTE, J. J. **Históricos das pesquisas sobre a utilização da manipueira (extrato líquido das raízes de mandioca) como defensivo agrícola**. Universidade Federal do Ceará. Fitopatologia, Venez., v.5, n.1, p.2-5, 1992.

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. Curitiba. 2007. (Dissertação). Universidade Federal do Paraná.

RUBELL, R. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação no estado sólido: Avaliação da ação anti-tumoral, Imunomoduladora e hipolipidêmica**. Paraná. 2006. (Tese de doutorado), Setor de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SABRA, G. E. **Aproveitamento biotecnológico do soro de queijo para produção de proteína microbiana por *Kluyveromyces marxianus***. Mogi das Cruzes: UMC, 2004. 87p. Dissertação Mestrado

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C. A. **Trends in biotechnological production on fuel ethanol from different feedstocks**. *Bioresourse Tecnology*. v.99, n.18. p.5270-5295, 2008.

SILVA, V. K.; AMOROSO, L.; FUKAYAMA, E. H.; DOURADO, L. R. B.; MORAESV. M. B. **Digestibilidade do extrato de leveduras em frangos de corte**. *Rev. Bras. Zootec.* v.38 n.10, p.1969-1973, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.46, p.541-549, 2010.

SQUIMA, F. M.; MORT, A. J.; DECKER, S. R.; PRADE, R. A. **Xilan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase.** *Protein expression and purification*, v.68, n.1, p.65-71, 2009.

SUHET, M. I.; FIOREZE, R. **Produção de proteína unicelular a partir do resíduo da industrialização do abacaxi utilizando fermentação em estado semissólido.** *Rev. Bras. de Tec. Agroindustrial*, v.5, n.2, p.584-592, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
TRIBOLI, E. P. D. R.; JURKIEWICZ, C. H.; BORZANI, W. **Influence of the temperature on batch cultivation of *Candida utilis* IZ-1840 on a synthetic medium containing glycerol as the main carbon source.** *Biotechnology Letters*, v.16, p.385-388, 1994.

VALADARES FILHO, S. C.; MARRCONDES, M. I.; CHIZZOTTI, M. L.; PAULINO, P. V. R. **EXIGENCIAS NUTRICIONAIS DE ZEBUÍNOS PUROS E CRUZADOS.** BR-CORTE. 2ª ED. – VIÇOSA, MG: UFV, DZO. 2010. 193P.

VAN WALSUN, G. P.; SHI, H. **Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of com stover.** *Biores. Technol.* v.93, n.3, p.217-226, 2004.

VENDRUSCOLO, F.; KOCH, F.; PITOL, L. DE O.; NINOW, J. L. **Produção de proteína unicelular a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido.** *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial.* v.1, n.0, p.53-57, 2007.

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C.S.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J.L. **Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.13, n.4, p.487-493, 2009

VENDRUSCOLO, F. **Cultivo em meio sólido e submerso do bagaço de maçã por *Gongronella butleri* e avaliação do seu potencial biotecnológico.** Florianópolis - SC: UFSC, 2005. 96p. Dissertação Mestrado

VILLAS BOAS, S. G.; ESPÓSITO, E. **Bioconversão do bagaço de maçã; enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado.** *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento.* Brasília, v.3, n.14, p.38-42, 2000.

WEI, L.; PODERSIMO, L. O.; IGATHYNATHANE, C.; BATCHELOR, W. D. **Process engineering evaluation of ethanol production from wood through bioprocessing and chemical catalysis.** *Biomass and Bioenergy*, v.33, p.255-266, 2009.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. **Composição centesimal e valor proteico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados.** *Revista de Nutrição*, v.16, n.4, p.423-432, 2003.

ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z.; YANG, Q. **Biomass production from glutamate fermentation wastewater by co-culture of *Candida halophila* and *Rhodotorula glutinis*.** *Bioresource Technology*, Essex, v.96, n.13, p. 1522-1524, 2005.

ZISKA, L. H.; RUNION, G. B.; TOMECEK, M.; PRIOR, S. A.; TORBET, H. A.; SICHER, R. **An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland.** *Biomass and Bioenergy*, Oxford, v.33, n.11, p.1503-1508, 2009.

CAPÍTULO I**ARTIGO I**

Seleção de leveduras para produção de Single Cell Protein usando manipueira e hidrolisado da casca da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) como substrato.

Artigo a ser enviado para a Revista Process Biochemistry.

Seleção de leveduras para produção de Single Cell Protein usando manipueira e hidrolisado da casca da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) como substrato.

¹Daiana Rodrigues Torres; ²João Vicente Braga de Souza; ³Erica Simplício de Souza.

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Univ. do Estado do Amazonas - UEA. ²Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia, INPA. ³Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Escola Superior de Tecnologia – EST.

Resumo

Há algumas décadas vem sendo estudada a biomassa de leveduras para a produção de Single Cell Protein (SCP), como fonte alternativa de proteínas. Dentre as vantagens da produção de SCP em relação às proteínas convencionais está a capacidade de utilização de uma grande variedade de substratos. Assim, o presente trabalho objetivou selecionar linhagens e substratos para a produção de biomassa (*single cell protein*), e apartir das linhagens selecionadas, investigar os parâmetros fermentativos em estudo cinético e as características da biomassa obtida com as linhagens selecionadas. Para a realização deste trabalho foram investigadas 20 leveduras de origem ambiental, não toxigênicas, pertencentes à coleção de microrganismos do INPA. As cepas foram submetidas à bioprocessamento contendo 25mL dos substratos inoculados com 1×10^4 cél/mL, sob agitação orbital de 100 rpm e temperatura ambiente por 72h. O conjunto microrganismo/substrato com a maior concentração celular foi selecionado para a etapa seguinte, estudo cinético, realizado em períodos de 24h até 120h (24h, 48h, 72h, 96h e 120h), para avaliação do tempo ideal para maior produção de biomassa. Ao final de cada ensaio do estudo cinético foram analisadas as características de pH, Brix, glicose, densidade óptica e biomassa seca. Por fim, a biomassa obtida foi quantificada quanto aos teores de proteínas totais. Nos ensaios de screening, o isolado *Rhodotorula* LMM 4375, apresentou a maior concentração celular ($9,64 \times 10^7 \pm 1,58 \times 10^7$) quando utilizado o hidrolisado da casca de mandioca como substrato. No estudo cinético da cepa *Rhodotorula* LMM 4375 apresentou suas maiores produtividades e conversão de nutriente/biomassa entre 48-96 h. Quando avaliado o teor de proteínas presente na biomassa obtida, o isolado *Rhodotorula* LMM 4375 apresentou teor igual a 23% de proteínas. Assim, pode-se observar o potencial de uso do hidrolisado da casca de mandioca como substrato para a produção de biomassa de leveduras, visto que este substrato proporcionou o crescimento das leveduras em estudo, tendo se destacado a cepa *Rhodotorula* LMM 4375 que apresentou considerável teor de proteínas totais, apresentando-se assim com potencial para fonte geradora de single cell protein.

Palavras-chaves: Single cell protein, Manipueira e hidrolisado da casca de mandioca.

1. INTRODUÇÃO

A expansão populacional mundial e a preocupação com a possível escassez de alimentos proteicos têm despertado a busca por novas fontes alimentícias não convencionais, capazes de satisfazer as necessidades nutricionais. Como alternativa às proteínas convencionais está sendo desenvolvido nas últimas décadas o uso de microrganismos como fonte de proteínas, assim, o termo “Single Cell Protein” (SCP) tem sido utilizado para designar as células microbianas cultivadas para utilização como proteína, fontes de alimentos ou rações para animais. Para Ferreira et. al. (2009), a proteína de microrganismos unicelulares é uma fonte não convencional alternativa, podendo substituir proteínas convencionais de alto custo, como a carne. As vantagens do uso da SCP citadas por este autor são: o seu rápido crescimento; a capacidade de usar uma variedade de substratos; o alto rendimento de biomassa; pode ser manipulado geneticamente para aumento de rendimento e melhora na composição, e, finalmente, não necessita de grandes áreas para a sua produção. A biomassa de levedura ainda pode ser utilizada na indústria de alimentos para produzir concentrados e isolados proteicos de levedura, mantendo suas propriedades funcionais e valores nutritivos.

Para a produção de proteínas unicelulares muitos métodos têm sido empregados a fim de se obter biomassa microbiana de alto valor proteico, esses processos utilizam uma fonte de carbono orgânico e nitrogênio inorgânico esperando-se obter um bioprocessamento adequado. O uso de substratos obtidos a partir de vários subprodutos da agroindústria tem sido registrados em diferentes trabalhos desenvolvidos com os mais diversos subprodutos agroindustriais, como o soro de queijo ou de leite (PARASKEVOPOULOU et al., 2003), material celulósico de origem vegetal (DIAZ et. al., 2003), melão e a vinhaça da cana de açúcar (ALTAF et. al. 2005), resíduos industriais de frutas (VENDRUSCOLO et. al., 2007), entre outros. O uso de subprodutos agroindústrias no processo de obtenção de proteína unicelular pode ser justificado pela sua disponibilidade local e também por ser uma fonte alternativa de baixo valor comercial. Outro fator importante é que no processo de industrialização dos produtos agropecuários, são gerados resíduos líquidos e sólidos que se não forem tratados de forma adequada poderão causar forte impacto ambiental. A utilização destes resíduos como substratos no processo de biofermentação para obtenção de proteína unicelular vem como alternativa de destinação adequada para estes resíduos, o que pode diminuir os custos na obtenção de proteínas unicelulares.

No Estado do Amazonas dentre as cultivares agrícolas produzidas, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) tem sua produção em destaque. Segundo dados do IBGE, o cultivo da mandioca é o mais expressivo, representando 23,8% da produção agrícola em 2010, sendo produzido no Município de Parintins o correspondente a 65,9 mil toneladas do produto agrícola, que após processamento para a produção da farinha de mandioca gera resíduos sólidos e líquidos não esgotados e que necessitam de descarte adequado ou que podem ser empregados na obtenção de produtos de valor agregado.

Assim, o presente trabalho teve como finalidade selecionar linhagens de leveduras e substratos alternativos obtidos a partir do processamento da mandioca, para obtenção de biomassa e, a partir de estudo cinético da linhagem selecionada, investigar o tempo ideal para a máxima produção de biomassa sob as condições em estudo, para a obtenção de single cell protein.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Foram investigados cepas de *Candida tropicalis*: LMM1746, LMM1744, LMM1743 e LMM1749; *Geotrichum spp*: LMM2255, LMM2254, LMM2258 e LMM2257 e *Rhodotorula spp*: LMM4375, LMM4377, LMM4376 e LMM4373, pertencentes à coleção de fungos da Coleção Microbiana do INPA e isolados de *Saccharomyces cerevisiae*: SC1, SC2, SC3 e SC4, obtidos de fermento biológico seco instantâneo, marca Bruggeman. As culturas foram mantidas em meio de cultura Sabouraud (Dextrose 40 g/L, peptona 10g/L, 20g ágar) e armazenadas a 4°C.

2.2. Substratos para bioprocessos.

Manipueira: Este resíduo foi produzido a partir da mandioca obtida em uma propriedade rural na cidade de Manaus - Amazonas e processado no setor de produção/meios de cultura do Laboratório de Micologia do INPA. As mandiocas após serem lavadas foram

descascadas, trituradas e peneiradas para a obtenção da manipueira, seguindo as etapas realizadas em casas de farinhas da região e conforme descrito por Christé e Cohen (2011).

Hidrolisado da casca da Mandioca: Foi obtido por hidrólise ácida, realizada em reator com capacidade de 2L, método adaptado de Alves et. al. (1998). O processo foi realizado sob 121°C por 10 minutos, sendo o reator carregado com 1000 mL de solução de ácido sulfúrico (100 mg H₂SO₄:g casca) para cada 100g de casca de mandioca. Visando a remoção de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, o hidrolisado foi filtrado com carvão ativo e, em seguida, a solução foi filtrada a vácuo com membrana filtrante 47 mm x 0,45 µm (Millipore) e o pH ajustado com solução de NaOH 1M para pH 5,0. O hidrolisado obtido foi estocado a 4-8 °C até a sua utilização.

2.3. Caracterização química dos substratos.

Para avaliação das características químicas de interesse dos substratos utilizados para bioprocessos, foram realizadas as análises de:

- *pH:* Esta análise foi realizada utilizando pHmetro da marca Hanna, modelo HI 98128, para a medição do potencial hidrogeniônico da solução.
- *Açúcares solúveis (°Brix):* Análise realizada em refratômetro portátil Biobrix, modelo 103. Este aparelho é utilizado para determinar o teor de açúcares solúveis em solução a partir do índice de refração. Para isto é utilizada a escala Brix, onde cada grau brix corresponde a 1g de açúcar para 100g de solução.
- *Concentração de glicose:* Determinada pelo método enzimático colorimétrico da glucose oxidase utilizando kit Glucos 500, o qual contém tampão fosfato pH 7,4, Glicose- oxidase (GOD), Peroxi-oxidase (POD), 4-AAP e p-hidroxibenzoato. Nessa determinação a glicose da amostra é oxidada a ácido glucônico pela enzima GOD, liberando peróxido de hidrogênio, que reage com 4-AAP em reação catalisada pela POD, formando 4-antipirilquinonimina. Este composto possui coloração avermelhada, sendo sua intensidade diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra. Assim, após 10 minutos de incubação a 37°C, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em 510 nm.

- *Carboidratos totais*: foi realizada pelo método fenol-sulfúrico, baseado na degradação dos açúcares por ácido forte, que levam a produção de derivados de furano, que são condensadas, produzindo substâncias de cor castanha, sendo a concentração de açúcares determinada por espectrofotometria, medindo-se a absorbância a 490 nm. Este método foi baseado em Dubois et. al., 1956.
- *Determinação do teor de Amido*: Foi realizado pelo método da iodometria a partir de uma solução padrão de iodo, adicionada à mostra que resultava em uma solução marrom-avermelhada a azul, sendo a concentração de amido determinada por espectrofotometria. Baseado no método do lugol, Instituto Adolfo Lutz (2005).

2.4. Seleção das linhagens e do substrato para produção de biomassa.

Os microrganismos foram submetidos à bioprocessos em erlenmeyers (125 mL), contendo 25mL dos substratos para bioprocessos, inoculado com 1×10^4 cél/mL, mantido sob agitação orbital de 100 rpm e temperatura ambiente. A cada 24h foram recolhidas amostras para contagem de células, conforme Lee et.al. (1981), assim como também foram feitas as medidas de pH e brix, até um total de 72h, após esse período o conjunto microrganismo/substrato com a maior concentração celular foi selecionado para a etapa seguinte, estudo cinético.

2.5. Estudo cinético das linhagens selecionadas

O estudo cinético foi realizado com o conjunto levedura/substrato que apresentou as melhores características de crescimento nos ensaios de screening. Os ensaios foram realizados em períodos de 24h até 120h (24h, 48h, 72h, 96h e 120h), para avaliação do tempo ideal para maior produção de biomassa. Nesta etapa, o bioprocessos foi realizado em erlenmeyers (250 mL), contendo 100mL do substrato, inoculado com 1×10^4 cél/mL, mantido sob agitação orbital de 100 rpm e temperatura ambiente. Ao final de cada ensaio foram analisadas as características de pH, Brix e glicose conforme descrito no item 2.3, densidade óptica a 600nm conforme descrito por Silva (2007) e biomassa seca expresso em g/L (AOAC, 1995) para identificação do melhor tempo de processo.

2.6. Caracterização da biomassa obtida.

O bioprocesso que durante os ensaios cinéticos apresentou o melhor tempo de produção para biomassa seca (maior produtividade e conversão nutriente/substrato), foi selecionado para análise da biomassa obtida, sendo esta biomassa caracterizada quanto ao teor de proteínas totais:

- Proteínas Totais: utilizada a técnica do destilador micro-Kjeldahl e bloco digestor, baseado em hidrólise e posterior destilação da amostra, utilizando o fator $6,25 \times \%N$, de acordo com o método 31.1.08 da AOAC (1995).

2.7. Análise dos resultados.

Os ensaios de produção de biomassa, caracterização do substrato e de caracterização centesimal da biomassa foram realizados em triplicata e então calculados a média e o desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Características físico-químicas dos substratos.

A manipueira e o hidrolisado da casca da mandioca foram caracterizados quanto a sua composição química e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tab. 1. Composição química da manipueira e do hidrolisado da casca da mandioca.

Características físico-químicas	Hidrolizado da casca de mandioca	Manipueira
Umidade (%)	$96,78 \pm 0,02$	$90,1 \pm 0,2$
Carboidratos Totais (g/L)	$12,4 \pm 0,2$	73 ± 2
Glicose (g/L)	$8,69 \pm 0,02$	N.R.
Amido (g/L)	$1,5 \pm 0,1$	107 ± 1
°Brix	$4,00 \pm 0,00$	$6,5 \pm 0,2$
pH	$5,07 \pm 0,05$	$4,11 \pm 0,03$

NR- Ensaio não realizado

Ambos os substratos apresentaram concentrações de carboidratos, no entanto, a manipueira apresentou maiores concentrações de todos os estudados.

3.2. Screening das leveduras para a produção de single cell protein.

No screening realizado para selecionar o conjunto substrato/microrganismo com maior produção de biomassa, foram utilizadas as leveduras *Candida tropicalis* cepas: LMM1746, LMM1744, LMM1743 e LMM1749; *Saccharomyces cerevisiae* isolados: SC1, SC2, SC3 e SC4, *Geotrichum* spp. cepas: LMM2255, LMM2254, LMM2258 e LMM2257 e *Rhodotorula* spp. cepas LMM4375, LMM4377, LMM4376 e LMM4373. Na avaliação do crescimento celular, a partir da contagem de células, observou-se que as maiores concentrações celulares foram obtidas utilizando o hidrolisado da casca de mandioca e as leveduras *Candida tropicalis* LMM1746 e *Rhodotorula* LMM4375 (Figura 1), após 72 horas.

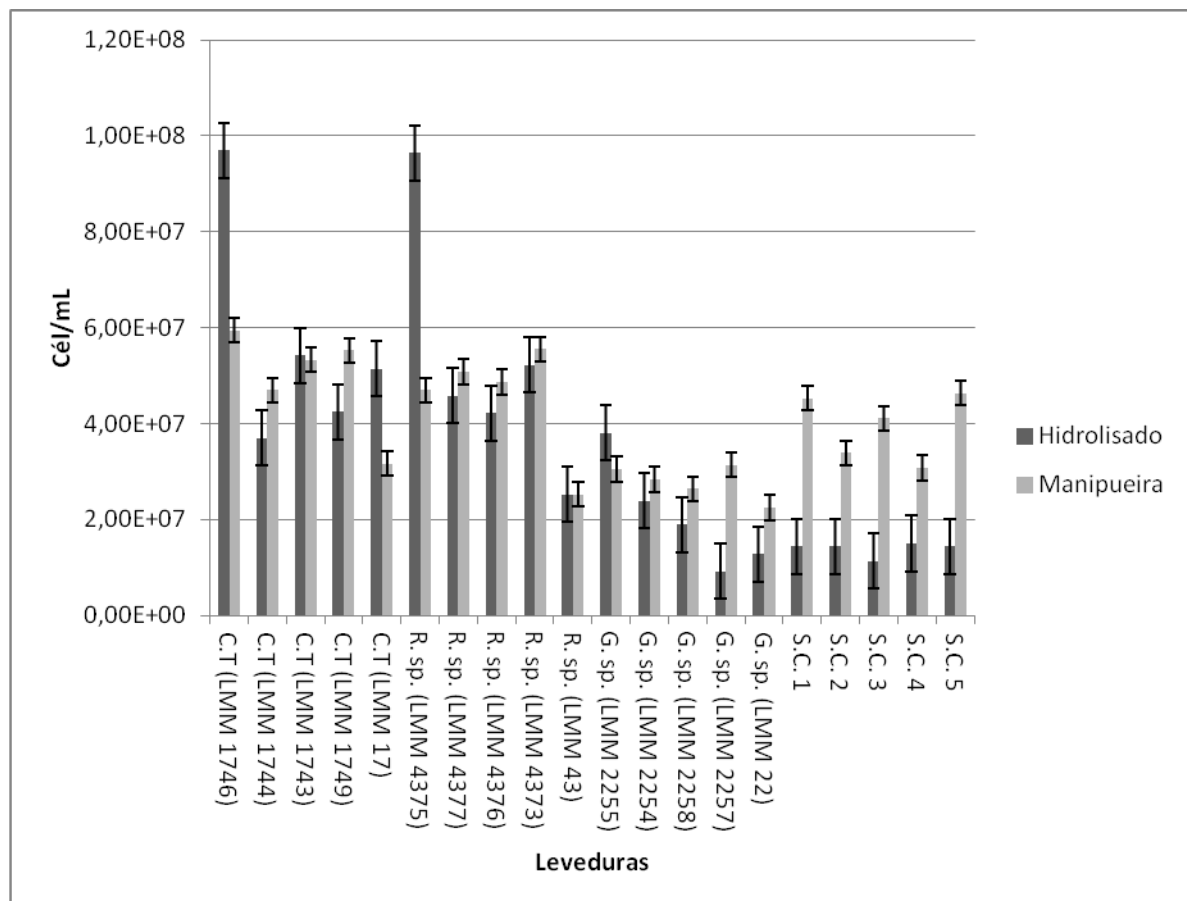


Figura 1. Concentração de células dos isolados de *C.tropicalis* (CT), *Rhodotorula* sp. (R. sp.), *Geotrichum* sp.(G. sp.) e *S. cerevisiae* (S.C.), em bioprocesso que utilizou como substrato manipueira ou hidrolisado da casca da mandioca, processo submerso, duração de 72horas.

Quanto ao pH do substrato, observou-se que, na maioria dos bioprocessos, ocorreu sua elevação (Tabela 2). No caso dos bioprocessos realizados com isolados *Saccharomyces cerevisiae* foi inicialmente observado redução do pH seguido de aumento.

Tab. 2. pH observado a cada 24 horas nos bioprocessos realizados utilizando isolados pertencentes a coleção do INPA e como substrato manipueira ou hidrolisado da casca da mandioca em processo submerso.

LEVEDURAS	pH							
	0h	HIDROLISADO			MANIPUEIRA			
		24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h
C.T (LMM 1746)	5,25	5,65	5,42	5,51	4,10	4,20	4,90	5,03
C.T (LMM 1744)	5,22	7,18	7,57	7,92	4,10	4,22	4,88	5,02
C.T (LMM 1743)	5,20	6,22	6,53	6,79	4,12	4,21	4,88	5,01
C.T (LMM 1749)	5,20	5,81	5,40	6,10	4,11	4,21	4,91	5,04
C.T (LMM 1745)	5,24	5,48	5,81	6,37	4,14	4,29	4,95	5,03
R. sp. (LMM 4375)	5,31	5,73	6,31	7,25	4,11	4,20	4,89	5,01
R. sp. (LMM 4377)	5,30	5,78	7,42	7,73	4,15	4,18	4,92	5,02
R. sp. (LMM 4376)	5,38	5,70	7,43	7,36	4,11	4,19	4,90	5,06
R. sp. (LMM 4373)	5,31	5,60	7,44	7,79	4,11	4,19	4,91	5,03
R. sp. (LMM 4309)	5,24	5,46	5,91	6,91	4,15	4,23	4,94	5,02
G. sp. (LMM 2255)	5,29	6,72	7,46	7,77	4,12	4,21	4,96	5,05
G. sp. (LMM 2254)	5,29	5,50	5,77	6,17	4,13	4,19	4,94	5,03
G. sp. (LMM 2258)	5,25	5,54	5,90	5,68	4,13	4,18	5,04	5,07
G. sp. (LMM 2257)	5,28	5,30	5,22	5,70	4,11	4,21	5,01	5,05
G. sp. (LMM 2256)	5,26	5,46	5,81	5,91	4,14	4,26	4,90	5,05
S.C. 1	5,30	4,88	5,17	4,79	4,11	4,23	5,10	7,62
S.C. 2	5,30	4,79	4,66	5,51	4,14	4,23	5,06	7,60
S.C. 3	5,26	4,76	4,89	5,32	4,12	4,23	5,10	7,67
S.C. 4	5,30	4,79	4,82	5,43	4,12	4,24	5,05	7,81
S.C. 5	5,25	5,44	5,52	6,40	4,14	4,24	4,98	5,04

*C.T: *C. tropicalis*; R. sp: *Rhodotorula sp.*; G. sp: *Geotrichum sp.*; S.C: *S. cerevisiae*.

Durante os bioprocessos, a concentração dos açúcares solúveis (graus Brix) foi quantificada refratometricamente (Tabela 3). Nos ensaios em que foram utilizados o hidrolisado da casca da mandioca como substrato, foi observada a redução na concentração de açúcares solúveis. Por outro lado, quando a manipueira foi utilizada como substrato, de uma forma geral, foram observados dois diferentes comportamentos na concentração dos açúcares solúveis (graus Brix): a) aumento ou b) aumento seguido de redução.

Tabela 3. Variação da concentração de açúcares solúveis nos substratos durante as 72h de fermentação.

LEVEDURAS	BRIX							
	0h	HIDROLISADO			MANIPUEIRA			
		24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h
C.T (LMM 1746)	4,00	4,00	3,73	3,47	7,13	7,33	7,33	7,20
C.T (LMM 1744)	4,00	4,00	3,87	4,00	7,40	7,47	7,40	7,47
C.T (LMM 1743)	4,00	4,00	3,13	3,07	6,93	7,07	6,42	5,73
C.T (LMM 1749)	4,00	4,00	2,93	2,87	7,47	7,40	7,07	5,67
C.T (LMM 1745)	4,00	3,53	3,27	3,00	6,87	7,20	7,40	7,47
R. sp. (LMM 4375)	4,00	4,00	4,00	4,00	7,07	7,13	7,27	7,33

Continuação Tab. 3								
R. sp. (LMM 4377)	4,00	4,00	3,53	3,60	7,67	7,33	7,53	7,53
R. sp. (LMM 4376)	4,00	4,00	3,80	3,73	7,73	7,47	7,33	7,53
R. sp. (LMM 4373)	4,00	4,00	3,60	3,60	7,60	7,27	7,53	7,67
R. sp. (LMM 4309)	4,00	3,67	3,13	3,07	7,07	7,27	7,40	7,40
G. sp. (LMM 2255)	4,00	3,80	3,73	3,93	7,13	7,47	7,47	7,80
G. sp. (LMM 2254)	4,00	4,00	4,00	3,80	7,53	7,53	7,67	7,67
G. sp. (LMM 2258)	4,00	4,00	4,00	3,80	7,87	7,60	7,87	7,73
G. sp. (LMM 2257)	4,00	4,00	3,87	3,73	7,33	7,73	7,73	7,87
G. sp. (LMM 2256)	4,00	3,60	3,60	3,27	6,53	7,27	7,27	7,47
S.C. 1	4,00	3,80	3,67	3,73	7,47	7,73	7,27	6,33
S.C. 2	4,00	3,80	3,73	3,73	7,47	7,53	6,93	6,47
S.C. 3	4,00	3,93	3,87	3,67	7,47	7,60	6,73	6,33
S.C. 4	4,00	3,93	3,87	3,87	7,13	7,40	6,73	6,13
S.C. 5	4,00	3,53	3,27	2,87	7,07	7,53	7,53	6,60

*C.T: *C. tropicalis*; R. sp: *Rhodotorula sp.*; G. sp: *Geotrichum sp.*; S.C: *S. cerevisiae*.

A partir dos dados obtidos nos ensaios de screening, decidiu-se selecionar para as demais etapas do estudo a cepa *Rhodotorula* LMM 4375 e, como substrato, o hidrolizado da casca da mandioca. Também foi selecionado para os novos ensaios o isolado *Saccharomyces cerevisiae* CS1, esse organismo é bem conhecido pela literatura e, portanto, foi utilizado para comparação de resultados.

3.3. Estudo cinético

Na Figura 2 são apresentados os resultados do estudo cinético realizado com os isolados *Rhodotorula* LMM 4375 e *S. cerevisiae* SC1 utilizando o hidrolizado da casca da mandioca como substrato. Foram avaliados os parâmetros: açúcares solúveis (Graus Brix), densidade celular (contagem por microscopia), abs 600nm, pH, concentração de glicose e biomassa total.

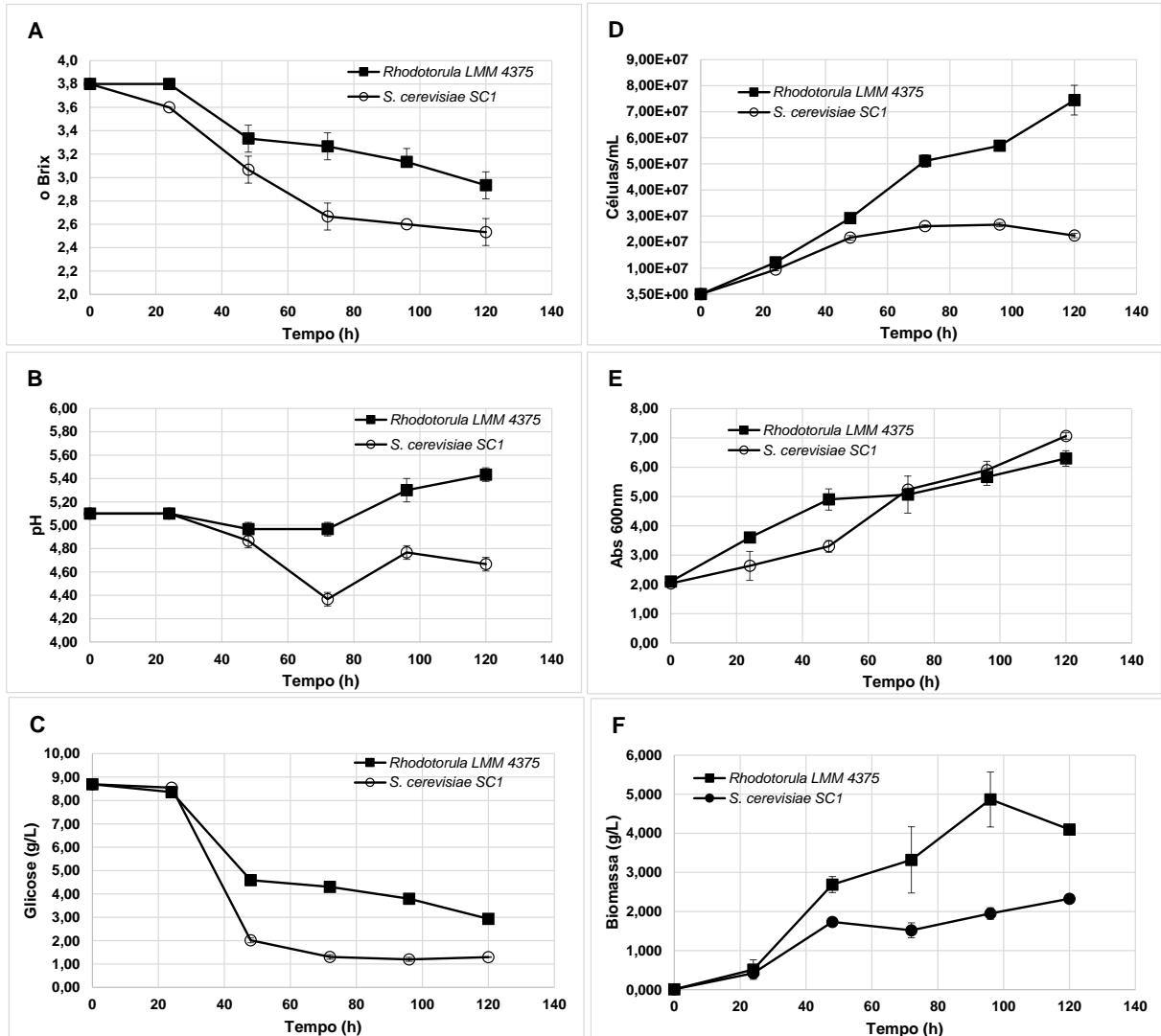


Figura 2. Estudo cinético (120h) realizado com os isolados *Rhodotorula LMM 4375* e *S. cerevisiae SC1* utilizando como substrato o hidrolizado da casca da mandioca. Foram avaliados os parâmetros: açúcares solúveis (Graus Brix), densidade celular (contagem por microscopia), abs 600nm, pH, concentração de glicose e biomassa total.

Com os dados obtidos nos bioprocessos, foi possível determinar a produtividade de biomassa (P_x) e a conversão de nutrientes em biomassa ($Y_{x/s}$) de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente.

Equação 1:

$$P_x = (X_m - X_o) / T_t$$

Onde:

P_x : Produtividade de biomassa;

X_m : Biomassa obtida no tempo final do bioprocesso;

X_o : Biomassa obtida no tempo inicial do bioprocesso;

T_t : Tempo total do bioprocesso.

Equação 2:

$$Y_{x/s} = (X - X_0) / (S_0 - S)$$

Onde:

$Y_{x/s}$: Taxa de conversão do nutriente em substrato;

X : Biomassa obtida no tempo final do bioprocesso;

X_0 : Biomassa obtida no tempo inicial do bioprocesso;

S : Concentração do nutriente ao final do processo;

S_0 : Concentração do nutriente no início do processo.

Na Tabela 4 pode ser observada a produtividade (P_x) e conversão de nutriente/biomassa ($Y_{x/s}$) durante o bioensaio realizado com os isolados *Rhodotorula* LMM 4375 e *S. cerevisiae* SC1 utilizando como substrato o hidrolizado da casca da mandioca.

Tab. 4. Produtividade (P_x) e conversão de nutriente/biomassa ($Y_{x/s}$) durante o bioensaio realizado com os isolados *Rhodotorula* LMM 4375 e *S. cerevisiae* SC1 utilizando como substrato o hidrolizado da casca da mandioca.

Tempo	<i>Rhodotorula</i> LMM 4375		<i>S. cerevisiae</i> SC1	
	P_x	$Y_{x/s}$	P_x	$Y_{x/s}$
24h	0,0209	0,0000	0,0170	2,0450
48h	0,0557	5,7314	0,0359	2,3486
72h	0,0460	6,2025	0,0209	2,0568
96h	0,0506	7,2820	0,0202	1,6131
120	0,0341	4,7169	0,0193	1,8282

Rhodotorula LMM 4375 apresentou suas maiores produtividades e conversão de nutriente/biomassa em 48 e 96h, respectivamente. Enquanto que, *S. cerevisiae* SC1 apresentou maiores resultados especificamente nas primeiras 48h.

3.4. Caracterização da biomassa microbiana obtida.

Com a finalidade de avaliar a concentração de proteínas na biomassa de *Rhodotorula* LMM 4375 e de *S. cerevisiae* SC1 foi realizada a quantificação de nitrogênio pelo método Kjeldahl. Na Tabela 4 podem ser observados os resultados de nitrogênio total e de proteínas totais.

Tab. 5. Teores de nitrogênio total e proteínas da biomassa obtida no ensaio cinético.

	Nitrogênio total (%)	Proteínas (%)
<i>Rhodotorula</i> LMM 4375	3,7 ± 0,6	23 ± 3
<i>S. cerevisiae</i> SC1	4,4 ± 0,3	28 ± 2

A partir dos resultados obtidos na determinação do teor de proteínas o teste t para 3 graus de liberdade, ao nível de 95% de confiança foi de 2,08 sendo então menor que o t crítico (2,35), dessa forma, não houve diferença significativa para os teores de proteínas totais encontrados nos ensaios realizados com as cepas *Rhodotorula* LMM 4375 e *S. cerevisiae* SC1.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho é inovador, pois apresenta um isolado do gênero *Rhodotorula* que produz biomassa utilizando como substrato o hidrolizado da casca da mandioca. A casca de mandioca (periderme e entrecasca) é um resíduo sólido, proveniente do processamento da mandioca para produção da farinha ou fécula. Segundo Lacerda (2009), este resíduo é rico principalmente em amido, além de apresentar teores de proteínas e fibras. Devido à carga orgânica desses resíduos, estes podem se tornar contaminantes ambientais se não forem tratados de forma adequada. A obtenção do hidrolizado da casca de mandioca apresenta-se como uma forma de aproveitamento deste resíduo, possibilitando o seu uso para a geração de um produto com valor agregado, visto que, a biomassa microbiana pode ser empregada para a obtenção de diferentes produtos.

Analisando as características físico-químicas dos substratos manipueira e hidrolizado da casca da mandioca, observou-se que a manipueira apresentou concentração de carboidratos maior que o hidrolizado da casca de mandioca, isso pode ser explicado pela presença de amido residual presente na manipueira. Outra característica importante dos substratos é a faixa inicial de pH, que tanto para a manipueira quanto para o hidrolizado, apresentou-se dentro da faixa considerada ótima para o crescimento de leveduras. Comparando as características da manipueira obtida com os resultados apresentados por Cassoni e Cereda (2011) são observadas algumas semelhanças: a) a umidade, apresentada pelos autores foi de 92,89%, e neste trabalho foi de 90,06%, valores bastante próximos; b) o °Brix obtido pelos

autores citados foi igual a 6,00 e o encontrado neste trabalho foi de 6,54; c) no entanto, para o pH a diferença foi bastante acentuada, os autores indicam pH igual a 6,56 e o pH obtido neste trabalho foi igual a 4,11. Ainda segundo Cassone e Cereda (2011), esta diferença foi observada por outros autores, que atribuem como fatores: a variedade das mandiocas, os processos utilizados, e a época da colheita.

Para o hidrolisado da casca de mandioca, devido à ausência de trabalhos utilizando o hidrolisado da casca de mandioca como substrato, a comparação foi realizada frente a características do hidrolisado da casca da cana-de-açúcar. Fujita (2010), em seu trabalho apresentou 3,44 g/L de glicose, já o hidrolisado da casca de mandioca apresentou 8,69 g/L de glicose, ou seja 2,53 vezes maior que no hidrolisado cana-de-açúcar. Fujita, só obteve concentrações maiores quando concentrou o hidrolisado, obtendo assim 9,87 g/L, no entanto o hidrolisado da casca de mandioca não passou pelo processo de concentração. Mesmo não passando pelo processo de concentração o hidrolisado da casca de mandioca apresentou concentrações de glicose mais elevadas do que hidrolisados obtidos do bagaço da cana-de-açúcar, isso pode ser explicado devido os resíduos utilizados para obtenção do hidrolisado da casca de mandioca ser proveniente da raiz das plantas e por isso apresentam elevados teores de carboidratos não estruturais como o amido (FERREIRA, 2011), que é hidrolisado aumentando a concentração de glicose no hidrolisado da casca de mandioca.

Nos ensaios de screening, as maiores concentrações celulares foram obtidas utilizando o hidrolisado da casca de mandioca e as cepas de *C. tropicalis* (LMM1746) e *Rhodotorula sp.* (LMM4375). A cepa LMM 4375 apresentou concentração celular muito próxima à apresentada pela cepa LMM 1746. Entretanto, a cepa LMM4375 foi escolhido visto que, as leveduras deste gênero apresentam capacidade de produzir quantidades consideráveis de carotenóides. Estes carotenóides apresentam atividade pró-vitamina-A, aplicação industrial (pigmentos, farmacêutica, química e de produção de alimentos e de rações) e atividade anticarcinogênica (SQUINA et.al, 2003). Devido o potencial para produção industrial, o gênero *Rhodotorula* tem se destacado atualmente, tendo vantagens sobre outros gêneros por apresentar taxa de crescimento elevada e ainda utilizar substratos de baixo custo (MALISORN; SUNTORNSUK, 2008). O isolado *S. cerevisiae* S.C.1, foi selecionado para os ensaios cinéticos, visto que a *S. cerevisiae* apresenta grande aplicação industrial e farmacêutica, sendo utilizada em diversos trabalhos como cepa de referência.

Durante os bioprocessos foi observado que ocorreu, de uma forma geral, a elevação do pH, utilizando manipueira ou hidrolisado como substrato. Isso pode ser justificado devido à formação de produtos da degradação dos componentes do substrato. Segundo Ribeiro (2010), a variação do pH durante a fermentação pode ocorrer por vários motivos, o autor cita o consumo de fontes de nitrogênio e também a formação de ácidos como o ácido acético, láctico, pirúvico e succínico como algumas das razões para a variação de pH. Também foi possível observar que em todos os ensaios realizados, tendo como substrato o hidrolisado da casca da mandioca, houve redução na concentração de açúcares solúveis. Por outro lado, quando manipueira foi utilizada como substrato, de uma forma geral, foram observados dois diferentes comportamentos quanto à concentração de açúcares solúveis: a) aumento ou b) aumento seguido de redução, o que pode representar a degradação de açúcares insolúveis presentes na manipueira, mais especificamente amido, que leva ao aumento da concentração dos açúcares solúveis e consequentemente o aumento em graus brix.

Como observado na figura 2, houve redução na concentração de glicose e do °Brix tanto para a cepa SC.1 quanto para a cepa LMM4375, o que indica que os açúcares presentes no substrato estavam sendo utilizadas como fonte de energia para as leveduras. A concentração celular, a biomassa seca e a absorvância ao longo dos ensaios cinéticos demonstram o aumento de biomassa para ambas as cepas em estudo, no entanto a cepa SC.1, apresentou concentração celular e biomassa seca inferior a cepa LMM 4375, sendo esta mais produtiva que a cepa SC.1. Já a absorvância para ambas as cepas são próximas, apesar da cepa SC1 apresentar concentração celular e biomassa seca inferior à cepa LMM 4375, esse fato pode ocorrer devido a presença de algumas substâncias produzidas pelas leveduras, como por exemplo álcool (etanol), que aumenta a turvação do meio, aumentando assim, a absorvância. Assim, pôde ser observado que para a maior produção de biomassa seca utilizando a cepa LMM 4375 o tempo foi de 96 horas de bioprocessos.

Observando a produtividade e a conversão nutriente/biomassa, a cepa LMM 4375 (*Rhodotorula sp.*) apresentou suas maiores produtividades e conversão de nutriente/biomassa entre 48-96 h, enquanto que, a cepa SC1 (*S. cerevisiae*) apresentou maiores resultados especificamente com 48h. Analisando a Tabela 4, podemos perceber que a partir de 72h a produtividade para a levedura *S. cerevisiae* (S.C.1) começa a se manter estável, já para a levedura *Rhodotorula sp* (LMM 4375) a produtividade é variável, tendo seu pico máximo em

48h, no entanto para ambas as leveduras o melhor tempo de produtividade de biomassa é de 48h.

O teor de proteínas obtido a partir da biomassa da cepa *Rhodotorula* sp. LMM 4375 (23%) foi superior ao encontrado por Cazetta et. al. (2005), quando este autor utilizou a levedura *Rhodotorula mucilagenosa* e melão de cana a 10% como substrato obtendo 0,68 g/L de proteínas. Adoki (2008) utilizando resíduos do processamento da laranja e banana em processo submerso com *Candida* sp., obteve 17,5% e 7,9% de proteínas totais, respectivamente. Já Umar et. al. (2011), utilizando *S. cerevisiae* e hidrolisado da casca da batata, obteve teor de proteínas igual a 49,29%. Sun et.al. (2012), obteve teor de proteínas igual a 56% quando utilizou a levedura *Wickerhamomyces anomalus* utilizando substrato sintético (YPD líquido). Observando que, em todos estes trabalhos houve suplementação do substrato com fontes de carbono e/ou nitrogênio, e que o hidrolisado da casca de mandioca não foi suplementado, os teores de proteínas são expressivos quando comparados com os resultados encontrados pelos autores citados acima.

Além disso, o fato do hidrolisado da casca de mandioca não ter sido suplementado com fontes de carbono e/ou nitrogênio, leva a uma possível redução de custos em relação aos substratos citados. Outro fato importante é que o hidrolisado da casca de mandioca não passou pelo processo de concentração, o que também pode reduzir custos energéticos e diminuir o tempo de processo para a obtenção deste hidrolisado. Assim, dentre as cepas estudadas, a que apresentou maior potencial para produção de biomassa foi a cepa LMM 4375, quando utilizado o hidrolisado da casca de mandioca como substrato, apresentando potencial para a produção de biomassa proteica com significativo teor de proteínas totais, dentro dos parâmetros utilizados no estudo.

5. REFERÊNCIAS

ADOKI, A. **Factors affecting yeast growth and protein yield production from orange, plantain and banana wastes processing residues using Candida Spp.** *African J. Biotech.*, v.7, n.3, p.290- 295, 2008.

ALMEIDA, V. V.; CANESIN, E. A.; SUZUKI, R. M.; PALIOTO, G. F. **Análise qualitativa de proteínas em alimentos por meio de reação de complexação do íon cúprico.** *Ver. Química Nova na escola*, v.35, n.1, p.34-40, 2013.

ALTAF, M. D.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V.; REDDY, G. **Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract – optimization by RSM.** *Process Biochemistry*, London, v.41, n.2, p.465-472, Feb. 2005.

ALVES, L.A.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; SILVA, S.S.; PRATA, A.M.R. **Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xilytol production by *Candida guilliermondii*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70/2:89-98, 1998.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official and tentative methods of analysis.** 16ed. Arlington, 1995.

CASSONI, V.; CEREDA, M. P. **Avaliação do processo de fermentação acética da manipueira.** *Rev. Eng. na Agricultura*, Botucatu, v.26, n.4, p. 101-113, 2011.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M.A.P.C. **Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria.** *Ciências Exatas e Tecnológicas*, v.26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CRISTÉ, R.C.; COHEN, K.O. Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi. *Rev. Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v.70, n.1, p.41-46, 2011.

DIAZ, M. J.; EUGENIO, M. E.; JIMÉNEZ, L.; MADEJÓN, E.; CABRERA, F. **Modelling vinasse/ cotton waste ratio incubation for optimum composting.** *Chemical Engineering Journal*, Lausanne, v.93, n.3, p.233-240, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** *Analytical Chemistry*, v. 28, n.3, p.350-356, 1956.

FERREIRA, L. F. R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial da cana-de-açúcar por fungos.** Piracicaba. 2009. 134p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FERREIRA, M.S.; DA SILVA, J.R.B. **Utilização da casca, entrecasca e raspa da mandioca na alimentação de ruminantes.** *Rev. Bras. de Agropecuária Sustentável*, v.1, n.2, p.73-76, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, IV.ed. São Paulo: IMESP, 2005.

LACERDA, L. G.; ALMEIDA, R. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO FILHO, M. A. S.; VASCONCELOS, E. C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; BANNACH, G.; SCHNITZLER, E.; SOCCOL, C. R. **Thermoanalytical and starch content evaluation of cassava bagasse as**

agro-industrial residue. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 52, n. 1, p. 143-150, 2009.

LEE, S.; ROBINSON, F.; WANG, H. **Rapid determination of yeast viability.** *Biotechnology & Bioengineering Symposium*, n. 11, p. 641-649, 1981.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. **Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine.** *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 7, p. 2281-2287, 2008.

PARASKEVOPOULOU, A.; ATHANASIADIS, I.; KANELLAKI, M.; BEKATOROU, A.; BLEKAS, G.; KIOSSEOGLU, V. **Functional properties of single cell protein produced by Kefir microflora.** *Food Research International*, Barking, v.36, n.5, p.431-438, 2003.

SILVA, N, JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos.** ed. 3. São Paulo. Livraria Varela, 2007. 536 p.

SQUINA, F. M.; YAMASHITA, F.; PEREIRA, J. L.; MERCADANTE, A. Z. **Production of carotenoids by *rhodotorula rubra* and *r. Glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice.** *Food Biotechnology*, v.16, n.3, p.227-235, 2002.

VENDRUSCOLO, F.; KOCH, F.; PITOL, L. DE O.; NINOW, J. L. **Produção de proteína unicelular a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido.** *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. v.1, n.0, p.53-57, 2007.

CAPÍTULO II**ARTIGO II**

**Obtenção de hidrolisado da casca de mandioca para
produção de Single Cell Protein por *Rhodotorula LMM 4375***

“Obtenção de hidrolisado da casca de mandioca para produção de Single Cell Protein por *Rhodotorula* LMM 4375 ”

¹Torres, D.R.; ²Souza, J. V. B. de.; ³Souza, E. S. de.

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Univ. do Estado do Amazonas - UEA. ²Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. ³Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Escola Superior de Tecnologia – EST.

Resumo: A hidrólise de resíduos agroindustriais via hidrólise ácida, é comumente utilizada a fim de promover a solubilização da fração hemicelulósica desses materiais para a obtenção de açúcares fermentescíveis, seja para a produção de biomassa microbiana ou bioetanol. Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar os fatores relacionados à obtenção do hidrolisado da casca de mandioca, a partir de um planejamento fatorial e da análise da superfície de resposta para a otimização da obtenção de açúcares fermentescíveis e da biomassa de levedura. Para a otimização do processo de obtenção do hidrolisado, foi realizado um delineamento experimental para avaliar a influência do tempo de hidrólise e da concentração de ácido sulfúrico (H_2SO_4) necessárias para a obtenção de um hidrolisado com maiores concentrações de açúcares. O planejamento fatorial utilizado foi do tipo 2^2 mais pontos axiais. O microrganismo utilizado para avaliação da produção de biomassa foi a levedura *Rhodotorula sp.* (LMM 4375), pertencente à coleção de culturas microbiológicas do INPA. A levedura selecionada foi submetida à bioprocesso, por 96 horas, 100rpm, com concentração celular de 1×10^4 cel/mL, sendo quantificado ao início e término de cada processo o °brix do substrato e ao final do bioprocesso a biomassa obtida foi quantificada. A Análise da superfície de resposta demonstrou que as concentrações ótimas para a máxima produção do Brix do hidrolisado foram: Tempo de hidrólise de 9,5 minutos e Razão 0,2g H_2SO_4 /g de casca de mandioca e para produção da biomassa foram: Tempo de hidrólise de 19,5 minutos e Razão 0,14g H_2SO_4 /g de casca de mandioca.

Palavras chaves: Hidrolisado, casca de mandioca, superfície de resposta.

1. Introdução

Resíduos da industrialização de plantios agrícolas são considerados matérias-primas viáveis para obtenção de hidrolisados, por estarem facilmente disponíveis em pátios de agroindústrias. Os resíduos sólidos do processamento de frutas tropicais, por exemplo, são abundantes e de baixo custo para obtenção de hidrolisados, potenciais substratos para processos fermentativos (SILVA, 2011). Outro resíduo agrícola com grande potencial para uso como substrato em processos fermentativos é a casca da mandioca. Sendo o Brasil o 2º maior produtor de mandioca, este resíduo pode ser encontrado nas diferentes regiões do país.

No entanto, para que essa biomassa lignocelulósica possa ser utilizada de forma eficaz, ou seja, de forma integral, é necessário utilizar alguns métodos capazes de transformar os constituintes dessa biomassa em açúcares fermentescíveis. Para a obtenção desses açúcares é necessário uma etapa de pré-tratamento para a desassociação dos componentes da biomassa lignocelulósica. Este pré-tratamento disponibiliza os açúcares para os microrganismos, facilitando assim o processo de bioconversão destes resíduos. Além do uso destes hidrolisados para a obtenção de alcoóis, estes também tem sido utilizado para a obtenção de proteína unicelular.

Dentre os principais métodos de pré-tratamento existentes, a hidrólise com ácido diluído é o mais comumente utilizado e pode ser aplicado a diversos resíduos vegetais agroindustriais, para promover a solubilização da fração hemicelulósica (AGBOR, 2011). Este método tem sido favorecido para aplicação industrial, por que alcança razoáveis rendimentos de açúcares provenientes da hemicelulose e quando comparada com a hidrólise com ácido sulfúrico concentrado é mais barata (HAMELINCK; van HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; CANILHA et.al., 2010), além de gerar menor quantidade de produtos de degradação (5-hidroximetilfurfural e furfural), que são tóxicos aos microrganismos, e causa menos problemas de corrosão nos tanques de hidrólise e tubulações (van WALSUM; SHI, 2004). Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar os fatores relacionados à obtenção do hidrolisado da casca de mandioca, a partir de um planejamento fatorial e da análise da superfície de resposta.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismo e preparação de inóculo

Foi utilizada neste estudo uma cepa de *Rhodotorula sp.* (LMM 4375) pertencente à coleção de fungos da Coleção Microbiana do INPA. A cultura foi mantida em meio de cultura Sabouraud (Dextrose 40 g/L, peptona 10g/L, 20g ágar) e armazenada a 4°C. Os inóculos foram preparados adicionando-se uma alçada do cultivo recente (até 48h) em 10mL de solução salina (0,85%) e homogeneizando, uma alíquota foi retirada para contagem de células em câmara de Neubauer. Após contagem de células retirava-se o volume necessário para obter um inóculo com 1×10^4 cel/mL.

2.2 Bioprocesso

A levedura selecionada foi então submetida a um bioprocesso em erlenmeyers (300 mL), contendo 100mL dos hidrolisados obtidos como descrito no Item 2.3, inoculado com 1×10^4 cél/mL, mantido sob agitação orbital de 100 rpm e temperatura ambiente, por 96 horas. Completadas as 96 h, a biomassa obtida foi submetida à análise.

2.3. Avaliação da influência do Tempo de hidrólise e razão H_2SO_4 /casca de mandioca no $^{\circ}$ Brix inicial do hidrolisado e na biomassa final.

A avaliação da influência do Tempo de hidrólise e razão H_2SO_4 /casca de mandioca no $^{\circ}$ Brix inicial do hidrolisado e na biomassa final foi realizada a partir de um delineamento experimental. Para este estudo foram selecionadas as seguintes variáveis independentes do processo: concentração de ácido (H_2SO_4 : 0 a 0,2 mg/g de casca) e tempo (0 - 20 min), sendo que a pressão foi mantida em todos os processos à 1atm acima da pressão atmosférica e a temperatura à 120 °C. Para tanto, um planejamento fatorial do tipo 2^2 mais pontos axiais foi realizado para avaliar as variáveis independentes. Os valores utilizados nos ensaios do planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 01.

Tab. 1. Delineamento experimental para otimização do hidrolisado da casca de mandioca.

Exp.	Tempo (min)	Razão (g H_2SO_4/g Casca)
1	2,9	0,029
2	10	0
3	17,1	0,029
4	2,9	0,171
5	10	0,1
6	10	0,2
7	0	0,1
8	20	0,1
9	10	0,1
10	10	0,1
11	17,1	0,171

Desta forma, os hidrolisados foram obtidos por hidrólise ácida, realizada em reator com capacidade de 2L. O processo foi realizado sob 121°C nos tempos determinados no planejamento. Os reatores foram carregados com 1000 mL de solução de ácido sulfúrico

(conforme as proporções apresentadas na tabela do planejamento fatorial, acima) para cada 100g de casca de mandioca. Visando à remoção de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, o hidrolisado foi filtrado com carvão ativo e em seguida a solução foi filtrada a vácuo com membrana filtrante de 47 mm x 0,45 µm e o pH ajustado para 5,0 com solução de NaOH 1M. O hidrolisado obtido foi estocado a 4-8 °C até a sua utilização.

2.4.Determinação do Brix do hidrolisado e de biomassa obtida

O brix dos hidrolisados obtidos foi medido utilizando refratômetro para a determinação do teor de açúcares solúveis em solução. Já a biomassa obtida em cada bioprocessos foi quantificada pela metodologia de peso seco expresso em g/L (AOAC, 1995)

3. Resultados

As influências do tempo de hidrólise e a razão $[H_2SO_4]/[casca\ de\ mandioca]$ no °Brix inicial do hidrolisado e na concentração final biomassa final de *Rhodotorula* LMM 4375 foram investigadas a partir de um planejamento experimental 2^2 + pontos axiais. A Tabela 2 apresenta os níveis dos fatores empregados nos experimentos e, ainda, os respectivos resultados do °Brix inicial do hidrolisado e da biomassa final.

O °Brix inicial do hidrolisado obtido variou de 1,1 a 4,1 e a concentração da biomassa final entre 2,58 e 4,89 g/L.

Tab. 2 Influência do tempo de hidrólise e da razão $[H_2SO_4]/[casca\ de\ mandioca]$ no °Brix inicial do hidrolisado e da biomassa final em experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial $2^2 +$ pontos axiais.

Exp.	Tempo de hidrólise (min.)	Razão $[H_2SO_4]/[casca\ de\ mandioca]$	°Brix inicial	Biomassa (g/L)
1	2,9	0,03	1,4	2,68
2	10	0,00	2,2	3,04
3	17,1	0,03	3,6	3,85
4	2,9	0,17	4,0	3,60
5	10	0,10	3,8	4,16
6	10	0,20	4,1	3,95
7	0	0,10	1,1	2,58
8	20	0,10	3,8	4,74
9	10	0,10	3,7	4,38
10	10	0,10	3,7	4,25
11	17,1	0,17	3,9	4,89

Os efeitos principais e suas respectivas interações, calculados a partir dos dados da Tab. 2 são apresentados na Tabela 3.

Tab. 3 Efeito das variáveis testadas para produção de Brix do hidrolisado e de biomassa obtida, calculados a partir dos dados apresentados na Tab. 1

Efeitos estimados	°Brix inicial	Biomassa (g/L)
Média	3,73 ± 0,03*	4,26 ± 0,06*
A:Tempo de hidrólise	1,48 ± 0,05*	1,38 ± 0,08*
B:razão $[H_2SO_4]/[casca]$	1,39 ± 0,05*	0,81 ± 0,08*
AA	-1,07 ± 0,05*	-0,51 ± 0,09*
AB	-1,15 ± 0,06*	0,06 ± 0,11
BB	-0,37 ± 0,05*	-0,68 ± 0,09*

Os erros padrão em um erro puro com 2 graus de liberdade
*Efeitos com significado estatístico ao nível de 95% de confiança.

A partir dos resultados (Tabela 2) foram calculados efeitos e os erros padrões (σ) foram estimados, por meio das três repetições do ponto central (Tab. 4). Segundo Barros Neto et al. (1995), ao nível de 95% de confiança, somente são considerados significativos os efeitos, em módulo, cujos valores forem maiores que " $t_v \times \sigma$ ", onde t_v é o valor do teste t para v graus de liberdade. O valor do teste t para 2 graus de liberdade (t_2), ao nível de 95% de confiança é 4,303. Podemos verificar que os dois fatores investigados, suas interações e efeitos quadráticos influenciaram de forma significativa a produção dos Brix do hidrolisado e de biomassa obtida (Tabela 3), exceto a interação entre os dois fatores não apresentou influência concentração da biomassa obtida.

Nas condições de estudo, os níveis estudados dos fatores tempo de hidrólise e da razão $[H_2SO_4]/[casca]$ apresentaram efeitos positivos e muito similares sobre a concentração inicial de °Brix e sobre a Biomassa final obtida nos bioprocessos.

Considerando-se os efeitos estatisticamente significativos, modelos quadráticos foram ajustados com os dados da Tab. 3, esses são descritos a seguir:

$$^{\circ}\text{Brix} = -0,86285 + 0,430686*\text{Tempo} + 28,5991*\text{Razao} - 0,0106212*\text{Tempo}^2 - 1,14065*\text{Tempo}*\text{Razao} - 36,7816*\text{Razao}^2$$

$$\text{Biomassa} = 1,53634 + 0,199169*\text{Tempo} + 19,1976*\text{Razao} - 0,00510398*\text{Tempo}^2 - 67,4056*\text{Razao}^2$$

Por meio de uma análise de ANOVA, pode-se observar na Tab. 4 e Tab 5 que as variáveis do modelo foram significativas e que a regressão apresentada pelo modelo matemático utilizado foi significativa ($R^2 > 90\%$).

Tab. 4. Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para o Brix do hidrolisado

Variáveis	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média do quadrado	F-Ratio	p-valor
A:Tempo de hidrólise	4,37839	1	4,37839	1313,52	0,0008
B: Razão gH₂SO₄/gcasca	3,90183	1	3,90183	1170,55	0,0009
AA	1,61885	1	1,61885	485,65	0,0021
AB	1,3225	1	1,3225	396,75	0,0025
BB	0,194141	1	0,194141	58,24	0,0167
Falta de ajuste	0,736023	3	0,245341	73,6	0,0134
Erro puro	0,006667	2	0,003333		

$R^2 = 93,7\%$

Tab. 5. Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para produção de biomassa

Variáveis	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média do quadrado	F-Ratio	p-valor
A:Tempo de hidrólise	3,80149	1	3,80149	310,75	0,0032
B: Razão gH₂SO₄/gcasca	1,31782	1	1,31782	107,72	0,0092
AA	0,373829	1	0,373829	30,56	0,0312
BB	0,651999	1	0,651999	53,3	0,0183
Falta de ajuste	0,167449	4	0,041862	3,42	0,2387
Erro puro	0,024467	2	0,012233		

$R^2 = 96,8\%$

Para representar a estimativa de Brix do hidrolisado e da concentração de biomassa obtida foram feitas superfícies de resposta (Fig. 1 e Fig. 2) a partir dos dados gerados pelos modelos avaliados. As superfícies de respostas construídas demonstraram que as

concentrações ótimas para a máxima produção do Brix do hidrolisado foram: Tempo de hidrólise de 9,5 minutos e Razão 0,2g H₂SO₄/g de casca de mandioca e para produção da biomassa foram: Tempo de hidrólise de 19,5 minutos e Razão 0,14g H₂SO₄/g de casca de mandioca (Fig. 1 e Fig. 2).

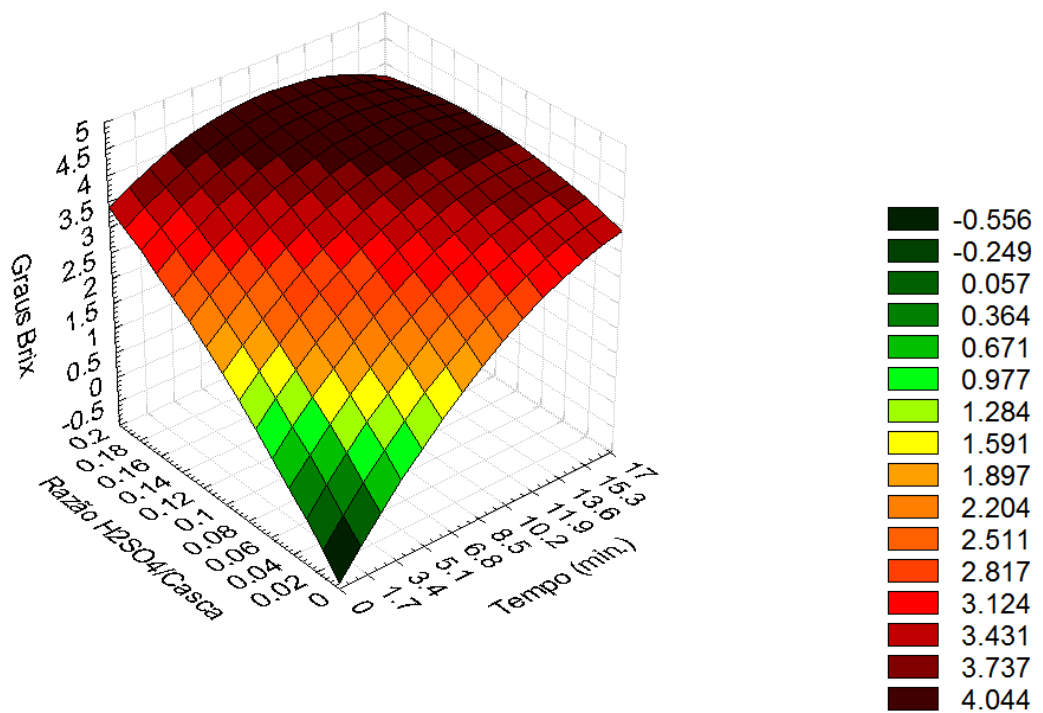


Fig. 1. Efeito do Tempo de hidrólise e da razão gH₂SO₄/gcasca de mandioca no Brix do hidrolizado

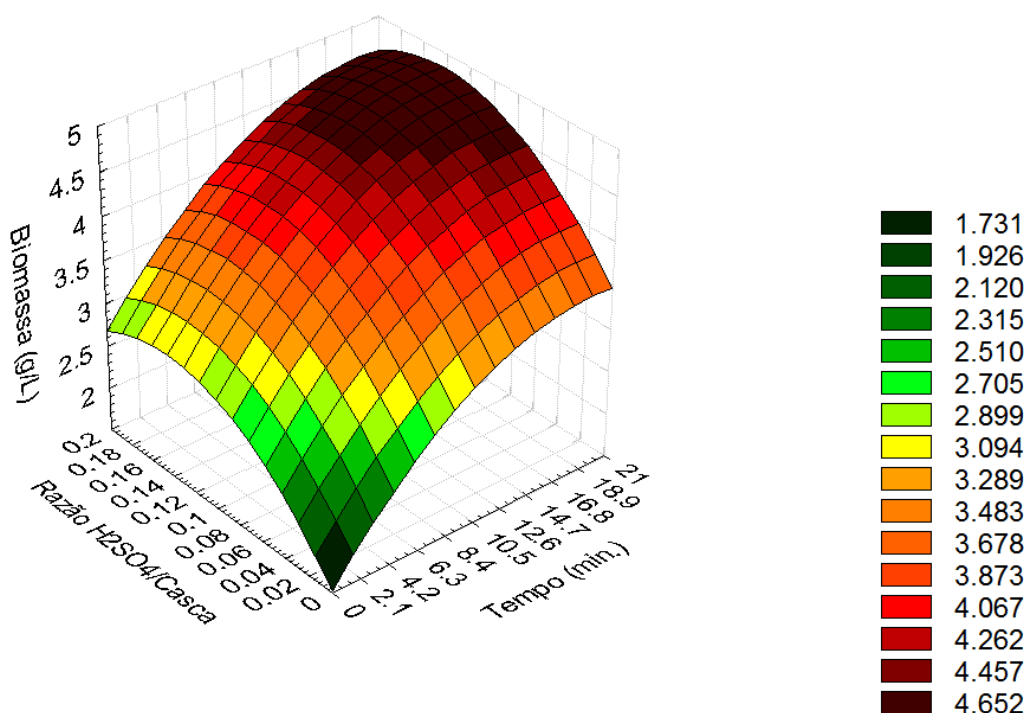


Fig. 2. Efeito do Tempo de hidrólise e da razão gH₂SO₄/gcasca de mandioca na biomassa obtida.

4. Discussão

Nos ensaios realizados, o °Brix inicial do hidrolisado obtido variou entre de 1,1 a 4,1 e a concentração da biomassa final variou entre 2,58 e 4,89 g/L, esses resultados demonstram que os fatores estudados possuem grande influência sobre as variáveis. Segundo RODRIGUES (2007), a hidrólise ácida é eficiente, com até 90% de recuperação de açúcares fermentescíveis, podendo gerar alguns produtos inibidores da fermentação (compostos fenólicos, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural), e os açúcares podem ser degradados devido ao tempo de hidrólise. Por isso é importante o planejamento fatorial para estabelecer os melhores tempos para a obtenção da máxima concentração de açúcares, e ainda reduzir o tempo do processo. Quanto à concentração de ácido utilizado na hidrólise, é importante determinar a menor concentração para que se obtenha a maior produção de açúcares, isso reduz o desperdício e os custos com o processo. Também é importante o estudo das variáveis tempo e concentração de ácido para a hidrólise dos resíduos agroindustriais, pois, o rendimento dos açúcares obtidos, depende do tipo de matéria-prima utilizada e também das condições operacionais (Akpınar et al., 2011).

As superfícies de respostas construídas demonstraram que as concentrações ótimas para a máxima produção do Brix do hidrolisado foram: Tempo de hidrólise de 9,5 minutos e Razão 0,2g [H₂SO₄]/[casca de mandioca] e para produção da biomassa foram: Tempo de hidrólise de 19,5 minutos e Razão 0,14g [H₂SO₄]/[casca de mandioca]. Comparando os resultados obtidos na hidrólise da casca de mandioca com resultados obtidos por outros autores utilizando diferentes subprodutos para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico, é possível observar que a hidrólise da casca de mandioca requer intervalos de tempo e concentrações de ácido inferiores aos utilizados por outros subprodutos também empregados na obtenção de hidrolisado hemicelulósico, obtendo concentrações de açúcares superiores ou próximos aos materiais comparados. A exemplo disso, pode ser observado o trabalho realizado por Moraes e Broetto (2012), que para o máxima produção de açúcares determinaram o tempo de 45 minutos e concentração ácida de 7% de H₂SO₄, para a obtenção de 6,89 g/L de açúcares redutores para o hidrolisado da cana-de-açúcar. Já Moraes (2008), avaliando a hidrólise hemicelulósica da palha da cevada, determinou o tempo de 40 minutos e concentração de ácido de 1%, obtendo 2,4 g/L de glicose. Outras condições operacionais utilizadas na obtenção de hidrolisados de diferentes resíduos agroindustriais podem ser observadas na tabela 6, abaixo:

Tab. 6. Parametros ideais para obtenção de hidrolisados de diversos resíduos agroindustriais, determinados por diferentes autores.

Resíduos agroindustrial	Ácido	Concentração de ácido (%)	Temperatura (°C)	Duração (min.)	Referências
Bagaço de azeitona	H ₂ SO ₄	3,5	130	130	(Guerra, 2011)
Resíduos de cervejaria	H ₂ SO ₄	3	130	15	(Cavalheiro et. al., 2004)
Palha de arroz	H ₂ SO ₄	3	140-145	20	(Roberto et.al.1996)
Sorgo	H ₂ SO ₄	1,4	130	75	(Torrado et. al,2010)
Sorgo	H ₃ PO ₄	6	134	300	(Vazquez et. al., 2007)
Eucalipto	H ₂ SO ₄	3	100-130	60	(Parajó et. al., 1997)

*Adaptada de Morais, 2012.

Observando a tabela acima é possível perceber que para a obtenção do hidrolisado da casca de mandioca as condições de processo são mais brandas que as utilizadas pelos autores citados na Tabela 6 acima. A presença de amido nas cascas de mandioca utilizadas para hidrólise pode ser um fator que contribui na redução das condições de processo, visto que o amido também sofre hidrólise ácida, no entanto requer condições mais brandas para a liberação de açúcares fermentescíveis do que a celulose ou hemicelulose. Segundo Freitas et.al. (2011), os resíduos da obtenção de amido de mandioca podem ser parcialmente hidrolisados

com a conversão de amido em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol ou outros bioprodutos, a partir do tratamento hidrolítico utilizando ácidos ou enzimas. As condições mais brandas obtidas neste trabalho são favoráveis para a obtenção do hidrolisado da casca de mandioca frente aos materiais citados acima, visto que com a redução de tempo, temperatura e concentração de ácido é possível reduzir o custo do processo e ainda diminuir o conteúdo de substâncias inibidoras de fermentação.

Agradecimentos

Às agências de fomento FAPEAM (284/2003) e CNPq (553200/2005-4).

Referências

AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D.B. **Biomass pretreatment: Fundamentals toward application.** *Biotechnology Advances*. 29:675-685, 2011.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official and tentative methods of analysis.** 16ed. Arlington, 1995.

AKPINAR, O.; LEVENT, O.; BOSTANCI, S.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. **The optimization of dilute acid hydrolysis of cotton stalk in xylose production.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 163:313-325, 2011.

CANILHA, L.; CARVALHO, W. ; FELIPE, M. G. A. ; ALMEIDA E SILVA, J.B. ; GIULIETTI, M. **Ethanol production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitis*.** *Applied Biotechnology*, n. 161, p.84-92, 2010.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MEDEIROS, R.; GÍRIO, F.M. **Optimization of brewery's spent grain dilute-acid hydrolysis for the production of pentose-rich culture media.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 115:1059-1072, 2004.

MORAIS, A. P. S. ; BROETTO, F. **Pré-hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e sua caracterização físico-química.** *Energ. Agric., Botucatu*, vol. 27, n.4, p.01-12, 2012.

HAMENLICK, C.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. **Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term.** *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384-410, 2005.

ROBERTO, I.C.; SATO, S.; DEMANCILHA, I.M. **Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*.** *Journal of Industrial Microbiology*. 16:348-350, 1996.

SILVA, O. G. **Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar.** Araçatuba, SP: Fatec, 2011. 45f.

TORRADO, I. **Optimização da hidrólise com ácido diluído para fraccionamento selectivo das hemiceluloses de palha de sorgo: estudo da bioconversão dos hidrolisados para a produção de xilitol.** Tese de Mestrado. Universidade do Algarve. 2010.

VAN WALSUN, G. P.; SHI, H. **Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of com stover.** *Biores. Technol.* v.93, n.3, p.217-226, 2004.

VAZQUEZ, M.; OLIVA, M.; TÉLLEZ-LUIS, S.J.; RAMÍREZ, J.A. **Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production.** *Bioresource Technology*. 98:3053-3060, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste trabalho foi possível avaliar as condições de bioprocessos estabelecidas e avaliar a produção de biomassa das leveduras selecionadas frente a essas condições. Assim, foi possível obter um bioprocessos capaz de produzir biomassa de leveduras de valor proteico, utilizando o hidrolisado da casca de mandioca, que se apresentou como um substrato alternativo eficiente para a obtenção de SCP quando utilizado a cepa de *Rhodotorula* LMM4375, que apresentou potencial para a produção de biomassa com teor proteico significativo. Ainda foi possível determinar as condições de tempo e concentração de ácido sulfúrico ótimas para a obtenção do hidrolisado da casca de mandioca, otimizando o processo de obtenção deste hidrolisado. O processo de obtenção do hidrolisado da casca de mandioca ainda apresentou vantagens em relação a outros hidrolisados, visto que, foi possível obter este hidrolisado em condições mais brandas, menor tempo e bons rendimentos de açúcares fermentescíveis, quando comparado a hidrolisados hemicelulósicos. A redução dessas condições e o uso de substrato alternativo para a obtenção de SCP a partir da cepa LMM4375, influencia no custo do produto final, podendo este processo ser de menor custo quando comparado as fontes de proteínas tradicionais. A utilização destes substratos contribui para a redução de custos na obtenção de SCP, assim como com a destinação de um resíduo agroindustrial, agregando valor a um resíduo antes descartado ou empregado em atividades de baixo valor agregado.