

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PRODUÇÃO DE *Candida utilis* UTILIZANDO O
HIDROLISADO DO RESÍDUO SÓLIDO DA INDÚSTRIA
CAMARONEIRA

EDUARDO PEREIRA GOMES

Recife, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

EDUARDO PEREIRA GOMES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado de Bioquímica da
Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Co-Orientadora: Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Co-Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra.

RECIFE, 2005.

Gomes, Eduardo Pereira
Produção de *Candida utilis* utilizando o
Hidrolisado do resíduo sólido da indústria
Camaroneira / Eduardo Pereira Gomes. – Recife : O
Autor, 2005
42 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB, Bioquímica, 2005.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Bioquímica – Microorganismos. 2. Leveduras -
Produção de SCP (Single cell protein) –
Processamento do camarão – Resíduo sólido. 3.
***Cândida utilis* - Crescimento em resíduo**
Agroindustrial. 4. Produção de biomassa –
Suplemento de rações. I. Título.

579.24
579.563

CDU(2.ed.)
CDD(22.ed.)

UFPE
BC2005-193

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
(Presidente)

Prof. Dr. José Arlindo Pereira
Titular (externo)

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia de Figueiredo Porto
Titular (interno)

Prof^a. Dr^a. Rosa Valéria da Silva Amorim
Titular (externo)

Prof^a. Dr^a. Maria da Paz Carvalho da Silva
Suplente (interno)

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes
Suplente (externo)

Ata da defesa de dissertação do mestrando **Eduardo Pereira Gomes**, realizada em 25 de fevereiro de 2005, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 15:10 minutos do dia 25 de fevereiro de 2005, foi realizada, na Sala de Aulas do LIKA, a defesa de dissertação de **Eduardo Pereira Gomes**, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando, o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, atendendo solicitação da Coordenadora do Curso, Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação do aluno, de seu orientador, Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, de seus Co-orientadores, Profa. Dra. Danyelly Brunheska Gondim Martins, e o Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: José Luiz de Lima Filho, na qualidade de Presidente, Ana Lúcia Figueiredo Porto, do Depto. De Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE, Rosa Valéria da Silva Amorim, do Depto. de Biologia Molecular/UFPE, e José Arlindo Pereira do Depto. de Oceanografia/UFPE. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Produção de Biomassa Utilizando Resíduos da Carcinocultura**", e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a sua apresentação em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a defesa, o Sr. Presidente convidou os membros da Banca Examinadora para ocupar seus lugares, passando a palavra para a Profa. Ana Porto, em seguida para a Profa. Rosa Amorim e finalmente para o Prof. José Arlindo Pereira. Concluídas suas arguições, agradeceram e cumprimentaram o mestrando e seus orientadores. Daí o Sr. Presidente, na qualidade de orientador, fez algumas considerações e a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na sala de reuniões do LIKA. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovado com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros presentes. Recife, 25 de fevereiro de 2005.

Jose Arlindo Pereira
Rosa Valéria da Silva Amorim
Jose Luiz de Lima Filho
Profa. Dra. Danyelly Brunheska Gondim Martins
Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Matheus Raposo Gomes Maciel
Suany Miulla de M. Melo
Mariana S. Arruda
Maria de Freitas M. da
Ana Lúcia Figueiredo Porto
Robert A. F. de S. Silva
D. Brunheska

Jose Arlindo Pereira
Rosa Valéria da Silva Amorim
Jose Luiz de Lima Filho
Profa. Dra. Danyelly Brunheska Gondim Martins
Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

DEDICO ESTE TRABALHO
À MINHA FILHA LARA

SINTO-ME NASCIDO A CADA MOMENTO
PARA A ETERNA NOVIDADE DO MUNDO...

FERNANDO PESSOA.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, ao LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami) e ao Departamento de Bioquímica pelo suporte físico, pessoal e instrumental necessários para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos Funcionários Miron e Otaviano, em nome de todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e do LIKA;

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho pela orientação, amizade, dedicação e postura diante da ciência tornando-a viva, incorporada às necessidades da atual sociedade;

Agradecimento especial à Dr^a Danyelly Bruneska Gondim Martins, primeiramente pela amizade e estilo de relação orientador-orientando, que se somando à sua dedicação e zelo pela ciência e pesquisa, me incentivou, e contribuiu decisivamente para a realização desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra pela co-orientação e informações sobre as possibilidades do uso de resíduos da indústria pesqueira;

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Arlindo Pereira, Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia de Figueiredo Porto, Prof^a. Dr^a Rosa Valéria da Silva Amorim, Prof^a. Dr^a Maria da Paz Carvalho da Silva e ao Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes, pelas suas consistentes e positivas observações ao trabalho;

À Marie Clarie Brassard e Justin Lapoint do Institut de Technologie Agroalimentaire – St-Hyacinthe – Quebec – Canadá, pela amizade e pelas prazerosas horas de laboratório, e também fora dele, onde o intercâmbio realizou-se além da ciência ;

Ao Dr. F. N. Wiggers pela revisão de linguagem;

Ao Engenheiro de Pesca André Ricardo Brito Santos, da empresa Netuno S/A, por ter gentilmente cedido o resíduo de camarão utilizado nesta pesquisa;

Aos amigos de mestrado, Joelma, Márcio, Mônica, Bianka, Aurelino, Carlos, Gilvanely, Ana Helena, Clébia e Amanda pelos bons e às vezes árduos momentos que passamos juntos nesta caminhada;

Também especialmente agradeço à minha esposa Suzan, a meus pais Antonio e Lygia, às minhas irmãs Letícia, Maria Clara e Maria Helena e aos meus sogros Josenildo e Maria José, que com seu apoio incondicional, compreensão e incentivo, possibilitaram a minha dedicação para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. A CARCINICULTURA BRASILEIRA.....	14
1.2. RESÍDUOS DA INDÚSTRIA CAMARONEIRA.....	16
1.3. AS LEVEDURAS.....	19
1.3.1. A LEVEDURA <i>Candida utilis</i>	20
1.4. “SINGLE CELL PROTEIN “ (SCP).....	22
1.4 .1. PRODUÇÃO DE SCP ATRAVÉS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. GERAL.....	25
3.2. ESPECÍFICOS	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
5. MANUSCRITO	30
6. CONCLUSÕES	37
7. PERSPECTIVAS	38
8. ANEXOS	39

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Destino das exportações de camarão cultivado brasileiro, no período 2002 a 2004.....	16
--	----

MANUSCRITO

Figure 1. Growth behavior of four GRAS yeast: <i>Kluyveromyces marxianus</i> (ATCC 36907), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Itaquatiara), <i>Candida utilis</i> and <i>Rhodoturulula glutinis</i> . The cells were grown in 100 ml HSW at 30°C, 150 rpm and initial pH of 7.8 ± 0.4	33
Figure 2. <i>Candida utilis</i> growth 2^3 Factorial planning , 100 ml working volume, at different condition of initial pH, temperature and glucose concentrations: F1(30°C; 6.0; 1%); F2(30°C; 7.5; 1%); F3(35°C; 6.0; 1%); F4(35°C; 7.5; 1%); F5(30°C; 6.0; 2%); F6(30°C; 7.5; 2%); F7 (35°C; 6.0; 2%); F8(35°C; 7.5; 2%).....	34
Figure 3. Mean glucose, reducing elements and protein consumption for <i>C. utilis</i> growth at, 100 ml working volume, at different initial glucose concentration: glucose Δ (F1-4), $\times$ (F5-8); reducing elements $\diamond$ (F1-4), $\square$ (F5-8); protein $\times$ (F1-4), $\circ$ (F5-8).....	34
Figure 4. Pareto Chart of Standardized Effects for 12 hours culture of 2^3 Factorial planning for <i>Candida utilis</i> growth, 100 ml working volume, at different condition of initial pH, temperature and glucose concentrations.....	34
Figure 5. <i>Candida. utilis</i> growth response in BioFlo 2000 fermentor, with 800ml working volume 2% glucose added, at 30°C, own inicial pH 7.8 ± 0.4 , 1vvm aeration at 150 rpm.....	34

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Perfil das exportações dos principais produtos do setor primário da região Nordeste.....	15
Tabela 2. Composição do resíduo de camarão e da farinha de peixe (g/kg).....	17
Tabela 3. Composição de aminoácidos do hidrolisado do resíduo de camarão (HRC), da proteína do músculo de bacalhau e da bacto-triptona (fonte de nitrogênio de alta qualidade para cultivo de microrganismos).....	18
Tabela 4. Composição aproximada e perfil de aminoácidos essenciais de diferentes fontes protéicas.....	21
Tabela 5. Composição bruta em percentagem de peso seco da <i>Candida utilis</i>	21
Tabela 6. Composição de aminoácidos, em percentagem do total de aminoácidos da <i>Candida utilis</i>	22
Tabela 7. Resíduos agroindustriais utilizados para produção de SCP, com as respectivas espécies de microrganismos cultivadas.....	23

MANUSCRITO

Table 1. Variables and levels for 2 ³ factorial design.....	33
Table 2. Kinetic parameters of <i>Candida. utilis</i> culture with 800 ml working volume, at 30°C, initial pH 7.8±0,4, 150 rpm.....	34
Table 3. Total dry weight and cell biomass relationship of <i>Candida utilis</i> 36h-culture on HSW, DHSW and YPD medium.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	-	Micrograma (corresponde a 10 ⁶ grama)
µl	-	Microlitro (corresponde a 10 ⁶ litro)
AAE	-	Aminoácidos essenciais
ABCC	-	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
DHSW	-	“Hydrolysed shrimp waste” (diluído 1:1 com água destilada)
DNSA	-	Ácido dinitrosalicílico
EAAI	-	Índice de aminoácidos essenciais
FAO	-	“Food and Agriculture Organization of the United Nations”
FDA	-	“Food and Drug Administration”
FOB	-	“Free On Board “
FPH	-	“Fish Protein Hidrolizated”
GRAS	-	“Generally Recognized as Safe”
HRC	-	Hidrolisado do resíduo de camarão
HSW	-	“Hydrolyzed Shrimp Waste”
LIKA	-	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
NFE	-	“Nitrogen-free extract”
NIM	-	Necrose Idiopática Muscular
Q	-	Produtividade
S	-	Substrato consumido
SCP	-	“Single Cell Protein “
X	-	Biomassa produzida
YPD	-	Meio de cultura [2%(p/v) glicose; 2% (p/v) peptona; 1% (p/v) extrato de levedura].
Y _{X/S}	-	Rendimento de biomassa produzida em relação ao substrato consumido

RESUMO

O resíduo sólido da indústria camaroneira após hidrolisado (HRC), foi investigado como meio de cultura para produção de biomassa de levedura. HRC foi utilizado como única fonte de nutrientes para o “screening” de leveduras (*Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Rhodoturula glutinis*), em cultivo de batelada em 100 ml de volume de trabalho, 30°C, pH inicial $7,8 \pm 0,4$, e 150 rpm. Uma vez selecionada a levedura mais apropriada, foi avaliado o seu crescimento em diferentes valores de concentração de glicose (1% e 2%) , pH inicial (6,0 e 7,5) e temperatura (30° C e 35°C) de acordo com um planejamento fatorial 2^3 completo. Este experimento foi conduzido em 100 ml de HRC a 150 rpm. Após a determinação das melhores condições de cultivo, foram realizados testes de escalonamento para 800 ml utilizando, HCR e HRC diluído 1:1 com água destilada (HCRD), ambos suplementados com 2% de glicose e, como padrão, o meio YPD [1% (p/v) extrato de levedura, 2% (p/v) peptona, 2% glicose]. Este experimento foi realizado em bioreator com 1vvm, 30°C, $7,8 \pm 0,4$ pH inicial e 150 rpm. Como resultado do “screening” de leveduras a *C. utilis* apresentou a melhor produção de biomassa em HRC, com os melhores resultados de crescimento após 36 horas de cultivo, 1,8 g/l, 0,27 /h e 0,47 g/g, para produção de for biomassa (X), taxa de crescimento específico máximo ($\mu_{\max}$) e rendimento (Y), respectivamente. O planejamento fatorial utilizado para *C. utilis* demonstrou que a glicose contribuiu para o aumento da produção de biomassa no hidrolisado, porém nenhuma diferença significativa foi observada quando avaliado os diferentes valores de concentração de glicose, pH e temperatura, com valores médios em de $X = 3,55$ g/l, $Y = 0,15$ g/g, $\mu_{\max} = 0,26$ h⁻¹, após 12 horas de cultivo. As condições de 2% de glicose, pH 7,5 e temperatura de 30°C, foram mantidas para os testes em bioreator. A curva de crescimento de *C. utilis* em HRC foi comparável com a observada em meio YPD. Em 12 horas de cultivo, no entanto HRC apresentou maior produção de biomassa X (HRC) = 7,04 g/l enquanto X (YPD) = 6,25 g/l. Estes resultados demonstram que o HRC pode ser usado como substrato para produção de biomassa de *C. utilis*, quando suplementado com glicose. Adicionalmente, a contribuição do peso seco do HRC no produto final contribui para o aumentar o valor nutricional da biomassa e oferecer um característico “flavor” de camarão para o produto, o que favorece o seu uso como suplemento alimentar.

ABSTRACT

Hydrolyzed shrimp waste (HSW), was investigated as medium for yeast biomass production. A screening (*Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* and *Rhodoturula glutinis*) tested HSW as the sole nutrient source in flasks batch mode at 100 ml working volume, 30°C, initial pH 7.8 ± 0.4 , and 150 rpm shaker. The yeast growth behavior was evaluated under different values of glucose concentration (1% e 2%), initial pH (6.0 e 7.5) and temperature (30° C e 35°C). This experiment was carried out with 100 ml HSW at 150 rpm stirring speed. In a later stage, experiments were carried out, on scales up to 800 ml, HSW was diluted at 1:1 with distilled water and 2% glucose initial. This experiment was carried out with a bioreactor, 1vvm, 30°C, 7.8 ± 0.4 initial pH and 150 rpm. It was found that *C. utilis*, showed the best growing results. After 36 hours culture, 1.8 g l^{-1} , 0.27 h^{-1} e 0.47 g g^{-1} , for biomass production (X), maximum specific growth rate (μ_{max}) and yield (Y), respectively. HSW supplemented with glucose enhanced the yeast growth, however no significant difference was observed under different tested parameters with mean value of $X = 3.55 \text{ g l}^{-1}$, $Y = 0.15 \text{ g g}^{-1}$, and $\mu_{\text{max}} = 0.26 \text{ h}^{-1}$, after 12 hours culture. HSW diluted showed a yield compared with those observed in YPD. At 12 hours culture HSW diluted shown higher $X = 7.04 \text{ g l}^{-1}$ than YPD $X = 6.25 \text{ g l}^{-1}$. The results demonstrate that HSW can be used as a substrate for SCP production by *C. utilis*, when it is supplemented with glucose. The contribution of HSW dry weight in the final product contributes to the increase of the nutritional value of the biomass, besides giving a characteristic shrimp flavor to the product, which helps its use as a feeding supplement.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A CARCINICULTURA BRASILEIRA

Os países orientais são responsáveis pela maior parcela da produção mundial de camarão cultivado, sendo os principais produtores, por ordem de importância: China, Tailândia, Indonésia, Vietnã, Índia e Bangladesh. Dentre os países produtores do ocidente destacam-se o Brasil, como o mais importante, seguido pelo Equador, México, Honduras, Panamá, Colômbia e Peru (ABCC¹, 2004).

No Brasil, a produção de camarão em cativeiro teve seu início no final da década de 70. Durante o período de 1978 a 1986 foi conduzida a criação da espécie exótica *Penaeus japonicus*, porém as características de ambiente tropical não favoreceram sua adaptação. Na década de 1986 a 1996 destacou-se a domesticação das espécies nativas (*Litopenaeus subtilis*, *L. paulensis* e *L. Schimitti*). O desempenho produtivo dessas espécies, com médias de 400 a 600 kg/ha/ano, apenas foi suficiente para cobrir os custos diretos de produção. Só a partir 1996, com a introdução do *Litopenaeus vannamei*, espécie importada da costa do Pacífico, consolidou-se a viabilidade técnica e econômica do agronegócio do camarão (ABCC², 2004).

O volume produzido pelo Brasil no quinquênio 1997/2001 cresceu a uma taxa média anual acumulada de 83,5%, o que resultou numa produção de 40.000 t. Já em 2003 foram produzidas 90.000 t um incremento de 50% em relação à produção do ano anterior, das quais 95,0% foram originadas do Nordeste. Nesta região, a carcinicultura vem se desenvolvendo em ritmo acelerado, apresentando significativa participação no perfil das exportações do setor primário (Tabela 1). Neste mesmo ano de 2003, o Brasil foi considerado o sexto maior produtor mundial, além de ocupar o primeiro lugar em produtividade, com rendimento físico da atividade de 6,08 t/ha/ano (ABCC¹, 2004).

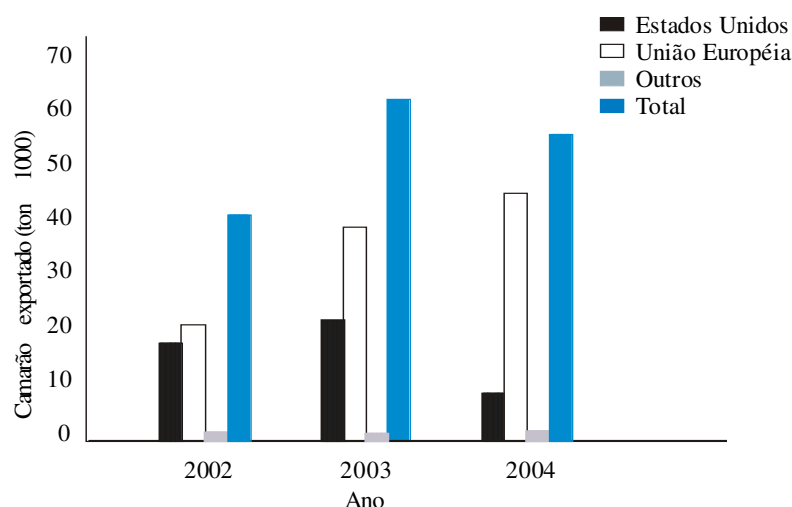
Tabela 1. Perfil das exportações dos principais produtos do setor primário da região Nordeste.

	2004 (jan/jun)	US\$ FOB 2003 (jan/nov)	2002
Açúcar de cana em bruto	173.631.576	297.791.952	230.388.521
Camarão cultivado	106.868.358	223.216.899	155.305.825
Fruticultura irrigada	49.750.880	222.436.177	141.394.895
Cacau e derivados	91.540.319	213.270.994	134.504.071
Couro animal e derivados	105.378.504	157.048.183	127.422.167
Soja e outros grãos	54.704.654	151.521.686	101.523.126

Fonte: (ABCC^{3,4,5}, 2004).

A produção de 2004 de 80.000 t foi afetada por uma enfermidade provocada por um vírus de RNA, chamada Vírus da Necrose Idiopática Muscular (NIMV), que causou a mortalidade de camarões e, por conseguinte, demissões no setor. O combate à disseminação da patologia inclui a utilização de técnicas adequadas de manejo e medidas de biossegurança (AQUALIDER, 2004).

Outro fator que influenciou a produção brasileira de camarão cultivado no ano de 2004 foi à sobretaxa aplicada pelos Estados Unidos da América (EUA) à importação de camarão de países como o Brasil, Vietnã, China, Equador, Índia e Tailândia. Esta ação protecionista, denominada “anti-dumping”, foi adotada devido à pressão dos produtores de camarão dos EUA, que afirmaram que os países acima citados estavam exportando seu produto a um preço inferior ao praticado em seus respectivos mercados. A sobretaxa do produto brasileiro chegou à ordem dos 60%, o que por outro lado, devido à necessidade de busca por outros mercados, favoreceu a consolidação da presença do camarão brasileiro na Comunidade Européia (Figura 1). Como o Brasil recorreu judicialmente à ação “anti-dumping”, ao final de 2004 o Departamento de Comércio dos EUA reduziu esta taxa para 10,4%, o que aumenta as expectativas de exportação do camarão brasileiro para o ano de 2005 devendo alcançar 105.000t.(ANBA,2004).



Fonte: SEAP, 2004.

Figura 1. Destino das exportações de camarão cultivado brasileiro, no período 2002 a 2004.

Um fator adicional que influenciará as exportações brasileiras em 2005 será a reorganização do mercado internacional de camarão, afetado pela quebra de produção dos países asiáticos atingidos pela tsunami no final de 2004. Segundo a Associação da Indústria de Camarão da Tailândia, o setor registrou prejuízos de US\$ 500 milhões, com uma perda na produção estimada em 80.000 t. A redução na oferta deverá refletir uma maior flexibilização das barreiras alfandegárias impostas pelos EUA, e ainda, a alta do preço do camarão no mercado internacional. Com isso, a produção interna deverá sofrer um novo impulso com as exportações, tornando-se bem mais atrativa para os produtores brasileiros (MERCADO DA PESCA, 2004).

1.2. RESÍDUOS DA INDÚSTRIA CAMARONEIRA

O crescimento da produção nacional de camarão cultivado gera um proporcional aumento de resíduos líquidos e sólidos. No mercado internacional, a exemplo dos EUA, cerca 60% do camarão importado é processado (SOCIL, 2004). O volume das exportações brasileiras de camarão no ano de 2004 foi de 54.379 t, das quais 60% em média correspondeu ao produto beneficiado (ABCC⁴, 2005). Podemos considerar desta forma, que cerca de 10.000 t de resíduos sólidos foram produzidos durante o período citado, já que as indústrias de processamento de camarão produzem cerca de 30 a 40% de resíduos, podendo alcançar 50%

quando cabeça, carapaça e calda são removidas (FERRER *et al.*, 1996). Devido ao alto custo sanitário para seu adequado descarte, muitas vezes os resíduos são lançados *in natura* no meio ambiente, sendo desta forma um potencial poluidor (RATTANAKIT *et al.*, 2002; CIRA *et al.*, 2002; FERRER *et al.*, 1996). Entretanto, este resíduo apresenta alto conteúdo de quitina, proteína e carotenóides, produtos de alto valor agregado e de ampla aplicação tecnológica. Devido a sua composição e qualidade nutricional podem ser utilizados como fonte de proteína e flavorizantes na formulação de alimentos (HEU *et al.*, 2003; RAO *et al.*, 2000). A farinha deste resíduo, obtida a partir da secagem e trituração da cabeça, apêndices e exoesqueleto, foi comparada com a farinha de peixe por FANIMO *et al.* (2000) (Tabela 2). Neste trabalho, verificou-se que o valor nutricional da farinha de resíduo de camarão depende da quantidade de quitina que fazendo parte do complexo protéico, apresenta baixa digestibilidade.

Tabela 2. Composição do resíduo de camarão e da farinha de peixe (g/kg).

	Resíduo de camarão	Farinha de peixe
Matéria seca	896,0	916,0
Proteína bruta	394	645,0
Fibra bruta	123,0	8,0
Extrato etéreo	26,8	70,0
Cinzas	140,0	200,0
Quitina	98,2	-
Energia metabolizável	10,58	-

Fonte: FANIMO *et al.*, 2000

Através de processos que envolvem hidrólises, no entanto, o conteúdo de quitina, proteína e carotenóides podem ser fracionados.

O FPH – “Fish Protein Hydrolyzated”, conforme designado pela FAO, é um concentrado protéico, obtido a partir da hidrólise das cadeias polipeptídicas do pescado. O hidrolisado de resíduo sólido do processamento de camarão obtido por GILDBERG & STENBERG (2001) recuperou 68% do Nitrogênio Total (Kjeldahl) do resíduo. A matéria seca deste hidrolisado obteve 49% (p/p), dos quais 86% foram de proteína bruta e 10% minerais. Sua composição é comparável a outras fontes protéicas já estabelecidas, principalmente em relação à concentração de aminoácidos essenciais (Tabela 3).

Tabela 3. Composição de aminoácidos do hidrolisado do resíduo de camarão (HRC), da proteína do músculo de bacalhau e da bacto-triptona (fonte de nitrogênio de alta qualidade para cultivo de microrganismos).

Aminoácidos	HRC	Músculo de bacalhau	Bacto- triptona
Essenciais			
Histidina	3,12 ± 0,00	3,1	2,5
Isoleucina	5,77 ± 0,03	4,8	4,4
Leucina	8,86 ± 0,09	8,4	8,3
Lisina	8,31±0,32	9,5	7,2
Metionina	3,30 ± 0,04	3,1	2,4
Fenilalanina	5,55	4,0	4,6
Treonina	6,04 ± 0,02	4,6	4,5
Triptofano	nd	1,2	nd
Valina	6,72 ± 0,04	5,3	6,7
Não essenciais			
Tirosina	5,08 ± 0,06	3,5	2,9
Ácido aspártico	2,84	10,6	7,7
Ácido glutâmico	8,92 ± 0,57	15,5	24,2
Glicina	6,76 ± 0,01	6,3	2,3
Serina	6,29 ± 0,04	4,2	6,1
Arginina	8,90 ± 0,21	6,2	3,4
Alanina	7,58 ± 0,01	5,0	3,5
Prolina	5,67 ± 0,00	3,7	9,3
Cystina	0,34 ± 0,02	1,1	0,0

Os valores dados são relativos à quantidade de aminoácidos em g/100g.

Fonte: GILDBERG & STENBERG, 2001.

Esta composição é dependente do processamento para obtenção do hidrolisado, que pode ser do tipo ácida - pelo uso de HCl (FERRER *et al.*, 1996)-, enzimática - através da adição de uma protease comercial (alcalase) (GILDBERG & STENBERG, 2001) - ou através da autólise, processo que utiliza as enzimas presentes no próprio resíduo (SILVA, 2004).

Devido a sua composição o hidrolisado pode ser utilizado para cultivo de microrganismos, como leveduras, visando o aumento da contribuição nutricional quando este for utilizado como suplemento alimentar.

1.3. AS LEVEDURAS

KREGER-VAN RIJ (1984), define leveduras como sendo “fungos unicelulares que se reproduzem por fissão ou brotamento”. Pertencentes a classe *Ascomycetes* ou *Basidiomycetes*, existe mais de 500 espécies descritas como leveduras “verdadeiras”, em 69 gêneros. As leveduras dependem do carbono orgânico como fonte de energia e podem ser sapróbios ou parasitas, encontrando-se normalmente associados a vegetais, insetos húmus ou qualquer outro substrato fornecedor de açúcar (WALKER, 1998; PHAFF, 1990).

Quando Cagniard de Latour, Kützing and Schwann, na década de 1830, descobriram que o crescimento de leveduras e outros protistas são responsáveis pela fermentação do vinho entre outras, teve início o estudo científico do cultivo de microorganismos. Pasteur, na década de 1850, caracterizou fisiologicamente bactérias e leveduras, introduzindo métodos assépticos, meio mínimo de cultivo, e iniciou a definição dos requerimentos para nutrientes e oxigênio (PIRT, 1975).

Durante o século XX também foram aprimoradas as técnicas de cultivo por Wildiers, mas apenas na década de 30 foi introduzida a técnica do Shake-flask por Kluyver & Perquin, no qual a homogeneização da cultura facilitou o controle e a compreensão do seu comportamento. Entre 1940 e 1950 foi desenvolvido o fermentador, um equipamento com controle automático das condições de cultivo, o que favoreceu a elucidação do comportamento da cultura microbiana. Já na década de 1950 foi desenvolvida a teoria de “chemostat”, cultura de fluxo contínuo, que hoje é uma tecnologia essencial para elucidação da relação entre o organismo e seu meio (PIRT, 1975).

Podemos citar algumas aplicações biotecnológicas das leveduras (WALKER, 1998):

- Na tecnologia ambiental (tratamentos e/ou remediação de resíduos como esgotos domésticos e lixo, utilização de subprodutos industriais, controle biológico e bioabsorção de metais);
- Nas pesquisas fundamentais (metabolismo de drogas, Biologia celular e molecular, Bioquímica e Genética);
- Na indústria de fermentação (vinhos, saquê, cerveja, pão e bioetanol)
- Na produção de agentes farmacêuticos de importância para a saúde humana.

As leveduras, consideradas ricas fontes de proteínas e vitaminas do complexo B, também têm sido usadas como suplemento em ração animal para compensar a deficiência de aminoácidos e vitaminas dos cereais (OLVERA-NOVOA *et al.*, 2002). As mais populares

entre elas são os gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Saccharomyces* (ANUPAMA, 2000). Como suplemento alimentar animal são relatados testes de níveis de substituição da principal fonte protéica por leveduras em rações para suínos, coelhos, peixes e aves (OLVERA-NOVOA *et al.*, 2002; GRANGEIRO *et al.*, 2001; FARIA *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 1996; PÁDUA *et al.*, 1996).

1.3.1. A LEVEDURA *Candida utilis*

Candida utilis (Henneberg), syn. *Pichia jadinii* (KURTZMAN & FELL, 1998), tem sido empregada na produção de uma variedade de compostos orgânicos como acetato de etila (ARMSTRONG *et al.*, 1984), álcoois ramificados (DERRICK & LARGE, 1993), ácido acético (CHRISTEN *et al.*, 1999; DOMENECH *et al.*, 1999), enzimas (SIM & HANG 1996), e etanol (JOSHI *et al.*, 2000); como também na produção de SCP para alimentação animal (JOSHI *et al.*, 2000; RAHMAT *et al.*, 1995; BHALLA & JOSHI, 1994), sendo considerada uma fonte segura de proteína altamente nutritiva pela indústria de alimentos.

No FDA “Food and Drug Administration”, há citações sobre *C. utilis* para as seguintes aplicações:

§172.590-Yeast-malt sprout extract, derived from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis*, *Candida utilis*.

§172.896-Dried yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis*, and dried torula yeast, *Candida utilis*.

A *C. utilis* é uma espécie com habilidade para crescer em várias fontes de açúcar como D-xilose, inulina, trealose e celobiose (KURTZMAN & FELL, 1998) metabolizando a maioria dos mono e dissacarídeos naturais, além de componentes lignocelulosídicos como fragmentos de pectina, xilana, celulose e lignina (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2002).

As leveduras *S. cerevisiae* e *C. utilis* são classificadas entre os microorganismos mais interessantes para inclusão como suplemento nutricional em rações, devido ao seu conteúdo protéico, que pode chegar a 50% do peso seco, além de lipídeos, polissacarídeos (ZIINO *et al.*, 1999), vitaminas, minerais e outros componentes que podem estimular a resistência a doenças em peixe (RAA, 1990).

O predominante metabolismo aeróbico da *C. utilis* e a ativa participação da via pentose fosfato para o metabolismo do açúcar, predispõe esta levedura para o balanço de carbono em favor da produção de biomassa quando comparado com outras leveduras como a *S. cerevisiae* que são sensíveis à glicose e altamente fermentativas (DE DEKEN, 1966; DIVJAK & MOR, 1973).

Especialmente, *C. utilis* tem uma concentração relativamente alta de aminoácidos essenciais (LAWFORD *et al.*, 1979), como pode ser verificado nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4. Composição aproximada e perfil de aminoácidos essenciais de diferentes fontes protéicas.

	Farinha de anchova	<i>Candida utilis</i>	Farinha de carne e osso	Concentrado protéico de alfafa	Farinha de soja
(% de peso úmido)					
Umidade	6,54	4,37	5,12	1,84	8,88
Proteína bruta	62,54	46,11	48,85	53,22	42,36
Extrato etéreo	9,56	1,51	10,90	6,77	1,20
Fibra bruta	-	0,62	-	1,92	5,39
Cinzas	14,90	10,20	29,74	4,81	3,00
NFE	6,46	37,19	5,39	31,44	36,17
AAE (gkg⁻¹)					
Arginina	37,3	23,9	33,8	27,1	31,5
Histidina	15,7	9,1	9,6	13,5	13,8
Isoleucina	30,7	18,3	15,9	24,3	18,9
Leucina	49,1	28,7	29,7	43,9	30,9
Lisina	51,3	44,4	28,1	24,3	24,9
Metionina	19,0	3,8	6,3	1,6	4,8
Fenilalanina	27,3	13,3	16,5	27,8	21,6
Treonina	27,5	23,5	15,9	24,1	17,2
Triptofano	7,3	5,2	2,9	24,5	4,6
Valina	44,6	25,4	23,7	24,5	24,0

Fonte: OLVERA-NOVOA *et al.*, 2002.

Tabela 5. Composição bruta em percentagem de peso seco da *Candida utilis*.

	% Peso seco
Proteína	
Soma de anidroaminoácidos	37
Bruta(Nx6,25)	42
Carboidratos	23
Mono- di- oligossacarídeo	1,0
Polossacarídeo	25
Lipídeos	6,1
Cinzas	13

Fonte: BROWN *et al.*, 1996.

Tabela 6. Composição de aminoácidos, em percentagem do total de aminoácidos da *C. utilis*.

Aminoácidos	% de aminoácidos totais
Essenciais	
Arginina	5,0
Histidina	2,2
Isoleucina	4,6
Leucina	7,8
Lisina	3,8
Metionina	1,6
Fenilalanina	4,6
Treonina	5,8
Triptofano	1,5
Valina	5,4
Prolina	3,6
EAAI*	89
Não essenciais	
Tirosina	4,7
Ácido aspártico	10,6
Ácido glutâmico	20
Glicina	5,2
Serina	6,0
Alanina	6,7
Cystina	1,0

EAAI Índice de aminoácidos essenciais (1989). valores a cerca de 90 indica boa qualidade, a cerca de 80 utilizável e menor que 70 , inadequado .

Fonte: BROWN *et al.*, 1996.

1.4 “SINGLE CELL PROTEIN” (SCP)

O Termo “Single Cell Protein” (SCP) refere-se à matéria seca proveniente do crescimento de microorganismos (algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos) destinada à alimentação ou formulação de alimentos. Há registros da utilização de microorganismos em processos fermentativos desde tempos remotos, como na fabricação do pão ($\pm$ 2.500 a.C.), de produtos lácteos, consumidos por egípcios, gregos e já bem desenvolvidos na era romana (100-50 a.C.). O cultivo de microorganismo para consumo direto de animais e humanos foi utilizado durante a primeira e a segunda guerra mundial pelos alemães que produziram *S. cerevisiae* e *C. utilis* (LITCHFIEL, 1979).

Após a segunda guerra, esforços vêm sendo dirigidos no sentido de otimizar o cultivo de células microbianas em grande escala, além de reduzir os custos de produção utilizando diferentes substratos como fonte de carbono, tais como: amido, celulose e resíduos do processamento de alimentos e da agricultura (LITCHFIEL, 1979).

1.4.1 Produção de SCP Através de Resíduos Agroindustriais

A produção de SCP a partir dos resíduos agroindustriais é economicamente vantajosa, uma vez que recupera subprodutos de valor agregado com a simultânea redução da carga orgânica gerada por estes (NIGAM, 1999). A SCP é facilmente produzida em escala industrial utilizando grande número de substratos (OLVERA-NOVOA *et al.*, 2002). Diversos trabalhos vêm sendo realizados neste sentido, como apresentados na tabela 9.

Tabela 7. Resíduos agroindustriais utilizados para produção de SCP, com as respectivas espécies de microrganismos cultivadas.

Microrganismos	Substratos utilizados	Referência
<i>C. utilis</i>	Resíduos da rizicultura	RAJOKA <i>et al.</i> , 2004
<i>K. marxianus</i>	Sorgo da silagem de milho	HANG <i>et al.</i> , 2003
<i>Pichia stipitis</i>	Resíduos da industrialização do repolho	CHOI <i>et al.</i> , 2002
<i>C. utilis</i>	Resíduos do enlatamento do abacaxi	NIGAN & KAKATI, 2002; NIGAN, 1999; NIGAN, 1998
<i>C. utilis</i>	Resíduos do processamento da polpa maçã	JOSHI & SANDHU, 1996
<i>C. utilis</i>	Melaço de cana-de-açúcar	LEE & KIM, 2001
<i>Trichosporon sp.</i>	Salmora de alface	SUNTORNISUK, 2000
<i>C. tropicalis</i>	Hidrolisado hemicelulolítico de cana-de-açúcar	PESSOA <i>et al.</i> , 1996

Em relação aos resíduos sólidos da indústria camaroneira, RATTANAKIT *et al.*, (2002) utilizaram fermentação sólida para produção de *Aspergillus sp.*, enquanto RHISHIPAL & PHILIP (1998) testaram os resíduos da carapaça de camarão em fermentação semi-sólida para produção de biomassa a partir de *Candida sp.* e *Rhodotorula sp.*. FERRER *et al.*, (1996) utilizaram a glicosamina, produzida pela hidrólise ácida da quitina, como fonte de carbono e energia para o crescimento da levedura *S. cerevisiae*.

2. JUSTIFICATIVA

Um material deixa de ser resíduo pela sua valorização como matéria-prima, para a produção de novos produtos. Neste caso, o resíduo passa a ser tratado como subproduto do processo produtivo (VALLE, 1995). A bioconversão de resíduos agroindustriais para recuperação de produtos de valor agregado tem despertado interesse da comunidade científica no sentido de reduzir o impacto ambiental deste tipo de atividade.

O aumento da criação de animais não ruminantes, em destaque as aves, peixes, suínos e camarões, em toda a região nordeste do Brasil, é dificultada pela falta sazonal de ingredientes para a fabricação de ração. A dificuldade de importação de milho e farelo de soja a preços competitivos durante a entressafra, e o alto preço da farinha de peixe constitui obstáculos à ampliação da criação animal.

Do ponto de vista estratégico a obtenção de ingredientes, especialmente de subprodutos da indústria de alimentos, representa uma vantagem competitiva, porque proporciona uma complementaridade ao fornecimento de ingredientes para as rações, a um baixo custo, além de contribuir para a redução dos custos gerados para o devido descarte destes resíduos.

A avaliação da produção de SCP através do resíduo proveniente do processamento do camarão, para a obtenção de um produto de alto valor agregado, vem contribuir para a superação de “gargalos” existentes na agroindústria nordestina. A busca por fontes protéicas alternativas, com baixo custo de produção, se torna imprescindível diante do aumento da demanda de alimentos devido ao natural crescimento demográfico. A diminuição do custo da produção de proteína vem contribuir para a diminuição do quadro de fome e desnutrição que ainda se vê presente em pleno terceiro milênio.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a produção de biomassa de alto valor protéico a partir do hidrolisado obtido do resíduo sólido da indústria camaroneira.

3.2. Objetivos Específicos

- Obter o hidrolisado do resíduo sólido do processamento industrial de camarão;
- Selecionar a levedura, considerada GRAS “Generally Recognized as Safe” pelo FDA, para produção de biomassa em hidrolisado de resíduo de camarão;
- Determinar as melhores condições de cultivo da levedura selecionada;
- Escalonar a produção de biomassa em hidrolisado de resíduo de camarão para fermentador de bancada.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCC¹ - <http://www.abccam.com.br/agronegocio/agro.htm>. acessado: agosto, 2004.
- ABCC² - <http://www.abccam.com.br/hist-in.htm> . acessado: Janeiro, 2005.
- ABCC³ - Revista da ABCC associação brasileira de criadores de camarão. ano 5, n. 1, março de 2003.
- ABCC⁴ - Revista da ABCC associação brasileira de criadores de camarão. ano 6, n. 1, março de 2004.
- ABCC⁵ - <http://www.abccam.com.br/estat%edsticas%20novas>. Acessado: Janeiro, 2005.
- ANUPAMA, R. P. Value-added food: single cell protein. **Biotechnology Advances**, v.18 p.459-479, 2000.
- ANBA - <http://www.anba.com.br/noticia.php?id=1670>. Acessado: Dezembro, 2004.
- AQUALIDER - <http://www.aqualider.com.br/news.php?action=newsview&recid=1425>. acessado: Dezembro, 2004.
- ARMSTRONG, D.W. MARTIN, S.M. YAMAZAKI, H. Production of ethyl acetate from diluted ethanol solutions by *Candida utilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p.1038–1041, 1984.
- BHALLA, T.C. & JOSHI, M. Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.116–117, 1994.
- BROW, M. R. BARRET, S. M. VOLKMAM, J. K. NEARHOS, S. P. NELL, J. A. ALLAM, G. L. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. **Aquaculture**, v.143 p. 341-360, 1996.
- CHRISTEN, P. DOMENECH, F. PÁÇA, J. REVAH, S. Avaluation of four *Candida utilis* strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol. Short communication. **Bioresource Technology**, v.68, p 193-195, 1999.
- CIRA L. A. HUERTA, S. HALL, G.M. SHIRAI. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. **Biochemistry**, v. 37, p.1359 – 1366, 2002.
- CHOI, M. H. JI, G. E. KOH, K. H. RYU, Y. W. JO, D. H. PARK, Y. H. Use of waste chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. short communication. **Bioresouce Technology**, v.83, p. 251-253. 2002.
- DE DEKEN, H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **Journal of General Microbiology**, v.44, p.149–156, 1966.

DERRICK, S. & LARGE, P.J. Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p.2783–2792, 1993.

DIVJAK, S. & MOR, J.R. On the activity of carbon dioxide fixation in growing yeasts. **Arch. Mikrobiol**, v.94, p.1991–1999, 1973.

DOMENECH, F., CHRISTEN, P., PACA, J. & REVAH, S. Ethanol utilization for metabolite production by *Candida utilis* strains in liquid medium. **Acta Biotechnology**, v.19, p. 27–36, 1999.

FANIMO, A.O. ODUGUWA, O.O. ONIFADE, A.O. OLUTUNDE, T.O. Protein quality of shrimp-waste meal. Short communication. **Bioresource Technology**, v.72, p.185-188, 2000.

FARIA, H. G. SCAPINELLO C. FURLAN, A. C. MOREIRA, I. MARTINS E.N. Valor Nutritivo das Leveduras de Recuperação (*Saccharomyces* sp), Seca por Rolo Rotativo ou por “Spray-Dry”, para Coelhos em Crescimento. **Rev. Bras. de Zootecnia**, v.29(6), p.1750 – 1753, 2000.

FERRER, J. PAEZ, G. MARMOL, Z. RAMONES, E. GARCIA, H. FORSTER C. F. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolyzate. **Bioresource Technology**, v. 57, p.55 – 60, 1996.

GILDBERG A. STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v.36, p.809-812, 2001.

GRANGEIRO, M.G.A. FUENTES, M.F.F. FREITAS, E.R. ESPÍNDOLA G.B. SOUZA, F.M. Inclusão da Levedura de Cana-de-Açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) em Dietas para Frango de Corte. **Rev. Bras. de Zootecnia**, v.30, p.766-773. 2001.

HANG, Y. D. WOODAMS, E. E. HANG, L. E. Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. short communication. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 305-307, 2003.

HEU, M. KIM, J. SHAHIDI. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. **Food Chemistry**, v.82, p.235-242, 2003.

JOSHI, V. K. & SANDHU, D. K. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. **Bioresouce Technmology**. v.56, p. 251-255, 1996.

JOSHI, V.K. GUPTA, K. DEVRAJAN, A. LAL, B.B. & ARYA, S.P. Production and evaluation of fermented apple pomace in the feed of broilers. **Journal of Food Science and Technology** v.37, p. 609–612, 2000.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. The yeasts – a taxonomic study, 3th ed., Elsevier Sc. Publ., Amsterdam, Netherlands, 1984.

KURTZMAN, P.C. & FELL, J.W. The Yeasts, A Taxonomic Study. 4th ed., p. 314–315, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V. ISBN 0-4481312-8, 1998.

LAWFORD, G.R., KLIGEMAN, A., WILLIAMS, T.. Production of high-quality edible protein from *Candida* yeast grown in continuous culture. **Biotechnol. Bioeng.** v.21, p.1163–1173, 1979.

LEE, B. & KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v.25, p.111–124, 2001.

LITCHFIEL, J. H. Production of Single-Cell Protein for use in Food or Feed. **Microbial Technology** 2^o ed. V.1 cap. 4. 1979.

MERCADO DA PESCA. <http://www.mercadodapesca.com.br/noticias2.php?id=2269>. acesso:2004.

MOREIRA, I. ANDREOTTI F. L. FURLAN, A.C. MARTINS, E.N. SCAPINELLO C. Níveis Crescentes de Levedura de Recuperação (*Saccharomyces* Spp.), Seca pelo Método “Spray-Dray”, na Alimentação de Leitões. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Fortaleza. Anais... Fortaleza:SBZ, v.4 p.116-118, 1996.

NIGAN, J. N. Single cell protein from pineapple cannery effluent. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, p. 693-696. 1998.

NIGAN, J. N. Continuous cultivation of the yeast *Candida utilis* at different dilution rates on pineapple cannery effluent. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15, p. 115 - 117. 1999.

NIGAN, J. N. & KAKATI, M. C. Optimizatin of dilution rate for the production of value added product and simultaneous reduction of organic load from pineapple cannery waste. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p. 301-305. 2002.

OLVERA-NOVOA, M. A. MARTÍNEZ- PALACIOS, OLIVERA-CASTILLO Utilization of torula yeast (*Candida utilis*) as a protein source in diets for tilapia (*Oreochomis mossambicus*, Peters) fry. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p.257-264. 2002.

PÁDUA, D.M.C. CARNEIRO, D.J. URBINATI, E.C. PÁDUA J.T. Avaliação preliminar da Proteína de Levedura Seca de Álcool (*Saccharomyces cerevisiae*) para Ração de Peixes de Água Doce. Anais da XXXIII Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia. v. 4, p.255 – 257, 1996.

PESSOA Jr. , A. MACHILA, I. M. SAT, S. Cultivation of *Candida utilis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. **Journal of biotechnology**, v. 51, p. 83-88, 1996.

PHAFF, H. J. isolation of yeast from natural source. In: isolation of biothechnological organisms from nature. **Labeda (ed), US Mc-Graw-Hill Inc.** pp. 53-59, 1990.

PIRT, S. J. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.

RAA, J. Biotechnology in aquaculture and the fish processing industry: A success story in Norway. In: Voigt, M.N., Botta, J.R. (Eds.), *Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability*. Technomic Publishing Co, Inc, Lancaster, PA, USA. 1990.

RAHMAT, H. HODGE, R.A. MANDERSON, G.J. & YU, P.L. Solid substrate fermentation of *Kloeckera apiculata* and *Candida utilis* on apple pomace to produce an improved stock-feed. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.11, p.168–170, 1995.

RAJOKA, M. I. KIANI, M. A. T. KHAN , S. AWAN, M.S. HASHIMI, A. Production of single cell protein from rice polishings using *Candida utilis*. **World Journal of microbiology & Biotechnology**, v.20, p. 297-301, 2004.

RAO, M. S. MUÑOZ, J. STEVENS, F. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.54, p. 808-813, 2000.

RATTANAKIT N. PLIKOMOL, A. YANO, S. WAKAYAMA, M. TACHIKI, T. Utilization of shrimp shellfish as a substrate for solid-state cultivation of *Aspergillus sp.* S1-13: evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 6, p.550-556, 2002.

RHISHIPAL, R. & PHILIP R. Selection of marine yeast for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. **Bioresource Technology**, v.65, p.255-256, 1998.

SILVA, C. P. Componentes e Qualidade Nutricional do Hidrolisado de Cabeça de Camarão. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Nutrição/UFPE, 2004.

SIM, S.L. & HANG, Y.D. Sauerkraut brine: a potential substrate for production of yeast b-glycosidase. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.29, p.365–367, 1996.

SOCIL www.socil.com.br/peixes/noticia_ABCC.htm. Acessado: Dezembro, 2004.

SUNTORNSUK, W. Yeast cultivation in lettuce brine. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p. 815 – 818, 2000.

VALLE, C.E. Qualidade ambiental: O desafio de ser competitivo protegendo o meio ambiente. São Paulo: Pioneira, 117p., 1995.

VILLAS-BÔAS, S. G. ESPÓSITO, E. MENDONÇA, M. M.. Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid-substrate cultivation on apple pomace. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, V. 18, P.541 –545, 2002.

WALKER, G. M. Yeasts physiology and Biotechnology, ed John Wiley and Sons, England, p 350, 1998.

ZIINO, M. LO CURTO, R.B. SALVO, F. SIGNORINO, D. CHIOFALO, B. GIUFFRIDA, D. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture. **Bioresource Technol**, v. 67, p.7–11, 1999.

5. MANUSCRITO

TÍTULO

SCP production by hydrolysed shrimp waste

A SER SUBMETIDO À REVISTA

Applied Microbiology and Biotechnology

Ciências Ambientais
Genética
Citologia e Biologia Celular
Histologia
Bioquímica
Biofísica
Microbiologia
Engenharia Química
Engenharia Sanitária

Tipo de Material: *Periódicos com texto completo*
Indexado ISI: *sim* Fator de Impacto: *2.034* (JCR-2003)
Editor/distribuidor: *Springer* ISSN: *0175-7598*

ORIGINAL PAPER

Eduardo Pereira Gomes · Marie Clarie Brassard · Justin Lapoint · Ranilson de Souza Bezerra ·
Danyelly Bruniska Gondin Martins and José Luiz de Lima Filho

SCP production by hydrolyzed shrimp waste

Abstract Hydrolyzed shrimp waste (HSW), was investigated as medium for yeast biomass production. A screening (*Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* and *Rhodoturulula glutinis*) tested HSW as the sole nutrient source in flasks batch mode at 100 ml working volume, 30°C, initial pH 7.8 ± 0.4 , and 150 rpm shaker. The yeast growth behavior was evaluated under different values of glucose concentration, initial pH and temperature. This experiment was carried out with 100 ml HSW at 150 rpm stirring speed. In a later stage, experiments were carried out, on scales up to 800 ml, HSW was diluted at 1:1 with distilled water and 2% glucose initial. This experiment was carried out with a bioreactor, 1vvm, 30°C, 7.8 ± 0.4 initial pH and 150 rpm. It was found that *C. utilis*, showed the best growing results. HSW supplemented with glucose enhanced the yeast growth, however no significant difference was observed under different tested parameters. HSW diluted showed a yield compared with those observed in YPD. The results demonstrate that HSW can be used as a substrate for SCP production by *C. utilis*, when it is supplemented with glucose. The contribution of HSW dry weight in the final product contributes to the increase of the nutritional value of the biomass, besides giving a characteristic shrimp flavor to the product, which helps its use as a feeding supplement.

Introduction

The Brazilian shrimp farm production in 2004 reached 80.000 t exporting ca. 54.000 t, 60% of of the processed products (ABCC 2005). According to Cira et al. (2002), the shrimp process industry yield about 30 to 40% of solid residues meaning that an average of 10.000 t solid waste was generated in Brazilian shrimp process industry. Its nutritional composition and quality enable the use of this waste as a protein and flavor source for feed formulation (Heu et al. 2003).

The high concentration of protein, chitin and carotenoids in this residue can be fractionated by processes involving hydrolysis acid using HCl (Ferrer et al. 1996), enzymatic hydrolysis by adding alcalase (Gildberg & Stenberg 2001) or by autolysis using its own proteolytic enzymes (Silva 2004). In *Pandalus borealis* hydrolyzed shrimp waste was found to be rich in amino acid and minerals, which is comparable to the bacto-triptone (Gildberg & Stenberg 2001).

The composition allows it to use hydrolyzed shrimp as a substrate for microbial growth and single cell protein (SCP) production. Nowadays, conversion of agroindustrial waste to SCP have been indicated as a cheap process; in here GRAS microorganisms are grown in waste, reducing their pollutant potential (Ferrer et al. 1996). Among the microorganisms, yeast have been indicated for SCP production due to its high content of proteins, the presence of B-complex group vitamins, good amino acid profile and low level of nucleic acid content, which can competes well with others protein sources used in animal feed formulation (Rajoka et al. 2004; Anupama 2000). Besides, it can be use with different kind of sugars as substrate, within a wide range of pH, with a high productivity (Rhishipal & Philip 1998; Kreger-Van Rij. 1984). Various yeasts are used as protein-rich food, mainly the *Candida sp.*, *Hansenula sp.*, *Pichia sp.*, *Torulopsis sp.* and *Saccharomyces sp.*

E. P. Gomes · D. B. G. Martins · R. S. Bezerra · J. L. Lima Filho (✉)

Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami - LIKA.
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brazil.
Av. Moraes Rego S/N. Tel.: (81) 21268484
e-mail: jose_luiz60@terra.com.br

R. S. Bezerra · J. L. Lima Filho
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brazil
M. C. Brassard · J. Lapoint
Institut de Technologie Agroalimentaire – St-Hyacinthe
– Quebec – Canada.

(Anupama 2000). The food supplements can be used for, porks, rabbits, fish and chicken. Some researches suggested the possibility to substitute at different concentration levels the main protein source for yeast biomass (Olvera-Novoa et al, 2002; Grangeiro et al., 2001; Faria et al., 2000; Moreira et al., 1996; Pádua et al., 1996).

SCP has been obtained by different yeast species using different wastes as substrate: *Candida utilis* in rice polishing (Rajoka et al. 2004), and pineapple cannery (Nigan & Kakati 2002; Nigan 1999; Nigan 1998); *Kluyveromyces marxianus* in corn silage juice (Hang et al. 2003); *Pichia stipitis* in chinese cabbage (Choi et al. 2002); *C. utilis*, in apple pomace (Villas-Bôas et al. 2002; Joshi & Sandhu 1996); *Trichosporon sp.* in lettuce brine (Suntornsuk 2000); and *C. tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzed medium (Pessoa et al. 1996). Regarding the use of solid shrimp waste as a carbon source for microorganisms production, few results have been described: *Aspergillus sp.* in solid-state cultivation (Rattanakit et al. 2002); *Candida sp.* and *Rhodotorula sp.* in semi-solid medium (Rhishipal & Philip 1998); and *S. cerevisiae* in acid hydrolyzed quitin (Ferrer et al. 1996).

The aim of this work was to select the best yeast species, where hydrolyzed shrimp waste can be used as substrate for the SCP production.

Materials and methods

Hydrolyzed shrimp waste treatment

The *Litopenaeus vannamei* head was provided by Netuno A/S (PE. Brazil). Shrimp heads were mixed with distilled water at proportion 1:1 and blended in an industrial blender. This mixture was hydrolyzed as described by Silva (2004), with the follow modifications: the hydrolysis (autolysis) process was carried out in a fermentor (BioFlo2000, New Brunswick), for 3 h at 40°C and constant agitation at 400 rpm. After this period, solid tissues were separated by filtration (using cotton tissue) and the liquid portion was centrifuged (40 min, 8.000 x g, at 4°C) to obtain a pellet rich in carotenoids and the supernatant protein-rich. The supernatant was autoclaved (15 min at 121° C) and centrifuged (40 min, 8000 x g, at 4°C). this second supernatant was called HSW which was aliquoted under sterile conditions to be use as substrate for yeast growth.

Yeast strains

The strains *Kluyveromyces marxianus* CBS6556, from the Central bureau voor Schimmelcultures Baarn (Netherlands), *Saccharomyces cerevisiae* (Itaiquara), *Candida utilis* and *Rhodotorula glutinis* (Department of Micology - UFPE, PE-Brazil) were used in this study. The yeasts were maintained in solid YPD (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose and 2% (w/v) Agar) at 4°C, and stored at -80°C on the same medium describe above, with glycerol (70%) (Sambrook et al. 1989).

Culture conditions

For yeast screening assay, one loopful of yeast cells were collected from solid YPD plates (cultivated after 48h, at 30°C) and inoculated in 10 ml YPD medium, at 50 ml Erlenmeyer flasks. After 12 h of growth at 30°C and 150 rpm, in a rotatory shaker, this culture was used as an inoculum. Yeast strains *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *C. utilis* and *R. glutinis* were grown in HSW as a sole nutrient source. The growth conditions were: 100 ml working volume into a 500 ml Erlenmeyer, 30°C, initial pH 7.8 ± 0.4, 150 rpm shaker, and inoculum concentration of 0.038 ± 0.02 g l⁻¹. Samples were taken during 48 hours, in regular intervals, for analyze.

2³ Factorial design

A full 2³ factorial design, with a one genuine replicate was used for yeast growth formed by three factors in two levels (Table 1). The pre-grown conditions for the selected yeast were the same as described above. After 12 h of cultivation, the culture was used to inoculate 100 ml HSW supplemented with glucose, into 500 ml Erlenmeyer, at 150 rpm shaking. The initial biomass concentration was 0.2 ± 0.1 g l⁻¹. Samples were taken for analysis with time intervals of 6 hours during the 36 hours of culture growth. The effects of three independent variables on biomass production were analyzed by using an experimental design matrix in STATISTICA 6.0 software for Windows (StatSoft, USA).

Table 1. Variables and levels for 2³ factorial design.

Variables	Levels	
	-1	+1
Glucose (%)	1	2
Temperature (°C)	30	35
Initial pH	6.0	7.5

Bioreactor assays

The assays were performed in a BioFlo2000 - New Brunswick (USA), with 800 ml working volume, 0.15 ± 0.06 g l⁻¹ inoculum, aeration 1 vvm, 150 rpm and 30°C, using 100 µl⁻¹ antifoam 204 Organic (Sigma Co.). The cell growth was evaluated on DHSW (diluted 1:1 with distilled water) and HSW (not diluted), both with 2% of glucose concentration. YPD medium was used as a standard. Samples were taken during 36 h of cultivation, and stored at 4°C for analytical measurements. The culture content at the end of a fermentation was dried and the relationship between total volume and cell dry weight (after washing) was measured.

Analytical determinations

The biomass concentration was determined by using a linear regression, generated by the calibration curve of the amount of cells versus dry weight (g l⁻¹). The total reducing sugars were determined by the DNS method using glucose as a standard sugar (Miller 1959). Glucose concentration was determined by using a colorimetric enzymatic method, using a commercial kit (Celm, SP, Brazil). Total protein content was determined by using Biuret method using a commercial kit (Celm, SP, Brazil).

Cultivation kinetic parameters

The kinetic parameters were calculated as described by Pirt (1975). Maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$) was determined from the growth curve in the exponential phase. The yield ($Y_{x/s}$) was calculated as the amount of cell (grams) produced per gram of consumed sugars. The biomass production [$X(g l^{-1})$] was determined as grams of dry cell produced per liter of the growth medium. The productivity [$Q(g l^{-1} h^{-1})$] was expressed as biomass produced per liter of medium per hour of cultivation. All analyzes were twice and expressed by calculating media and standard deviation. ± 5.0%.

Results

Yeast screening assay

In the screening assay, *C. utilis* showed the highest biomass production (1.8 g l⁻¹) after 36 h of incubation, followed by *R. glutinis* (1.22 g l⁻¹) (Figure 1). Both species consumed around 66% of the initial sugar concentration within this period. The maximum specific growth rate and yield of biomass on sugar consumption was obtained for *C. utilis*, $\mu_{\max} = 0.27 h^{-1}$ and $Y_{x/s} = 0.47$. *S. cerevisiae* and *K. marxianus* showing an extended lag phase and low cell growth. Based on this result, *C. utilis* was chosen for the further experiments.

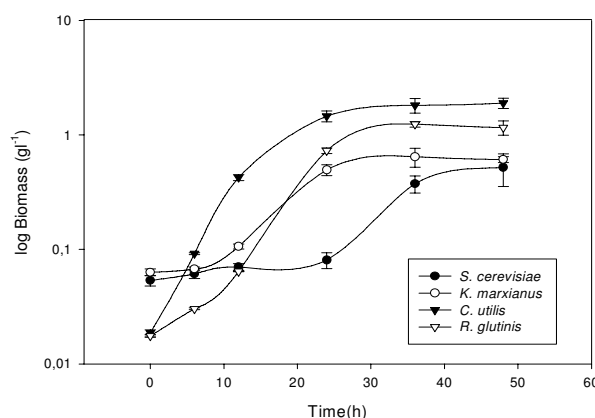


Fig. 1 Growth behavior of four GRAS yeast: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 36907), *Saccharomyces cerevisiae* (Itaquatiara), *Candida utilis* and *Rhodoturulula glutinis*. The cells were grown in 100 ml HSW at 30°C, 150 rpm and initial pH of 7.8 ± 04.

2³ Factorial design

Considering that at 36h *C. utilis* is already in stationary phase the growth curves in all treatments were followed up to 36 h, (Figure 2). In all yeasts flasks, after 12 h of incubation the cells reached the beginning of a stationary phase correlated with the whole glucose and fall of protein consumption (figure 3). Mean values at 12-hour culture were obtained as follows: 3.55 g l⁻¹, 0.15 g g⁻¹, 0.26 h⁻¹ and 0.30 g l⁻¹ h⁻¹ for biomass production, yield, maximum specific growth rate and productivity, respectively.

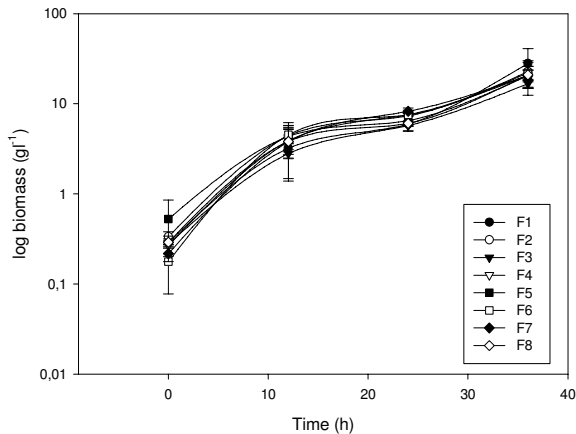


Fig. 2. *Candida utilis* growth 2³ Factorial planning , 100 ml working volume, at different condition of initial pH, temperature and glucose concentrations: F1(30°C; 6.0; 1%); F2(30°C; 7.5; 1%); F3(35°C; 6.0; 1%); F4(35°C; 7.5; 1%); F5(30°C; 6.0; 2%); F6(30°C; 7.5; 2%); F7 (35°C; 6.0; 2%); F8(35°C; 7.5; 2%).

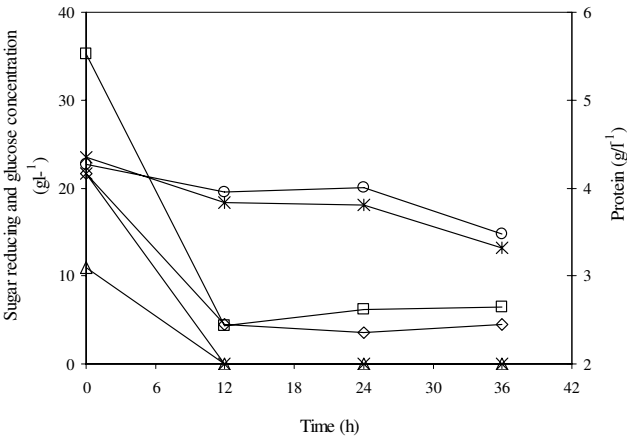


Fig 3. Mean glucose, reducing elements and protein consumption for *Candida. utilis* growth at, 100 ml working volume, at different initial glucose concentration: glucoseΔ(F1-4), ×(F5-8); reducing elements ◇ (F1-4), □(F5-8); protein×(F1-4), ○(F5-8).

No significant differences among the treatments were found in the factorial design analysis for *C. utilis* growth (Figure 2). Based on this result, the initial pH, temperature of 30°C and 2% glucose supplementation were chosen for scale up experiments carried out in a bioreactor. The growth curve of *C. utilis*, in 800 ml HSW, DHSW and YPD, was quite similar (Figure 5). Its kinetic parameters are shown in Table 2.

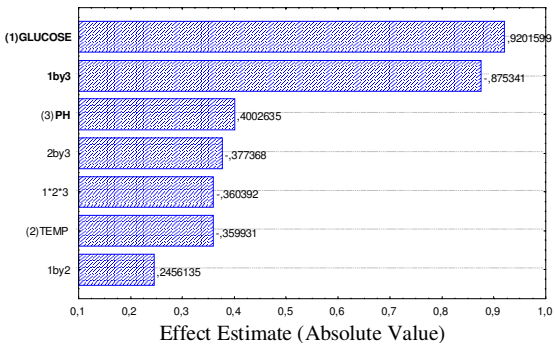


Fig 4 Pareto Chart of Standardized Effects for 12 hours culture of 2³ Factorial planning for *Candida utilis* growth, 100 ml working volume, at different condition of initial pH, temperature and glucose concentrations.

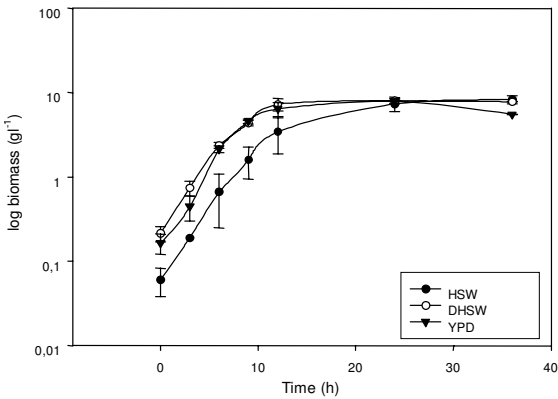


Fig 5. *Candida. utilis* growth response in BioFlo 2000 fermentor, with 800ml working vol, 2% glucose added, at 30°C, own initial pH 7.8±0.4, 1vvm aeration at 150 rpm.

Table 2. Kinetic parameters of *Candida utilis* culture with 800 ml working volume, at 30°C, initial pH 7.8±0.4, 150 rpm.

	μ_{max} (h ⁻¹)	Y (gg ⁻¹)	Q (gl ⁻¹ h ⁻¹)
HSW	0.32±0.02	0.30±0.03	0.30±0.02
DHSW	0.30±0.02	0.42±0.02	0.59±0.02
YPD	0.33±0.01	0.27±0.01	0.52±0.02

However , the total HSW dry weight obtained at final culture was two times higher than YPD (Tab. 3). The medium percentages for the total weight culture were 86.73%, 77.16% and 82.38% for HSW, DHWS and YPD respectively.

Table 3. Total dry weight and cell biomass relationship of *Candida utilis* 36h-culture on HSW, DHSW and YPD medium.

medium culture	medium dry weight (g l ⁻¹)	Dry weight cell biomass (g l ⁻¹)	total Dry weight (g l ⁻¹)
HSW	61.82±7.9	8.20±0.89	70.02±8.79
DHSW	33.20±0.4	7.58±0.08	40.78±0.48
YPD	30.26±2.4	5.33±0.19	35.59±2.59

Discussion

The results obtained with HSW used as the sole source of nutrients for *C. utilis* growth was more efficient than those obtained with diluted lettuce brine for *Candida sp* growth at same conditions, $X = 0.43 \text{ g l}^{-1}$, $Y = 0.48 \text{ g g}^{-1}$ and $\mu_{\max} = 0.06 \text{ h}^{-1}$ (Suntornsuk 2000).

The addition glucose analyzed by factorial planning enhanced the biomass production of *C. utilis* 12 times, compared to the sole-HSW assays under 36-h. The average biomass production was $X = 3.55 \pm 0.5 \text{ g l}^{-1}$ in 12-h cultivation equivalent to the one obtained in the same period with HSW in bioreactor. The analysis of the 36-h growth curve, with factorial planning ($X = 21.19 \pm 2.96 \text{ g l}^{-1}$), showed an increase of 3.2 times in the *C. utilis* biomass production compared to the 24-h results. This production, when compared with bioreactor assays under 36-h cultivation showed a increase of 2.5, 2.8 and 3.9 times for HSW, DHSW and YPD respectively. With DHSW, the same conditions in the bioreactor, a two times higher biomass culture was obtained, like with the production with *C. utilis* in YPD. These facts suggest that the dilution of the residue has prevented a substrate inhibition, as cited by Verduyn (1991). After 24-h cultivation, in all glucose supplemented treatments, the biomass production was similar. Regarded to treatments with HSW residues, the period between 24 to 36-h of cultivation showed an increase on biomass production. However, in the bioreactor this behavior was not so significant when compared to Erlenmeyer flasks. This fact could be related to the surface:volume:agitation relationship in bioreactor, which could reduce the superficial gaseous interchanges, allowing the action of limiting factors such accumulation of cellular by-products as ethanol, acetic and pyruvic acids (Verduyn 1991; Hensing et al. 1995; Lee 1996). The inhibition of cellular respiration by a high concentration of dissolved CO₂

could also occur in these conditions (Jones & Greenfield 1982).

The whole consumption of glucose in the factorial planning, with 1% as well as 2%, occurred near 12-h cultivation, helping the fall in productivity in the subsequent 12-h period. Lee & Kim (2001) verified the depletion of 5 g l^{-1} molasses glucose equivalent after 12-h when microorganisms were grown in a medium containing a sugar mixture. Pessoa et al. (1996) observed a rapid consumption of glucose about 6h after inoculation, followed by xylose and acetic acid consumption. So yeast utilizes the different sugars in a sequential manner but glucose is preferred. According to this observation, 15% of total sugar was registered after 12h cultivation followed by a minor rise in biomass production in all treatments. This fact suggests that when other carbon sources, it available as such non-reducing disaccharide trealose (Roy et al. 2001), since cells do have the ability to alter their metabolism with changes in their environment (Ordaz et al. 2001). So the period between 12 and 24 h was distinguished by a yeast metabolic adjustment for this other carbon source, that might have provided energy for biomass synthesis, using the nutrients when yet present in the medium in the period between 24 and 36h.

The total microorganism weight at the end of cultivation with HSW was higher compared to the one in the YPD medium (Table 3). The significant contribution of the HSW to the final product increases the nutritional value of the biomass. Besides, it gives as well a distinct shrimp flavor to the product and helps it to use it as a feed supplement.

The results of this study have shown that, HSW obtained by shrimp waste using enzymatic autolysis, can be used as a rich substrate for yeast growth when it is supplemented by glucose, and shows a similar growth compared to YPD medium. *C. utilis* is appropriated yeast for SCP production in this medium. The biomass produced from HSW provides a shrimp flavor and contributes to nutritional composition for final product. Further studies could increase the biomass production and improve its utilization for animal feedstock.

Acknowledgments

The authors would like to thank Netuno S/A for providing shrimp waste. This work was supported by LIKA/UFPE, CAPES, CNPq, FINEP, P&T Ltd.

Hereby I would like to thank Dr. F. N. Wiggers for the language revision.

References

- Anupama RP (2000) Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances* 18:459-479
- ABCC - <http://www.abccam.com.br/estat%edsticas%20novas>. Acess: Janeiro, 2005
- Choi MH, Ji GE, Koh KH, Ryu YW, Jo DH, Park YH (2002) Use of waste chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. short communication. *Bioresouce Technology* 83:251-253
- Cira LA, Huerta S, Hall GM, Shirai (2002) Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Biochemistry* 37:1359 – 1366
- Faria HG, Scapinello C, Furlan AC, Moreira I, Martins EM (2000) Valor Nutritivo das Leveduras de Recuperação *Saccharomyces* sp., Seca por Rolo Rotativo ou por “Spray-Dry”, para Coelho em Crescimento. *Rev. Bras. de Zootecnia* 29:1750 – 1753
- Ferrer J, Paez G, Marmol Z, Ramones E, Garcia H, Forster CF (1996) Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolyzate. *Bioresource Technology* 57:55 – 60
- Gildberg A, & Stenberg E (2001) A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry* 36:809-812
- Grangeiro MGA, Fuentes MFF, Freitas ER, Espindola GB, Souza FM (2001) Inclusão da Levedura de Cana-de-Açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) em Dietas para Frango de Corte. *Rev. Bras. de Zootecnia* 30:766-773
- Hang Y D, Woodams EE, Hang LE (2003) Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. short
- Hensing M, Rouwennhorts R, Heijnen JJ, Dijken JP Van, Pronk JT (1995) Physiological and technological aspects of heterologous protein production with yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* 67:261-279
- Heu M, Kim J, Shahidi (2003) Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry* 82:235-242
- Jones RP, & Greenfield PF (1982) Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microb Technol* 4:210-223
- Joshi VK, & Sandhu DK (1996) Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresouce Technology* 56:251-255
- Kreger-Van RNJW (1984) The yeasts – a taxonomic study, 3th ed., Elsevier Sc. Publ., Amsterdam, Netherlands
- Lee B, & Kim JK (2001) Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering* 25:111–124
- Lee SY (1996) High-cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 14:98-105
- Miller GL, (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31:426-428
- Moreira I, Andreotti F L, Furlan AC, Martins EN, Scapinello C, (1996) Níveis Crescentes de Levedura de Recuperação (*Saccharomyces* Spp.), Seca pelo Método “Spray-Dray”, na Alimentação de Leitões. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Fortaleza. Anais... Fortaleza:SBZ, v:116-118.
- Nigan JN (1998) Single cell protein from pineapple cannery effluent. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14:693-696
- Nigan JN (1999) Continuous cultivation of the yeast *Candida utilis* at different dilution rates on pineapple cannery effluent. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15:115-117
- Nigan JN, & Kakati MC (2002) Optimizatin of dilution rate for the production of value added product and simultaneous reduction of organic load from pineapple cannery waste. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18:301-305
- Olvera-Novoa M, Martínez- Palacios, Olivera-Castillo (2002) Utilization of torula yeast (*Candida utilis*) as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*, Peters) fry. *Aquaculture Nutrition* 8:257-264
- Ordaz L, López R, Melchy O, de la Torre M (2001) effect of high-cell-density fermentation of *Candida utilis* on Kinetic parameters and the shift to respiro-fermentative metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:374-378
- Pádua DMC, Carneiro DJ, Urbinati EC, Pádua JT, (1996) Avaliação preliminar da Proteína de Levedura Seca de Alcool (*Saccharomyces cerevisiae*) para Ração de Peixes de Água Doce. *Anais da XXXIII Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 4:255 - 257
- Pessoa Jr. A, Machila IM, Sat S (1996) Cultivation of *Candida utilis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. *Journal of biotechnology* 51:83-88
- Pirt SJ (1975) Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Rajoka MI, Kiani MAT, Khan S, Awan MS, Hashimi A (2004) Production of single cell protein from rice polishings using *Candida utilis*. *World Journal of microbiology & Biotechnology* 20:297-301
- Rattanakit N, Plikomol A, Yano S, Wakayama M, Tachiki T (2002) Utilization of shrimp shellfish as a substrate for solid-state cultivation of *Aspergillus* sp. S1-13: evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93:550-556
- Roy A, Bhattachryya S, Sengupta S, Ghosh AK (2001) Acid trehalase deficiency and extracellular trehalose utilization in *Candida utilis*. *W. Jour. of Microbiol. & Biotech.* 17:727-729
- Silva CP (2004) Componentes e Qualidade Nutricional do Hidrolisado de Cabeça de Camarão. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Nutrição/UFPE
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Edition. ISBN: 0879693096
- Suntornsuk W (2000) Yeast cultivation in lettuce brine. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16:815–818
- Verduyn C (1991) Physiology of yeast in relation to growth yields. *Antonie van Leeuwenhoek* 60:325-353
- Villas-Bôas SG, Espósito E, Mendonça MM (2002) Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid-substrate cultivation on apple pomace. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18:541–545

6. CONCLUSÕES

Os resultados da presente pesquisa indicam que o hidrolisado obtido a partir da autólise do resíduo do processamento de camarão *Litopenaeus vannamei*, quando suplementado com glicose possibilita a produção de biomassa de levedura, obtendo resultados de crescimento equivalentes ao obtido em meio YPD.

Candida utilis é uma levedura indicada para produção de biomassa neste meio. A significativa participação do hidrolisado no produto final proporciona um “flavor” característico de camarão à biomassa contribuindo também para sua composição nutricional.

7. PERSPECTIVAS

As informações aqui obtidas darão suporte para futuras pesquisas que objetivem a utilização do resíduo sólido do processamento industrial do camarão e também que otimizem a obtenção da biomassa aqui estudada, possibilitando o escalonamento de sua produção, com a devida análise econômica que viabilize a inclusão deste produto na dieta animal e/ou humano.

8. ANEXOS

Os resultados da presente pesquisa produziram publicações em congressos, relacionados à biotecnologia e aquicultura.

- XXXIII Reunião Anual da SBBq, 2004. Caxambu, MG.

SCP Production by Shrimp Waste Hydrolysate as Substrate for Yeast Growth

Gomes, E.P.¹; Bezerra, R.S.^{1,2}; Souza, P.R.E.¹; Martins, D.B.G.¹; Lima Filho, J.L.^{1,2}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE; ²Departamento de Bioquímica - UFPE - Recife - PE.
e-mail: epgostras@hotmail.com

ABSTRACT

The shrimp industry produces about 30 to 40% of waste (head, tail and shell). In order to reduce the cost of this discards and to improve the value-added product, batch fermentation on a shrimp waste was performed to SPC production. The strains *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, *Saccharomyces cerevisiae* (Itaquatara) and *Torula utilis* were grown in alternative substrate for biomass production. The medium was obtained from the shrimp waste, after hydrolyses, centrifugation and the filtrations steps. The cells were pre-grown on YPD medium during 12 hours at 30° C using a rotatory shaker at 150 rpm. The initial concentration of 0.02 g.l⁻¹ biomass was inoculated in this substrate at the same conditions mentioned above, during 92 hours. Several samples were harvested for analytical determinations. The biomass concentration was measured by absorbance (A 600nm) and dry weight was obtained using a linear regression. The reducing sugar concentration was determined using DNSA method. *T. utilis* showed the highest biomass production (3.52 g.l⁻¹) after 96 hours of incubation followed by *S. cerevisiae* (2.83 g.l⁻¹). Both species consumed around 48% of the initial sugar concentration (around 3.5 g.l⁻¹) within this period. *K. marxianus* ATCC36907 did not show satisfactory growth, despite of the consumption of 37% total reducing sugar. The highest growth rate and yield of biomass on sugar consumption was obtained for the *T. utilis*, $\mu = 0.27\text{ h}^{-1}$ and $Y_{x/s}=2.13$, respectively. These data show that *T. utilis* is appropriated yeast for biomass production on shrimp waste medium, and further studies could allow the utilization of this specie for animal feedstock.

INTRODUCTION

The Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) report that in 2002 the shrimp farm production in Brazil was 60.000 ton, a increment of 50% in relation to 2001. The shrimp industry produces about 30 to 40% of waste (head, tail and shell) a appreciable potential for pollution and do pose a disposal problem. Efforts for developing techniques for the recovery and utilization of the discards are necessary. This discard has a high protein and chitin content and can be hydrolyzed by acid hydrolysis (FERRER et al. 1996) or by a commercially available protease (alkalase) and recovered fractions as a protein hydrolysate, chitin and carotenoids (GILBERG & STENBERG, 2001). The conversion of the waste matter into yeast biomass (SCP) is useful because of the high nutritional quality of the yeasts, and this would give possible uses in aquaculture or animal feed formulations. The advantages of microbial protein are high productivity, a high proportion of cell mass as protein and a good profile of desirable amino acids (RHISHIPAL & PHILIP, 1998). In order to reduce the cost of shrimp waste discards and to improve the value-added product, the present work tested the yeasts growth on Protein Hydrolysate medium provided of shrimp waste enzymatic autolysis.

MATERIALS AND METHODS

Shrimp Waste Hydrolysate Obtention - shrimp waste was provided by Netuno A/S. the waste was packed in plastic bags and stored at - 20° C before use. The shrimp waste was mixed with distilled water at proportion 1:1 and triturated in a industrial blender. The hydrolysis (autolysis) process was carried out for 3h at 40° C and constant agitation. After this, the enzyme was inactivated by heating (90° C, 10 min). Slitting manual process separated solid tissues and crude hydrolysate. The crude hydrolysate was centrifuged (40 min, 10.000 x g). The Protein Hydrolysate (supernatant) obtained was autoclaved for 15 min at 121° C.

Microorganisms Acquirement - The yeasts were obtained from the culture collection of Biotechnology lab (LIKA), maintained on a solid YPD plate. The strains *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, *Saccharomyces cerevisiae* Itaquatara and *Torula utilis* were used in this study.

Batch Fermentation - The batch fermentation was conducted as follows: 100ml of Protein Hydrolysate were dispensed into 500 ml Erlenmeyer flasks. Each flask was inoculated with a 12-h-old culture previously grown on YPD medium during 12 hours at 30° C using a rotatory shaker at 150 rpm. The initial concentration of 0.02 g.l⁻¹ biomass was inoculated in this substrate at the same conditions mentioned above. During 92 hours several samples were harvested for analytical determinations.

Analytical Methods - The biomass concentration was determined by using a calibration curve to correlate optical density (O.D.) with dry weight (g.l⁻¹) using a linear regression. The total reducing sugars (TRS) were determined as glucose using DNSA method.

Cultivation kinetic Parameters - Maximum specific growth rate (μ_{max}) was determined from the growth curve in the exponential phase. The Yield ($Y_{x/s}$) was calculated as grams of dry cell produced per gram of reducing sugars used.

RESULTS AND DISCUSSION

T. utilis showed the highest biomass production (3.52 g.l⁻¹) after 96 hours of incubation followed by *S. cerevisiae* (2.83 g.l⁻¹) (Fig. 1). Both species consumed around 48% of the initial sugar concentration (around 3.5 g.l⁻¹) within this period. *K. marxianus* ATCC36907 did not show satisfactory growth, despite of the consumption of 37% total reducing sugar. The highest growth rate and yield of biomass on sugar consumption was obtained for the *T. utilis*, $\mu = 0.27\text{ h}^{-1}$ and $Y_{x/s}=2.13$, respectively, table 1.

PESSOA (1996) obtained with *Candida tropicalis* on sugar cane hemicellulosic hydrolyzate adding urea and P₂O₅ a maximum specific growth rate (μ_{max}) of 0.137 h⁻¹; yield 0.31 g.g⁻¹ and productivity of 0.202 g.l⁻¹ per h, while LEE (2001) testing *Candida utilis* in batch fermentation on sugar molasses at various concentrations of urea and phosphoric acid obtained the highest biomass yield (0.67g.g⁻¹), with 0.24 g.l⁻¹.h⁻¹ of biomass productivity. FERRER, 1996 used chitin acid hydrolyzed as a carbon and energy source for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* with batch conditions, obtained a yield (0.58 kg.kg⁻¹) and a highest specific grow rate (0.23.h⁻¹).

The data from this current study demonstrated that Protein Hydrolysate medium provided of shrimp waste enzymatic autolysis could serve as a substrate for yeast growth and that *T. utilis* is appropriated yeast for biomass production on this medium. Further studies could allow the utilization of this species for animal feedstock.

Time (h)	<i>K. marxianus</i> (g.l ⁻¹)	<i>S. cerevisiae</i> (g.l ⁻¹)	<i>T. utilis</i> (g.l ⁻¹)
0	0.0	0.0	0.0
12	0.1	0.2	0.3
24	0.2	0.5	0.8
36	0.3	1.0	1.5
48	0.4	1.5	2.2
60	0.5	2.0	3.0
72	0.6	2.5	3.5
84	0.7	2.8	3.8
96	0.8	2.8	3.5

Fig 1. Batch fermentation, strains *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Torula utilis* a 30° C e 150 rpm.

Microorganisms	$\mu\text{ (h}^{-1}\text{)}$	$Y_{x/s}$
<i>K. Marxianus</i>	0,14	0,26
<i>S. Cerevisiae</i>	0,09	1,72
<i>T. utilis</i>	0,27	2,13

Tabel 1. Maximum specific growth rate and Yield for strains *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Torula utilis* a 30° C e 150 rpm.

References

ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão: www.abcc.org.br.
FERRER, J. PAEZ, G. MARCOL, Z. RAMONES, E. GARCIA, H. FORSTER C. F. 1996. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Bioresource Technology*, v. 57, p.55 – 60.
GILBERG A. STENBERG, E. 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, v.36, p.809-812.
LEE, B. KIM, J. K. 2001. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*, V. 25 p. 111-124.
PESSOA JR., A. MANCINIHA, I.M. SATO, S.1996. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. *Journal of Biotechnology*, V. 51, p. 83-88.
RHISHIPAL, R. PHILIP, R. 199. Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. *Bioresource technology* V. 65, P. 255-256.

Supported by: UFPE, FINEP, CAPES, CNPq, P & T Ltda.

- XIII Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 2004. Fortaleza, Ceará.

Crescimento de Levedura em Hidrolisado de Resíduo de Camarão para Produção de Biomassa Microbiana

Gomes, E.P.¹; Brassard, M. C.²; Lapoint, J.²; Bezerra, R.S.^{1,3}; Martins, D.B.G.¹; Lima Filho, J.L.^{1,3}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – UFPE- PE - Brasil; ² Institut de Technologie Agroalimentaire – St-Hyacinthe – Québec – Canadá; ³ Departamento de Bioquímica - UFPE - Recife – PE - Brasil.

e-mail: epgostras@hotmail.com

ABSTRACT

The shrimp industry produces about 30 to 40% of waste (head, tail and shell). In order to reduce the cost of this discards and to improve the value-added product, batch fermentation on a shrimp waste Hydrolysed was performed to SFC production. The yeast *C. utilis* was grown at different conditions (pH, temperature and glucose concentration) following a factorial assay. No significant difference was observed, the means values in 12 h-old were 6.61 g.l⁻¹, 0.25 h⁻¹ and 0.55 g.l⁻¹h⁻¹ for X_{max} , μ_{max} and Q_{max} respectively. Therefore the sugar addition improve the grown against the no supplemented medium. The yield 0.37g.l⁻¹ e 0.28g.l⁻¹ for supplemented HRC with glucose 1% e 2% respectively, show that other nutritional factors inhibited the grown. The full glucose (1% and 2%) consumption was at 12h-old but occurring cell grown after this showing the consumption or cell production of other carbon source. These data show that *C. utilis* is appropriated yeast for biomass production on shrimp waste medium, and further studies could allow the utilization of this specie for animal feedstock.

INTRODUÇÃO

A Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) reporta que em 2003 a carcinicultura brasileira produziu 90.000 ton, um incremento de 50% em relação a 2002. As indústrias de processamento de camarão produzem cerca de 30 a 40% de resíduos sólidos um poluente potencial. Desta forma estudos têm sido realizados no sentido de recuperar e agregar valor a esse descarte. Seu alto conteúdo de proteína, quitina e carotenoides podem ser fracionados através de processos que envolvem hidrólises, ácida (FERRER *et al.* 1998) ou por uma protease comercial (alcalase) (GILBERG & STENBERG, 2001). Por outro lado, a conversão de resíduos agroindustriais em biomassa vem sendo desenvolvida devido a alta qualidade nutricional de leveduras, além de sua alta produtividade, e alta proporção de proteína com um bom perfil de aminoácidos, podendo assim ser utilizada em aquicultura ou em formulação de ração animal (RHISHIPAL & PHILIP, 1998). Com o objetivo de reduzir os custos financeiros e ambientais do descarte dos resíduos sólidos da indústria camaroneira ao mesmo tempo gerar um produto com valor agregado, o presente trabalho testou o crescimento de levedura em meio de hidrolisado proteico provido da autólise enzimática do resíduo de camarão.

MATERIAIS E METODOS

Microorganismo - foi utilizada uma cepa de *Torula utilis* obtida a partir da coleção da Micoteca do Departamento de Micologia da UFPE.

Obtenção do hidrolisado a partir do resíduo de Camarão - o resíduo de camarão foi obtido da Netuno A/S. A uma proporção de 1:1 com água destilada o resíduo foi triturado em um liquidificador industrial. O processo de hidrólise (autólise) ocorreu por 3h a 40° C e agitação constante de 400 rpm. Seguiu-se a inativação enzimática por aquecimento (90° C, 10 min). Através de peneiras foi separada a parte sólida (porção rica em quitina) e o hidrolisado líquido. O hidrolisado líquido foi centrifugado (40 min, 10.000 x g) precipitando a porção de carotenoides. O hidrolisado proteico (sobrenadante) obtido foi autoclavado por 15 min a 121°C.

Planejamento Fatorial - Um planejamento fatorial foi desenvolvido para avaliação da produção de biomassa em hidrolisado de resíduo de camarão (HRC) diante da variação de pH (6,0 e 7,5), da concentração de glicose (1% e 2%) e da temperatura (30°C e 35°C).

Condições de cultivo - Para o cultivo foi utilizada cultura previamente crescida em meio YPD por 12 horas a 30° C e 150 rpm. Uma concentração inicial de biomassa (0,02 g.l⁻¹) foi inoculada em erlenmeyer (500 ml) contendo 50 ml de hidrolisado proteico obedecendo as condições do planejamento fatorial sob agitação de 150 rpm. Durante 36 horas amostras foram retiradas para determinações analíticas.

Métodos analíticos - A concentração de biomassa foi determinada pela correlação entre número de células e o peso seco (g.l⁻¹) usando uma regressão linear. O açúcar redutor total foi determinado pelo método do DNSA. A glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico (GOD/POD).

Parâmetros Cinéticos de Cultivo - A taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}) foi determinada pela fase exponencial da curva de crescimento. O rendimento ($Y_{p/x}$) foi calculado como gramas de células secas produzidas por gramas de açúcar redutor consumido. A Produção de biomassa ($X_{p/x}$) como gramas de células secas produzidas por litro de meio utilizado e a produtividade ($Q_{p/x}$) como biomassa produzida por litro de meio por hora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de uma seleção entre quatro diferentes espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*; *Kluyveromyces marxianus*; *Candida utilis* e *Rhodotorula glutinis*), Gomes *et al.* (2004) identificou a *C. utilis* como o microorganismo mais adequado para crescimento e produção de biomassa em HRC. Esta levedura foi utilizada no presente trabalho para avaliação, através de um planejamento fatorial, do efeito da variação de temperatura, pH, e concentração de glicose na produção de biomassa (Tabela 1). Os resultados do planejamento fatorial demonstram que não houve diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 1), com valores médios em 12 horas de cultivo de 6,61 g.l⁻¹, 0,25 h⁻¹ e 0,55 g.l⁻¹h⁻¹ para produção de biomassa, taxa de crescimento específico máximo e produtividade respectivamente. Quando comparado ao HRC não suplementado, a adição de glicose acarretou em um aumento na produção de biomassa. No entanto dados de rendimento 0,37g.l⁻¹ e 0,28g.l⁻¹ para HRC suplementado com 1% e 2% de glicose respectivamente, indicam que outro fator nutricional (por excesso ou carência) pode estar limitando a otimização do crescimento do microorganismo. O consumo total do referido suplemento (1% e 2%) deu-se nas primeiras 12 horas de cultivo, porém observa-se a constância de elementos redutores (a 4,0 g.l⁻¹) nos tempos subsequentes em detrimento da produção de biomassa em todos os tratamentos, o que sugere o consumo de outra fonte de carbono, já presente no meio, ou produzida pelo microorganismo. PESSOA (1996) obteve com *Candida tropicalis*, cultivada em hidrolisado de hemicelulose de cana-de-açúcar (suplementado com ureia e P₂O₅) uma taxa de crescimento específico máximo de 0,137 h⁻¹; rendimento (0,31 g.p.g⁻¹) e produtividade de 0,20 g.l⁻¹h⁻¹; enquanto LEE (2001) testando *Candida utilis* em melão, com diferentes concentrações de ureia e ácido fóscico, obteve um rendimento de 0,67g.g⁻¹, com 0,24 g.l⁻¹h⁻¹ de produtividade. FERRER (1998), usando a glicosama obtida da hidrólise ácida da quitina como fonte de carbono e energia, obteve com *Saccharomyces cerevisiae* um rendimento de 0,58 kg.kg⁻¹ e uma taxa de crescimento específico máximo de 0,23.h⁻¹. Os dados do presente estudo reiteram o potencial de utilização da *C. utilis* para produção de biomassa, utilizando hidrolisado proteico de resíduo de camarão. Futuros estudos poderão indicar uma complementar suplementação deste resíduo para a obtenção de biomassa viável para aplicação em alimentação na aquicultura ou formulação de ração animal.

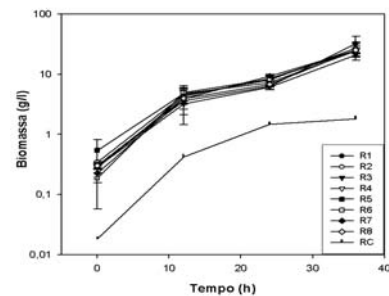


Fig. 1 - Resposta de crescimento da *C. utilis* em hidrolisado de resíduo de camarão à variação de temperatura, pH, e concentração de glicose (R1 – R8) comparado ao crescimento em resíduo não suplementado (RC).

Treatamento	pH	Temperatura (°C)	Glicose (%)
R1	6,0	30	1
R2	7,5	30	1
R3	6,0	35	1
R4	7,5	35	1
R5	6,0	30	2
R6	7,5	30	2
R7	6,0	35	2
R8	7,5	35	2

Tabela 1 - Planejamento fatorial utilizado no crescimento da *C. utilis* em hidrolisado de resíduo de camarão para avaliação da variação de temperatura, pH, e concentração de glicose

References

- ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão: www.abcc.org.br
- FERRER, J. PAEZ, G. WARGOL, Z. RAMONES, E. GARCIA, H. FORSTER C. F. 1998. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Bioresource Technology*, v. 57, p.55 – 60.
- GILBERG A. STENBERG, E. 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, v.36, p.89-92.
- GOMES, E. P., BEZERRA, R. S., SOUZA, P. R. E., MARTINS, D. B. G., LIMA FILHO, J. L. SFC Production by Shrimp Waste Hydrolysate as Substrate for Yeast Growth. XXXII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ, 2004.
- LEE, B., KIM, J. K. 2001. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*, V. 25, p. 111-124.
- PESSOA JR., A., MANCINHA, I. M., SATO, S. 1996. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemi-cellulosic hydrolysate for microbial protein production. *Journal of Biotechnology*, V. 51, p. 83-88.
- RHISHIPAL, R., PHILIP, R. 199. Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from green-shell waste. *Bioresource technology* V. 65, P. 255-256.

Supported by: UFPE, FINEP, CAPES, CNPq, P. & T Ltda. **Simbraq 2004**

- VII Reunião Regional da SBBQ, 2004, Recife, PE.

OPTIMIZATION OF SHRIMP WASTE HYDROLYSED
FOR *Candida utilis* YEAST GROWTH MEDIUMGomes, E.P.¹; Bezerra, R.S.^{1,2}; Martins, D.B.G.¹; Lima Filho, J.L.^{1,2}¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE- PE - Brasil; ² Departamento de Bioquímica - UFPE - Recife - PE

e-mail: epgostas@hotmail.com

ABSTRACT

Yeasts are a rich source of proteins and B-complex vitamins. They have been used as a supplement to compensate the amino acid and vitamin deficiencies of cereals, and are recommended as a substitute for soybean oil in animal feed. In addition, they are considered a cheap dietary supplement as they are easily produced on an industrial level from a number of carbon-rich substrate by-products such as citrus pulp, molasses, paper industry wastes and fruit pomace. The shrimp waste hydrolysed obtained by chitin recovery process is a protein and mineral rich by-product that can be used as growth medium for *Candida utilis*. This work evaluated the effect of temperature (30 and 35°C), pH (6.0 and 7.5) and glucose concentration (supplementation with 1 or 2%) on SWH for biomass production, correlated 30°C and 2% glucose as the better growth conditions for this yeast. Under these conditions, mean values at 12-hour culture were obtained as follows: 27.03 g/l; 0.68 g/g; 0.27 h⁻¹ for biomass production, yield and specific growth rate respectively. When this by-product was diluted 1:1 with distilled water grown at 30°C, pH 6.0 and supplemented with 2% glucose, the growth curve was quite similar to that obtained in YPD (rich media). The yield at 12h-culture was 1.676g/g¹, 24.43 g/l¹ biomass production and 0.31h⁻¹ specific growth rate. These results suggest that shrimp waste hydrolysed supplemented with carbon source can be used as rich medium for *Candida utilis* growth for Single Cell Protein Production.

INTRODUÇÃO

A Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) reporta que em 2003 a carcinicultura brasileira produziu 50.000 ton, um incremento de 50% em relação a 2002. As indústrias de processamento de camarão produzem cerca de 30 a 40% de resíduos sólidos que representam um poluente em potencial. Desta forma estudos têm sido realizados no sentido de recuperar e agregar valor a esse descarte. Seu alto conteúdo de proteína, quitina e carotenoides podem ser fracionados através de processos que envolvem hidrólises, ácidos (FERRER *et al.* 1996) ou por uma protease comercial (alcatalase) (GILBERG & STENBERG, 2001). Por outro lado, a conversão de resíduos agroindustriais em biomassa vem sendo desenvolvida devido a alta qualidade nutricional de leveduras, além de sua alta produtividade, e alta proporção de proteína com um bom perfil de aminoácidos, podendo assim ser utilizada em aquicultura ou em formulação de ração animal (RISHIPAL & PHILIP, 1998). A partir de uma seleção entre quatro espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*; *Kluyveromyces marxianus*; *Candida utilis* e *Rhodotorula glutinis*), GOMES *et al.* (2004) foi selecionada a levedura *C. utilis*, devido ao seu melhor crescimento em hidrolisado de resíduo de camarão HRC não suplementado. Assim a presente pesquisa teve o objetivo de otimizar a produção de biomassa (*Candida utilis*), em meio de HRC provido da autólise enzimática do resíduo de camarão, a partir da resposta do microorganismo à variação dos parâmetros de cultivo.

MATERIAIS E METODOS

Microorganismo - foi utilizada uma cepa de *Candida utilis* obtida a partir da coleção da Micoteca do Departamento de Micrologia da UFPE.

Obtenção do hidrolisado a partir do resíduo de Camarão HRC - Cabeças de camarão *Leopoldus vannamei* foi obtido de Netuno S/S. A uma proporção de 1:1 com água destilada o resíduo foi triturado em um liquidificador industrial. O processo de hidrólise (autólise) ocorreu por 3h a 40°C e agitação constante de 400 rpm. Seguiu-se a inativação enzimática por aquecimento (90°C, 10 min). Através de peneiras foi separada a parte sólida (porção rica em quitina) e o hidrolisado bruto. O hidrolisado bruto foi centrifugado (40 min, 10.000 x g) precipitando a porção de carotenoides. O hidrolisado protéico (sobrenadante) obtido foi autoclavado por 15 min a 121°C.

Cultivo em frasco aerado - Um planejamento fatorial foi desenvolvido para avaliação da produção de biomassa em hidrolisado de resíduo de camarão (HRC) diante da variação de pH (6.0 e 7.5), da concentração de glicose (1% e 2%) e da temperatura (30°C e 35°C). O ensaio foi realizado com amostras retiradas durante 36 horas de cultivo. Para o inóculo foi utilizada cultura previamente crescida em meio YPD por 12 horas a 30°C e 150 rpm. Uma concentração inicial de biomassa (0.02 g/l) foi inoculada em Erlenmeyer's (500 ml) contendo 50 ml de HRC obedecendo as condições do planejamento fatorial, sob agitação em "shaker" a 150 rpm. Durante 36 horas amostras foram retiradas para determinações analíticas.

Cultivo em biorreator - A produção de biomassa também foi avaliada em fermentador (Bioflo 2000, New Brunswick) com volume de trabalho de 1l, sob agitação constante de 150rpm, a uma temperatura constante de 30°C e taxa de aeração constante de 1 vvm. Para o controle de espuma utilizou-se 100ml de antifoam. Células de *C. utilis* foram pré-cultivadas em meio 50ml de YPD durante 10 h e posteriormente inoculadas em biorreator contendo 950ml de HRC diluído 1:1 com água destilada e 2% de concentração de glicose. Como controle um crescimento sob as mesmas condições em meio YPD foi realizado.

Métodos analíticos - A concentração de biomassa foi determinada pela correlação entre número de células e o peso seco (g/l) usando uma regressão linear. O açúcar redutor total foi determinado pelo método do DNSA. A glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico (GOD-POD).

Parâmetros Cinéticos de Cultivo - A taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}) foi determinada pela fase exponencial da curva de crescimento. O rendimento (Y_p) foi calculado como gramas de células secas produzidas por gramas de açúcar redutor consumido. A produção de biomassa (X) como gramas de células secas produzidas por litro de meio utilizado e a produtividade (P) como grama de biomassa produzida por litro de meio por hora de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento da *C. utilis* sob diferentes condições de pH inicial, temperatura e concentração de glicose, dentro de um planejamento fatorial demonstrou que 30°C e 2% de glicose são os principais parâmetros que determinam uma melhor resposta de crescimento. Nestas condições, os valores medidos em 12 horas de cultivo foram os seguintes: 27.03 g/l; 0.68 g/g; 0.27 h⁻¹ para concentração de biomassa, rendimento e taxa de crescimento específico, respectivamente (Fig. 1). Para o lote de concentração de biomassa foi obtido em 12h de cultura 24.43 g/l; 1.67 g/g; 0.31h⁻¹ para concentração de biomassa, rendimento e taxa de crescimento específico, sua taxa de crescimento específico máxima ocorreu em 5 horas de cultivo (0.44 h⁻¹). Esta curva de crescimento apresentou-se similar à obtida em meio YPD, nas mesmas condições de cultivo (Fig. 2). FERRER, 1996 usando glicosamina proveniente da hidrólise ácida da quitina como única fonte de carbono e energia para cultivo em batelada de *Saccharomyces cerevisiae* obteve um rendimento de 0.58 g/g; taxa de crescimento específico de 0.23h⁻¹ e concentração de biomassa em 12h de 2.72g/l. PESSOA (1996) cultivando *Candida tropicalis* em hidrolisado de hemicelulose de cana-de-açúcar (rico em xilose) adicionando ureia e P_2O_5 obteve uma taxa máxima de crescimento específico de 0.14h⁻¹ e rendimento de 0.21 g/g. Utilizando glicose (5g/l), ureia (0.2 g/l) e ácido fosfórico (10 ml/l), LEE & KIM(2001) obtiveram em batelada com *C. utilis* uma concentração de biomassa de 2.68 g/l, e um rendimento de 0.67g/g. WEI *et al.*, (2003) verificaram a influência da temperatura no cultivo de *C. utilis*, obtendo melhores resultados a 30°C. No presente pesquisa o consumo total da glicose suplementada deu-se em 12 horas de cultivo, para todos os tratamentos, sendo correlacionado ao início da fase estacionária. Para o cultivo em YPD a fase de declínio iniciou-se após 24 horas. No entanto foi observado de presença de outros açúcares redutores no HRC após as 12 horas de cultura. Em HRC diluído 1:1 este fato contribuiu para extensão da fase estacionária até 36h de cultivo. Enquanto que em HRC não diluído uma pequena resposta de crescimento ocorreu após 24 horas de cultivo. Neste caso pode ter ocorrido um ajuste metabólico para o consumo de outro açúcar ainda presente no meio. PESSOA (1996) também observou um rápido consumo de glicose (cerca de 5 horas após inóculo), seguido pelo consumo de xilose e ácido acético. Os resultados deste estudo comprovaram o potencial do HRC como um meio para produção de biomassa quando suplementado com uma fonte de carbono. Neste meio *C. utilis* foi confirmada como apropriada para produção de biomassa, e que a temperatura de 30°C e a adição de 2% de concentração de glicose mostram melhores resposta de crescimento. Futuros estudos são necessários para determinar a viabilidade desta de biomassa para aplicação em alimentação na aquicultura ou formulação de ração animal.

SBBQ regional 2004

Supported by: UFPE, FINER, CAPES, CNPq, P & T Ltda.

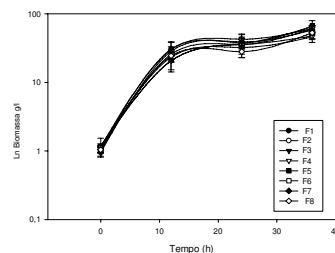


Fig. 1- Resposta de crescimento da *C. utilis* em hidrolisado de resíduo de camarão à variação de temperatura, pH, e concentração de glicose. (F1-30°C; 6.0; 1%) (F2-30°C; 7.5; 1%) (F3-35°C; 6.0; 1%) (F4-30°C; 7.5; 1%) (F5-30°C; 6.0; 2%) (F6-30°C; 7.5; 2%)

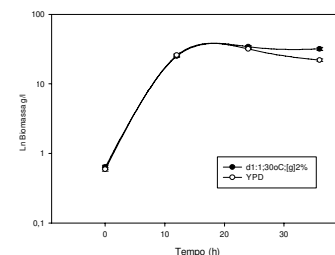


Fig. 2 Resposta de crescimento da *C. utilis* em: hidrolisado de resíduo de camarão (diluído 1:1; 30°C; 2% de concentração de glicose e em meio YPD (30°C - extrato de levedura 1%; peptona 2%; glicose 2%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão.
FERRER, J. PAEZ, CL. MARINOL, Z. RAMONIES, E. GARCIA, H. FORSTER, C. P. 1996. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single-cell protein from the hydrolysate. *Bioresour. Technology*, v. 57, p.55 - 60.
GILBERG A. STENBERG, E. 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, v.36, p.820-822.
GOMES, E. P. BEZERRA, R. S. SOUZA, P. R. MARTINS, D. B. G. LIMA FILHO, J. L. SCP Production by Shrimp Waste Hydrolysis as Substrate for Yeast Growth. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biociências e Biologia Molecular - SBBQ 2004.
LEE, B. KIM, J. Y. 2001. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*, V. 29 p. 111-124.
PESSOA JR., A. MANOJAN, I. M. SARTO, S. RIBE. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemiacetals hydrolysate for microbial protein production. *Journal of Biotechnology*, V. 51, P. 81-86.
RISHIPAL, R. PHILIP, R. 1998. Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. *Bioresour. Technology*, V. 65, P. 255-256.
WEI, DILL, Y. DU, D. CHEN, J. 2003. Application of two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*. *Biotechnology Letters*, v. 25, 887-890.

- SINAFERM, a ser realizado em 2005. Recife, Pernambuco.

Gomes, E.P. Bezerra, R.S. Martins, D.B.G. Lima Filho, J.L. **Resíduos da indústria camaroneira para Produção de *Candida utilis*** resumo aprovado na seleção do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos.

Envio de resumo de trabalho - Sinaferm 2005

Preencha as informações nos campos abaixo.

Ao final, salve o arquivo e envie-o como anexo de e-mail para resumosinaferm2005@factos.com.br

Autor(es): Eduardo P. Gomes; Ranielson S. Bezerra; Danyelly B.G. Martins ; José Luiz de Lima Filho.

Título do trabalho: Resíduos da indústria camaroneira para Produção de *Candida utilis*

Área Temática: Biotecnologia

Instituição: LIKA - UFPE

Autor para

correspondência: Eduardo P. Gomes

E-mail: epgostras@hotmail.com

Resumo: Considerando o atual momento da agroindústria brasileira, o aproveitamento dos resíduos gerados torna-se essencial, para o aumento de sua competitividade, além de diminuir o impacto ambiental proveniente de eventuais descartes. Sob este foco, o hidrolisado proveniente dos resíduos da indústria camaroneira (HRC) foi utilizado para crescimento da levedura *Candida utilis*. Parâmetros cinéticos de crescimento $\mu_{\max} = 0.34/h$; $Y_{x/s} = 0.96 \text{ g/g}$ e 8.75 g/l de biomassa produzida em 12h de cultivo, indicaram que: o HRC(1) diluído 1:1 e suplementado com 2% de glicose, foi mais eficiente que o HRC(2) não diluído e suplementado com 4% de glicose (2% inicial e 2% no final da fase exponencial). Quando comparado ao meio padrão YPD, o HRC(1) mostrou-se equivalente, sendo verificado desta forma seu potencial como fonte de proteína e minerais para produção de biomassa de *C. utilis*.