

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Trichosporon sp.*: FERMENTAÇÃO EM MANIPUEIRA UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE NITROGÉNIO

MARECI M. ALMEIDA *
CARLA C. KANUNFRE **
CÁSSIO L. KIRCHNER *
GILVAN WOSIACKI *

A quantidade e a qualidade dos resíduos do processamento de mandioca tem sido motivo de experimentos, visando agregar valores aos subprodutos para aplicação no setor agro-industrial. Neste trabalho foram investigados processos de formação de biomassa de *Trichosporon sp* em manipueira, suplementada ou não com nitrogênio. Foi observado que esta suplementação beneficia o processo de formação de biomassa, que pode atingir o nível de 22,00 g/L, o qual comparado ao processo controle representa aumento de 138%. O sulfato de amônio apresentou-se como a melhor fonte de nitrogênio, em todos os aspectos. A razão entre carbono e nitrogênio de 5,15 mostrou-se adequada para aumentar a produção de biomassa e para diminuir o teor do açúcar residual. Os teores de nitrogênio no meio mostraram-se correlacionados aos teores de proteínas na biomassa. O tratamento térmico do substrato mostrou-se interessante para a produção de biomassa de melhor qualidade, mas não é adequado quando se considera apenas o consumo de açúcar.

1 INTRODUÇÃO

Na produção da farinha de mandioca é obtido, como consequência da prensagem das raízes raladas, um resíduo líquido denominado manipueira, também conhecido como água de prensa (TAKAHASHI, 1987). Os volumes de manipueira gerados nas unidades processadoras de mandioca correspondem, em média, a 2,62 m³ por tonelada de raízes na produção de farinha e a 3,68 m³ por toneladas de raízes na extração da fécula (CEREDA, 1994).

* Departamento de Zootecnia e Tecnologia de Alimentos, Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR.

** Departamento de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR.

A manipueira, que apresenta aspecto leitoso, é considerada como resíduo de elevado potencial poluidor em função do amido em suspensão presente em sua composição (ANRAIN, 1983). Além disso, apresenta o agravante de conter compostos tóxicos cianogênicos, provenientes da mandioca processada (CEREDA, 1994; HESS, 1962; LAMO e MENEZES, 1979; OKE, 1969). A disposição deste resíduo portanto, somente pode ser feita após tratamento adequado a fim de diminuir danos ao meio ambiente. Tentativas de agregar algum valor econômico a este resíduo já foram feitas, podendo-se citar seu uso como nematicida (PONTE et al., 1979; SENA e PONTE, 1982), fertilizante e herbicida (FIORETTTO, 1994; PONTE, 1994), ou mesmo como substrato para crescimento de microrganismos (CEREDA, 1994; KENNEDY et al.; 1987; WOSIACKI et al., 1994).

Dentre os microrganismos estudados para produção de biomassa protéica e oleaginosa, cepas de levedura do gênero *Trichosporon* isoladas da própria manipueira estão entre os que tiveram boa adaptação neste líquido residual, pois apresentam via respiratória alternativa ao cianeto (CEREDA et al., 1981; BRASIL et al., 1982).

Estudos para avaliar o crescimento deste microrganismo em meio sintético semelhante à manipueira para verificar suas exigências nutricionais básicas e melhor sistema de cultivo já foram realizados (EFING, 1991; FIORETTTO, 1987; SICHIERI, 1986; WOSIACKI et al., 1995). Entretanto, há necessidade de se averiguar qual o comportamento do *Trichosporon sp* na própria manipueira, determinando os nutrientes a serem suplementados para melhor desenvolvimento na produção de biomassa protéica ou oleaginosa, assim como sua capacidade de competição frente à microbiota ambiental. Estes conhecimentos podem vir a contribuir como subsídios para a definição da tecnologia de transformação do resíduo industrial, de custo negativo em subproduto comercial, com valor agregado.

O presente trabalho apresenta os resultados de experimentos efetuados visando identificar a influência de tratamento térmico da manipueira, a razão carbono/nitrogênio, a qualidade de fonte de nitrogênio na produção de biomassa microbiana e a diminuição dos teores de carboidratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

• Microrganismo

O agente de processo fermentativo foi isolado da água de prensagem de mandioca, tipificado como levedura do gênero *Trichosporon sp*, e mantido em estoque, em manipueira agarizada a temperatura de 8 °C, como cultura pura (LÖDDER, 1970). A manipueira, coletada durante a prensagem da massa ralada da mandioca foi utilizada como meio de cultura para o desenvolvimento dos experimentos. Após o processo de decantação do

amido e da retirada de impurezas sólidas, a manipurira foi armazenada a -18 °C.

- **Preparo do inóculo e condições de cultivo**

As células do microrganismo foram adaptadas ao meio líquido de cultura por incubação a 20 °C por 24 horas, a partir da cultura armazenada em ágar inclinado. Os meios de cultura esterilizados (121 °C; 1 atm; 20 minutos) receberam inóculo na proporção de 1% (v/v), sendo mantidos em estufa estabilizada a 20 °C, sem agitação.

- **Procedimentos analíticos**

A biomassa foi retirada do meio de cultura por filtração para a determinação do peso do micélio seco. No meio de cultivo, os teores de açúcares totais, redutores e de glucose foram determinados pelos métodos do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), Somogyi-Nelson (PLUMMER, 1981) e da glucose oxidase (DAHLQVIST, 1961), tendo os resultados sido expressos como glucose, em g/100 mL. O teor de nitrogênio no meio de cultivo foi determinado pelo método tradicional de Kjedahl (IAL, 1976). Como parâmetro de avaliação do desempenho do microrganismo foi utilizado indicador definido pela razão entre o peso seco da biomassa produzida e o teor de açúcar residual (EFING, 1991). Outros parâmetros foram também monitorados, como o pH, o consumo real de açúcar, o percentual de açúcar consumido e a quantidade de biomassa produzida por grama de açúcar, ou conversão.

- **Avaliação microbiológica**

Realizou-se a contagem do número de células após cultivo em *Plate Count Agar* (PCA), com pH ajustado para 6,5.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de aproveitar os resíduo industrial como meio de cultura para produção de biomassa foram realizados experimentos averiguando a influência de tratamentos térmicos na manipueira e da quantidade e qualidade de fontes de nitrogênio no crescimento de *Trichosporon sp* e na diminuição dos teores de carboidratos residuais.

• Tratamento térmico da manipueira

Com a intenção de estabelecer condições adequadas para o desenvolvimento de processos fermentativos controlados, produtivos e padronizados com o microrganismo em estudo, investigou-se a influência de tratamentos térmicos sobre a numerosa e diversificada microbiota da manipueira (Tabela 1). Estes tratamentos foram planejados levando-se em consideração as temperaturas de empastamento do amido e buscando-se o estabelecimento de processamento mínimo em termos de simplicidade e custos. Os teores de carboidratos na manipueira foram de 32,0 g/L (totais), 22,00 g/L (redutores) e 11,3 g/L (glucose).

TABELA 1 - INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO DA MANIPUEIRA SOBRE O PROCESSO FERMENTATIVO

Tratamento tempo versus temperatura	Biomassa g/L	Açúcar			Conversão	Indicador	pH final
		Residual g/L	Consumido g/L	Consumo %			
None	9,23	1,00	31,00	96,88	0,30	9,23	8,25
60 °C/30 min	6,58	6,95	25,05	78,28	0,26	0,95	4,46
70 °C/30 min	6,07	11,50	20,50	64,06	0,30	0,53	4,16
Estéril	10,64	13,87	18,13	56,66	0,59	0,77	7,49
Média	8,13	8,33	23,67	73,97	0,36	0,87	6,09
Desvio	2,17	5,67	5,67	17,71	0,15	4,24	2,08
Variação %	26,69	68,07	23,95	23,94	41,67	>100	34,15

No início do experimento, o número total de células viáveis - unidades formadoras de colônias (UFC) - em todos os ensaios foi de cerca de $1,7 \times 10^6$ células por mL. Esta situação evidencia que o resíduo industrial usado como meio de cultura apresentou carga microbiana menor do que a citada na literatura. CEREDA et al. (1981) isolaram doze tipos de microrganismos morfológicamente diferentes e determinaram número de células viáveis da ordem de $2,91 \times 10^8$ por mL. O tratamento térmico mais brando, de 60 °C durante 30 minutos, acarretou diminuição de aproximadamente 99% das células viáveis ($1,68 \times 10^4$ de UFC). Em tempo menor (15 min) e em pH mais baixo (4,5), a contagem foi de $1,29 \times 10^5$ células por mL, o que corresponde a diminuição de apenas 7,63% no número de células viáveis inicial. Os tratamentos térmicos seguintes mostraram-se eficientes para propiciar ao meio de cultura esterilização comercial.

A produção de biomassa foi de 8,13 ($\pm 2,17$ g/L), demonstrando variação elevada e indicando que o tratamento térmico influencia, de alguma forma, o crescimento do microrganismo. O valor elevado do ensaio controle pode ser explicado pela carga microbiana inicial, e o valor encontrado no ensaio estéril sugere que a cultura de *Trichosporon sp* utilizada teve seu crescimento inibido na presença da microbiota natural da manipueira. Com a realização de tratamentos térmicos mais eficientes, a biomassa atinge o nível esperado, ou seja, em torno de 10 g/L (EFING, 1991).

O nível de açúcar residual elevou-se na medida em que o tratamento térmico foi mais drástico, indicando que os microrganismos inviabilizados foram responsáveis pela diminuição do teor de carboidratos. No ensaio controle, o teor de açúcar residual (de 1,00 g/L) correspondeu ao consumo efetivo de 96,88%, indicando a capacidade da microbiota em fermentar glucose, dextrinas e amido. O teor de açúcares redutores residuais (0,04 g/L) indicou consumo de 99,86% e o de glucose, não detectado pelo método da glucose oxidase, evidenciou consumo de 100%. No ensaio realizado com meio de cultura previamente esterilizado, o consumo máximo observado (56,66%) mostrou-se coerente com os dados disponíveis na literatura (EFING, 1991). Os valores encontrados para a conversão indicaram produção média de biomassa de 0,36 g ($\pm 0,15$) por grama de açúcar consumido. O indicador do processo fermentativo, neste caso, revelou que o consumo de açúcar foi muito elevado no ensaio controle, além da apresentação de biomassa atípica. Os demais ensaios apresentaram valores próximos aos já encontrados em outros relatos, com a biomassa característica de *Trichosporon sp*, o que se justifica pelo elevado número de células contaminantes.

Tratar termicamente, ou não, a manipueira, depende do objetivo desejado. Para o uso do resíduo como substrato em processos fermentativos, com a intenção de se obter biomassa microbiana, o tratamento térmico se impõe, principalmente em função da necessidade de pureza e qualidade da biomassa. No entanto, quando se pretende tratamento puro e simples do resíduo, outras medidas podem ser adotadas. Para evitar a interferência de outros microrganismos utilizou-se neste experimento, a manipueira esterilizada.

• Estudo cinético em manipueira esterilizada

A manipueira, após esterilização, apresentou pH 4,7 e teores de açúcar total, redutores e glucose de 3,10 g%, 2,60 g% e 1,13 g%, respectivamente. Os resultados obtidos quanto a produção de biomassa, teor de açúcar residual e quantidade de açúcar consumido estão apresentados na Tabela 2.

O microrganismo apresentou formação de micélio na superfície a partir de 24 horas e aspecto característico após 48 horas de fermentação. A produção de biomassa apresentou-se praticamente estável no período após 144 horas de cultivo, com valor médio de 8,59 (\pm 2,96 g/L). Esta produção revela que o processo fermentativo com manipueira esterilizada é semelhante àquele conduzido em meios de composição definida contendo dextrinas e glucose (EFING, 1991), com valores da ordem de 10 g/L.

TABELA 2 – FERMENTAÇÃO EM MANIPUEIRA ESTÉRIL

Tempo horas	Biomassa g/L	Açúcar			Conversão	Indicador	pH
		Residual g/L	Consumido g/L	Consumo %			
0	0,01	31,00	0,01	0,01	0,01	0,01	5,50
48	6,85	24,20	6,80	21,94	1,01	0,28	5,25
96	8,28	20,70	10,30	43,23	0,80	0,40	5,46
120	8,70	18,50	12,50	40,32	0,70	0,47	5,59
144	9,67	18,00	13,00	41,94	0,75	0,54	5,91
168	9,00	15,30	15,70	50,65	0,57	0,59	5,80
192	10,17	15,60	15,40	49,68	0,66	0,65	6,81
216	9,75	13,80	17,20	55,49	0,57	0,71	6,87
240	9,72	13,80	17,20	55,49	0,57	0,70	7,07
264	9,60	13,70	17,30	55,81	0,55	0,70	7,14
288	12,00	16,00	15,00	48,36	0,80	0,75	7,31
312	9,40	14,10	16,90	54,52	0,55	0,66	6,50
Média	8,59	17,89	13,11	43,12	0,63	0,54	6,27
Desvio	2,96	5,23	5,23	16,63	0,24	0,22	0,73
Variação %	34,45	39,23	39,89	38,57	38,09	40,74	11,55

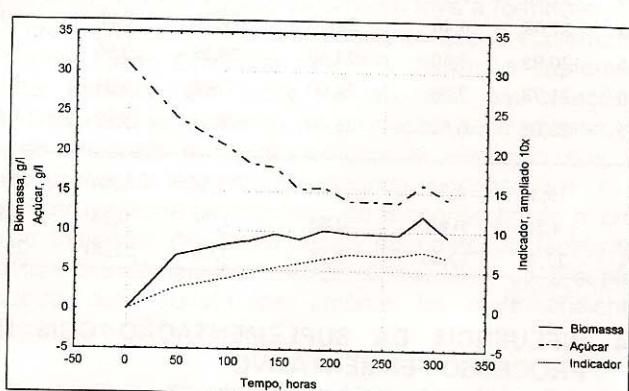
O açúcar residual diminuiu sensivelmente nos primeiros 5 dias, quando atingiu valores médios de 15 g/L, mantendo-se estável até o término do experimento. O consumo de açúcares, da ordem de 50%, pode ser explicado pela existência de dextrinas no meio de cultura inicial. A conversão de açúcar em biomassa foi de 0,63 (demonstrando variação relativamente alta de 38,09%). O indicador do processo, semelhantemente, apresentou valores típicos, da ordem de 0,54, mas com patamar estável em torno de 0,70 (EFING, 1991).

Os valores de pH da manipueira elevaram-se gradativamente no decorrer da fermentação, passando de 4,7 no início, para 7,3 ao final do experimento. A cor do meio de cultura apresentou alterações à medida que o pH se elevou. Após 168 horas, quando o pH estava em torno de 5,8, houve escurecimento do meio de cultivo, indicando sensibilidade dos pigmentos contidos no líquido em relação ao pH e a possibilidade de acompanhamento do processo por meio visual. FERNANDES JR. e

TAKAHASHI (1994), em relação ao tratamento aeróbio da manipueira, observaram que as alterações da cor do líquido (branco-amarelado para marrom-acinzentado) estavam associadas a variações de pH e que estas ocorrem quando o pH se aproxima da neutralidade. Verificou-se que nas primeiras 48 horas de fermentação houve rápida diminuição dos ácidos equivalente a 62% da acidez titulável inicial, sugerindo que o microrganismo estaria utilizando ácidos orgânicos presentes no meio de cultivo, o que pode estar associado com a elevação do pH.

O processo fermentativo está ilustrado na Figura 1, tendo sido levado em consideração os valores concernentes à produção de biomassa, teores residuais de açúcar e o indicador.

FIGURA 1 - ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE DA MANIPUEIRA POR *Trichosporon sp*



- Influência da relação carbono/nitrogênio - C/N no processo fermentativo**

A adição de nitrogênio ou a correção dos seus teores nos meios de fermentação são necessários para melhorar a produtividade dos processos fermentativos ou para suprir as exigências nutricionais dos microrganismos, quando o objetivo é a produção de biomassa protéica. A manipueira utilizada para o cultivo continha teor inicial de nitrogênio de 0,6 g/L tendo sido suplementada com sulfato de amônio ou uréia, como fontes de nitrogênio. A fonte de carbono utilizada foi a composição natural de carboidratos da manipueira, que correspondeu a 31,0 g/L. Para o ensaio controle (sem suplementação) utilizou-se a composição própria da manipueira, tendo sido determinado como valor intrínseco 24,1 (~24C : 1N). O processo fermentativo foi conduzido por 240 horas.

Nas Tabelas 3 e 4 estão apresentados as variáveis de entrada e de saída dos ensaios efetuados com relação à suplementação com sulfato de amônia e com uréia.

O primeiro ensaio (Tabelas 3 e 4) com variáveis de entrada C/N e teor de nitrogênio intrínsecas à maniqueira, sem qualquer complementação, propiciou o estabelecimento dos valores referenciais do processo fermentativo.

TABELA 3 - INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIA NO PROCESSO FERMENTATIVO

Razão C/N	Nº total g/L	Biomassa g/L	Açúcar			Conversão	Indicador	pH final
			Residual g/L	Consumido g/L	Consumo %			
24,1	0,6	9,40	8,80	22,20	71,61	0,42	1,07	5,44
14,1	1,0	18,12	7,10	23,90	77,10	0,76	2,55	8,04
9,6	1,5	21,08	6,40	24,60	79,36	0,86	3,29	8,04
7,2	2,0	22,08	6,40	24,60	79,36	0,86	3,45	5,76
5,8	2,5	20,95	6,40	24,60	79,36	0,90	3,27	5,00
4,8	3,0	21,78	7,00	24,00	7742	0,91	3,11	4,65
4,1	3,5	22,05	6,60	24,40	78,71	0,90	3,34	4,46
Média		19,35	6,96	24,04	77,56	0,80	2,87	5,91
Desvio		4,59	0,86	0,86	2,79	0,18	0,85	1,51
Variação %		23,72	12,36	3,58	3,60	22,50	29,62	25,54

TABELA 4 - INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM URÉIA NO PROCESSO FERMENTATIVO

Razão C/N	Nº total g/L	Biomassa g/L	Açúcar			Conversão	Indicador	pH final
			Residual g/L	Consumido g/L	Consumo %			
24,1	0,6	9,43	8,80	22,20	71,61	0,42	1,07	5,44
14,1	1,0	20,37	7,80	23,00	74,20	0,89	2,61	6,74
9,6	1,5	21,00	7,70	23,30	75,17	0,90	2,77	9,05
7,2	2,0	20,92	7,90	23,10	74,52	0,91	2,65	9,48
5,8	2,5	17,40	7,90	23,00	74,20	0,76	2,20	9,50
4,8	3,0	1628	7,90	23,10	74,52	0,70	2,06	9,69
4,1	3,5	15,04	8,20	22,80	73,55	0,66	1,83	9,75
Média		17,20	8,02	22,93	73,97	0,75	2,17	8,52
Desvio		4,17	0,37	0,35	1,14	0,18	0,59	1,72
Variação %		24,24	4,61	1,53	1,54	24,00	27,19	20,19

A produção de biomassa no ensaio controle foi de 9,40 g/L. Nos ensaios suplementados com sulfato de amônio observaram-se valores mais elevados, que chegaram a 22,00 g/L (aumento de 134%). Da mesma forma foram mais elevados os valores de biomassa produzida quando suplementados com uréia, tendo atingido o valor máximo de 21,00 g/L (aumento de 123%). Os perfis de produção de biomassa nos dois experimentos são, todavia, distintos e, embora os resultados médios não sejam estatisticamente significativos, os valores encontrados nos ensaios suplementados com sulfato de amônio são mais elevados e mais estáveis.

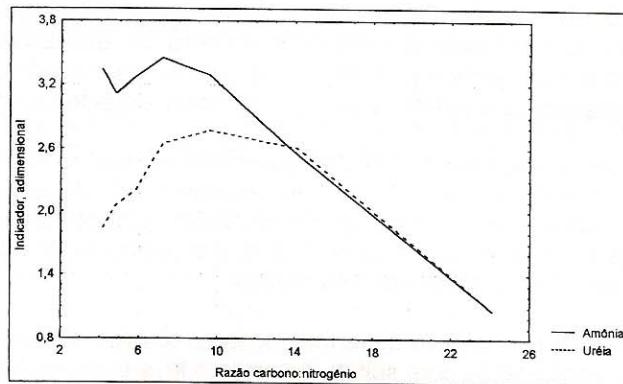
No que diz respeito aos teores de açúcares residuais, no experimento com sulfato de amônio os valores são inferiores ao do ensaio controle, enquanto que nos ensaios contendo uréia praticamente não houve diferença em relação ao controle. Assim, a suplementação com sulfato de amônio beneficia o processo fermentativo.

Os valores de pH no meio de fermentação ao término dos ensaios indicam que a suplementação com sulfato de amônio leva à formação de ambiente alcalino na faixa C/N de 14,4 a 9,6, enquanto que a suplementação com uréia, apresenta razão C/N inferior a 9,6. Assim, a suplementação de nitrogênio foi benéfica em todos os ensaios, em relação ao valor referencial. Observou-se aumento na produção de biomassa, diminuição dos açúcares residuais e consequentemente elevação dos valores de indicador do processo fermentativo, ficando evidente que as correções podem significar melhoria no processo de fermentação do microrganismo. Entretanto, o indicador de desempenho do processo fermentativo, bem como a análise dos demais parâmetros, demonstra que a suplementação da manipueira com sulfato de amônia foi mais eficiente que a suplementação com uréia (Figura 2).

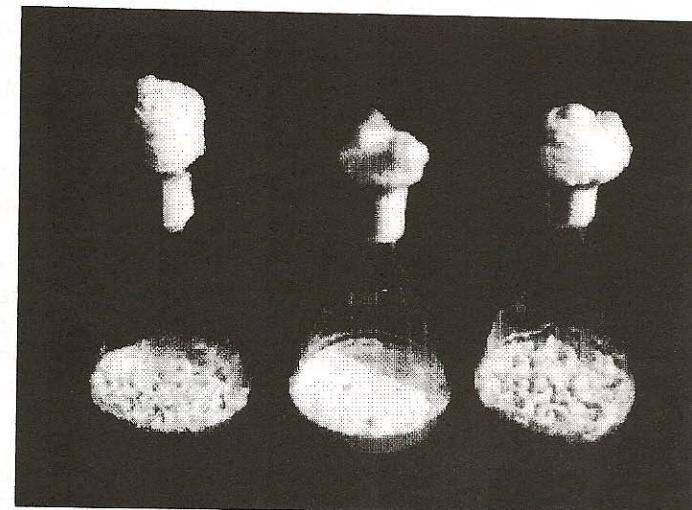
DUM (1985) refere-se ao nitrogênio como elemento essencial para o crescimento, multiplicação e manutenção metabólica vital, tendo estabelecido como exigência mínima o teor de 0,14 g/L de nitrogênio disponível no meio. Apesar da manipueira utilizada apresentar maior teor de nitrogênio (0,6 g/L), considerado suficiente para manter a vida microbiana, seu enriquecimento com nitrogênio mostrou-se como uma das formas de melhorar o cultivo do *Trichosporon sp* na fermentação em superfície, sendo o sulfato de amônio a fonte de nitrogênio que melhor se presta para a operação de correção.

A Fotografia 1 ilustra o comportamento da produção de biomassa em meio contendo adição de uréia e de sulfato de amônio, em comparação com o controle, sem adição.

FIGURA 2 - INFLUÊNCIA DA RAZÃO C/N SOBRE O INDICADOR DO PROCESSO FERMENTATIVO COM SULFATO DE AMÔNIO E URÉIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO



FOTOGRAFIA 1 – ILUSTRAÇÃO DOS ENSAIOS COM URÉIA (ESQUERDA), SEM SUPLEMENTAÇÃO (CENTRO) E COM SULFATO DE AMÔNIO, APÓS 72 HORAS



A necessidade de suplementação da manipueira com sulfato de amônio (0,15%) visando a produção de biomassa foi relatada por BALAGOPAL et al. (1977), quando cultivaram levedura do gênero *Candida*, e a taxa de produção de biomassa com o efluente suplementado foi maior que a do

meio não suplementado. A melhor razão C/N encontrada para o desenvolvimento de *Trichosporon sp* em manipueira suplementada foi de 7,2 sendo que EFING (1991), buscando otimização do processo de produção de biomassa de *Trichosporon sp* em meio sintético, semelhante a manipueira, determinou a relação C/N em torno de 4,0 como a mais adequada para o crescimento do microrganismo.

- Influência da suplementação de sulfato de amônio na fermentação de manipueira**

Este experimento foi conduzido com manipueira estéril suplementada com sulfato de amônio, apresentando teor de nitrogênio total igual a 2 g/L e relação C/N igual a 7,2. A produção de biomassa microbiana em manipueira suplementada com sulfato de amônio (Tabela 5) foi maior do que aquela observada no experimento sem suplementação (Tabela 2), tendo havido, em termos médios, aumento de 58,20%. É possível observar que neste experimento a fase estacionária é atingida em 48 horas, com valores estáveis em torno de 16 g/L. Sem suplementação isto ocorre praticamente após 144 horas, com valores instáveis próximos a 10 g/L.

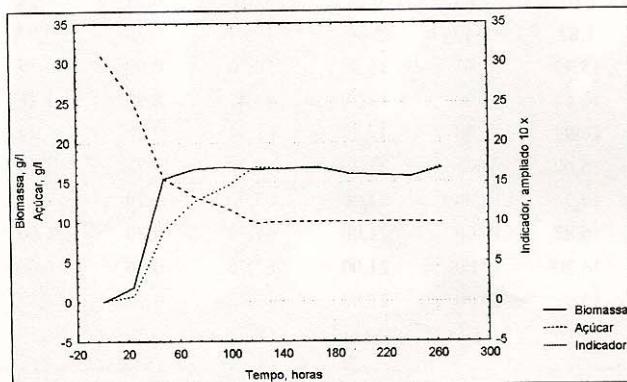
TABELA 5 - FERMENTAÇÃO EM MANIPUEIRA ESTÉRIL COM SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

Tempo horas	Biomassa g/L	Açúcar			Conversão	Indicador	pH
		Residual g/L	Consumido g/L	Consumo %			
0	0,01	31,00	0,01	0,01	0,01	0,01	5,00
24	1,82	25,40	5,60	18,07	0,33	0,07	4,86
48	15,41	15,50	15,50	50,00	0,99	0,86	4,55
72	16,64	13,20	14,70	47,42	0,93	1,26	4,36
96	16,94	11,80	19,20	61,94	0,88	1,44	4,65
120	16,60	9,80	21,20	68,36	0,78	1,69	5,50
144	16,73	10,00	21,00	67,75	0,79	1,67	6,60
168	16,87	10,00	21,00	67,75	0,80	1,60	6,68
192	16,20	10,00	21,00	67,75	0,76	1,60	7,00
240	15,69	10,00	21,00	67,75	0,74	1,57	7,35
264	16,80	9,89	21,11	68,07	0,79	1,57	7,35
Média	13,59	14,24	16,48	53,17	0,71	1,24	5,81
Desvio	6,30	7,24	7,26	23,41	0,29	0,64	1,19
Variação %	46,36	50,84	44,05	44,03	40,85	51,61	20,48

Em termos de aproveitamento de açúcares, todavia, as diferenças não são tão drásticas, embora significativas. Assim, como o teor de açúcar residual foi um pouco inferior (14,24 g/L, em comparação com 17,89 g/L), a quantidade consumida e o consumo percentual também apresentaram diferenças. A conversão aumentou em 13%.

O indicador do processo, até 120 horas de fermentação, apresentou variações positivas e posteriormente, mostrou-se estável com pequenas variações. Obteve-se valores ao redor de 1,60 nos ensaios com suplementação de sulfato de amônio, demonstrando melhor desempenho do *Trichosporon sp* em relação ao seu desenvolvimento em manipueira sem adição de nitrogênio (Figura 3). A relativa estabilidade dos valores de indicador caracteriza a fase estacionária do microrganismo, momento que pode ser considerado o término do processo fermentativo. Comparativamente à fermentação ocorrida em manipueira sem adição de nitrogênio foi verificado, através do peso seco da biomassa e consumo de açúcar, que houve diminuição no tempo da fase exponencial de crescimento do microrganismo, quando foi utilizado nitrogênio suplementar. Assim, foi possível verificar que o início da fase estacionária da levedura *Trichosporon sp* ocorreu entre 96 e 120 horas de incubação na manipueira (Figura 3).

FIGURA 3 - INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO EM MANIPUEIRA NO PROCESSO FERMENTATIVO COM *Trichosporon sp*



- Teor de proteína no micélio de *Trichosporon sp*

Em ensaios com o *Trichosporon sp* em manipueira enriquecida com nitrogênio foi testada a capacidade da bioconversão de nitrogênio em proteína microbiana. A variação de nitrogênio total foi da ordem de 1,35 a 4,75 g/L e o teor de açúcares totais foi de 35,4 g/L em todos os ensaios (Tabela 6).

Os resultados das análises dos teores de proteína no micélio do microrganismo indicaram elevada correlação positiva (+ 0,96) significativa em nível de 5% com os teores iniciais de nitrogênio no meio de cultura. O maior teor foi de 37,97%, obtido no ensaio com o maior teor de nitrogênio inicial. Os demais resultados foram semelhantes aos anteriores.

TABELA 6 - INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO C/N NO PROCESSO FERMENTATIVO SOBRE O TEOR PROTÉICO DA BIOMASSA

Razão C/N	Nº total g/L	Biomassa g/L	Açúcar			Conversão	Indicador	pH final
			Residual g/L	Consumido g/L	Consumo %			
14,49	1,35	10,75	1168	23.72	67.00	0.45	0.92	2.20
8,89	1,75	13,53	9.96	25.44	71.86	0.53	1.36	26.66
5,15	2,75	13,00	5.92	29.48	83.28	0.44	2.20	32.97
2,98	4,75	13,32	7.73	27.67	78.16	0.48	1.72	37.97
Média		12.65	8.82	26.58	75.08	0.48	1.55	30.20
Desvio		1.29	2.52	2.52	7.13	0.04	0.54	6,57
Variação %		10.20	28.57	9.48	9.50	8.33	34.84	21.75

4 CONCLUSÃO

Tratamentos térmicos brandos são eficazes na diminuição do grau de contaminação da manipueira, possibilitando produção de biomassa de *Trichosporon sp* com maior qualidade, embora o desempenho do processo seja, em parte, prejudicado considerando-se os aspectos de aproveitamento de açúcares.

A suplementação do meio com sulfato de amônia influenciou a produção de biomassa e o consumo de açúcares, assim como aumentou a velocidade do processo de fermentação, tendo sido observado que a relação C/N de 5,15 mostrou-se como a mais promissora para o processo.

Abstract

Large amounts of cassava are processed both to obtain flour or starch, for human consumption or for industrial ends. Such process generates several wastes, solid or liquid, with peculiar characteristics, due to their starch and cyanogenic compounds. In order to contribute with some knowledge concerning to decrease the environmental impact or/and to utilize them as raw material, many scientist have been working on the subject. In this rework, microbial biomass production of *Trichosporon sp* using manipueira, the main liquid residue, as culture medium, has been studied especially to observe the influence of nitrogen supplementation. It was found that supplementation with ammonium sulfate allows to increase the biomass production up to 22.00 g/L, representing an increase of 138%, as compared with the control; indeed, this nitrogen source had better results if compared to urea. Carbon : nitrogen ratio of 5.15 was found to be the most interesting both to increase the biomass production and to reduce the residual sugar. With more nitrogen in the fermentation medium, the biomass showed more protein, and the order of correlation was significantly higher. Thermal treatment of manipueira shows a peculiar behavior considering that to produce high quality microbial biomass it is necessary to sterilize the medium and if the objective is to decrease the sugar content, the thermal treatment is no longer necessary.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANRAIN, E. Tratamento de efluente de fecularias em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA AMBIENTAL, Balneário de Camboriú, 1983. *Anais...* Balneário de Camboriú : Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente, 1983. p. 1-21.
- 2 BALAGOPAL, C., MAINI, S.B., HRISHI, N. Microbial treatment of starch factory effluents and the production of single cell protein. *J. Root Crops*, v. 3, n. 2, p. 47-50, 1977.
- 3 BRASIL, O.G., CEREDA, M.P., FIORETTO, A.M.C. Indução da respiração resistente ao cianeto em microrganismo pela presença de inibidores de crescimento microbiano. *Phyton*, Buenos Ayres, v. 42, n. 1, p. 49-53, 1982.
- 4 CEREDA, M.P. *Resíduos da Industrialização da mandioca no Brasil*. São Paulo : Paulicéia, 1994. [160] p.
- 5 CEREDA, M.P., BRASIL, O.G., FIORETTO, A.M.C. Microrganismos com respiração resistente ao cianeto isolados de líquido residual de fecularias. *Phyton*, Buenos Ayres, v. 41, n. 1/2, p. 197-201, 1981.
- 6 DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose oxidase reagent. *Biochem. J.*, London, v. 80, p. 547-551, 1961.

- 7 DUBOIS, M.C. Colorimetric methods for determination of sugars and related compounds. *Anal. Chem.*, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- 8 DUM, G.M. Nutritional requirements of microorganisms. In: BULL, A.T., DALTON, H. *Comprehensive biotechnology*. Oxford : Pergamon Press, 1985. p. 460-481.
- 9 EFING, L.M.A.C. **Biomassa de *Trichosporon sp.* determinação das condições de cultivo em meio químico de composição definida semelhante à da manipueira.** Curitiba, 1991. [50] p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Universidade Federal do Paraná.
- 10 FERNANDES JR., A., TAKAHASHI, M. Tratamento da manipueira por processo biológico: aeróbio e anaeróbio. In.: CEREDA, M.P. **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil.** São Paulo : Paulicéia, 1994. [160] p.
- 11 FIORETTTO, A.M.C. **Viabilidade de cultivo de *Trichosporon sp.* em manipueira.** São Paulo, 1987. [50] p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- 12 FIORETTTO, R.A. Uso direto da manipueira em fertirrigação. In: CEREDA, M.P. **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil.** São Paulo : Paulicéia, 1994. p. 33-149.
- 13 HESS, M.L. Tratamento de despejos de fecularia de mandioca por oxidação biológica. *Rev.D.A.E.*, São Paulo, v. 23, n. 46, p. 29-35, 1962.
- 14 INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo : IAL, 1976. 270 p.
- 15 KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S., SÁ CORREIA, I. Starch biomass: a chemical feedstock for enzyme and fermentation process. In: GALLIARD, T. **Starch: properties and potential.** New York : John Wiley, 1987. 151 p.
- 16 LAMO, P.R., MENEZES, T.J.B. Bioconversão das águas residuais do processamento de mandioca para produção de biomassa. *Col. ITAL*, Campinas, v. 10, p. 1-14, 1979.
- 17 LODDER, J. **The yeasts: a taxonomic study.** 2.ed. London : North Holland, 1970. p. 35-120, 1308-1352.

- 18 OKE, E. The role of hydrocyanic acid in nutrition. *World Rev. Nutr. Dietetics*, v. 11, p. 170-198, 1969
- 19 PLUMMER, D.T. *An introduction to practical biochemistry*. London : McGraw Hill, 1981. 369 p.
- 20 PONTE, J.J. Uso da manipueira como defensivo agrícola. In: CEREDA, M.P. *Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil: utilização e tratamento*. São Paulo : Paulicéia, 1994. 174 p.
- 21 PONTE, J.J., TORRES, J., FRANCO, A. Investigações sobre uma possível ação nematicida da manipueira. *Fitopatologia Brasileira*, v. 4, v. 2, p. 283-297, 1979.
- 22 SENA, E.S., PONTE, J.J. A manipueira no controle do Meloidoginose da cenoura. *Publ. Soc. Brasil. Nemat.*, Piracicaba, n. 6, p. 95-98, 1982.
- 23 SICHERI, V.L.F.S. *Produção e caracterização dos lipídios da biomassa de Trichosporon penicillatum*. Londrina, 1986. [50] p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina.
- 24 TAKAHASHI, M. Aproveitamento da manipueira e de resíduos do processamento da mandioca. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, n. 145, p. 69-74, 1987.
- 25 WOSIACKI, G., FIORETTTO, A.M.C., CEREDA, M.P. Utilização da manipueira para produção de biomassa oleaginosa. In: CEREDA, M.P. *Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil: utilização e tratamento*. São Paulo : Paulicéia, 1994. 174 p.
- 26 WOSIACKI, G., SICHERI, V.L.F.S., CEREDA, M.P., SILVA, R.S.F., BRUNS, R.E. Improved submerged fermentation conditions for *Trichosporon* sp. *Arq.Biol.Tecnol.*, Curitiba, v. 38, n. 2, p. 406-416, jun. 1995.