



UNIVERSIDADE
FEDERAL
DE PERNAMBUCO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GUSTAVO ALVES DO NASCIMENTO

**ANÁLISE DO POTENCIAL DA *Candida utilis* PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO**

RECIFE, 2008

GUSTAVO ALVES DO NASCIMENTO

**ANÁLISE DO POTENCIAL DA *Candida utilis* PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração – Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-orientadora:

Prof^a. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

RECIFE, 2008

Nascimento, Gustavo Alves do

Análise do potencial da *Candida utilis* para a produção de biomassa utilizando resíduos agroindustriais como substrato/ . – Recife: O Autor, 2008.

52 folhas : il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. Biotecnologia 2. Biomassa 3. *Saccharomyces cerevisiae* I. Lima Filho, José Luiz de II. Martins, Danyelly Bruneska Gondim III. Título.**

660.6 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-090

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. José Arlindo Pereira
Titular (externo)

Prof. Dr. José Bezerra de Carvalho Júnior
Suplente (interno)

Prof^a. Dr^a. Neide Kazue Sakugawa Shinohara
Suplente (externo)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nivaldo e Eunice, pelo carinho e dedicação nos ensinamentos transmitidos.

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho pela orientação, amizade conquistada, paciência, determinação e competência nos ensinamentos passados durante esse processo de titulação;

À Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins pela amizade conquistada, orientação e dedicação a pesquisa, contribuindo para o desenvolvimento desse projeto;

Ao programa de pós-graduação do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco por apresentarem professores e funcionários dedicados, e capacitados na formação de Mestres e Doutores;

Ao LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami) por ter permitido toda infra-estrutura para a realização dessa pesquisa na obtenção do título de mestre;

Ao CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste) pelo suporte para a realização desse trabalho e apoio financeiro por meio de bolsa de pesquisa;

À empresa Netuno por ter gentilmente cedido o resíduo da carcinicultura para o desenvolvimento desse projeto;

Ao Engenho Sítio do Meio por ter cedido o melaço, subproduto da cultura sucroalcooleira, para a realização dos experimentos que deu como fruto esse trabalho;

Ao LEAAL (Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos *Nonete Barbosa Guerra*) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco por promover a realização das análises físico-químicas;

À Prof^a. Dr^a. Alexandra Amorim Salgueiro por ter me inserido primeiramente na pesquisa científica e por ter intermediado esse contato com o meu orientador Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho;

A todos os funcionários do LIKA, em destaque aos técnicos Otaviano e Rafael pela atenção e devotamento ao trabalho voltado a pesquisa científica;

Aos amigos do LIKA, alunos, professores e pesquisadores que contribuíram para esse resultado durante todo o desenvolvimento do projeto;

Aos amigos do CETENE, professores, pesquisadores e funcionários, pelo apoio na realização desse trabalho e amizades conquistadas;

Aos amigos da graduação em Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco pelo companheirismo e apoio nesse processo de qualificação;

À todos os meus familiares pela ajuda, direta e indireta, nesse processo de qualificação profissional;

Também em especial a minha noiva Danielle C. Cavalcanti, pela atenção, carinho, ajuda e incentivo no qual possibilitou minha dedicação na conquista desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A Cultura Sucroalcooleira no Brasil	13
1.1.1. Os resíduos da Indústria da Cana-de-açúcar	15
1.2. Carcinicultura e seus aspectos socioeconômicos	16
1.2.1. Resíduos da Indústria do camarão e suas aplicabilidades	18
1.3. Leveduras como fonte alimentar	20
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
4. ARTIGO CIENTÍFICO	30
ANEXO 1	51
ANEXO 2	52

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 – Evolução das exportações brasileiras de açúcar e álcool. Os dados de açúcar (mil ton) e álcool (mil m³) foram demonstrados no decorrer dos anos da produção brasileira..... 14

Artigo Científico

Figura 1 – Avaliação das proteínas hidrolisadas do resíduo de camarão durante 5 horas de processamento. A hidrólise das proteínas totais foi avaliada a partir das diluições investigadas em biorreator com agitação de 400 rpm a temperatura constante de 40 °C..... 37

Figura 2 – Efeito das condições de trabalho investigadas na produção de biomassa. As leveduras *C. utilis* (A) e *S. cerevisiae* (B) foram crescidas em cultivo submerso contendo resíduo de camarão processado. Os parâmetros diluição (1:2 e 1:4) e tempo de tratamento (3 h e 5 h), usados no processo de hidrólise do resíduo de camarão, foram às referências para investigação do crescimento das leveduras..... 39

Figura 3 – Curva de crescimento da *C. utilis* (A) em cultivo submerso contendo melaço nas concentrações 1%, 2%, 4%, 6%, 8% e 10% (p/v), e consumo dos açúcares (B) presentes no melaço durante 48 h de cultivo..... 41

Figura 4 – Efeito da concentração de melaço na produção de biomassa pela *C. utilis* em fermentação submersa durante 48 h de cultivo. O parâmetro cinético da taxa de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) foi avaliado a partir da correlação significativa do teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 42

Figura 5 – Cultivo da *C. utilis* em biorreator com volume de trabalho de 1 L (círculos) e 4 L (triângulos). Os valores das médias de crescimento da levedura (símbolos em preto) e do consumo de açúcares redutores (símbolos em branco) durante 48 horas de fermentação foram calculados com base nos experimentos realizados em triplicatas..... 44

ANEXO 1

FIGURA 1 – *Candida utilis* repicada em meio sólido constituído de resíduo de camarão hidrolisado..... 51

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1 – Produção sucroalcooleira no Brasil por ano safra.....	14
Tabela 2 – Evolução da produção Brasileira de bagaço e melaço.....	16
Tabela 3 – Composição dos aminoácidos presentes no resíduo de camarão hidrolisado.....	19
Tabela 4 – Composição dos sais minerais presentes em resíduo de camarão.....	20
Tabela 5 – Perfil dos Aminoácidos do concentrado protéico a partir da fermentação do resíduo de arroz com a <i>C. utilis</i>	22

Artigo Científico

Tabela 1 – Condições de trabalho investigadas para a seleção das linhagens em cultivo submerso contendo meio de resíduo de camarão hidrolisado.....	35
Tabela 2 – Análise comparativa dos resultados do crescimento da <i>Candida utilis</i> nos volumes de trabalho investigados.....	44
Tabela 3 – Composição nutricional da <i>C. utilis</i> seca fermentada em meio contendo resíduo de camarão hidrolisado e melaço.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC	–	Associação Brasileira de Criadores de Camarão;
DNSA	–	Ácido dinitrosalicílico
FAO	–	Food and Agriculture Organization of the United Nations;
FDA	–	Food and Drug Administration;
FENACAM	–	Feira Nacional do Camarão;
GRAS	–	Generally Regard As Safe;
IBGE	–	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
MAPA	–	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
MME	–	Ministério de Minas e Energia;
Q_x	–	Produtividade da biomassa;
SCP	–	<i>Single cell protein</i> ;
SECEX	–	Secretaria Especial de Comércio Exterior;
X	–	Biomassa;
YPD	–	Meio de cultura (1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose);
$Y_{x/s}$	–	Taxa de conversão de substrato em biomassa (rendimento);
$\mu_{\max}$	–	Taxa de crescimento máximo.

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae e *Candida utilis* apresentam interesse biotecnológico para produção de biomassa e outros bioingredientes em substratos alternativos. O objetivo deste trabalho foi a produção de biomassa, por cultivo submerso utilizando como substrato resíduos da carcinicultura e das indústrias sucroalcooleira. O resíduo de camarão foi tratado com diferentes taxas de diluição a 40 °C, e analisada ao longo de 5 horas em intervalos de 1 hora, atingindo os melhores resultados de hidrólise protéica na diluição 1:4. O cultivo das leveduras nesse resíduo mostrou que apenas a *C. utilis* se adaptou ao substrato, atingindo uma taxa de crescimento máximo ($\mu_{\max}$) 0,10 h⁻¹ no cultivo submerso em frasco Erlenmeyer sob agitação de 150 rpm, a 30 °C durante 48 horas. A *C. utilis* foi cultivada em melaço *in natura* nas concentrações 1%, 2%, 4%, 6%, 8% e 10% (p/v) como fonte alternativa de carbono, obtendo os melhores resultados na condição de 2%. Os experimentos de cultivo em batelada com um volume de trabalho de 1 L e 4 L foram conduzidos em biorreator (BioFlo2000, New Brunswick Scientific) a 30 °C, taxa de aeração 1 vvm e velocidade de agitação 150 rpm utilizando o resíduo de camarão hidrolisado na diluição de 1:4 durante 3 horas com inclusão de 2% (p/v) de melaço. A *C. utilis* mostrou a maior produção de biomassa (9.90 g/L) em 48 h de cultivo, consumindo cerca de 75% da concentração inicial dos açúcares redutores presentes no meio. Valores de $\mu_{\max}$, rendimento da biomassa ($Y_{x/s}$) e produtividade (Q_x) foram 0,20 h⁻¹, 0,8 g/g e 0,53 g/L h, respectivamente. A biomassa seca apresentou valores nutricionais com baixa concentração de lipídeos (0,63 g/100g de biomassa) e alta concentração de proteína (61,60 g/100g de biomassa), além de energia metabolizável (316,09 Kcal/100g de biomassa) e minerais como cálcio e sódio. Desta forma é possível concluir que a levedura *C. utilis* apresenta potencial na *single cell protein* visando sua utilização na suplementação alimentar animal.

Palavras-chaves: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, Levedura, Proteína unicelular

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae and *Candida utilis* are yeasts that show biotechnological interest for production of biomass and other bioingredients in alternative substrates. The aim this work was to produce biomass in submerged culture using shrimp waste hydrolyzed and molasses as substrates. The shrimp waste was treated with different dilution rate at 40 °C. It was analyzed during 5 h of treatment with samples harvested at each 1 h. The best result of hydrolyze protein was found in the dilution 1:4. Yeasts cultivation showed that only *C. utilis* was adapted to the shrimp waste hydrolysate, reaching a growth rate coefficient (μ_{max}) of 0.10 h⁻¹ in Erlenmeyer flasks under stirred speed of 150 rpm at 30 °C during 48 hours. *C. utilis* cultivated in molasses (*in natura*) at concentrations 1%, 2%, 4%, 6%, 8% and 10% (w/v) as carbon source alternative showed the best results in the condition 2%. The batch fermentation experiments with working volume of 1 L and 4 L were carried out in bioreactor (BioFlo2000, New Brunswick Scientific) at 30°C, aeration rate 1 vvm and stirred speed 150 rpm for 48 h. The medium was shrimp waste hydrolyzed in the dilution 1:4 in 3h processing with inclusion of 2% (w/v) molasses. *C. utilis* showed the highest biomass production (9.90 g/L) at 48 h of cultivation in 1 L bioreactor. The consumption was around 75% of the initial sugar in medium. Values of growth rate coefficient (μ_{max}), biomass yield ($Y_{x/s}$) and productivity (Q_x) were 0.20 h⁻¹, 0.8 g/g and 0.53 g/L h, respectively. The biomass dry presented nutritional values with low concentration of lipids (0.63 g/100 g of biomass) and high concentration of protein (61.60 g/100 g biomass) and metabolizable energy (316.09 Kcal/100 g biomass). In addition, it has consistent values of calcium and sodium. Thus, it is possible to conclude that *C. utilis* shows good potential for single cell protein production to be applied in animal feedstock.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, Yeast, Single cell protein

1. INTRODUÇÃO

A criação intensiva de animais no Brasil tem sido uma prática constante, iniciada desde a colonização do país, porém, essa cultura vem sendo atualmente prejudicada em decorrência da crescente falta sazonal de matéria-prima para fabricação de ração. Diante da escassez dos alimentos tradicionalmente utilizados na cultura dos animais e da dificuldade na importação, principalmente, do milho e farelo de soja a preços competitivos na entressafra, cria-se uma barreira na ampliação da produção animal.

Programas alternativos na produção de alimentos para consumo animal vêm se intensificando no campo científico. A produção de proteínas a partir de microrganismos, conhecida como *single cell protein* (SCP), surgiu como uma das propostas para a suplementação da ração animal já que essa biomassa microbiana possui aminoácidos essenciais e vitaminas indispensáveis na dieta dos animais (LIMA, AQUARONE, BORZANI, 1992; ANUPAMA, RAVINDRA, 2000).

Muitos microrganismos, em destaque as leveduras, têm sido investigados na produção de SCP (ZHENG, CHEN, WANG, 2005; RAJOKA *et al.*, 2006). Esses microrganismos possuem vantagens, pois convertem os mais diversos substratos, num curto espaço de tempo de crescimento, em biomassa rica em nutrientes essenciais ao crescimento animal; além das facilidades de manipulação durante o processo (ANUPAMA, RAVINDRA, 2000; PATERSON, MELO, 1993).

Do ponto de vista estratégico, a obtenção de novos compostos a partir de subprodutos da indústria de alimentos como substrato alternativo para o cultivo desses microrganismos, representa uma vantagem agregativa, porque proporciona uma complementaridade ao fornecimento de nutrientes para as rações, a baixo custo, além de contribuir para a redução dos custos gerados no descarte destes resíduos (PELIZER, PONTIERI, MORAES, 2007).

Processos fermentativos, na obtenção de biomassa microbiana a partir de resíduos agroindustriais, tem sido uma ferramenta biotecnológica importante para produção de proteína como suplemento alimentar animal. Dentre as vantagens estão a viabilidade econômica por se tratar de um processo de baixo custo de produção e o fornecimento de um produto de valor agregado com alta qualidade nutricional (LIM, LAM, DING, 2005; BACCARIN, PEZZATO, 2001).

1.1. A Cultura Sucroalcooleira no Brasil

A cana-de-açúcar, originária do sudeste da Ásia, foi introduzida no Brasil em 1532 por Martim Afonso de Sousa, sendo o principal pólo de produção a Zona da Mata Nordestina, tendo depois se expandido pela região Sudeste, notadamente no Estado de São Paulo. Hoje, quase todos os estados brasileiros produzem cana, mas o maior estado produtor ainda é São Paulo, com cerca de 60% da produção nacional (MAPA, 2007).

O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil destina-se principalmente a produção de açúcar e álcool, podendo ser atribuída também sua utilização na alimentação animal sob a forma de forragem, ou como matéria-prima para fabricação de rapadura e aguardente. Com isso, o setor sucroalcooleiro é parte importante do quadro econômico brasileiro, além de ser referência para os demais países produtores de açúcar e álcool (MOLINA *et al.*, 1988).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2007) a produção de açúcar e álcool a partir de cana-de-açúcar permite os menores custos de produção quando comparado com outras matérias-primas. A produtividade da cana em se tratando de área cultivada é de aproximadamente 85 ton/ha, obtendo um rendimento de 138 kg/ton em relação a produção de açúcar e de 82 L/ton em relação ao álcool.

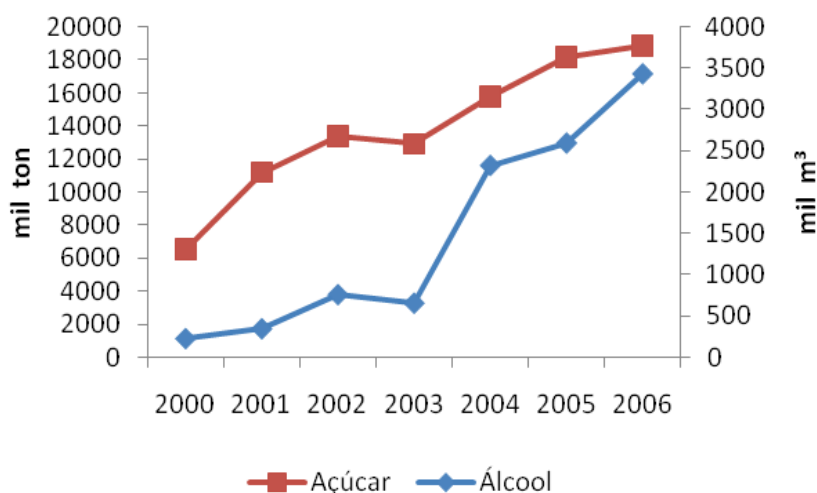
A Tabela 1 mostra o crescimento da produção sucroalcooleira brasileira por ano safra que de 2000/01 a 2005/06 constata-se um aumento de 33,35% em toneladas de cana moída, passando de 10,5 a 15,8 milhões de m³ de álcool produzido, e de 16 a 26,2 milhões de toneladas de açúcar produzido (MAPA, 2007). Segundo o Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias (GCEA/IBGE), atualmente, a área cultivada por cana no território brasileiro é cerca de 6,7 milhões de hectares, atingindo uma produção estimada de 5,1 milhões de toneladas aproximadamente, com um rendimento médio de 76.577 kg/ha (IBGE, 2007).

Tabela 1 – Produção sucroalcooleira no Brasil por ano safra

Período	Cana moída (t)	Álcool (m ³)	Açúcar (t)
Safra: 2000/01	254.921.721,00	10.517.535	16.020.340
Safra: 2001/02	292.329.141,00	11.467.795	18.994.363
Safra: 2002/03	316.121.750,00	12.485.426	22.381.336
Safra: 2003/04	357.110.883,00	14.639.923	24.944.434
Safra: 2004/05	381.447.102,00	15.207.909	26.632.074
Safra: 2005/06	382.482.002,00	15.808.184	26.214.391

Fonte: MAPA, 2007

Com essa potencialidade no setor e os interesses de muitos países pelos produtos da indústria da cana-de-açúcar, a economia brasileira tem sido favorecida com o aumento nas exportações (Figura 1). Estatísticas mostram que de 2000 a 2006 as exportações brasileira do álcool e do açúcar cresceram, respectivamente, 93,38% e 65,54%, sendo comercializados 7,771 bilhões de dólares em 2006 (MAPA, 2007).



Fonte: MAPA, 2007

Figura 1 – Evolução das exportações brasileiras de açúcar e álcool. Os dados de açúcar (mil ton) e álcool (mil m³) foram demonstrados no decorrer dos anos da produção brasileira.

1.1.1. Os resíduos da Indústria da Cana-de-açúcar

No processamento da cana-de-açúcar, são gerados vários tipos de resíduos, além dos produtos diários. Dentre esses destaca-se o bagaço, um material fibroso, que é resultado da prensa da cana-de-açúcar para extração do caldo, constituindo 30% do total da cana e o primeiro resíduo a ser gerado. Na sua composição estão presentes lignina, ligno-celulose, celulose e hemicelulose (KNAUF, MONIRUZZAMAN, 2004).

No Brasil, o bagaço tem sido destinado basicamente à geração de energia, nas formas térmica, mecânica e elétrica. Essa energia é capaz de suprir toda a demanda das unidades produtoras e ainda gerar excedentes exportáveis à rede elétrica (MAPA, 2007); além de ser utilizado como matéria-prima na produção de papel, celulose, madeira sintética prensada e alimentação animal (PELIZER *et al.*, 2007).

Como segundo resíduo a ser obtido, tem-se as tortas (resíduos do processo de decantação), que constituem aproximadamente 0,9%, sendo resultante da primeira separação das impurezas para produção de açúcar ou mel. É muito rico em cálcio, apresentando 16% de proteína e com nitrogênio na forma de proteína gerando uma porcentagem de proteína bruta entre 8% e 16% (MOLINA *et al.*, 1988).

Um outro resíduo de importância econômica, produzido durante o processamento da cultura da cana é o melaço, líquido viscoso de coloração escura, resultante da desidratação e caramelização dos açúcares e aminoácidos presentes no caldo para a produção do açúcar cristalizado. Na sua composição estão presentes açúcares totais (46%), sacarose (36%), frutose (5,6%), glicose (2,6%), proteína bruta (3%), além de vitaminas e dos sais minerais como cálcio, fósforo, potássio, sódio, cloro e enxofre (CURTIN, 1983; LEE, KIM, 2001).

O melaço pode ser empregado na forma de substrato alternativo para alimentação animal (LEE, KIM, 2001); na produção de bioprodutos a partir de processos fermentativos; ou exportado como matéria-prima para indústria farmacêutica e química (SHOJAOSADATI *et al.*, 1999; RYAN, JOHNSON, 2001).

Samocha *et al.* (2006) relatam que o melaço pode ser usado como fonte de carbono para microrganismos heterotróficos aquáticos na produção de proteína, servindo de alimento para carcinicultura; além de minimizar o impactando no meio

ambiente pela diminuição dos compostos inorgânicos nitrogenados gerados no efluente dessa cultura.

A prática de uso do melaço como fonte nutricional para o crescimento de microrganismos é reportada por Paterson e Melo (1993), mostrando que as espécies de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* têm potencial produtivo no fornecimento de fontes alternativas de proteína e vitamina para consumo humano e animal.

Segundo o Ministério de Minas e Energia – MME (2007), no período de 2000 a 2005 o Brasil aumentou a produção de bagaço e melaço em 37,72% e 42,06% respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Evolução da produção Brasileira de bagaço e melaço.

Ano	Produção em milhões de (t)	
	Bagaço	Melaço
2000	66.309	7.245
2001	78.040	9.026
2002	87.233	10.295
2003	97.321	11.215
2004	101.795	11.779
2005	106.470	12.521

Fonte: MME (2007)

Conseqüentemente, esse quadro favorável de produção desses resíduos tem estimulado sua utilização na busca por novas alternativas tecnológicas, principalmente pelo baixo custo de produção e agregação de valor pelos produtos formados; além de contribuir na redução do impacto ambiental haja visto que com o crescente aumento da produção há também um aumento do excedente desses resíduos.

1.2. Carcinicultura e seus aspectos socioeconômicos

Com a intensa exploração predatória e desordenada do camarão marinho, atingindo o limite sustentável pela produção extrativista mundial, e associado a um

aumento do consumo em várias culturas, a carcinicultura tem sido uma alternativa viável para suprir essas demandas no mercado.

Estatísticas mostram que a produção mundial de camarão capturado no qual consiste da pesca em ambiente marinho, tem diminuído sua produção em até 2% no período de 2003 (3.349.466 t) a 2005 (3.419.503 t), enquanto que o camarão cultivado cresceu sua produção em 27% no mesmo período, alcançando 2.733.134 t em 2005 (ROCHA, 2007). Segundo a FAO (2007), estima-se que a produção mundial de camarão cultivado atinja um crescimento médio anual de 13,03%, alcançando aproximadamente uma marca de 3,5 milhões de toneladas nos próximos anos.

A carcinicultura brasileira iniciou-se na década de 70, ganhando caráter empresarial a partir da década de 80 sob a forma operacional semi-extensiva. A partir de 1995, o cultivo de camarão no Brasil iniciou uma nova fase. Com a aceitação no mercado e consolidação do camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) oriundo do Oceano Pacífico, a produção comercialmente nos laboratórios de pós-larvas intensificou-se e o setor tomou um novo impulso ganhando destaque na economia brasileira (ROCHA, ROCHA, 2007).

Tendo em vista que a China é líder no ranking mundial de produção de camarão em cativeiro, o Brasil, apesar dos gargalos das enfermidades e de outros entraves no setor, tem mostrado potencial no mercado mundial, apresentando-se na oitava posição entre os países produtores em 2006. Nesse mesmo ano, a produção brasileira de camarão foi de 65 mil toneladas, numa área de 15,2 mil hectares, com uma produtividade de 4.276 kg/ha/ano (ROCHA, 2007).

Conforme lista da Secretaria Especial de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento (Secex), de Janeiro a Março de 2007, o camarão ficou na quarta colocação (8,9%) entre os produtos brasileiros mais exportados, perdendo apenas para o melão (23%), castanha de caju (9,7%) e açúcar (9,1%), com valores de exportação em torno de 9 milhões de dólares nos dois primeiros meses de 2007. (FENACAM, 2007; REVISTA PANORAMA DA AQUICULTURA, 2007).

Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC (2007) do volume total da produção brasileira em 2006, cerca de 46,9% do camarão foi destinado ao mercado externo, comercializado com países como Japão, Estados Unidos, França, Espanha, Portugal, Holanda, Itália, Bélgica e Argentina.

1.2.1. Resíduos da Indústria do camarão e suas aplicabilidades

Com o aumento da produção mundial de camarão, e as exigências relacionadas ao tipo do produto e controle da qualidade, as indústrias voltadas ao processamento do camarão têm aumentado a geração de resíduo para o beneficiamento do produto.

Atendendo a essas exigências do mercado, os países produtores têm diversificado o camarão por tipo de produto, sendo vendido inteiro (*head-on*), ou sem a cabeça (*headless*); além dos produtos de valor agregado, incluindo camarões com cortes específicos prontos para venda. Em 2006, 5% do camarão brasileiro exportado foi *headless*, representando 1.728 toneladas do produto processado (ABCC, 2007).

Segundo Ruttanapornvareesakul *et al.* (2006) durante o processamento do camarão para comercialização, cerca de 49% do seu peso total é descartado, onde 35% representa a cabeça (cefalotórax) e 14% corresponde à carapaça (quitina). Já segundo Gildberg e Stenberg (2001) do camarão processado para alimentação, mais de 40% (w/w) é resíduo sólido, contendo de 25-30% de matéria seca. Na fração sólida desse resíduo estão presentes quitina - um polissacarídeo composto de β -1,4 *N*-acetil-D-glucosamina -, proteínas, lipídios, e minerais (MATSUMOTO *et al.*, 2004). Ferrer *et al.* (1996) mostraram em seu trabalho que o resíduo de camarão tem aproximadamente 39,6% de proteína e 28,15% de cinza. As porcentagens de lipídios e carboidratos também foram quantificadas na silagem de cabeça de camarão, correspondendo a 12,5% e 15,8% respectivamente (GUILHERME, CAVALHEIRO, SOUZA, 2007).

De acordo com a literatura, o resíduo de camarão tem sido empregado nas mais diversas áreas de interesse, podendo ser utilizado como matéria-prima para produção de quitosana, a partir da conversão enzimática ou deacetilação alcalina da quitina. A quitosana, que é um biopolímero do tipo polissacarídeo com estrutura molecular quimicamente similar à fibra vegetal chamada celulose, tem sido empregada nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e alimentícias (WESKA *et al.*, 2007).

A recuperação da quitina, componente estrutural do exoesqueleto dos crustáceos, tem-se mostrado como uma alternativa para o reaproveitamento do resíduo de camarão. A partir da hidrólise enzimática ou química, a quitina liberada

desse resíduo pode ser aplicada na purificação de mares contaminados com petróleo; produção de corantes naturais para a indústria de alimentos; fabricação de cosméticos como corantes essenciais; e fabricação de medicamentos para perda de peso (COWARD-KELLY, AGBOGBO, HOLYZAPPLE, 2006).

As proteínas presentes no resíduo de camarão têm sido alvo de pesquisas, principalmente como fonte nutricional para alimentação animal. Segundo Mizani, Aminlari e Khodabandeh (2005) as proteínas presentes no resíduo da cabeça de camarão podem ser hidrolisadas com enzimas alcalases, liberando aminoácidos e peptídeos, compostos estes que podem ser empregados na formulação alimentar para aquicultura e produção animal. Nesse citado processo, o rendimento da hidrólise protéica foi de 45,1%. Gildberg e Stenberg (2001) ressaltam que no processo de hidrólise protéica do resíduo de camarão com alcalases podem ser liberados aminoácidos essenciais e não-essenciais, além de fontes nitrogenadas livres (Tabela 3).

Tabela 3 – Composição dos aminoácidos presentes no resíduo de camarão hidrolisado.

Aminoácidos		Resíduo de camarão hidrolisado (g/100g)
Essenciais	Histidina	3,12 ± 0,00
	Isoleucina	5,77 ± 0,03
	Leucina	8,86 ± 0,09
	Lisina	8,31 ± 0,32
	Metionina	3,30 ± 0,04
	Fenilalanina	5,55 ± 0,09
	Treonina	6,04 ± 0,02
	Triptofano	Nd
	Valina	6,72 ± 0,04
Não essenciais	Tirosina	5,08 ± 0,06
	Ácido aspártico	2,84 ± 0,26
	Ácido glutâmico	8,92 ± 0,57
	Glicina	6,67 ± 0,01
	Serina	6,29 ± 0,04
	Arginina	8,90 ± 0,21
	Alanina	7,58 ± 0,01
	Prolina	5,67 ± 0,00
	Cistina	0,34 ± 0,02

Fonte: Gildberg e Stenberg (2001) modificada

Carotenóides tipo astaxantina – pigmento responsável pela coloração da maioria dos crustáceos e que possui atividade antioxidante, antiinflamatória, imunomoduladora, anticâncer e antidiabetes – são extraídos de resíduo de camarão e aplicados principalmente nas indústrias de cosméticos como um composto antioxidante. A recuperação dos carotenóides a partir desse resíduo pode ser realizada por processo enzimático, isolando-o do complexo caroteno-proteína, ou por fermentado do resíduo da cabeça de camarão (BABU *et al.*, 2007; SACHINDRA *et al.*, 2007).

Sais minerais, presentes no camarão, também podem ser recuperados desse resíduo (Tabela 4). Segundo Coward-Kelly, Agbogbo e Holzapple (2006) os sais de cálcio presentes no processo final da hidrólise protéica do resíduo da cabeça de camarão podem ser utilizados como suplemento alimentar animal.

Tabela 4 – Composição dos sais minerais presentes em resíduo de camarão.

Sais Minerais	Resíduo da cabeça de camarão
P (%)	1,27
K (%)	1,045
Ca (%)	4,6296
Mg (%)	0,3781
Na (ppm)	11,82
Zn (ppm)	90
Fe (ppm)	261
Cu (ppm)	157,5
Mn (ppm)	95

Fonte: Adaptada de Coward-Kelly, Agbogbo, Holzapple (2006)

1.3. Leveduras como fonte alimentar

Diante do problema da desnutrição e da fome global, o emprego da biotecnologia utilizando microrganismos tem sido investigado como uma alternativa viável para minimizar essas questões. Dentre esses microrganismos, destacam-se as leveduras que são fontes principais de proteína e podem ser utilizadas como proteína unicelular na alimentação de humanos e animais. Esses microrganismos são convenientes por crescerem relativamente rápido e utilizarem matérias-primas à baixo custo da agricultura e da indústria (ANUPAMA, RAVINDRA, 2000).

O termo *Single Cell Protein* (SCP) foi introduzido em meados de 1960 em consequência dos diversos trabalhos publicados, explorando a possibilidade de extração de SCP do crescimento de microrganismos a partir de hidrocarbonetos. A produção de SCP tem sido praticada desde a Primeira Guerra Mundial sendo incorporada, nessa época, em sopas e salsichas. Durante a Segunda Guerra Mundial os alimentos com leveduras, incluindo as espécies *Candida arborea* e *Candida utilis*, foram mais frequentemente usados como fonte protéica na Alemanha (TREHAN, 1990).

A produção de SCP ou proteína unicelular é difundida mundialmente como uma ferramenta de interesse biotecnológico e vem sendo aplicada principalmente nas indústrias alimentícias como suplemento alimentar humano e animal. O consumo de microrganismos como alimento é uma prática antiga, podendo ser encontrado na produção do pão pela presença de células de leveduras como componente do fermento; no queijo pela presença de bactérias e fungos; no leite fermentado como iogurtes e kefir; salsichas e salames fermentados; além de serem usados como agentes na preparação de produtos fermentados orientais a partir da soja e em produtos do pescado (MARX, 1989).

As leveduras, além das proteínas, apresentam na sua constituição compostos nutricionais importantes para dieta dos animais, tais como: aminoácidos, carboidratos, lipídios, minerais, aditivos para alimentos e vitaminas. Embora a levedura seja uma fonte rica em vitaminas do complexo B como tiamina, riboflavina, biotina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, colina, ácido fólico e ácido p-aminobenzóico, a maioria dos estudos realizados durante décadas e que utiliza como fonte protéica sucedânea às proteínas de origem animal. Essa composição bioquímica das leveduras depende da natureza do substrato utilizado, espécie, concentração de sais e condições de fermentação (ANUPAMA, RAVINDRA, 2000).

Quanto à produção alimentar, as leveduras, resultantes de processos exclusivamente destinados à sua propagação, são denominadas leveduras primárias, enquanto que leveduras obtidas como subprodutos de outras indústrias fermentativas, destilarias de álcool por exemplo, são denominadas leveduras secundárias. Esses microrganismos são ainda qualificados de acordo com o uso a que se destinam em leveduras para rações animais e leveduras para consumo humano. Classificam-se leveduras alimentares destinadas à utilização em rações animais a levedura primária seca, cuja atividade fermentativa tenha sido

completamente destruída; enquanto que a levedura qualificada como alimento humano deve ter características de sabor, aroma, cor, pureza microbiana, composição química e conteúdo vitamínico, além de atender as especificações dos órgãos que regem o controle de qualidade e fiscalização dos alimentos nos diversos países (PATERSON, MELO, 1993).

Diversas espécies de leveduras são empregadas na produção de SCP destacando-se as do gênero *Saccharomyces* e *Candida*; dentre esses estão incluídas as espécies *C. utilis*, *C. reukaufii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* e *S. fragilis*. A *C. utilis*, entre esses microrganismos, tem mostrado potencial devido sua habilidade em assimilar várias fontes de carbono como hidrolisados de madeira, e outros materiais celulósicos, licor sulfítico, melaços, resíduos de amido, soro de leite e resíduos de camarão processado (ANUPAMA, RAVINDRA, 2000; PATERSON, MELO, 1993).

A biomassa da levedura *Candida utilis*, produzida por processo fermentativo a partir de resíduos do arroz, pode ser utilizada como fonte de aminoácidos na alimentação atendendo aos requisitos nutricionais de acordo com a FAO (1957) (Tabela 5). A levedura obtida a partir desse processo pode substituir ingredientes alimentares de alto custo, tradicionalmente utilizados na formulação de ração para aves domésticas (RAJOKA *et al.*, 2006).

Tabela 5 – Perfil dos Aminoácidos do concentrado protéico a partir da fermentação do resíduo de arroz com a *C. utilis*.

Aminoácido	Aminoácido padrão* (mg/g)	Aminoácido da Biomassa (mg/g)
Lisina	42 ± 3.5	34.59 ± 3
Leucina	48 ± 3.7	58.32 ± 4
Isoleucina	42 ± 3.5	29.14 ± 2.4
Fenilalanina	28 ± 2.5	35.72 ± 3.1
Metionina	22 ± 1.8	16.18 ± 1.3
Treonina	28 ± 1.9	21.98 ± 1.5
Valina	42 ± 2.1	45.19 ± 2.2

* FAO (1957)

Fonte: Rajoka *et al.* (2005)

Espécies de *Candida* isoladas de ambiente marinho foram selecionadas para produção de proteína a partir de resíduos da carapaça de camarão. Nesse trabalho foi possível aumentar de 38,5% para 70,4% o concentrado protéico no final do processo (RHISHIPAL, PHILIP, 1998). Christen *et al.* (1999) ressaltam que a linhagem de *C. utilis* tem potencial para converter etanol em biomassa com rendimento máximo de 0,305 (biomassa produzida g/álcool consumido g), numa concentração inicial de 16 g/L de etanol.

Segundo Zheng, Yang e Yang (2005) espécies de leveduras como *Rhodotorula rubra*, *Candida tropicalis*, *C. utilis*, *C. boidinii* e *Trichosporon cutaneum*, isoladas de solo contaminado com águas residuárias do processamento industrial do óleo de salada, foram investigadas na produção de biomassa como fonte de proteína para ração animal. Dentre essas leveduras, a *C. utilis* cultivada nesse resíduo de óleo de salada com adição de cloreto de amônio foi a que apresentou os melhores resultados de taxa de conversão do óleo em biomassa (0,96 g/g) e a taxa de crescimento ($0,25\text{ h}^{-1}$), obtendo no processo final 26% de proteína, 9% de lipídeo bruto, 55% de carboidrato e uma composição balanceada de aminoácidos.

Ressaltando sua importância nos processos biotecnológicos, a *S. cerevisiae*, uma levedura utilizada como modelo no estudo das áreas da bioquímica, genética com o genoma seqüenciado (GOFFEAU *et al.*, 1996) e biologia celular; vem sendo aplicada principalmente nas indústrias produtoras de álcool, bebidas e alimentos. Atualmente, seu interesse tem aumentado por possuir alto potencial produtivo e viabilidade econômica, isto porque possui fácil manutenção em laboratório e o conhecimento biológico sobre ela é bem desenvolvido (LÓPEZ, RAMÍREZ, CANALES, 2002).

Segundo Baccarin e Pezzato (2001) a *S. cerevisiae* desidratada da produção industrial do álcool pode ser utilizada como fonte de vitaminas hidrossolúveis em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). De acordo com esse artigo, a partir de testes experimentais *in vivo* no cultivo dos peixes, foi constatada alta mortalidade nos peixes alimentados com dietas sem suplemento vitamínico.

As espécies de leveduras *C. utilis*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* e *S. cerevisiae* foram investigadas na produção de biomassa a partir de resíduos de couve como substrato, mostrando que a *C. utilis* tem potencial para gerar proteína unicelular a baixo custo, sem pré-tratamento desse resíduo ou suplementação por outros nutrientes. (CHOI *et al.*, 2002; CHOI, PARK, 2003).

Pesquisas mostram ainda que algumas leveduras usadas como suplemento alimentar podem estimular o sistema imunológico de alguns animais. Segundo Li e Gatlin III (2003) híbridos juvenis de peixes (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) têm influência positiva no crescimento, alimentados com leveduras de cervejaria (*S. cerevisiae*); bem como na melhoria da resistência pela infecção da bactéria patogênica *Streptococcus iniae*, onde resultados da resposta imune demonstraram que essas leveduras podem ser administradas por períodos relativamente longos sem causar imunossupressão.

Pesquisas revelam também a importância do uso de leveduras incorporadas com microelementos (íons de zinco, ferro, selênio, cromo, cobre, magnésio e manganês) na dieta em humanos e animais, podem ter conseqüências benéficas à saúde. Publicações relevantes têm mostrado, surpreendentemente, prevenção de doenças em humanos e de animais pela incorporação de proporções desses microelementos na biomassa de leveduras como suplemento alimentar. Resultados têm mostrado que a espécie *S. cerevisiae* possui um grande potencial na produção de biomassa em meio de cultura enriquecido com íons de Cu^{2+} , bioacumulando-os no espaço intracelular (MRVČIĆ *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir e caracterizar a biomassa a partir das leveduras *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* utilizando como substratos resíduos da agroindústria do camarão e das usinas de cana-de-açúcar.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de diluição do resíduo da carcinicultura para o processo de hidrólise protéica;
- Testar o resíduo de camarão hidrolisado como fonte alternativa de nitrogênio para a produção de biomassa
- Determinar o nível de inclusão do melaço de cana-de-açúcar como substrato na formulação do meio de cultivo;
- Produzir a biomassa e avaliar os parâmetros cinéticos em escala experimental no biorreator de 5 litros;
- Realizar análises bromatológica e bioquímica da biomassa obtida.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO, 2007. Disponível em: <http://www.abccam.com.br/>. Acessado em: agosto de 2006.

ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**. v. 18, 2000, p. 459–479.

BABU, C. M. *et al.* Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. **LWT - Food Science and Technology**, 2007, 9 p.

BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia-do-nilo. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 549-556, mar. 2001.

CHOI, M. H. *et al.* Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. **Bioresource Technology**, v. 83, 2002, p. 251–253.

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, 2003, p. 221 – 226.

CHRISTEN, P. *et al.* Evaluation of four *Candida utilis* strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol. **Bioresource Technology**, v. 68, 1999, p. 193–195.

COWARD-KELLY, G.; AGBOGBO, F. K.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. **Bioresource Technology**, v. 97, 2006, p. 1515–1520

CURTIN, L. V. Molasses – General Considerations. Molasses in animal nutrition, 1983, 11 p.

FAO/WHO, 1957. Ad Hoc Expert Committee, Energy and Protein Requirements. World Health publishing Co. pp. 35–36.

FAO, 2007. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acessado em: 10 de junho de 2007.

FENACAM, 2007. Boletim informativo. Disponível em: <http://www.fenacam.com.br/port/informativo.php?idinformativo=15>. Acessado em 15 de maio de 2007.

FERRER, J. *et al.* Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 57, 1996, p. 55-60.

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

GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, 1996, p. 546-567.

GUILHERME, R. F.; CAVALHEIRO, J. M. O.; SOUZA, P. A. S. Caracterização química e perfil aminoácídico da farinha de silagem de cabeça de camarão. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, 2007, p. 793-797.

IBGE (Brasil), 2007. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em 10 de agosto de 2007.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International Sugar Journal**, v. 106, 2004, p. 147-150.

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

LI, P.; GATLIN III, D. M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture**, v. 219, 2003, p. 681-692.

LIM, E. H.; LAM, T. J.; DING, J. L. Single-cell protein diet of a novel recombinant vitellogenin yeast enhances growth and survival of first-feeding tilapia (*Oreochromis mossamicus*) larvae. **The Journal of Nutrition**, 2005, p. 513-518.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. v. 1, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1992, p. 254-285.

LÓPEZ, A.; RAMÍREZ, R. Q.; CANALES, A. L-M. **Biotecnología alimentaria**. Ed. Limusa, 2002, 200 p.

MAPA (Brasil), 2007. Balanço Nacional da Cana-de-açúcar e Agroenergia. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 03 de setembro de 2007.

MARX, J. L. **A Revolution in Biotechnology**. Cambridge University Press, 1989, 238 p.

MATSUMOTO, Y. *et al.* Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. **Process Biochemistry**, v. 39, 2004, p. 665-671.

MIZANI, M.; AMINLARI, M.; KHODABANDEH, M. An effective for producing a nutritive protein extract power from shrimp-head waste. **Food Sci. Tech. Int.** v. 11, 2005, p. 49-54.

MME (Brasil), 2007. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/>. Acessado em: 03 de setembro de 2007.

MOLINA *et al.* Alimentação de ruminantes com subprodutos da industrialização da cana-de-açúcar; medula de bagaço e creme de levedura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, n. 1, 1988, p. 81-85.

MRVČIĆ, J. *et al.* Optimization of Bioprocess for Production of Copper-Enriched Biomass of Industrially Important Microorganism *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n°. 4, 2007, p. 331–337.

PATERSON, M.; MELO, F. A. D. Processos de produção de proteínas a partir da propagação de leveduras. **Imprensa Universitária da UFRPE**, n° 3, 1993, 46 p.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H., MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **J. Technol. Manag. Innov.** v. 2, 2007, p. 118-127.

RAJOKA, M. I. *et al.* Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. **Bioresource Technology**, v. 97, 2006, 1934–1941.

REVISTA PANORAMA DA AQUICULTURA. Estatísticas e mercado, v. 17, março/abril 2007, n°. 100, p. 60-61.

RHISHIPAL, R.; PHILIP, R. Selection of marine yeast for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. **Bioresource Technology**, v. 67, 1998, p. 255-256.

ROCHA, I. P. Carcinicultura brasileira: realidade, desafios e perspectivas. **Revista Panorama da aquícultura**, v. 17, março/abril 2007, p. 62-63.

ROCHA, I. P.; ROCHA, D. M. Carcinicultura: produção, demanda e processo tecnológico com responsabilidade ambiental e compromisso social. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**. n°. 1, setembro/2007, p. 16-22.

RUTTANAPORNVAREESAKUL, Y. *et al.* Concentration-dependent suppressive effect of shrimp head protein hydrolysate on dehydration-induced denaturation of lizardfish myofibrils. **Bioresource Technology**, v. 97, 2006, p. 762–769.

RYAN, D.; JOHNSON, R. Dialysis and ultrafiltration of molasses for fermentation enhancement. **Separation Purification Technology**. v. 22-23, 2001, p. 239–245.

SACHINDRA, N. M. *et al.* Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. **Bioresource Technology**, v. 98, 2007, p. 1642–1646.

SAMOCHA, T. M. *et al.* Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. **Aquacultural Engineering**, (2006).

SHOJAOSADATI, S. A. *et al.* Bioconversion of molasses stillage to protein as an economic treatment of this effluent. **Resources, conservation and recycling**, v. 27, 1999, p. 125-138.

TREHAN, K. **Biotechnology**, New Age Publishers, 1990, 294 p.

WESKA, R.F. *et al.* Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp waste: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**. v. 80, 2007, p. 749-753.

ZHENG, Y.-G.; CHEN, X.-L.; WANG, Z. Microbial biomass production from rice straw hydrolysate in airlift bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 118, 2005, p. 413–420.

ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. **Bioresource Technology**, v. 96, 2005, p. 1183–1187.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

ANÁLISE DO POTENCIAL DA *Candida utilis* PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

Gustavo Alves do Nascimento^{1,2}, Danyelly Bruneska Gondim Martins^{1,2}, José Luiz de Lima Filho^{1,2,3}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil; ²Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE-INT/MCT, Recife, Brasil; ³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Palavras-chave: Resíduo de camarão, Melaço, Levedura, *Candida utilis*, *Single cell protein*

O artigo será submetido a revista científica Bioresource Technology

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae e *Candida utilis* apresentam interesse biotecnológico para produção de biomassa e outros bioingredientes em substratos alternativos. O objetivo deste trabalho foi a produção de biomassa, por cultivo submerso utilizando como substrato resíduos da carcinicultura e das indústrias sucroalcooleira. O resíduo de camarão foi tratado com diferentes taxas de diluição a 40 °C, e analisada ao longo de 5 horas em intervalos de 1 hora, atingindo os melhores resultados de hidrólise protéica na diluição 1:4. O cultivo das leveduras nesse resíduo mostrou que apenas a *C. utilis* se adaptou ao substrato, atingindo uma taxa de crescimento máximo (μ_m) 0,10 h⁻¹ no cultivo submerso em frasco Erlenmeyer sob agitação de 150 rpm, a 30 °C durante 48 horas. A *C. utilis* foi cultivada em melaço *in natura* nas concentrações 1%, 2%, 4%, 6%, 8% e 10% (p/v) como fonte alternativa de carbono, obtendo os melhores resultados na condição de 2%. Os experimentos de cultivo em batelada com um volume de trabalho de 1 L e 4 L foram conduzidos em biorreator (BioFlo2000, New Brunswick Scientific) a 30 °C, taxa de aeração 1 vvm e velocidade de agitação 150 rpm utilizando o resíduo de camarão hidrolisado na diluição de 1:4 durante 3 horas com inclusão de 2% (p/v) de melaço. A *C. utilis* mostrou a maior produção de biomassa (9.90 g/L) em 48 h de cultivo, consumindo cerca de 75% da concentração inicial dos açúcares redutores presentes no meio. Valores de μ_m , rendimento da biomassa ($Y_{x/s}$) e produtividade (QX) foram 0,20 h⁻¹, 0,8 g/g e 0,53 g/L h, respectivamente. A biomassa seca apresentou valores nutricionais com baixa concentração de lipídeos (0,63 g/100g de biomassa) e alta concentração de proteína (61,60 g/100g), além de energia metabolizável (316,09 Kcal/100g) e minerais como cálcio e sódio. Desta forma é possível concluir que a levedura *C. utilis* apresenta potencial na *single cell protein* visando sua utilização na suplementação alimentar animal.

1. INTRODUÇÃO

A criação intensiva de animais no Brasil tem sido uma prática constante, iniciada desde a colonização do país, porém, essa cultura vem sendo atualmente prejudicada em decorrência da crescente falta sazonal de matéria-prima, dificuldades de importação e os altos preços para fabricação de ração. Do ponto de vista estratégico, programas alternativos têm sido investigados para minimizar esses gargalos na alimentação animal, em destaque a produção de proteínas microbianas.

A produção de proteínas unicelulares, conhecida como *single cell protein* (SCP), tem sido proposta para a suplementação da ração animal já que essa biomassa microbiana possui aminoácidos essenciais (metionina, lisina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) e vitaminas principalmente do complexo B (tiamina, riboflavina, biotina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, colina, ácido fólico e ácido p-aminobenzóico) indispensáveis na dieta dos animais. (LIMA, AQUARONE, BORZANI, 1992; ANUPAMA, RAVINDRA, 2000).

Muitos microrganismos, com ênfase nas leveduras, têm sido investigados para produção de SCP tais como: *Candida sp*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces sp*. (ZHENG, CHEN, WANG, 2005; RAJOKA *et al.*, 2006). Esses microrganismos possuem vantagens relacionadas ao tempo de crescimento, faixa de pH, faixa de temperatura e baixa toxicidade; fatores esses importantes para conversão dos mais diversos substratos em biomassa rica em ingredientes essenciais ao crescimento animal. Além disso, apresentam facilidades de manipulação durante o processo quando comparadas a outros eucariontes (ANUPAMA, RAVINDRA, 2000; PATERSON, MELO, 1993).

O uso de resíduos agroindustriais como substrato alternativo para produção de biomassa tem proporcionado uma complementaridade ao fornecimento de ingredientes para as rações, a um baixo custo, além de contribuir para a redução dos níveis de descarte destes resíduos (PELIZER, PONTIERI, MORAES, 2007).

Dentre esses subprodutos agroindustriais, destacam-se os resíduos da carcinicultura, onde cerca de 50% do camarão processado é descartado sem tratamento prévio (RUTTANAPORNVAREESAKUL *et al.*, 2006; GILDBERG, STENBERG, 2001), podendo ser utilizado como fonte nutricional para o cultivo de microrganismos. Os resíduos da cultura da cana-de-açúcar também representam

grande potencial poluidor ao ambiente com ênfase no melaço que possui viabilidade produtiva como fonte alternativa de carbono (LEE, KIM, 2001; SAMOCHA *et al.*, 2006).

A suplementação alimentar por leveduras, como fonte de proteínas e vitaminas, tem sido uma importante alternativa na produção de animais, contribuindo para redução dos custos de produção e fornecimento de alimento com qualidade nutricional (LIM, LAM, DING, 2005; BACCARIN, PEZZATO, 2001).

O objetivo deste trabalho foi produzir biomassa a partir das leveduras *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, por cultivo submerso em frasco agitados e biorreator, utilizando como substratos alternativos resíduos agroindustriais da carcinicultura e da cultura sucroalcooleira visando a suplementação alimentar animal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Linhagens utilizadas e manutenção

Foram utilizadas para os ensaios experimentais as leveduras, consideradas GRAS (*Generally Regard As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), *Saccharomyces cerevisiae* comercial da Fleischmann Royal® e a *Candida utilis* cedida pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

As linhagens foram mantidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ em placas de Petri contendo meio sólido YPD [1% (p/v) extrato de levedura, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) glicose e 2% (p/v) agar-agar], sendo repicadas mensalmente. Já o estoque congelado foi acondicionado a uma temperatura de ultra congelamento ($-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) em meio líquido YPD, contendo 70% de glicerol.

2.2. Obtenção do Hidrolisado Protéico a partir do Processamento de Camarão

O resíduo de camarão (cabeça) da espécie *Litopenaeus vannamei* foi cedido pela empresa Netuno e armazenado em sacos plásticos de 1 Kg a uma temperatura de congelamento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$). A cabeça do camarão *in natura* foi diluída e triturada com água destilada nas proporções 1:2, 1:4, 1:6 e 1:8, e posteriormente submetida ao processo de auto-hidrólise parcial a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitação constante de 400 rpm como condições de trabalho, durante 5 horas em biorreator (BioFlo2000 e BioFlo110, New Brunswick Scientific). Em seguida foi separada a parte sólida da líquida (hidrolisado bruto) através de centrifugação. Após esse procedimento o hidrolisado bruto foi submetido ao processo de esterilização a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, resfriado e estocado para futuros experimentos. As amostras foram retiradas do biorreator em intervalos regulares de 1 hora para realização de análises bioquímicas do hidrolisado.

2.3. Obtenção do Resíduo do Processamento da Cultura Sucroalcooleira

O subproduto da cultura sucroalcooleira (melaço) foi coletado na usina de açúcar Sítio do Meio, localizada no município de Gameleira - PE, e estocado de forma asséptica, na qual após ser esterilizado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, o subproduto foi acondicionado em câmara fria a temperatura de $1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$.

2.4. Condições de cultivo em frasco aerado

Uma colônia de cada uma das linhagens, *C. utilis* e *S. cerevisiae*, foi retirada de placas de Petri contendo meio YPD sólido e pré-inoculadas em 50 mL de meio YPD em frascos de Erlenmeyer de 250 mL por 12 horas a 30 °C e 150 rpm em agitador orbital. A partir da cultura obtida, uma concentração inicial de biomassa (10^6 células/mL) foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 120 mL do meio de camarão hidrolisado (Tabela 1). O mesmo procedimento foi realizado para testes utilizando melaço *in natura* nas concentrações 1%, 2%, 4%, 6% e 8%. Os experimentos foram conduzidos por um período de 48 h em agitador orbital a 150 rpm numa temperatura de 30 °C. As amostras foram retiradas em intervalos de 12 h para a realização de determinações analíticas.

Tabela 1 – Condições de trabalho investigadas para a seleção das linhagens em cultivo submerso contendo meio de resíduo de camarão hidrolisado.

Linhagens	Diluição* (p/v)	Tratamento** (h)
<i>C. utilis</i>	1:2	5
<i>C. utilis</i>	1:4	3
<i>S. cerevisiae</i>	1:2	3
<i>S. cerevisiae</i>	1:4	5

*resíduo de camarão kg/água destilada L

**tempo do processo de hidrólise do resíduo de camarão

2.5. Condições de cultivo em Biorreator

Os experimentos em escala piloto foram conduzidos em biorreator BioFlo2000 (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., EUA) com capacidade máxima para 5 litros. O microrganismo foi pré-inoculado em frascos Erlenmeyer contendo resíduo de camarão hidrolisado mais melaço e cultivado por 12 h em agitação orbital de 150 rpm a uma temperatura constante de 30 °C. Este caldo foi utilizado para inóculo no biorreator correspondendo a 5% do volume total de trabalho. Foram utilizados os controles de temperatura (30 °C), agitação (150 rpm), aeração (1 vvm), além da adição do anti-espumante – antifoam 204 organic SIGMA (0,01%).

2.6. Determinações analíticas

A biomassa foi determinada a partir da regressão linear através da correlação entre a quantificação do peso seco da amostra e a absorbância, utilizado o método de densidade ótica pelo comprimento de onda 600 nm em espectrofotômetro. As proteínas totais presentes no hidrolisado de camarão foram analisadas segundo método de Biureto, como descrito por Verduyn (1990). O consumo dos açúcares redutores foi mensurado pelo método DNSA segundo Miller (1959).

2.7. Parâmetros cinéticos da fermentação

Os parâmetros cinéticos foram calculados como descrito por Pirt (1975). A taxa de crescimento específico máximo ($\mu_{\max}$) foi determinada pela fase exponencial da curva de crescimento. O rendimento ($Y_{x/s}$) foi calculado em gramas de células secas produzidas por gramas de açúcar redutor consumido. A produção de biomassa (X) foi determinada em gramas de células secas produzidas por litro de meio utilizado e a produtividade (Q_x) em biomassa produzida por litro de meio por hora de cultivo. Os testes em frasco aerado foram realizados em duplicata, enquanto os testes em biorreator foram desenvolvidos em triplicata. O teste de Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para avaliar os níveis de inclusão de melaço em relação à produção de biomassa. Os demais números representam a média das replicatas.

2.8. Análises Bromatológicas da Biomassa

A matéria seca de biomassa, liofilizada no equipamento FTS Systems, foi analisada quanto a umidade e substâncias voláteis, concentração de proteínas totais, cinzas e lipídeos pelo método de Adolfo Lutz (2005); carboidratos pelo método de ASCAR (1985); valor calórico total por cálculo; e minerais (Ca, P, K, Na e Fe) pelos métodos de Adolfo Lutz (2005) e AOAC (2002). As referidas análises foram realizadas no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos *Nonete Barbosa Guerra* – LEAAL do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise do hidrolisado protéico do resíduo de camarão

O processo da auto-hidrólise do resíduo de camarão foi investigado quanto a sua potencialidade de utilização como substrato rico em nitrogênio. Para tanto, foram realizados testes correlacionando as diferentes diluições com o tempo de tratamento necessário para que as enzimas hidrolíticas quebrassem as moléculas de proteínas presentes no resíduo. O tempo de processamento do camarão *in natura* para a hidrólise protéica foi fixado por um período máximo de 5 horas, uma vez que estudos sensoriais e químicos, sobre a perecibilidade, demonstraram que o camarão apresenta uma vida-útil de 6 horas em temperatura ambiente (Laghmari e El Marrakchi, 2005).

Nos testes realizados, observou-se que em todas as diluições investigadas ocorreu hidrólise das proteínas presentes no resíduo, apresentando o mesmo perfil de resposta no processo de auto-hidrólise (Figura 1). Com isso, foi possível constatar que as concentrações iniciais de proteínas não interferiram na eficiência das enzimas hidrolíticas, presentes no resíduo, em cada uma das diluições investigadas.

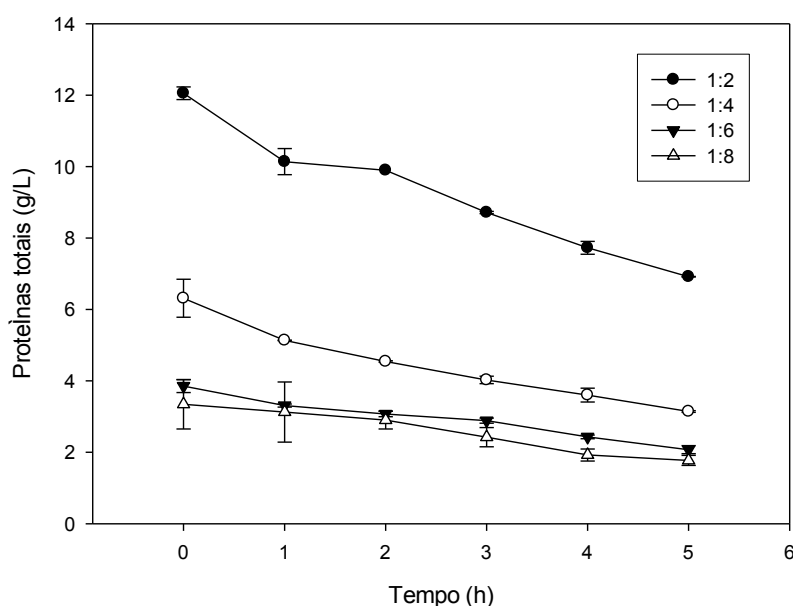


Figura 1 – Avaliação das proteínas hidrolisadas do resíduo de camarão durante 5 horas de processamento. A hidrólise das proteínas totais foi avaliada a partir das diluições investigadas em biorreator com agitação de 400 rpm a temperatura constante de 40 °C.

Quando comparado com outros trabalhos, a eficácia desse processo apresentou resultados semelhantes quanto a quebra das moléculas de proteínas (40 – 50%), tendo como vantagem a redução dos custos já que nesses outros processos utilizam-se compostos químicos (ácidos) ou enzimas comerciais tipo alcalases (FERRER *et al.* 1996; GILDBERG, STENBERG, 2001; MIZANI, AMINLARI, KHODABANDEH, 2005). A utilização dessas enzimas pode inviabilizar o processo em escala industrial em virtude de seus altos preços de mercado.

A maior variação das concentrações protéicas, no processo de hidrólise durante o tempo, pôde ser visualizada na diluição 1:2 que correspondeu a 5,14 g/L em 5 horas de tratamento cuja Figura 1 mostra uma concentração inicial de 12,05 g/L, chegando a 6,92 g/L de proteína nesse período. Por conseguinte, as diluições 1:4, 1:6 e 1:8 apresentaram uma variação máxima de 3,17 g/L, 1,78 g/L e 1,57 g/L de proteína hidrolisada durante 5 horas de tratamento, respectivamente.

Considerando que cerca de 144 toneladas de resíduo são produzidas por mês no Brasil (ABCC, 2007), o parâmetro diluição constitui um fator primordial para utilização do resíduo em escala industrial. Ou seja, altas taxas de diluição podem acarretar a elevação dos custos de processamento, uma vez que é dependente do aumento na adição de água e por sua vez, no volume de resíduo a ser tratado. Tais fatores resultariam no aumento no tempo total de processamento e utilização do resíduo, encarecendo o processo nas diluições 1:6 e 1:8.

Tendo em vista que as leveduras podem ser utilizadas em processos de biorremediação com subsequente produção de biomassa (SALEEM *et al.*, 2008), foram escolhidas as diluições 1:2 e 1:4 que apresentaram a maior taxa inicial de proteína. Tais concentrações podem funcionar, depois da hidrólise, como fonte de nitrogênio que é um fator determinante para o cultivo de microrganismos na produção de proteína unicelular (ZHENG, YANG, YANG, 2005).

3.2. Seleção das linhagens cultivadas no resíduo de camarão hidrolisado

Os parâmetros (diluição e tratamento) foram avaliados de acordo com o grau de inibição e indução de crescimento das leveduras (*C. utilis* e *S. cerevisiae*), tomando-se como base o resíduo de camarão nas diluições 1:2 e 1:4 como fonte alternativa de nitrogênio.

O tempo de tratamento do resíduo foi avaliado quanto à produção de biomassa, sendo testado o tempo de 5 h no qual apresentou o melhor perfil de quebra das moléculas de proteínas em todas as diluições, e o tempo de 3 h na tentativa de reduzir os custos de produção da proteína unicelular na etapa de auto-hidrólise.

Na Figura 2 é possível observar que apenas a *C. utilis* se adaptou ao substrato de camarão, crescendo no meio com os parâmetros 1:4 de diluição e 3h de tratamento, atingindo uma taxa de crescimento máxima de $0,10\text{ h}^{-1}$. Nas demais condições de cultivo, os parâmetros analisados inibiram o crescimento tanto da *S. cerevisiae* como da *C. utilis*.

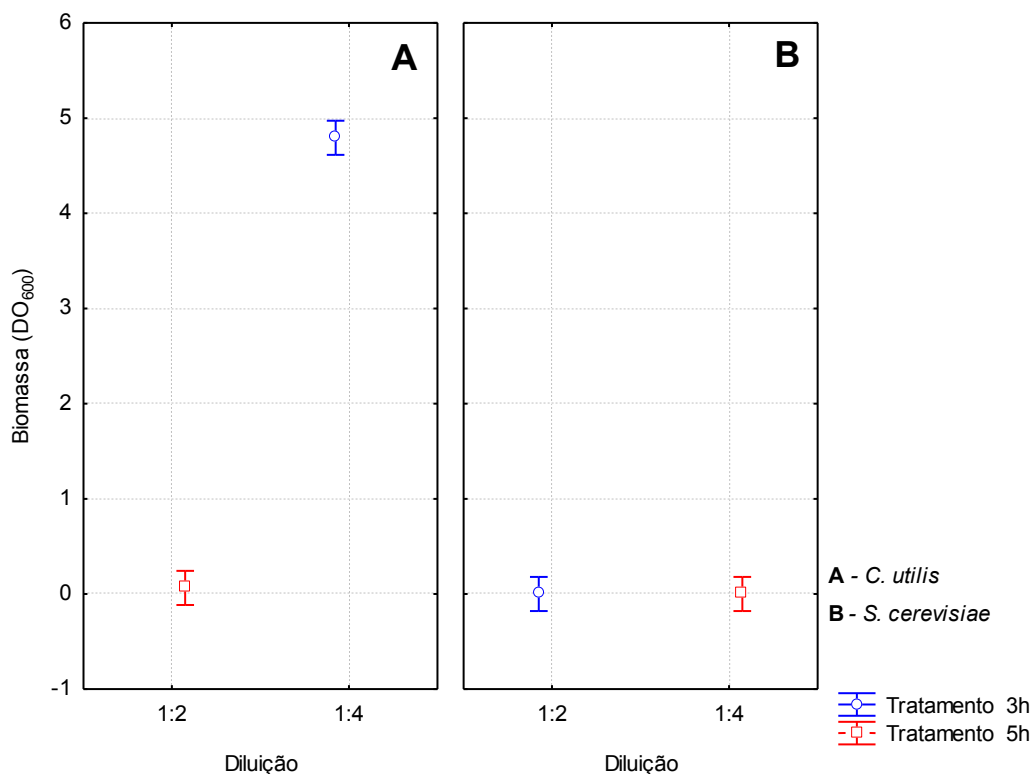


Figura 2 – Efeito das condições de trabalho investigadas na produção de biomassa. As leveduras *C. utilis* (A) e *S. cerevisiae* (B) foram crescidas em cultivo submerso contendo resíduo de camarão processado. Os parâmetros diluição (1:2 e 1:4) e tempo de tratamento (3 h e 5 h), usados no processo de hidrólise do resíduo de camarão, foram às referências para investigação do crescimento das leveduras.

As linhagens, *C. utilis* e *S. cerevisiae*, segundo a literatura possuem viabilidade na bioacumulação de nitrogênio (RODRIGUES, KOETZ, 1996; TAILLANDIER *et al.*, 2007). Entretanto, a levedura *S. cerevisiae* não cresceu em

nenhuma das condições investigadas, o que pode ter sido tanto devido ao tipo de cepa comercial utilizada, como a alta concentração de algum componente inibitório, provavelmente o nitrogênio presente no resíduo de camarão hidrolisado. Esse fenômeno inibitório foi demonstrado no trabalho de Taillandier *et al.* (2007) quando utilizaram uma concentração máxima de nitrogênio de 290 mg/L na fermentação alcoólica a partir de diferentes linhagens de *S. cerevisiae*. Ferrer *et al.* (1996) utilizaram a mesma espécie para demonstrar o potencial na produção de *single cell protein* quando cultivada em substrato de resíduo de camarão hidrolisado com ácido clorídrico. Os autores utilizaram esse método de hidrólise da quitina para liberação de N-acetil-glicosamina como fonte alternativa de carbono, adicionando extrato de levedura e sais minerais para a complementação do substrato.

O resíduo de cabeça de camarão após hidrolisado apresentou uma concentração máxima de açúcares redutores em torno de 2 g/L. Desta forma, para estabelecer uma razão C:N adequada, faz-se necessário o aumento da concentração da fonte de carbono, indispensável na produção de biomassa.

O tipo de tratamento apresentado neste trabalho não é eficiente para liberação de carboidratos, podendo ser utilizado para liberação de compostos nitrogenados, que constituem substratos de alto valor agregado. Com base nos resultados, o resíduo de camarão hidrolisado, poderia ser aplicado como um dos substratos necessários ao cultivo de microrganismos. No cultivo da *C. utilis*, esse resíduo hidrolisado poderia ser utilizado em substituição ao extrato de levedura, geralmente considerado como uma adequada fonte de nitrogênio para a produção de biomassa (KAYALI, TARHAN, SORAN, 2005).

3.3. Utilização do melaço como fonte de carbono

O resíduo da cultura sulcroalccoleira foi utilizado como fonte de carbono para o crescimento da *C. utilis*, espécie de levedura que melhor se adaptou as condições estudadas no resíduo de camarão hidrolisado. Para tanto, testes de inclusão em diferentes concentrações do melaço foram realizados.

A produção de biomassa pela *C. utilis* foi observada em todas as concentrações testadas (Figura 3A), atingindo uma concentração celular máxima de 3,34 g/L durante 48 h de cultivo em 10% (p/v) de melaço. Em seguida, as

proporções 1%, 2%, 4%, 6% e 8% apresentaram uma concentração celular máxima de 1,97 g/L, 2,52 g/L, 2,82 g/L, 2,97 g/L e 3,18 g/L em 48 h de crescimento, respectivamente.

Em se tratando do consumo dos açúcares redutores, é possível observar que a *C. utilis* atingiu um consumo máximo em torno de 83% nas concentrações de 1% e 2%. Entretanto, a *C. utilis* é incapaz de consumir todo o açúcar presente no substrato, estando mais evidente a maior concentração de açúcar residual em 10% de melaço, com o valor de 39,81 g/L.

A inibição do crescimento em decorrência da alta concentração de açúcar no meio pôde ser observada em todas as condições testadas. Adicionalmente, a baixa concentração de nutrientes como fósforo e nitrogênio pode ter sido limitante a produção de biomassa (SHANG *et al.*, 2006). Na Figura 3B, é possível observar que quanto maior a concentração inicial de açúcares redutores presentes no melaço maior a concentração dos açúcares residuais ao final do processo fermentativo. É possível evidenciar ainda, que em todas as concentrações investigadas a *C. utilis* atingiu a fase estacionária em aproximadamente 24 h de cultivo, mesmo com alta concentração de açúcar no meio, comprovando a existência de fatores limitantes ao crescimento.

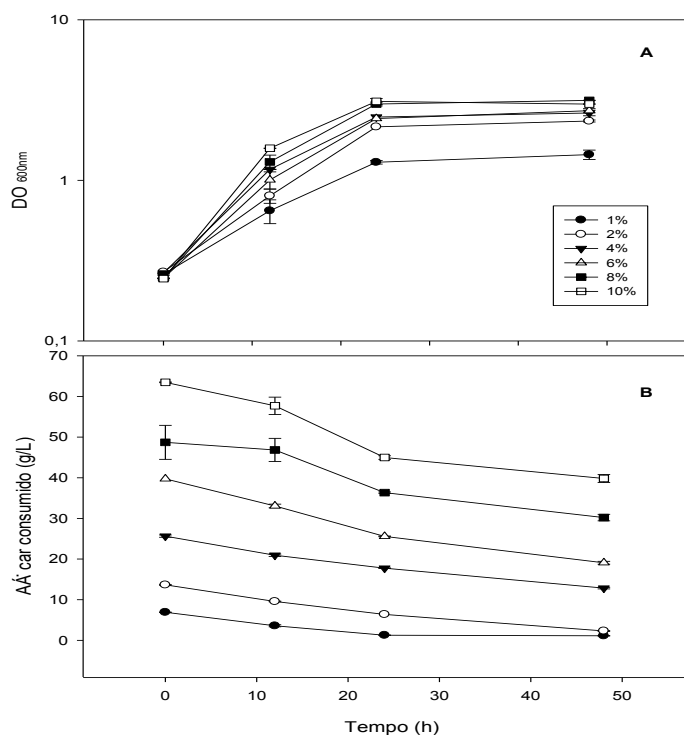


Figura 3 – Curva de crescimento da *C. utilis* (A) em cultivo submerso contendo melaço nas concentrações 1%, 2%, 4%, 6%, 8% e 10% (p/v), e consumo dos açúcares (B) presentes no melaço durante 48 h de cultivo.

Esse efeito da concentração de açúcar como inibidor na produção de biomassa a partir da *C. utilis* foi demonstrado no trabalho de Lee e Kim (2001). Esses autores mostraram que o rendimento da biomassa ($Y_{x/s}$) apresentava uma relação inversamente proporcional com a concentração inicial de açúcar no crescimento dessa levedura, resultando também na produção de etanol.

O cultivo da *C. utilis* em melaço de cana-de-açúcar *in natura* apresentou potencial na produção de biomassa e vantagem quanto a redução dos custos quando comparados com a literatura, já que em alguns trabalhos o melaço *in natura* antes de ser utilizado como substrato é clarificado e pré-tratado para liberação de glicose e frutose, a partir da sacarose presente nesse subproduto (PATERSON, MELO, 1993). Diante disso, os resultados de taxa de conversão de substrato em biomassa apresentaram resultados menores quando comparados com o trabalho de Lee e Kim (2001) cujo valor foi de 0,61 g/g no cultivo em frascos contendo melaço clarificado e pré-tratado. Esse rendimento pode ser explicado em virtude da fonte direta de glicose já que as células das leveduras metabolizam mais facilmente esse monossacarídeo em comparação a sacarose, dissacarídeo encontrado em maior quantidade no melaço sem tratamento (RANGEL, ANDERSON, ROBERTS, 2006).

Na análise da taxa de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$), as concentrações 2% e 4% apresentaram os melhores resultados, atingindo valores de 0,26 g/g e 0,28 g/g, respectivamente (Figura 4). Esses valores não apresentaram diferença significativa utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$). Por outro lado as diluições 6% e 10% apresentaram os menores valores (0,15 g/g) de rendimento.

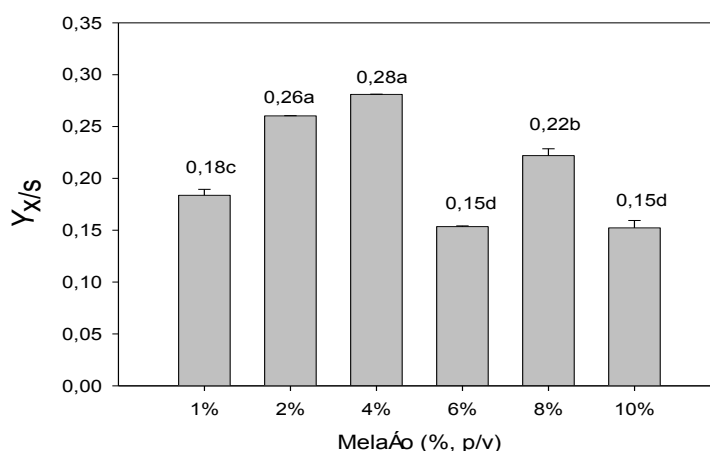


Figura 4 – Efeito da concentração de melaço na produção de biomassa pela *C. utilis* em fermentação submersa durante 48 h de cultivo. O parâmetro cinético da taxa de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) foi avaliado a partir da correlação significativa do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Sendo assim, pode-se concluir que a melhor condição para produção da biomassa por *C. utilis* foi na concentração de 2% de melaço, considerando que a concentração residual de açúcar foi semelhante ao observado na condição de 1% e menor que nas concentrações de 4%, 6%, 8% e 10%. Além disso, a taxa de conversão de substrato em biomassa não apresentou diferença significativa entre 2% e 4%.

3.4. Cultivo da *C. utilis* em biorreator

No escalonamento da produção de biomassa, a espécie foi cultivada em biorreator, em meio constituído de resíduo de camarão nas condições 1:4 de diluição em 3 horas de processamento, com adição de melaço na concentração de 2% (p/v) como fonte de carbono em cultivo submerso.

Nessa condição de cultivo, foi possível observar através de microscopia óptica que a *C. utilis* se apresentava formando complexos celulares por ocorrer forças de atração entre as células, facilitando com isso o processo de floculação no caldo fermentado. Este fato pode ser útil no processo de decantação por ocorrer uma rápida sedimentação das células no fundo dos biorreatores, contribuindo na recuperação dessa levedura após os processos fermentativos (NAHVI, EMTIAZI, ALKABI, 2002). Paterson e Melo (1993) reforçam a importância da floculação, demonstrando que no processo de recuperação de leveduras em escala industrial, antes de serem centrifugadas, geralmente são armazenadas em tanques de decantação, podendo reduzir consideravelmente dessa forma os custos de produção.

O resíduo de camarão hidrolisado usado como fonte de nitrogênio e o melaço como fonte alternativa de carbono foram testados na batelada em biorreator para produção de proteína pela biomassa. Na escala experimental, com volume de trabalho de 1 L, a *C. utilis* cultivada em biorreator apresentou maior concentração em 48 h com 9,9 g/L de células ao final do processo, consumindo aproximadamente 75% da concentração inicial de açúcares presentes no melaço (Figura 5).

Na produção de biomassa com volume de trabalho de 4 L em biorreator, a *C. utilis* obteve em 48 h de cultivo uma concentração celular máxima de 6,06 g/L, consumindo 72,5% da concentração inicial de açúcares presente no meio (Figura 5).

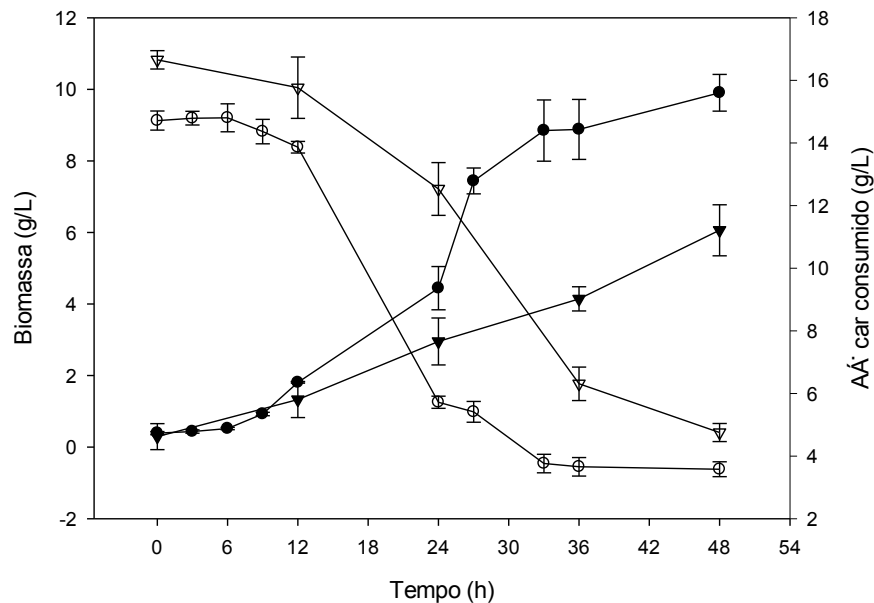


Figura 5 – Cultivo da *C. utilis* em biorreator com volume de trabalho de 1 L (círculos) e 4 L (triângulos). Os valores das médias de crescimento da levedura (símbolos em preto) e do consumo de açúcares redutores (símbolos em branco) durante 48 horas de fermentação foram calculados com base nos experimentos realizados em triplicatas.

Na Tabela 2 é possível observar que os resultados cinéticos da fermentação no cultivo de 4 L foram inferiores aos obtidos no volume de trabalho de 1 L, utilizando a mesma taxa de aeração (1 vvm) e agitação (150 rpm). Esse fato é devido a limitação na transferência de oxigênio dissolvido, que segundo Pirt (1975) leva os microrganismos a não assimilarem de forma eficiente os nutrientes presentes no meio; como consequência tem-se um baixo rendimento na produção de biomassa.

Tabela 2 – Análise comparativa dos resultados do crescimento da *Candida utilis* nos volumes de trabalho investigados.

Volume de trabalho (L)	X (g/L)	μ_{max}	Consumo de açúcar (%)	$Y_{x/s}$	Q_x
1	9,90	0,20	75,0	0,80	0,53
4	6,06	0,16	72,5	0,50	0,12

Nota: Os experimentos nessas condições foram realizados em triplicata.

O K_La , coeficiente de transferência de oxigênio, resultante da combinação dos parâmetros de agitação e aeração pode ter sido inadequado para produção de biomassa da *C. utilis* em biorreator com volume de trabalho de 4 L. Tal comportamento já foi descrito para *Candida guilliermondii* cultivada em resíduo do processamento de arroz (MUSSATTO, ROBERTO, 2004; ROBERTO, MANCILHA, SATO, 1999).

Tais fatores contribuíram para a taxa de crescimento máxima de 0,16 em biorreator com volume de trabalho de 4 L comparado a $\mu_{\max}$ 0,20 h⁻¹ em 1 L. Conseqüentemente foram observados valores de rendimento e produtividade mais baixos quando a *C. utilis* foi cultivada em maior volume de meio (Tabela 2).

Em se tratando do consumo de açúcares presentes no meio de cultura (resíduo de camarão hidrolisado e melaço), os volumes de 1 L e 4 L apresentaram valores semelhantes em relação a quantidade consumida, sendo de 75% e 72,5%, respectivamente, das concentrações de açúcares presentes no início da batelada.

Valores de rendimento ($Y_{x/s}$ = 0,80 g/g) e produtividade (Q_x = 0,53 g/L h) obtidos em biorretor de 1 L foram maiores do que descritos por Lee e Kim (2001) em fermentação batelada utilizando melaço processado como fonte de carbono adicionado de uréia e ácido fosfórico para o crescimento da *C. utilis*. Os autores obtiveram valores de 0,67 g/g e 0,24 g/L h, respectivamente. Já a taxa de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) conforme Ferrer *et al.* (1996) utilizando resíduo de camarão como meio de cultivo para a *S. cerevisiae* apresentou o valor máximo de 0,58 g/g. Produção de *single cell protein*, a partir de *C. utilis* em meio contendo resíduos de arroz também apresentou rendimento inferior com valor de 0,65 g/g utilizando fermentador de 14 L, sob agitação de 300-400 rpm, taxa de aeração 1 vvm e temperatura constante de 35 °C (RAJOKA *et al.* 2006).

3.6. Composição nutricional da biomassa

Nas análises físico-químicas da biomassa seca foi observado que esse produto fermentado possui alto valor nutricional, sendo composto por substâncias voláteis, proteínas, cinzas, lipídeos, carboidratos, energia e sais minerais (Tabela 3).

Tabela 3 – Composição nutricional da *Candida utilis* seca obtida em meio contendo resíduo de camarão hidrolisado e melaço.

Componentes	Valores*
Umidade e substâncias voláteis (g/100g)	10,96
Proteínas (g/100g)	61,60
Cinzas (g/100g)	10,81
Lipídeos (g/100g)	0,63
Carboidratos (g/100g)	16,00
Energia metabolizável (Kcal/100g)	316,09
Cálcio (mg/100g)	1.080,46
Sódio (mg/100g)	513,15
Potássio (mg/100g)	329,66
Fósforo (mg/100g)	106,08
Ferro (mg/100g)	24,51

*Determinações realizadas no Laboratório de experimentação e análises de alimentos da Universidade Federal de Pernambuco

A concentração de proteína unicelular (61,60%) foi significativamente maior quando comparado com 48% pela *Hansenula* sp. cultivada em melaço (SHOJAOSASADATI *et al.* 1999), 30,4% no crescimento do *Aspergillus niger* (SINGH *et al.*, 1991) e 26% cultivando *C. utilis* em resíduo de óleo de salada (ZHENG, YANG, YANG, 2005).

Em se tratando do valor calórico, a biomassa seca apresentou um valor maior (316,09 kcal/100g) quando comparado com o trabalho de Rajoka *et al.* (2006) cujo valor foi de 297,17 kcal/100g. No referido trabalho, os autores ressaltam ainda que a produção de *single cell protein* possui potencial como fonte alternativa de energia, além da protéica. Sucupira *et al.* (2007) reportaram uma energia metabolizável de 290 kcal/100g utilizando levedura como suplemento alimentar animal.

O conteúdo de lipídeo obtido ao final do cultivo da *C. utilis* em resíduo de camarão (0,63%) foi significativamente menor em relação a alguns trabalhos. Grangeiro *et al.* (2001) mostraram um teor médio de lipídeo na levedura *S. cerevisiae* de 4,63%, enquanto Almeida *et al.* (2005) demonstraram um teor de 9,57% para essa mesma espécie.

Os sais minerais presentes na *C. utilis* fermentada se apresentam, em termos percentuais, semelhantes aos da literatura, variando em alguns trabalhos como demonstrado por Maia *et al.* (2001) na composição de levedura seca (*S. cerevisiae*) de cana-de-açúcar, no qual as quantidades de cálcio e sódio presente foram de 0,36% e 0,01%, respectivamente.

4. CONCLUSÕES

Os resíduos da carcinicultura e da cultura sucroalcooleira investigados nesse trabalho como fontes alternativas de nitrogênio e carbono, respectivamente, mostraram viabilidade na produção de *single cell protein* a partir da *C. utilis*. Por outro lado, a *S. cerevisiae* não se adaptou a nenhuma das condições de trabalho investigada utilizando apenas o resíduo de camarão hidrolisado.

O $K_L a$ é um parâmetro importante quando relacionado ao escalonamento na produção de biomassa, sendo provavelmente o fator responsável pela diminuição da produtividade no cultivo submerso em biorreator com volume de trabalho 4 L em relação ao de 1 L.

O presente trabalho mostrou que a utilização desses resíduos agroindustriais (resíduo de camarão hidrolisado e melaço), como substratos baratos, possibilita a substituição de meios de cultura rico em nutriente de alto custo. Além disso, a *C. utilis*, que demonstrou potencial no processo de floculação como proposta para o reaproveitamento da levedura em processos industriais, apresentou resultados significativos quanto a possibilidade na suplementação alimentar animal por apresentar uma composição nutricional de alto valor agregado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. B. O. *et al.* Use of Yeast from Tropical Fruits Wines in Human Feeding. **Braz. J. Food Technol.**, 5º SIPAL, 2005, p. 65-69.
- ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, 2000, p. 459–479.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC, 2007. Disponível em: <http://www.abccam.com.br/>. Acessado em: agosto de 2006.
- BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia-do-nilo. **Pesq. agropec. bras.**, v. 36, 2001, p. 549-556.
- FERRER, J. *et al.* Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 57, 1996, p. 55-60.
- GILDBERG, A.; STENBERG E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. **Process Biochemistry**. v. 36, 2001, p. 809–812.
- GRANGEIRO *et al.* Inclusion of Sugar Cane Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in Broiler Chickens Diets. **Rev. bras. zootec.**, v. 30, 2001, p. 766-773.
- KAYALI, H. A.; TARHAN, L.; SORAN, H. Variations of alcohol dehydrogenase activity and fermentative pyruvate, ethanol production of *F. equiseti* and *F. acuminatum* depend on the yeast extract and urea concentrations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, 2005, p. 706–711.
- LAGHMARI, H.; EL MARRAKCHI, A. Organoleptic and physical-chemical assessment of shrimp *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) stored in ice at ambient temperature. **Revue Méd. Vét.**, v. 156, 2005, p. 221-226.
- LEE, B.-K.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, 2001, p. 111-124.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. v. 1, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1992, p. 254-285.
- LIM, E. H.; LAM, T. J.; DING, J. L. Single-cell protein diet of a novel recombinant vitellogenin yeast enhances growth and survival of first-feeding tilapia (*Oreochromis mossamicus*) larvae. **The Journal of Nutrition**, 2005, p. 513-518.
- MAIA, G. A. R. *et al.* Desempenho de Poedeiras Comerciais Alimentadas com Levedura Seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de Cana-de-Açúcar. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 3, 2001, p.163-171
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, 1959, p. 426-428.

MIZANI, M.; AMINLARI, M.; KHODABANDEH, M. An effective for producing a nutritive protein extract power from shrimp-head waste. **Food Sci. Tech. Int.** v. 11, 2005, p. 49-54.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate. **Process Biochemistry**, v. 39, 2004, p. 1433–1439.

NAHVI, I.; EMTIAZI, G.; ALKABI, L. Isolation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, 2002, p. 481 – 486.

PATERSON, M.; MELO, F. A. D. Processos de produção de proteínas a partir da propagação de leveduras. **Imprensa Universitária da UFRPE**, nº 3, 1993, 46 p.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H., MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **J. Technol. Manag. Innov.** v. 2, 2007, p. 118-127.

PIRT, S. J. Principles of Microbe an Cell Cultivation. **Blackwell Scientific Publication**, Oxford, 1975.

RAJOKA, M. I. *et al.* Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. **Bioresource Technology**, v. 97, 2006, 1934–1941.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, 2006, p. 127–134.

ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Influence of K_La on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Eng.** 1999;21:505–8.

RODRIGUES, R. S.; KOETZ, P. R. Remoção de nitrogênio de efluente da indústria de arroz parboilizado por incorporação em biomassa celular de *Candida utilis* - IZ-1840. **Rev. Bras. de Agrociência**, v.2, 1996, p. 141-146.

RUTTANAPORNVAREESAKUL, Y. *et al.* Concentration-dependent suppressive effect of shrimp head protein hydrolysate on dehydration-induced denaturation of lizardfish myofibrils. **Bioresource Technology**, v. 97, 2006, p. 762–769.

SALEEM, M. *et al.* Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation. **Biotechnology Advances**, v. 26, 2008, p. 151–161.

SAMOCHA, T. M. *et al.* Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. **Aquacultural Engineering**, (2006).

SHANG, F. *et al.* Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 122, 2006, p. 285–292.

SHOJAOSADATI, S. A. *et al.* Bioconversion of molasses stillage to protein as an economic treatment of this effluent. **Resources, conservation and recycling**, v. 27, 1999, p. 125-138.

SINGH, A. *et al.* Single cell protein production by *Aspergillus niger* and its evaluation. **Zentralbl Mikrobiol.** v. 146, 1991, p. 181–184.

SUCUPIRA, F. S. *et al.* Performance of laying quails fed diets containing sugar cane yeast. **Ciência Rural**, v. 37, 2007, p. 528-532.

TAILLANDIER, P. *et al.*, Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. **Food Microbiology**, v. 24, 2007, p. 95–100.

VERDUYN, C. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **J. Gen. Microbiol.** v. 59, 1990, p. 49-63.

ZHENG, Y.-G.; CHEN, X.-L.; WANG, Z. Microbial biomass production from rice straw hydrolysate in airlift bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 118, 2005, p. 413–420.

ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. **Bioresource Technology**, v. 96, 2005, p. 1183–1187.

ANEXO 1

Resultado adicional:

A *C. utilis*, espécie de levedura que melhor cresceu no resíduo de camarão hidrolisado, foi repicada e mantida em placa de Petri contendo meio sólido constituído de resíduo de camarão nas condições 1:4 de diluição em 3 horas de processamento (Figura 1).



Figura 1 - *Candida utilis* repicada em meio sólido constituído de resíduo de camarão hidrolisado.

ANEXO 2

Com os resultados do presente trabalho foi produzido uma publicação em Congresso relacionada à área de Biotecnologia.

- XXXVI Reunião Anual em conjunto com a X Conferência da IUBMB, Salvador, Bahia, no período de 21 a 25 de maio de 2007.

