

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
E AGRÍCOLA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA UNICELULAR  
A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Carmen E. García Rojas

Orientador:  
Dr. Young K. Park  
Professor Titular da Faculdade  
de Engenharia de Alimentos e Agrícola

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e  
Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, SP (Brasil)  
para obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia  
de Alimentos.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais, Benildo e Elena

C O N T E Ú D O

página

	RESUMO	
	SUMMARY	
CAPITULO I	INTRODUÇÃO	1
CAPITULO II	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
	1. Generalidades	3
	2. Celulases	4
	3. Proteína uni-celular	7
CAPITULO III	MATERIAIS	10
	1. Bagaço de cana de açúcar	10
	2. Micro-organismo	10
	3. Equipamentos	10
	4. Equipamentos complementares	11
	5. Material de vidro	11
	6. Meios de cultura	12
	7. Reagentes	12
CAPITULO IV	MÉTODOS	13
	1. Substrato	13
	1.1 Obtenção, tratamento e ar- mazenamento do bagaço de cana de açúcar.	13
	1.2 Determinação de açúcares redutores no bagaço	13
	2. Micro-organismo	14
	2.1 Isolamento das leveduras	14
	2.2 Seleção da levedura	14

	página
2.3 Identificação	15
2.4 Determinação do tipo respiratório	16
2.5 Conservação da levedura	16
2.6 Determinação da temperatura ótima de crescimento	16
2.7 Determinação do pH ótimo para o início do crescimento	16
3. Desenvolvimento da levedura no meio bagaço-sais	17
3.1 Concentração ótima de bagaço	17
3.2 Massa celular	17
3.2.1 Espectrofotometria	17
3.2.2 Contagem direta ao microscópio	18
3.2.3 Contagem em superfície em agar malte-levedura a pH 3.5	18
3.3 Atividade celulolítica de celulase Cx	18
3.4 Medida do pH	19
3.5 Cromatografia de açúcares em camada delgada	19

	página
3.6 Massa seca	20
3.7 Nitrogênio	20
3.8 Digestibilidade do bagaço	20
4. Purificação da enzima celulase	20
CAPITULO V RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
1. Substrato	22
1.1 Determinação de açúcares redutores no bagaço	22
2. Micro-organismo	22
2.1 Identificação e determi- nação do tipo respiratório	22
2.2 Temperatura ótima de crescimento	26
2.3 pH ótimo para início do crescimento	27
3. Desenvolvimento da levedura no meio bagaço - saís	28
3.1 Concentração ótima de bagaço	28
3.2 Atividade celulolítica de celulase Cx	29
3.3 Comparação do meio bagaço 3% - saís com outros meios	30

	página
3.4 Cromatografia de açúcares	31
3.5 Massa seca e nitrogênio	31
3.6 Digestibilidade do baga- ço	33
3.7 Produtividade	34
4. Purificação da celulase	
CAPITULO VI CONCLUSÕES	35
CAPITULO VII INDICE DE FIGURAS, TABELAS E APÊNDICE	36
CAPITULO VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
AGRADECIMENTOS	

## RESUMO

Uma linhagem de Aureobasidium pullulans isolada da flor foi cultivada no bagaço de cana de açúcar pretratado. O bagaço foi aquecido em NaOH 4% a 100°C durante 15 min, lavado com água corrente e secado a 55°C. Uma solução de sais minerais foi preparada e o bagaço suspenso nela sendo a melhor proporção de bagaço igual a 3%. A levedura cultivada no meio bagaço-sais deu a máxima atividade para Carboximetilcelulose depois de 48 h e o número de células por ml igual a  $3.4 \times 10^6$ /ml depois de 72 h. A digestibilidade do bagaço foi de 23.3% e o nitrogênio (segundo Kjeldahl) das células de levedura igual a 8.16%.

### SUMMARY

A *Aureobasidium pullulans* strain isolated from a flower was cultivated in sugar cane bagasse pretreated. The bagasse was boiled in NaOH 4% at 100°C x 15 min, washed with tap water and dried at 55°C. A solution of mineral salts was prepared and the bagasse suspended in it being the best proportion 3%. The yeast cultivated in that mixture gave maximum Carboxymethylcellulose activity after 48 h and a cell number of  $3.4 \times 10^6$ /ml after 72 h. The bagasse digestibility was 23.3 % and the yeast cells nitrogen (Kjeldahl) 8.16%.



## CAPITULO I

### INTRODUÇÃO

A ingestão de microrganismos como alimento se faz há uns 60 anos, mas atualmente a idéia tem sido espalhada devido à previsão segundo as estatísticas de que dentro de alguns anos as fontes de alimentos não serão suficientes para abastecer a crescente população mundial.

Existem razões importantes para pensar nos microrganismos (leveduras, bactérias, fungos, algas) como fontes de alimentos as quais são: o seu rápido desenvolvimento, e o controle que pode-se fazer nas condições de cultura. A reprodução dos microrganismos é tão rápida que podem duplicar a massa de uma a duas horas como é o caso das leveduras e bactérias. Por outra parte, durante a cultura podem-se controlar: a concentração de substâncias nutritivas, o pH, a temperatura, a tensão de oxigênio e a concentração de células.

A maior parte da literatura, experiência e produção comercial de proteína unicelular pertence as leveduras e há vários motivos para pensar nelas devido a que durante séculos elas têm sido empregadas para preparar cerveja, fermentar vinho e fazer pão. A aceitação do cheiro e gosto das leveduras nesses alimentos permite uma fácil introdução no mercado, como alimentos por si mesmas ou como complemento de outros alimentos. Outra razão para dar ênfase às leveduras é a segurança nas técnicas de produção em grande escala adquirida através da indústria das leveduras e da indústria do álcool.

Junto com o problema da falta de alimentos no futuro, existe atualmente outro grande problema que é o acúmulo de desperdícios industriais e agrícolas os quais são renovados anualmente por fotossíntese e bio-degradados lentamente. Por isso tem-se feito trabalhos com o objetivo principal de utilizar estes resíduos que em geral são de baixo custo e transformá-los em substâncias úteis para a humanidade.

A celulose é o mais abundante resíduo da agricultura a qual pode-se degradar sob a ação de microrganismos produtores de celulase, liberando os açúcares, celobiose e glicose, facilmente aproveitáveis, para o desenvolvimento microbiano.

O bagaço da cana de açúcar representa 52% dos resíduos celulósicos da agricultura sendo por isso incluído entre o grupo de materiais de interesse para utilização na produção de proteína unicelular.

Pelas razões expostas foi feito este trabalho de pesquisa durante o qual utilizou-se o bagaço de cana de açúcar como substrato celulósico para obtenção de proteína unicelular. O microrganismo empregado foi um fungo do género *Aureobasidium* isolado duma flor em nosso Laboratório.

CAPITULO II  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA  
GENERALIDADES

Frequentemente de um terço a um meio da matéria seca das colheitas é recolhida como grão, fruta, semente ou outro produto primário. O resto da matéria seca da planta é resíduo ou produto intermediário e se deixa descompor no campo ou se acumula num dos passos posteriores ao processo da colheita. Às vezes estes resíduos se acumulam em volume considerável e constitui problema o seu desperdício.

Vários destes resíduos das colheitas têm potencial econômico e factibilidade tecnológica para ser utilizados como substratos na produção de proteína unicelular microbiana. A celulose contida nos resíduos é metabolizada pelos microorganismos e portanto, os desperdícios fibrosos, os quais contêm uma fração substancial de celulose são preferidos. Há alguns resíduos que contêm frações significativas de amido, açúcares solúveis, ácidos orgânicos e proteína, mas os seus volumes são menores comparados com os resíduos celulósicos das colheitas e eles, com frequência, podem ser aplicados para outros fins. Os desperdícios típicos a serem considerados são: as cascas e fibras dos grãos de cereais, talos e espigas de milho e produtos intermediários fibrosos como o bagaço de cana de açúcar e os desperdícios de vegetais processados.

Os resíduos celulósicos apresentam várias vantagens

como substratos para obtenção de proteína unicelular. Esses resíduos são: atóxicos, totalmente renováveis, abundantes, comuns, geralmente baratos e têm poucas alternativas de serem utilizados.

Entretanto, apresentam a desvantagem de fermentar lentamente quando não são tratados previamente e é difícil manipulá-los.

As velocidades e eficiências dos processos de biodegradação dos resíduos celulósicos foram melhorados empregando tratamentos alcalinos que são mais baratos e menos eficientes que outros processos como a irradiação ultravioleta, moenda forte ou hidrólise parcial ácida (8). Foram estudados os efeitos dos tratamentos químicos, físicos e enzimáticos realizados sobre o bagaço da cana de açúcar para aumentar a degradação microbiana da celulose, utilizando-a potencialmente como substrato para o crescimento de *Cellulomonas*. O tratamento com NaOH 4% por 15 min a 100°C aumentou a digestibilidade a 57,0%. Os tratamentos com ácido sulfúrico e preparações de celulase crua solubilizaram a celulose mas não aumentaram a digestibilidade. A moenda ou a cocção a alta pressão do substrato tiveram pouco efeito para aumentar a digestibilidade dos substratos celulósicos atacados por *Cellulomonas*. (16)

#### CELULASES

Apesar de que muitos animais e plantas possuem celulasas não têm um papel importante na degradação da celulose. Por isso, os pesquisadores de celulasas concentraram sua atenção nas celulasas produzidas por micro-organismos. Os fungos

têm sido objeto dos mais intensivos estudos entre os micro-organismos devido à facilidade de cultivo e à alta atividade das celulases.

As bactérias e os fungos são os dois grupos principais de micro-organismos responsáveis pela degradação microbiana da celulose, embora espécies de algas, leveduras e myxobactérias foram encontradas algumas vezes. Algumas mutantes de *Neurospora crassa* e de *Trichoderma Viride* foram obtidas para maior produção de celulase.

A celulase é considerada uma enzima induzível formada somente na presença de celulose. Os estudos com *Trichoderma Viride* mostram que uma substância deve chegar ao lugar de ação para permiti-la agir como indutora.

Segundo essas pesquisas, a celobiose solúvel, um dímero produzido por hidrólise de celulose é o verdadeiro indutor de celulase. Os estudos sobre o efeito nos diferentes substratos mostram que o pH ótimo para a celulase de *T. viride* sobre Carboximetilcelulose é 4,5 e sobre a celulose é 5,0. A máxima atividade enzimática para *T. viride* foi a 29°C. (13)

Vários micro-organismos foram isolados por Bellamy W.D. para a utilização dos resíduos celulósicos. Um *Actinomyces* termofílico, apresentou a maior capacidade para digerir celulose e complexos celulose-lignina em rápidas velocidades empregando desperdícios de forragem. A temperatura ótima de crescimento foi de 55°C e o pH = 7,5 - 7,8. Este micro-organismo produziu uma celulase extra-celular com um pH ótimo de

6.0 e uma temperatura ótima de 65-70°C. (2 )

A linhagem do fungo *Myrothecium verrucaria* NRRL 2003 foi cultivada para obtenção de celulase num meio com os seguintes sais:  $\text{NaNO}_3$  0.3% ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1% ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05% ;  $\text{KCl}$  0.05% ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001% ; Tween 80 0.1% ; proteose peptona 0.05%.

A este meio acrescentou-se glicose 0.1% e bagaço de cana de açúcar. A produção de celulase máxima foi aos três dias sendo superior à produzida empregando Carboximetilcelulose (CMC) em lugar de bagaço de cana. (23)

A maioria das celulases foram descritas como hidrolizantes de B-1,4 D-glucanos e podem ser sistematicamente designadas como B-1,4 glucano - glucano - hidrolases. Algumas celulases têm uma capacidade maior para degradar celulose insolúvel e celulose nativa quando se comparam com derivados solúveis de celulose, enquanto outras mostram a relação inversa. O primeiro tipo de celulase foi designado  $C_1$  e o último  $C_x$ .

Na maioria dos organismos celulolíticos, vários componentes da celulase constituem juntos um "Sistema de celulases", e os substratos celulósicos são convertidos em açúcares solúveis por sua ação sinérgica.

Foi proposto que o primeiro passo na degradação de celulose é a função duma celulase  $C_1$  e o segundo passo é o de uma celulase  $C_x$ . Nos estudos mais recentes sobre a ação das celulases, os componentes correspondentes a  $C_x$  foram examinados e os derivados solúveis de celulose e B-1,4 oligo-

glicosídeos foram principalmente empregados como substratos. Como consequência, o processo de degradação de celulose insólúvel permanece muito escuro. (25)

#### PROTEINA UNI-CELULAR

As bactérias ou as leveduras são as fontes de proteína uni-celular mais procuradas devido à maior velocidade de crescimento e ao maior conteúdo protéico em comparação com os fungos. Portanto, as que estão provistas de intensa atividade celulolítica são preferidas para a produção de proteína uni-celular a partir de resíduos celulósicos. (15)

Vásquez A. propôs a utilização do bagaço para obter simultaneamente celulase e levedura, hidrolizando parcialmente o bagaço com ácido sulfúrico. De 3.5 toneladas de bagaço seco podem-se obter teoricamente, uma tonelada de celulose e meia tonelada de levedura seca empregando *Torula utilis*. (39)

Para ter uma idéia aproximada do preço da celulose do bagaço de cana (Julio, 1974) comparada com outras fontes pode observar-se a seguinte tabela:

<u>Material</u>	<u>Valor</u> (U.S.\$ por tonelada)	<u>Celulose</u> (%base seca)	<u>Custo de Celulose</u> (U.S.\$ por tonelada)
Alfafa	55	24	229.1
Erva	33	28	118
Trevo e erva	44	19	232
<u>Bagaço de cana de açúcar</u>	10	53	19
Papel de jornal	17	78	22
Restos de papel	10	78	13

Polpa de papel tratada com sulfito	280	97	289
Madeira	200	83	241 (11)

Nesta, a celulose do bagaço de cana de açúcar ocupa o segundo lugar como o material celulósico mais barato.

Com o fim de utilizar o bagaço de cana de açúcar, que está composto principalmente de celulose, hemi-celulose e lignina, realizou-se um estudo básico para hidrolizar enzimaticamente o bagaço. Uma preparação enzimática, altamente capaz de hidrolizar o bagaço foi obtida de um filtrado do cultivo de *Penicillium variabile* num meio contendo casca de trigo e bagaço tratado com alcali. O hidrolizado do bagaço tratado com alcali reagiu com a preparação enzimática a pH 5.0 a 40°C contendo predominantemente glicose e xilose, conforme o que se observou na cromatografia em papel. (10)

A digestibilidade da celulose aumentou a 85% quando o bagaço de cana de açúcar foi submetido a oxidação alcalina. O tempo de duplicação da massa para culturas puras de *Cellulomonas* foi de 2.1 a 16 h, principalmente menos de 5 h e o rendimento de eficiência da fermentação foi de 0.273 - 0.442 g. de células por grama de carbo-hidrato metabolizado.

As células de *Cellulomonas* foram analisadas dando 52.3% de proteína crua em base seca e um bom perfil de aminoácidos exceto para metionina. (7)

Uma bactéria do gênero *Cellulomonas* isolada do solo



dos campos de cana de açúcar foi cultivada em bagaço de cana de açúcar depois de tratá-lo com alcali quente. A celulase deu a máxima atividade entre pH 4.7 a 6.8. O produto da hidrólise mostrou a presença de celobiose utilizando o método de cromatografia em papel. Também encontraram um aumento de produção de proteínas quando se empregou uma cultura mista de *Alcaligenes faecalis* e *Cellulomonas*. (14)

O fungo *Trichoderma viride* foi empregado para a produção de celulase e proteína com bagaço de cevada pré-tratado com NaOH sob alta pressão. As concentrações de bagaço foram 1 - 2% e o pH mantido entre 3.5 - 4.5. O crescimento do fungo foi medido pela quantidade de CO<sub>2</sub> produzido e a proteína celular. O crescimento parou depois de 2 - 6 dias, as fases estacionárias duraram 0 - 2 dias, aumentando paralelamente com o aumento da concentração de bagaço. A máxima produção de enzima obteve-se entre 4 - 10 dias. O conteúdo de proteína foi de 21-26% e até 70% do bagaço foi utilizado. (28)

O mesmo fungo associado com *Saccharomyces cerevisiae* ou com *Candida utilis* também foi empregado para obter celulase e proteína do mesmo substrato anterior com a mesma concentração e sendo tratado previamente com alcali. Mediante esta associação diminuem o tempo de produção de celulase e de proteína. O conteúdo de proteína do produto chegou a 21 - 22 % e a composição de amino-ácidos foi semelhante ao *Trichoderma viride* sozinho. (29)

CAPITULO III

MATERIAIS

1. Bagaco de cana de açúcar

Abastecido pela moenda de cana "Caninha", estrada de Nova Odessa.

2. Microorganismo

Linhagem de *Aureobasidium pullulans* isolada no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Central de Venezuela.

3. Equipamentos

3.1 Incubador agitador-rotativo, Modelo G-27, Psychotherm, New Brunswick Scientific Co. Inc.

Velocidade: 40 a 400 r.p.m. ( $\pm 5$ )

Passo: 2.54 cm

Temperatura: 0 a 60°C ( $\pm 0.5$ )

3.2 Incubador de gradiente de temperaturas

Scientific Industries Inc N.Y. 11501

Temperaturas: - 5°C ( min ) + 80°C ( max )

Agitação: 20 - 70 vezes (ângulo 30°)

3.3 Peneira vibratória Granutest

<u>Peneiras Nº</u>	<u>Abertura (polg.)</u>	<u>Módulo de finura</u>
14	0.046	4
28	0.0232	3
48	0.0116	2
100	0.0058	1
Fundo	0.0000	0

### 3.4 Moinhos

- Moinho de martelos (Lab. Pulverizing Mill, Weber Bros & Whiste Metal Works, Inc. Chicago, 111)
- Moinho tipo Willey ( peneira N° 2 )
- Moinho de tres cilindros

### 4. Equipamentos complementares

Estufas para incubação: 30°C, 55°C.

Estufas para secagem: 100°C

Centrífugas

-Beckman Modelo J 21 - B Max: 25.000 rpm

-Sorvall RC2-B Max: 20.000 rpm. Temperatura mínima: -20°C

Microscopio Zeiss

Espectrofotómetro Bausch and Lomb Spectronic 20

Espectrofotómetro Coleman 295

Potenciômetro Horiba com eletrodo de Calomel, sensibilidade:  
0,1

Balanças

-Analítica Sauter. Max 200 g. Sensibilidade: 0.0001 g

-Sauter. Max 1000 g. Sensibilidade: 0.1 g

Refrigerador Frigidaire

Autoclave horizontal

Banho Maria: 40°C

### 5. Material de vidro

Erlenmeyers de 250 ml, lâminas e lamínulas, Câmara de Neubauer, pipeta para contagem de leucocitos, placas de Petri, tubos de 16 x 160 mm, 20 x 20 mm, 9 x 180 mm, tubos em L,

balões volumétricos de 25 ml, pipetas de 1,5 e 10 ml, pipetas Pasteur, beakers, funis, cápsulas de porcelana, provetas, termômetros, e outros materiais de uso comum nos laboratórios.

#### 6. Meios de cultura

meio de saís

agar malte-levedura

agar para estudo da morfologia de leveduras (Difco)

meios bagaço-saís

agar farinha de milho

caldo malte-levedura

meio A - meio caseiro Lactrimel

#### 7. Reagentes

Solução de NaOH 4%, 50%.

soluções de Fehling I e II

solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.925 N

solução de carboximetilcelulose (sal sódico a 0.625%)

solução de Somogyi-Nelson I (reagente de cobre)

solução de Somogyi-Nelson II (reagente de arsenomolibdato)

ácido bórico a 3%, HCl 0.02 N,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado e outros.

## CAPITULO IV

### METODOS

#### 1. Substrato

##### 1.1 Obtenção, tratamento e armazenamento do bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana foi obtido depois da moenda da cana (*Saccharum officinarum*) num moinho de 3 cilindros e foi reduzido de tamanho pela passagem através de um moinho Wiley provido de peneira Nº 2 e à continuação por um moinho de martelos até atingir um diâmetro médio de 0.46 mm. O tamanho das partículas de bagaço foi determinado numa peneira vibratória Granutest e os cálculos feitos segundo Henderson. (17) Logo foi submetido a tratamento com NaOH a 4% aquecendo a 100°C x 15 min. O bagaço foi misturado com o NaOH na proporção 1:10. Após o aquecimento foi lavado com água comum até pH 7, espremido numa malha Mesh Nº 14 (35) e seco na estufa a 55°C x 18 h atingindo dessa forma uma humidade de 50%. Nestas condições o bagaço foi armazenado em sacolas plásticas de 40 x 30 cm, seladas e guardadas a temperatura ambiente (25 - 30 °C).

##### 1.2 Determinação de açúcares redutores no bagaço.

Os açúcares redutores foram determinados pelo método baseado na redução do cobre da solução de Fehling, de cúprico (CuO) a cuproso (Cu<sub>2</sub>O) em presença desses açúcares. (3,18,26)

Para esta determinação foram preparadas suspensões de bagaço em água a 5%, em triplicata, com o bagaço preparado

em três formas diferentes. Empregou-se, o bagaço depois da moenda; bagaço moído, tratado com NaOH, lavado e seco; e bagaço auto-clavado no meio de sais (Apêndice: Nº 1)

## 2. Micro-organismo

### 2.1 Isolamento das leveduras.

Oitenta e quatro (84) amostras de terra de diferentes lugares e quatorze (14) amostras de pólen de diversas flores foram colhidas para o isolamento. No caso das terras, aproximadamente uma grama foi suspensa em 5 ml de água destilada estéril. O pólen de cada uma das flores foi transportado com a alçada húmeda e suspenso em 5 ml de água destilada estéril. A partir destas suspensões fez-se o isolamento com a alçada na superfície do agar malte-levedura (Apêndice: Nº 2) a pH 5.5 repartido em placas de Petri. A incubação realizou-se a 25°C durante 3 dias.

As colônias isoladas de leveduras foram transplantadas a tubos de 16 x 160 mm contendo agar para estudo da morfologia de leveduras (Yeast morphology agar Difco, Apêndice: Nº 3) em posição inclinada a pH 5.6. Incubaram-se a 25°C durante 3 dias. Logo observaram-se ao microscópio entre lâmina e lamínula com aumento de 430 X

### 2.2 Seleção da levedura.

As leveduras isoladas ( 24 linhagens ), cultivaram-se no meio-bagaço 2%-sais (Apêndice: Nº 4) a pH 5.5 repartido a razão de 50 ml em Erlenmeyer de 250 ml e foram incubadas em agitador rotativo (220 rpm) a 30°C durante 3 dias.

As leveduras foram numeradas pela contagem direta ao

microscópio, utilizando-se a Câmara de Neubauer e pipeta para contagem de leucocitos (19). Para isso o bagaço foi separado por sedimentação num tubo de 20 x 200mm durante 5 min e filtração através de gaze. Mediram-se 0.5 ul do filtrado os quais foram diluídos a 11 ul com água destilada. Depois a pipeta foi agitada vigorosamente, eliminando as três primeiras gotas e colocando a seguinte entre a lâmina e a lamínula havendo entre as duas uma altura de 0.1 mm. As células presentes em 16 quadrados foram contadas com um aumento de 100 X. A média das células por quadrado multiplicou-se por 200 para obter o número de células por mm<sup>3</sup>. Escolheu-se a levedura que apresentou a contagem mais elevada.

### 2.3 Identificação da levedura.

A levedura selecionada foi cultivada no meio agar para estudo da morfologia de leveduras, a 30°C x 3 dias. A morfologia foi observada por exame ao fresco, entre lâmina e lamínula com aumento de 430 X.

O cultivo feito no meio anterior, foi semeado fazendo uma linha na superfície dos meios: agar farinha de milho (Corn Meal Agar Difco, Apêndice: N° 5) e meio caseiro Lactrimel (Apêndice: N° 10) repartidos em camada fina sobre uma lâmina e incubados dentro de uma placa de Petri húmida (cultura em lâmina), a 30°C x 3 dias. Logo foram observadas diretamente ao microscópio com aumento de 430 X.

A continuação foi feito o estudo das propriedades fisiológicas da levedura utilizando as provas de assimilação e

fermentação de açúcares e assimilação do nitrogênio. (21,40)

#### 2.4 Determinação do tipo respiratório.

Uma suspensão da levedura foi inoculada com pipeta Pasteur, em dois tubos de 9 x 180 mm contendo o meio agar malte levedura a pH 5.5, derretido e resfriado a 55°C. Os tubos foram resfriados em água e incubados a 30°C x 3 dias.

#### 2.5 Conservação da levedura .

A levedura foi semeada na superfície do agar para estudo da morfologia de leveduras, incubada a 30°C x 3 dias e guardada na geladeira a 4°C até o momento da utilização. Os transplantes no mesmo meio foram feitos cada mês. Para preparar os inoculos utilizaram-se culturas incubadas a 30°C x 3 dias.

#### 2.6 Determinação da temperatura ótima de crescimento da levedura.

Uma suspensão homogênea de células de levedura foi preparada em solução salina a 0.85%. A suspensão (0.05 ml) foi inoculada no meio Caldo malte-Levedura (Apêndice: Nº 6) a pH 5.5 repartido a razão de 10 ml em tubos L adaptáveis ao incubador de gradiente de temperaturas. Duas séries de tubos foram incubadas com agitação (25 vezes/min). Uma série foi incubada no rango de 28 - 38°C e outra entre 20 - 29°C durante 21 h. A leitura da absorvância realizou-se a diferentes tempos num espectrofotômetro Bausch and Lomb Spectronic 20 a 660 nm.

#### 2.7 Determinação do pH ótimo para o início do crescimento da levedura.

Inoculou-se 0.5 ml duma suspensão homogênea da levedura em



solução salina, em 50 ml do meio bagaço 2% - sais. O meio foi preparado em duplicata, em Erlenmeyer de 250 ml, com os seguintes pH: 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0. A incubação foi feita com agitação rotativa (220 rpm) a 27°C durante 5 dias. O número de leveduras por ml de meio foi determinado depois de 3 dias de incubação por contagem direta na superfície do agar malte-levedura (pH 3.5) repartido em placas de Petri. As placas foram incubadas a 30°C x 3-5 dias.

### 3. Desenvolvimento da levedura no meio bagaço-sais.

#### 3.1 Concentração ótima de bagaço .

O bagaço armazenado foi suspenso no meio de sais nas seguintes concentrações: 1, 2, 3, 4%. O pH foi ajustado a 4.0 e o meio de sais foi repartido a razão de 50 ml em Erlenmeyer de 250 ml. Uma suspensão de células de levedura foi inoculada na proporção de 1% com relação ao meio, e os meios incubaram-se com agitação automática (220 rpm) a uma temperatura de 27°C durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Após cada tempo de incubação determinou-se a massa celular. Na cultura com bagaço ao 3% também foi determinada a atividade celulolítica e o pH.

#### 3.2 Massa celular.

Os meios bagaço - sais depois da incubação com a levedura foram decantados em tubos de 20 x 20 mm, depois de 5 min o líquido sobrenadante foi filtrado através de gaze e no filtrado determinou-se a massa celular por três métodos:

##### 3.2.1 Espectrofotometria.

A absorvância dos filtrados foi determinada num espectrofotômetro Coleman 295 a 660 nm. Utilizou-se como branco a solução de sais sem inóculo.

3.2.2 Contagem direta ao microscópio (Igual ao ponto 2.2)

3.2.3 Contagem em superfície em agar malte-levedura (pH 3.5) Diluições decimais do filtrado ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) foram semeadas na superfície do agar repartido em placas de Petri, medindo 0.1 ml com uma pipeta e espalhando o líquido com espátula de vidro. As placas foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  x 3-5 dias. Depois desse tempo foram contadas as colônias e calculou-se o número de células por ml.

### 3.3 Atividade celulolítica de celulase Cx

A atividade da celulase Cx foi determinada pela quantidade de açúcar redutor, expresso como glicose, resultante de ação enzimática sobre o substrato carboximetilcelulose (CMC - Na) sob condições específicas. Foi utilizado o método proposto por Reese et al (31)

Os balões volumétricos (25 ml) contendo cada um 0.1 ml de solução de carboximetilcelulose (sal sódico) a 0.625%, pH 4.5 e 0.9 ml da solução de celulase filtrado da cultura de levedura no meio bagaço 3%-sais (pH 5.5) foram incubados a  $40^{\circ}\text{C}$  x 30 min. Ao final da incubação foram determinados os açúcares redutores. Utilizou-se o método colorimétrico de Somogyi - Nelson (24, 32, 33). O volume final da solução e elevado a 25 ml com água destilada e a absorvância lida a  $540\text{nm}$ . Para os controles (poder redutor da solução enzimática) os

balões foram preparados da mesma forma descrita anteriormente, mas sem incubação.

Para o cálculo da quantidade de açúcar redutor em miligramas de glicose, utilizou-se uma curva padrão (absorvância a 540 nm contra mg de glicose).

#### 3.4 Medida do pH.

Utilizou-se um potenciômetro marca Horiba, sensibilidade 0.1. As determinações foram efetuadas nos filtrados das culturas.

#### 3.5 Cromatografia de açúcares em camada delgada (30)

A cromatografia foi realizada em camada de sílica-gel G 60 - Merck a 33% em água. As amostras testadas foram obtidas pela filtração através de gaze das culturas de levedura no meio bagaço-3% sais (pH 5.5) as quais foram incubadas a 27°C durante 24, 48, 72 horas. Ao mesmo tempo utilizou-se um padrão de glicose a 0.1% e um branco do meio bagaço 3% - sais sem inóculo.

Os solventes empregados para fazer a migração foram os seguintes:

Butanol	70 ml
Ácido acético	20 ml
Cloroformo	15 ml
Acetato de etila	20 ml

Esta mistura foi colocada na cubeta com a placa do cromatograma e deixou-se migrar até 10 cm de altura. A placa foi seca na estufa a 100°C e revelada atomizando primeiro uma solução de  $\text{AgNO}_3$  em acetona (Apêndice: Nº 7) e imediatamente uma solução alcoólica de  $\text{NaOH}$  0.5 N (Apêndice: Nº 8). As manchas

dos açúcares aparecem pretas sobre o fundo marron imediatamente após atomização das soluções reveladoras.

### 3.6 Massa seca.

Filtrados da cultura da levedura no meio bagaço 3%-sais foram medidos, lavados várias vezes com água e centrifugados a 10.000 rpm x 10 min numa centrífuga Beckman até completa eliminação da sal de amonia a qual foi determinada qualitativamente nas águas de lavado com o reagente de Nessler. As massas lavadas foram decantadas em cápsulas de porcelana previamente pesadas e secas em estufa a 100°C x 18 h.

As massas secas foram determinadas por pesagem diferencial e os cálculos feitos por 100 ml de filtrado.

### 3.7 Nitrogênio.

A massa seca foi diluída com 5 ml de água destilada e o nitrogênio determinado pelo método de Kjeldahl (26)

### 3.8 Digestibilidade do bagaço.

O bagaço restante depois da separação da cultura da levedura no meio bagaço 3%-sais (pH 4.0) incubado a 27°C x 3 dias foi colocado num filtro de porcelana com papel de filtro previamente pesado. O bagaço foi lavado várias vezes com água destilada a fim de eliminar as células e sais minerais e logo foi seco no papel filtro a 55°C x 18 h. A diferença de peso entre o papel filtro com bagaço e o peso do papel deu o bagaço não digerido. Os cálculos foram feitos por 100 g de bagaço.

## 4. Purificação da enzima celulase.

Uma cultura da levedura foi realizada em 3 Erlenmeyer, cada um com 50 ml do meio bagaço 3%-sais (pH 5.5) incubados a 27°C x 2 dias, com agitação rotativa (220 rpm) ou seja até o momento da máxima atividade celulolítica. O conteúdo dos Erlenmeyer foi filtrado através de gaze para separar o bagaço e o líquido foi centrifugado a 10.000 r.p.m. x 10 min numa Centrífuga Sorval, a 0°C. O sobrenadante foi transferido para um beaker e misturado com  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  até 80% de saturação a 0°C. Guardou-se na geladeira a 4°C x 18 h. O líquido com o precipitado foram centrifugados na mesma Centrífuga a 15.000 rpm x 20 min a 0°C. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado obtido foi suspenso novamente em 2 ml de água destilada. A suspensão foi dializada contra água comum durante 2 h. A determinação da atividade celulolítica foi feita com a suspensão dializada segundo o procedimento do ponto 3.3.

CAPITULO V  
RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Substrato

1.1 Determinação de açúcares redutores no bagaço

O bagaço submetido a três tratamentos diferentes deu os seguintes resultados:

Bagaço	%
depois da moenda	4.03
moído, tratado com NaOH e seco	0
auto-clavado no meio de sais	0

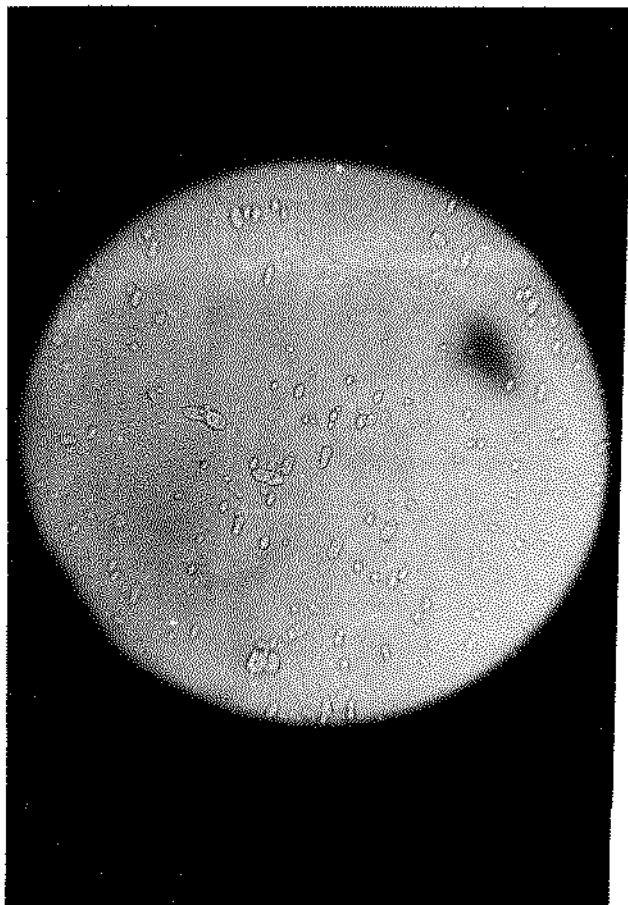
Isto fez pensar que a levedura estava se desenvolvendo no meio bagaço-sais a partir da celulose do bagaço devido à falta de açúcares como fonte de carbono. Por isto determinou-se posteriormente a presença de celulase Cx induzida produzida pela levedura em presença de celulose do bagaço.

2. Micro-organismo

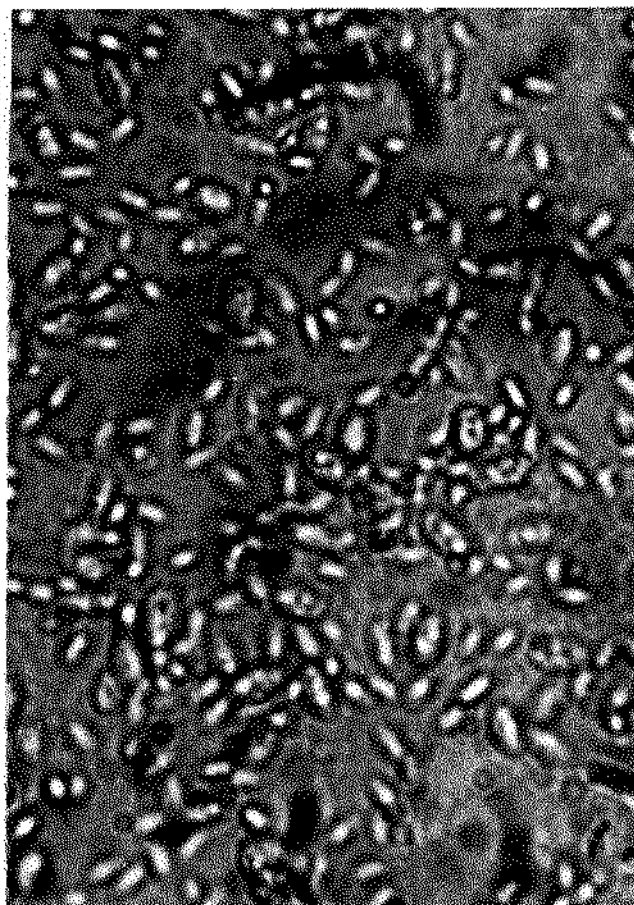
2.1 Identificação da levedura e determinação do tipo respiratório.

A levedura semeada no meio agar para estudo da morfologia de leveduras e cultivada no meio bagaço-sais apresentou ao microscópio células ovais com 1 a 4 gémulas. (Ver fotos)

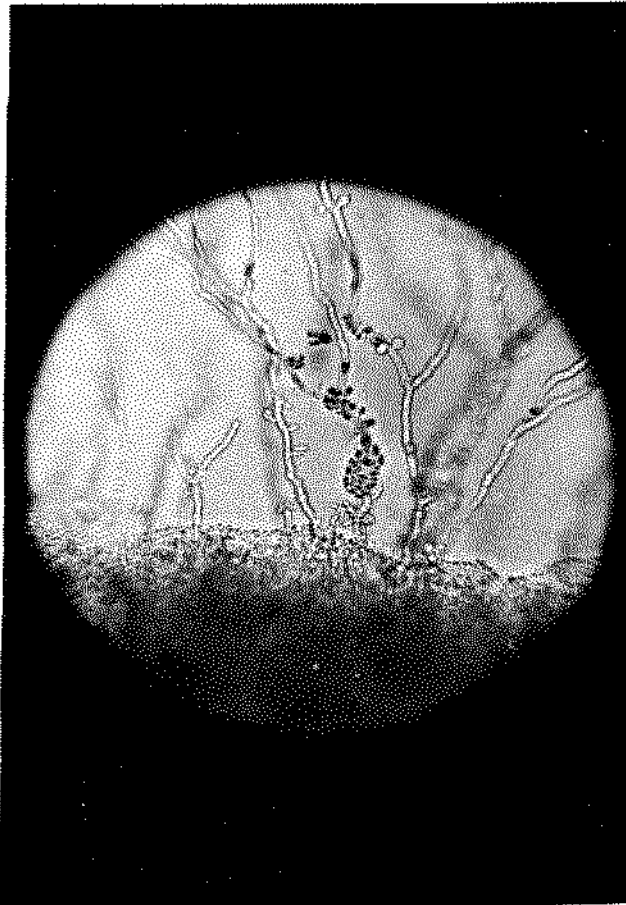
A apariência das colônias no mesmo meio e cremosa, suave e levemente côr-rosa. Nos meios, agar farinha de milho e meio caseiro Lactrimel, pode-se observar ao microscópio o micelio com as blastosporas ou seja as esporas que vão originar novos micelios. (Ver fotos)



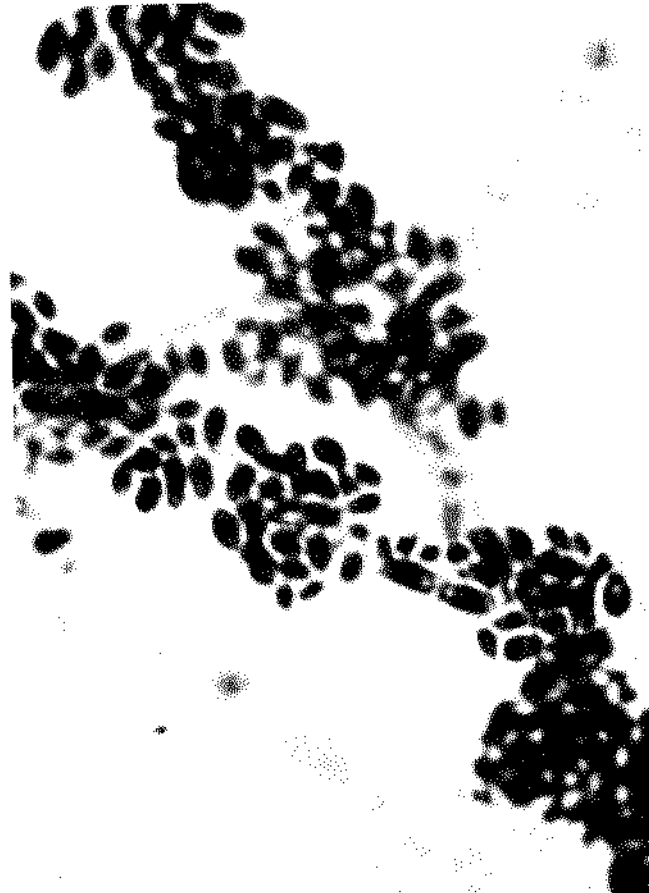
Agar para estudo da morfo-  
logia de leveduras  
(exame ao fresco - 430 X)



Meio bagaco-sais após 72 h  
de incubação  
(exame ao fresco - 430 X)



Agar farinha de milho  
( 430 X )



Maio caseiro Lactrimel  
( 430 X )



Baseando-nos nestas características pode-se dizer que o micro-organismo estudado é um fungo pertencente ao grupo das leveduras pretas, sendo um Aureobasidium pullulans (de Barry) Arnaud (1) da família Moniliales.

As leveduras pretas são fungos comuns do solo, apresentam-se sobre matéria orgânica em decomposição e às vezes têm sido referidas como patógenas de plantas e animais. As espécies mais comuns, Pullularia pullulans, têm sido descritas sob diferentes nomes, Aureobasidium pullulans (de Barry) Arnaud é o nome aceito no presente.

O caráter mais dominante das leveduras pretas é a pigmentação intensa. Porém, tem-se feito isolamentos de linhagens claras e algumas culturas de esporas são claras embora depois de um tempo longo se escureçam. Estas linhagens são parecidas com Candida (9).

Apresentam um aspecto muito variável. Podem-se encontrar quase completamente como leveduras (blastosporas) ou quase completamente como filamentos (micelio septado). Nas culturas com agitação o micelio pode-se reduzir a cadeias de poucos elementos. Todas as linhagens têm sempre poucas ou muitas células que desenvolvem uma pigmentação marrón nas paredes embora as colônias sobre agar claro apareçam cor-rosa ou pretas. Tais células são capazes de produzir blastosporas e a partir destas se originam as novas células. (6)

As provas de assimilação de açúcares deram os seguin

tes resultados: glicose + , galactose + , sacarose + , maltose + , lactose - , melibiose + , celobiose + , rafinose + , trehalose - , eritrytol - , rhamnose - , manitol + , inositol - .

A fermentação de açúcares deu: glicose+, galactose-, sacarose+, maltose+, lactose+ .

A assimilação do nitrogênio feita com  $\text{KNO}_3$ : + .

A cultura para observação do tipo respiratório apareceu em profundidade e na superfície sendo mais acentuado o crescimento na parte superficial. A levedura portanto é aerobia anaerobia facultativa, atingindo um maior desenvolvimento em presença de oxigênio. Esta característica deve ser tomada em conta para o desenvolvimento dos processos de fermentação.

## 2.2 Temperatura ótima de crescimento.

Os resultados do desenvolvimento da levedura nas diferentes temperaturas podem-se observar nas figuras: 1, 2, 3 e 4.

Para cada curva fez-se o cálculo do valor K ou seja da constante de velocidade de crescimento cujo valor é igual a pente da curva deduzida das seguintes equações:

$$\begin{array}{l} \text{M= massa} \\ \text{T= tempo} \\ \text{K= constante de} \\ \text{velocidade de} \\ \text{crescimento} \end{array} \quad \begin{array}{l} \frac{dM}{dT} = KM \\ \left( \frac{dM}{dT} \right) \cdot \frac{1}{M} = K \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{integrando} \\ \frac{M_2}{M_1} = e^{K(T_2-T_1)} \\ \ln \frac{M_2}{M_1} = K(T_2-T_1) \end{array} \quad (22)$$

Utilizando os valores dos log de  $K \times 10^3$  e os inversos das

temperaturas absolutas  $\times 10^3$  (tabela 1) construiu-se a figura 5 a fim de observar melhor a temperatura ótima de desenvolvimento. O valor de K mais alto obteve-se a 27°C. A partir da curva de crescimento a 27°C calculamos o período de latência de levedura no meio caldo malte-levedura a pH 5.5 (figura 6) fazendo: 1. Uma linha reta desde o ponto de origem da curva e paralela ao eixo X 2. Extrapolando a porção exponencial da curva até o cruzamento com a linha anterior (ponto A). A distância entre A e o eixo Y representa o tempo de latência ou adaptação da levedura nas condições estabelecidas, sendo igual a 7 horas e 6 minutos. Para localizar a curva ideal sem período de adaptação, ficando a curva em forma exponencial fez-se uma linha paralela à linha de crescimento observada saindo desde a mesma origem (20).

### 2.3 pH ótimo para início do crescimento.

O maior número de células foi obtido a pH 4 sendo os valores inferiores mais próximos os correspondentes aos pH 3.5 e 3.0 (figura 7)

O número de células aos pH 4.5 e 5.0 foi inferior aos valores determinados a pH 3.0, 3.5 e 4.0. Portanto, pode-se dizer que o pH ótimo para início do crescimento desta levedura nestas condições de cultura foi 4.0, sem esquecer os pH 3.5 e 3.0 nos quais embora tenha-se produzido um número menor de células em comparação com o pH 4.0, existe uma menor possibilidade de contaminação microbiana o qual é um ponto importante nos processos de fermentação industrial devido a

que os pH ácidos inibem o desenvolvimento dos micro-organismos.

### 3. Desenvolvimento da levedura no meio bagaço-sais

#### 3.1 Concentração ótima de bagaço.

A levedura mostrou maior densidade ótica nos meios com 2 e 3% de bagaço. No meio com 1% os resultados foram inferiores e com 4% obteve-se o menor desenvolvimento. (figura 8) Para seleccionar com mais exatidão a melhor concentração fez-se a contagem do número de células por ml utilizando o método da contagem em placa e ao microscópio dos meios com 1, 2 e 3% de bagaço (figura 9 e 10). As duas contagens mostraram o meio com 3% de bagaço como o melhor para produção do maior número de células. A concentração de 2% deu os valores mais próximos e 1% os menores.

A partir da curva de crescimento da levedura no meio com 3% de bagaço (figura 9) fizemos a determinação da velocidade de crescimento segundo o procedimento do ponto 2.2 (figura 11). A pendente da curva (pontos A e B) deu igual a 0.07 células/h.

O tempo de duplicação ou tempo preciso para duplicar a população calculou-se com a seguinte fórmula (5):

$$k = \frac{\log X_t - \log X_0}{0.301 \cdot t}$$

$X_0$  = nº de células, no tempo inicial  
 $X_t$  = nº de células, no tempo posterior  
 $t$  = período de tempo desde  $X_0$  até  $X_t$   
 expresso em horas ou minutos

$$k = \frac{5.26 - 4.0}{0.301 \times 18.9} = 0.22$$

$k$  = constante de taxa de crescimento, expresso como o número de duplicações por unidade de tempo.  $\frac{1}{k}$  = tempo de duplicação = 4.5 h

A fase de latência calculada igual ao ponto 2.2 deu igual a 15 h.

### 3.2 Atividade celulolítica de celulase Cx

A liberação de glicose no meio bagaço 3% - saís devido à atividade celulolítica (celulase Cx) começou depois das 24 h atingindo o valor máximo às 48 h, diminuindo logo e chegando a 0 às 96 h (Figura 13).

A fase de produção de celulase coincide com o aumento do número de células o qual continua até chegar a um máximo de  $10^6$  células/ml em 72 h. Provavelmente entre as 24 e 48 h a glicose liberada no meio é aproveitada pela levedura para o seu desenvolvimento o qual continua além das 48 h embora a atividade celulolítica decaia a partir desse tempo.

O período de atividade enzimática é curto e seu rápido declínio pode ser devido à instabilidade da enzima, à destruição dela pelas enzimas proteolíticas extra celulares, ou à inibição produzida pela celobiose liberada na hidrólise da celulose (13). A celobiose também pode agir como indutor da produção de celulase no começo da fase de hidrólise da celulose.

O pH no momento da máxima atividade celulolítica é de 5.1 .

O resultado é próximo aos obtidos com a celulase de *Trichoderma koningi* a qual atinge sua máxima atividade sobre celulose a pH 5.0 (13). Depois de 24 h o pH continua descendo até chegar a um valor de 3.2 provavelmente devido à liberação de ácidos orgânicos como produto da fermentação de glicose.

Para conhecer a influência da presença de sais na atividade celulolítica comparamos essa atividade do meio bagaço 3% - sais com um meio de bagaço 3% em água (Figura 14). No meio sem sais apareceu uma leve atividade celulolítica equivalente a 30 ug/ml de glicose depois de 24 h de incubação. Às 48 h subiu até uma concentração de 60 ug/ml sumindo às 72 h. Na presença de sais a atividade chegou a um máximo de 450 ug/ml em 48 h, sumindo às 96 h. A celulase é uma enzima induzida formada só na presença de celulose, mas os estudos feitos com celulase de *Trichoderma viride* têm demonstrado que os minerais são necessários para uma melhor produção da enzima, sendo essenciais: uma fonte de nitrogênio, geralmente na forma de sais de amônio, sulfato de magnésio, uma fonte de potássio e fósforo. Alguns elementos como Ca, Co, Fe, Zn e Mn podem ser necessários para uma melhor produção de celulase (13).

### 3.3 Comparação do meio bagaço 3% - sais com outros meios

A continuação comparamos o crescimento da levedura num meio (meio A) preparado com extrato de levedura (0.3%); peptone (0.5%); glicose (1%) e bagaço (3%) com o meio bagaço 3% em

água, bagaço 3% em sais e a solução de sais sem bagaço (figura 15) a pH 5.5.

O melhor desenvolvimento obteve-se no meio A devido à presença de glicose disponível além da peptone e o extrato de levedura as quais são substâncias ricas em aminoácidos e vitaminas, capazes de aumentar a velocidade de utilização da celulose e portanto a velocidade de síntese enzimática. O meio bagaço 3% - sais deu um número de células menor que o meio anterior e o meio bagaço 3% - água deu o crescimento menor de todos. Na solução de sais não houve crescimento devido à falta duma fonte de carbono.

#### 3.4 Cromatografia de açúcares

O revelado da cromatografia mostrou a presença de glicose no filtrado da cultura de 48 h de incubação coincidindo com o momento da máxima atividade celulolítica. Os filtrados de 24 e 72 h não apresentaram manchas comparáveis ao padrão de glicose. Isto confirma que após 48 h existe a maior concentração de glicose coincidindo com o ponto máximo da atividade de de celulase. (Ver foto)

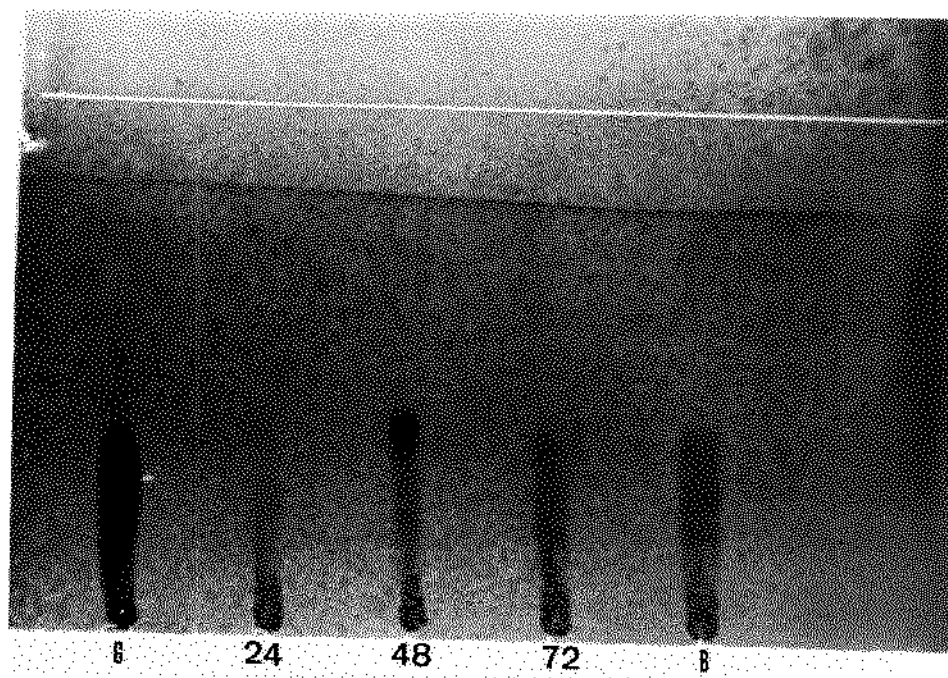
G= glicose

B= branco (meio bagaço 3% - sais sem inóculo)

24, 48, 72 = filtrados das culturas após 24, 48 e 72 h de incubação.

#### 3.5 Massa seca e nitrogênio

A massa seca deu um máximo de 0.061 g/100 ml em 72 h (Tabela 2 e Figura 16) ou seja 0.61 g/l de medio. Comparando em



Cromatografía de açúcares  
em camada delgada



forma absoluta este resultado com os obtidos com outras leveduras cultivadas em outros substratos pode-se considerar baixo. Linhagens de *Rhodotorula* cultivadas em batata têm produzido entre 2.84 a 2.40 g/l. Uma linhagem de *Torula utilis* no mesmo substrato produziu 2.03 g/l (36). Aqui é preciso esclarecer que este substrato é rico em amido o qual é um polissacarídeo formado por unidades de glicose, sendo por isto mais favorável para o maior desenvolvimento da levedura.

TABELA 2

Relações entre Massa seca, Nitrogênio e N° células/ml

Tempo (h)	Massa seca (base seca, g/100 ml)	Nitrogênio (g%)	N° células/ml
0	0.0002	0.74	$1.4 \times 10^4$
12	0.0020	3.90	$1.2 \times 10^5$
24	0.0100	5.00	$5.6 \times 10^5$
48	0.0250	8.12	$1.4 \times 10^6$
72	0.0610	8.16	$3.4 \times 10^6$

### 3.6 Digestibilidade do bagaço.

O bagaço submetido ao tratamento descrito deu uma digestibilidade igual a 23.3%. Segundo outros autores (14) o bagaço de cana sem tratamento utilizando a bactéria *Cellulomonas* como produtor de celulase num meio a base de sais e extrato de levedura chega só a 3.4%. Tratando o bagaço com NaOH a 2% e aquecendo a 100°C durante 15 min atinge 43%. O meio de cultura se diferencia do utilizado nesta experiência pela presença de  $\text{CaCl}_2$  e extrato de levedura, a primeira subs

tância e conhecida como indutora da produção de celulase devido ao cation Ca e a segunda é fonte de vitaminas do complexo B utilizadas pela levedura para sua reprodução.

### 3.7 Produtividade.

Considerando que 23% do bagaço foi digerido depois de 3 dias ou seja utilizaram-se somente 0.69 g ( 0.345 g em base seca) por 100 ml de meio e sabendo que foram produzidas 0.061 g de levedura por 100 ml de meio pode-se dizer que a produtividade ou rendimento foi de 17.6 g de levedura por 100 g de bagaço digerido.

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Peso de células secas (g)}}{\text{Peso de bagaço digerido (g)}} \times 100$$

$$\text{Produtividade} = \frac{0.061}{0.345} \times 100 = 17.6\%$$

### 4. Purificação da celulase

O ensaio para determinação da presença de celulase Cx feito com a enzima purificada deu resultado positivo, superior aos obtidos nos ensaios precedentes devido à concentração da enzima. Isto permitiu confirmar que a hidrólise da celulose do bagaço foi realizada pela enzima e não por outras substâncias.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSÕES

O fungo isolado é *Aureobasidium pullulans*. O tipo respiratório é aerobio - anaerobio facultativo.

A temperatura ótima de desenvolvimento é 27°C e o pH ótimo para início do crescimento é igual a 4,0.

Degrada o bagaço de cana de açúcar previamente tratado com NaOH produzindo o carboidrato glicose, e a enzima celulase Cx. A concentração de bagaço de cana melhor para obter um maior número de células nas condições estudadas é 3% e a produtividade igual a 17,6%.

Em consequência, poderia se utilizar para obtenção de proteína unicelular a partir de bagaço de cana de açúcar se a composição de aminoácidos fosse satisfatória em comparação com a proteína de referência da FAO (Food and Agricultural Organization) e oferecendo à levedura melhores condições de cultura para o seu desenvolvimento a fim de aumentar a produtividade.

CAPITULO VIIINDICE DE FIGURAS, TABELAS E APÊNDICE

## Figura Nº

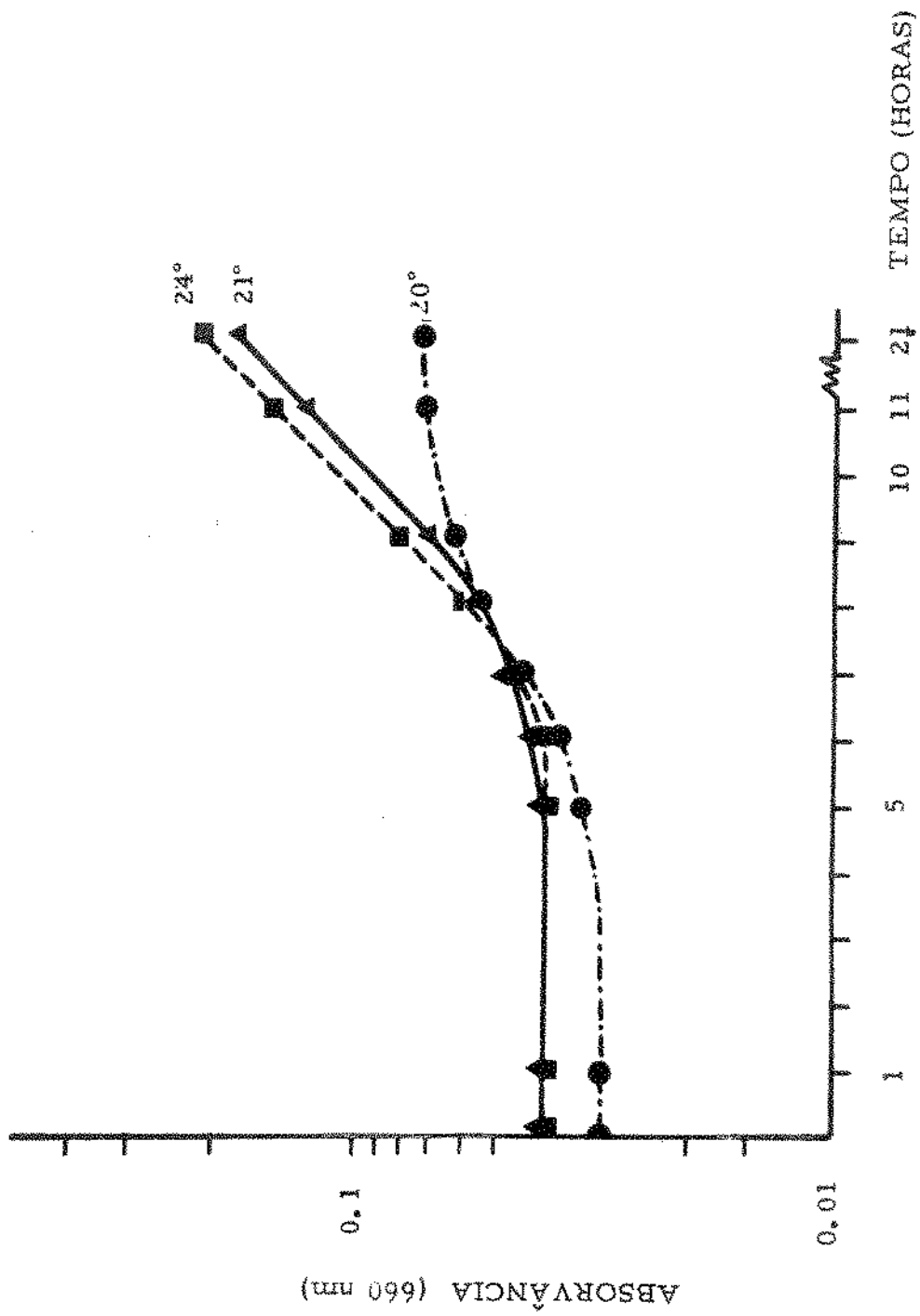
- 1 Curvas de crescimento de *Aureobasidium pullulans* em meio caldo malte-levedura, pH 5.5 às temperaturas de 20, 21, 24°C durante 21 h.
- 2 Idem a 25, 27, 28°C.
- 3 Idem a 29, 30, 32°C.
- 4 Idem a 34, 36, 38°C.
- 5 Figura de Van't Hoff Arrhenius para *Aureobasidium pullulans*.
- 6 Período de latência de *Aureobasidium pullulans* no meio caldo malte-levedura a pH 5.5 e a 27°C.
- 7 Desenvolvimento da levedura no meio bagaço 2% - sais a diferentes pH com agitação rotativa (220 rpm) a 27°C durante 5 dias.
- 8 Determinação de massa celular por absorvância.
- 9 Determinação de massa celular por contagem em placa.
- 10 Determinação de massa celular por contagem direta ao microscópio.
- 11 Cálculo da velocidade de crescimento da levedura no meio bagaço 3% - sais, tempo de duplicação e fase de latência.
- 12 Curva padrão de glicose (Método colorimétrico de Sogomogyi- Nelson)
- 13 Relação entre atividade celulolítica, multiplica -

ção das células e pH no meio bagaço 3% - sais a 27°C.

- 14 Determinação de atividade celulolítica (Cx).
- 15 Determinação do crescimento celular (contagem direta ao microscópio)
- 16 Relação entre concentração celular e porcentagem de Nitrogênio no *Aureobasidium pullulans*.

Tabela Nº

- 1 Valores de  $k \times 10^3$  correspondentes às temperaturas de incubação de *Aureobasidium pullulans*.
- 2 Relações entre Massa seca, Nitrogênio e nº células / ml



F I G U R A 1. - CURVAS DE CRESCIMENTO DE AUREO-BASIDIUM PULLULANS EM MEIO CALDO DO MALTE-LEVEDURA, pH 5.5. AS TEMPERATURAS DE 20; 21; 24° C DURANTE 21 H

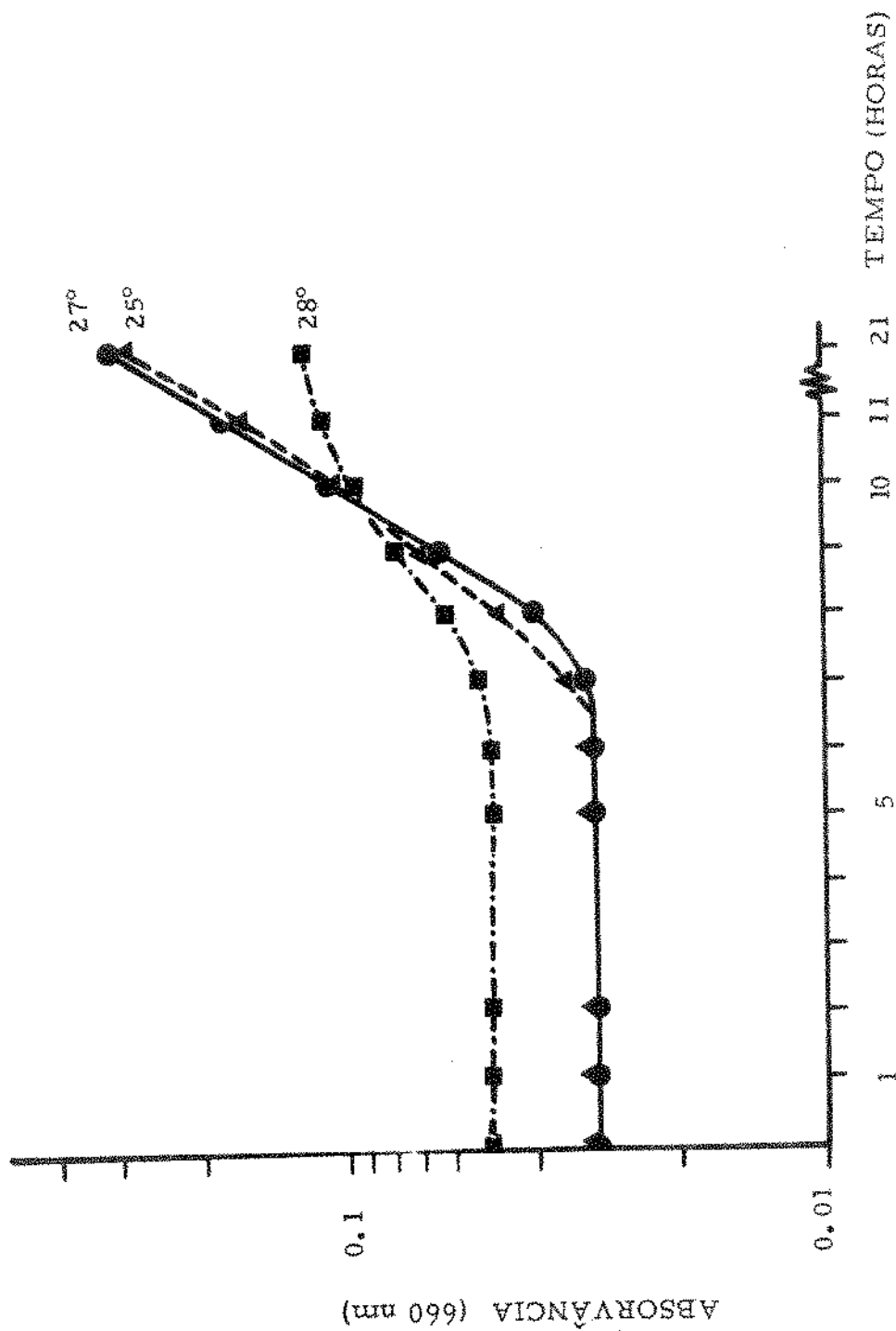


FIGURA 2.- CURVAS DE CRESCIMENTO DE AUREO  
 BASIDIUM PULLULANS EM MEIO CAL-  
 DO MALTE-LEVEDURA, PH 5.5 AS  
 TEMPERATURAS DE 25°, 27°, 28° C  
 DURANTE 21 H

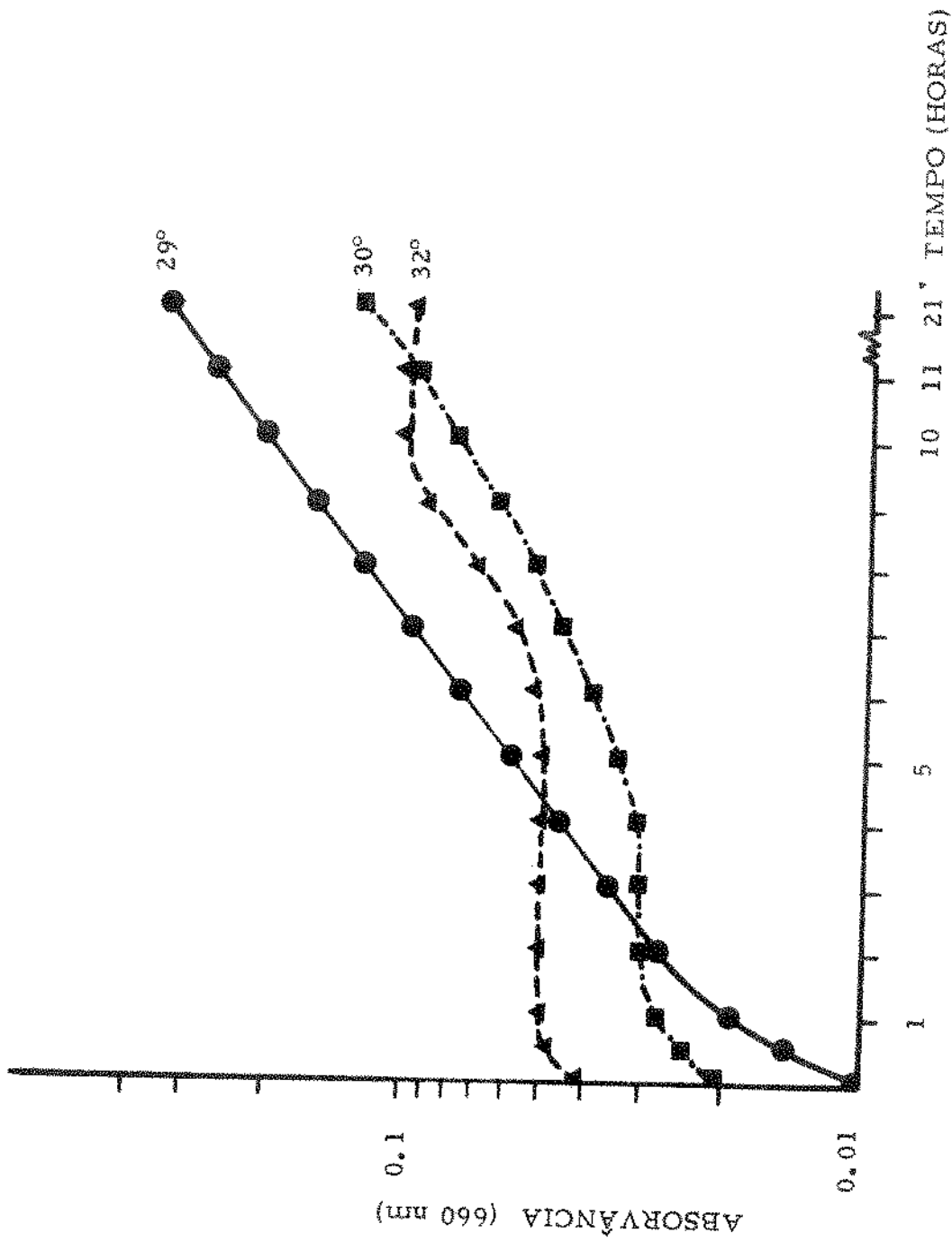


FIGURA 3.- CURVAS DE CRESCIMENTO DE AUREO  
 BASIDIUM PULLULANS EM MEIO CAL-  
 DO MALTE-LEVEDURA, pH 5.5 AS  
 TEMPERATURAS DE 29°, 30°, 32° C  
 DURANTE 21 H



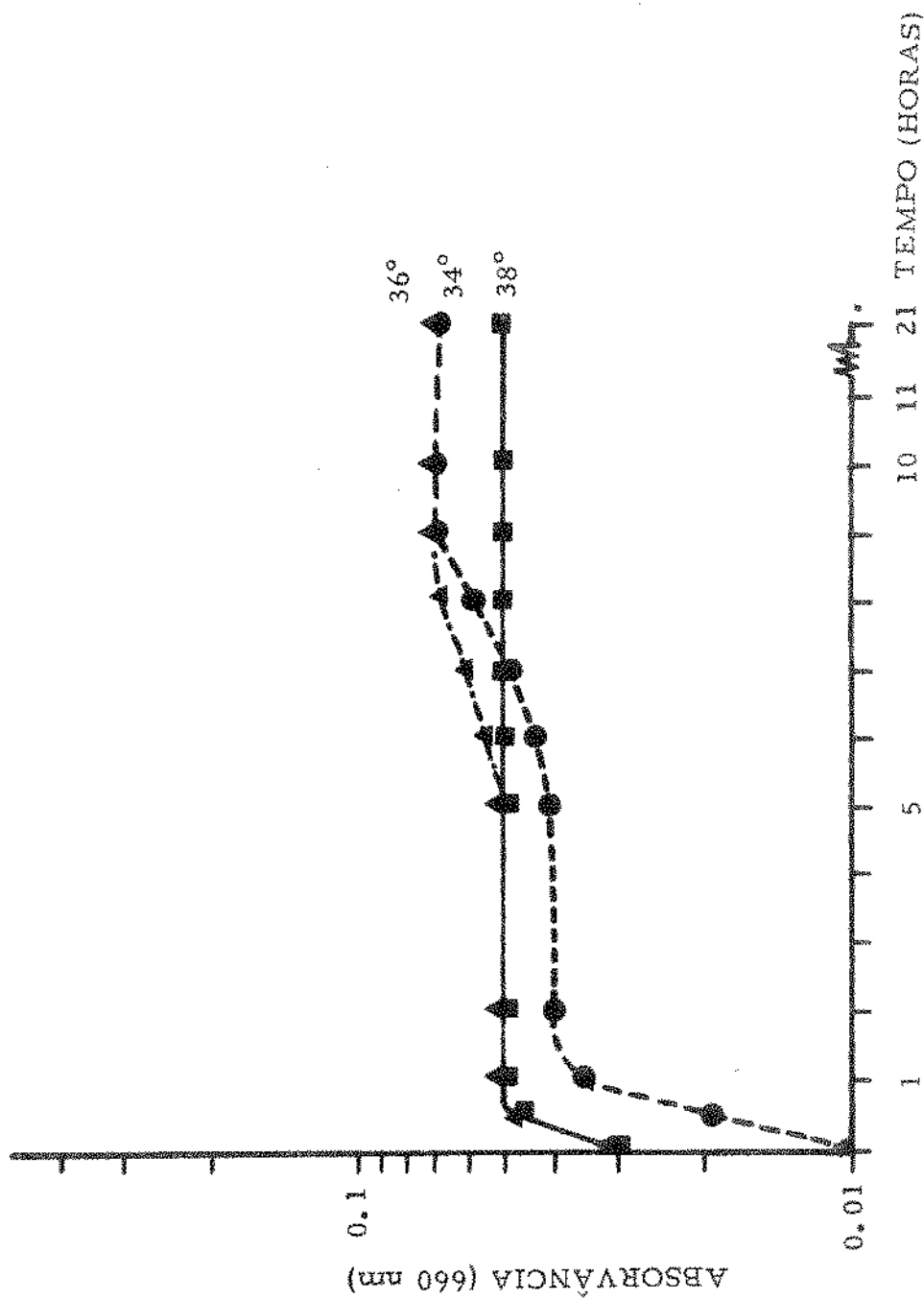


FIGURA 4.- CURVAS DE CRESCIMENTO DE AUREO  
 BASIDIUM PULLULANS EM MEIO CAL-  
 DO MALTE-LEVEDURA, PH 5.5 AS  
 TEMPERATURAS DE 34°, 36°, 38° C  
 DURANTE 21 H

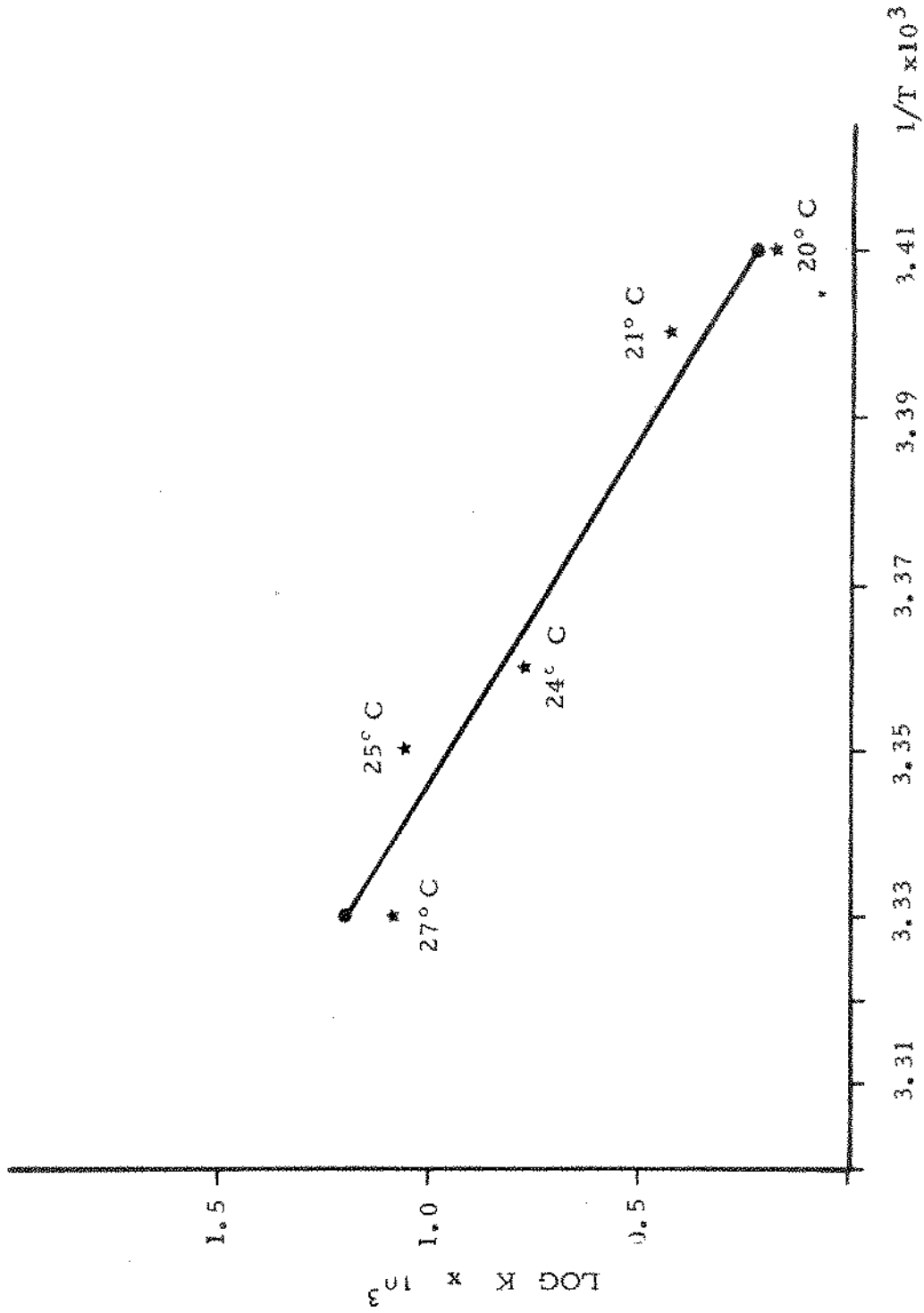


FIGURA 5.- FIGURA DE VANT HOFF-ARRHENIUS PARA AUREO-BASIIUM PULLULANS.

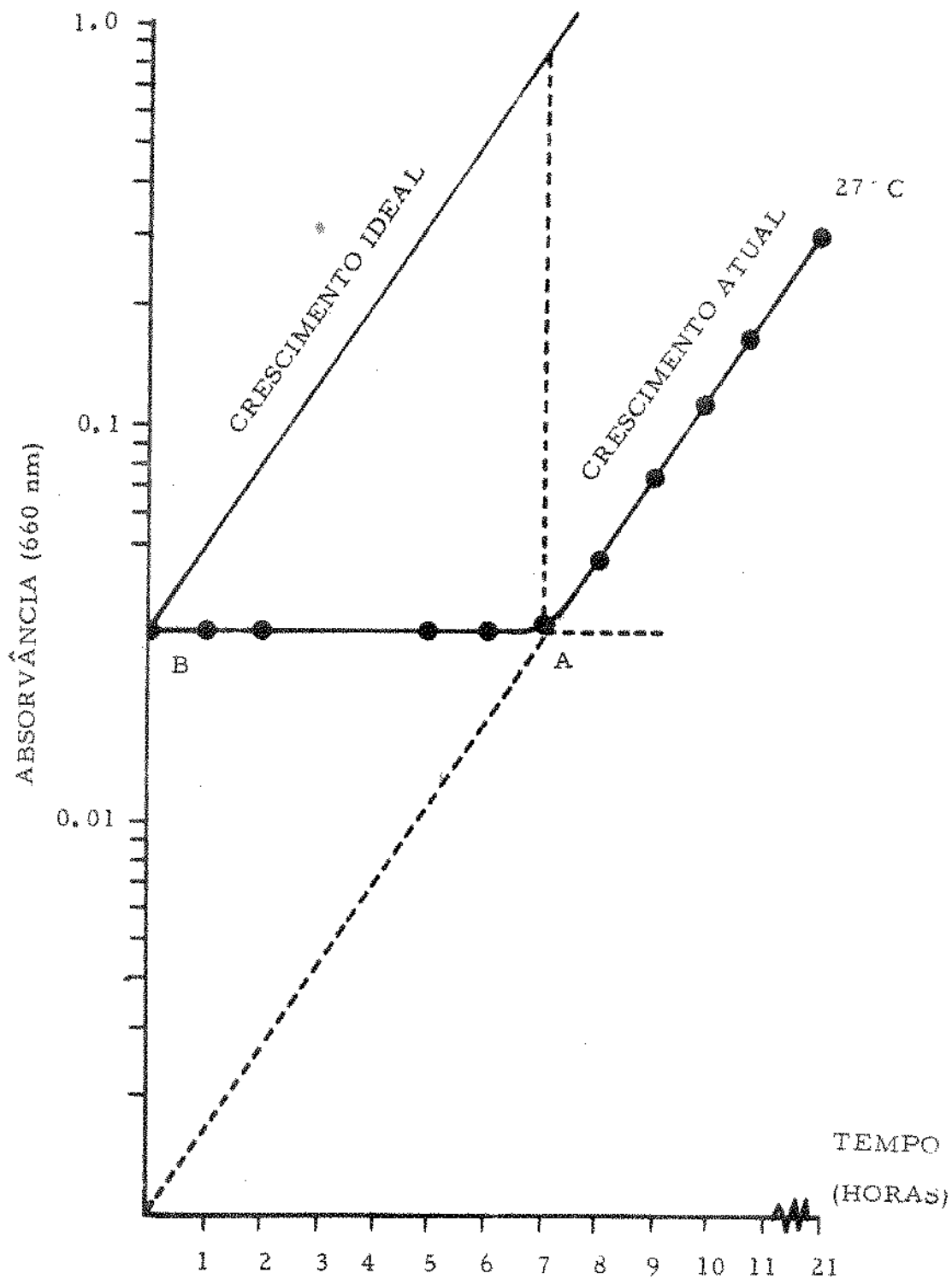


FIGURA 6. - PERIODO DE LATENCIA DE AUREO *BASIDIUM PULLULANS* NO MEIO CALDO MALTE-LEVEDURA A pH 5.5 e a 27° C = AB

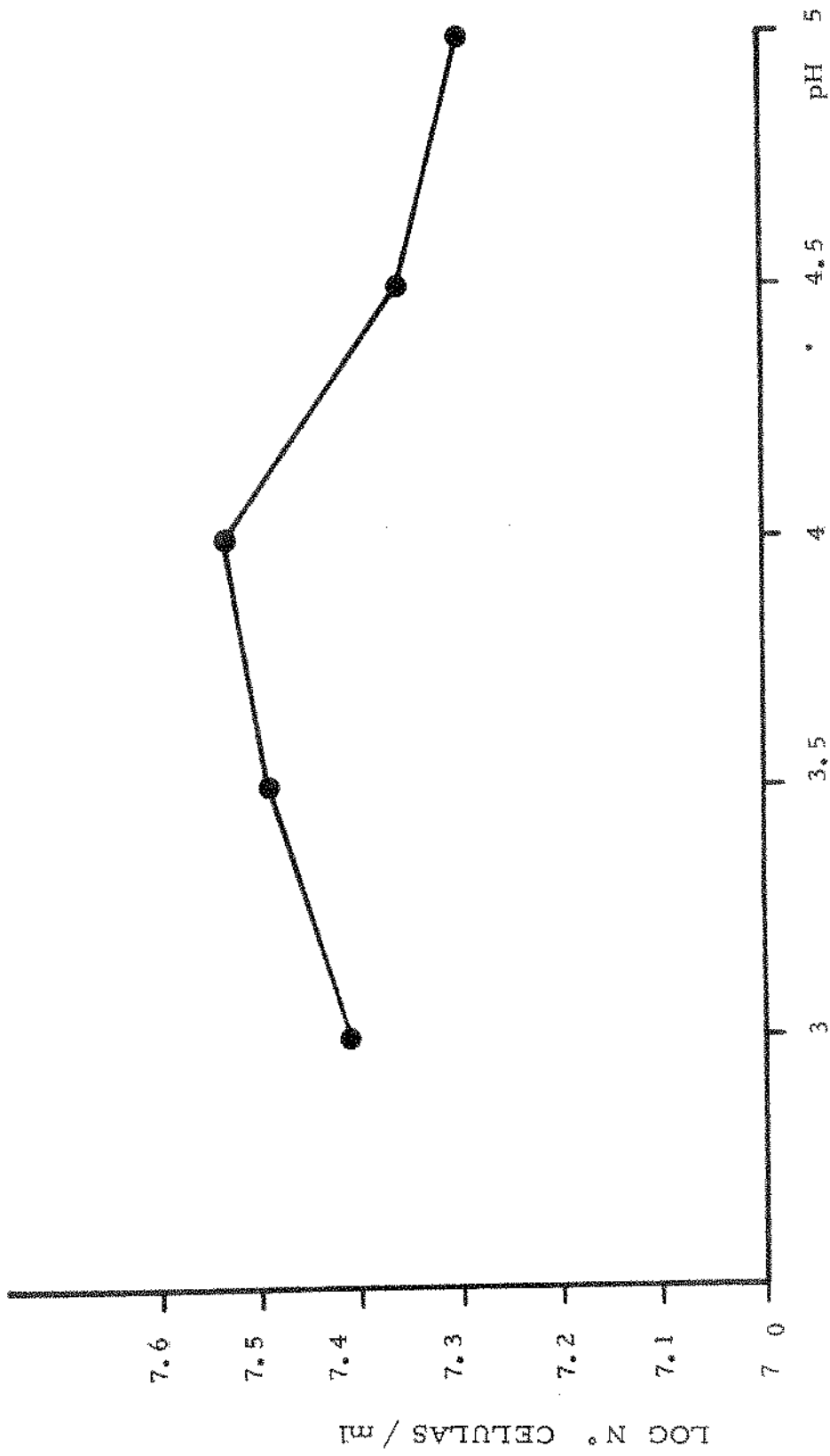


FIGURA 7. - DESENVOLVIMENTO DA LEVEDURA NO MEIO BAGACQ 2% -SAIS A DIFERENTES pH COM AGITAÇÃO ROTATIVA (220 R.P.M.) A 27° C DURANTE 5 DIAS

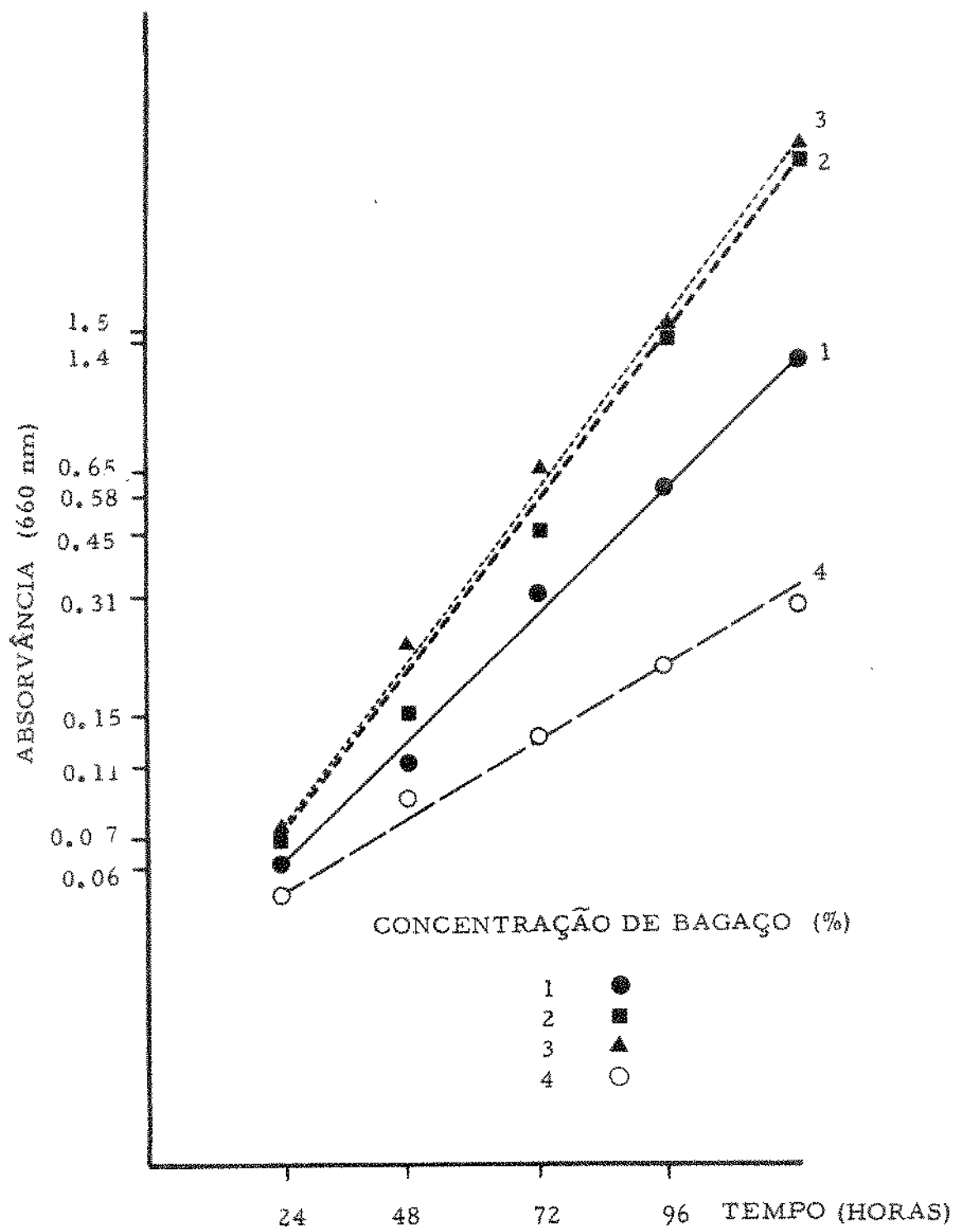


FIGURA 8. - DETERMINAÇÃO DE MASSA CELULAR POR ABSORVÂNCIA

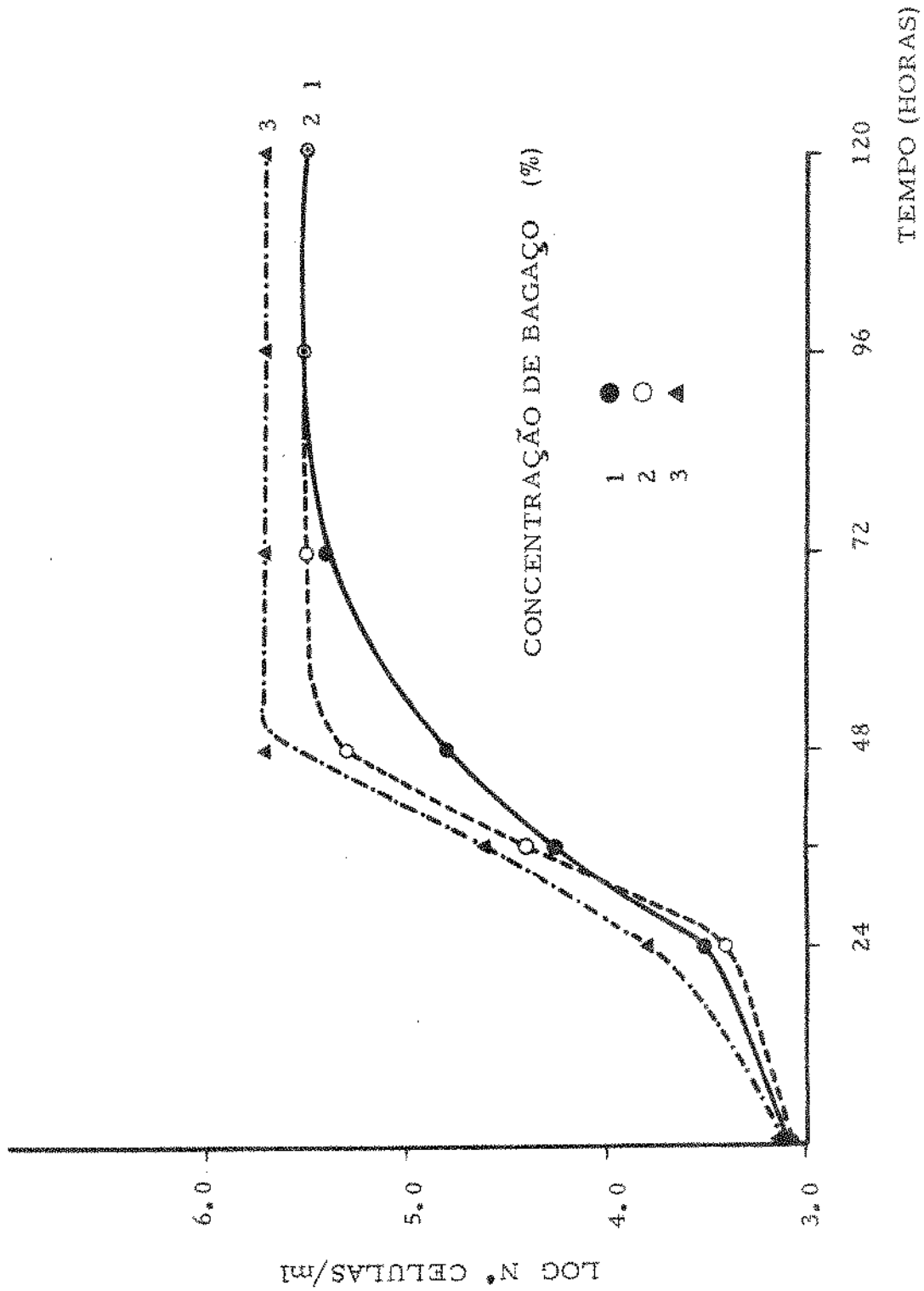


FIGURA 9. - DETERMINAÇÃO DE MASSA CELULAR POR CONTAGEM EM PLACA

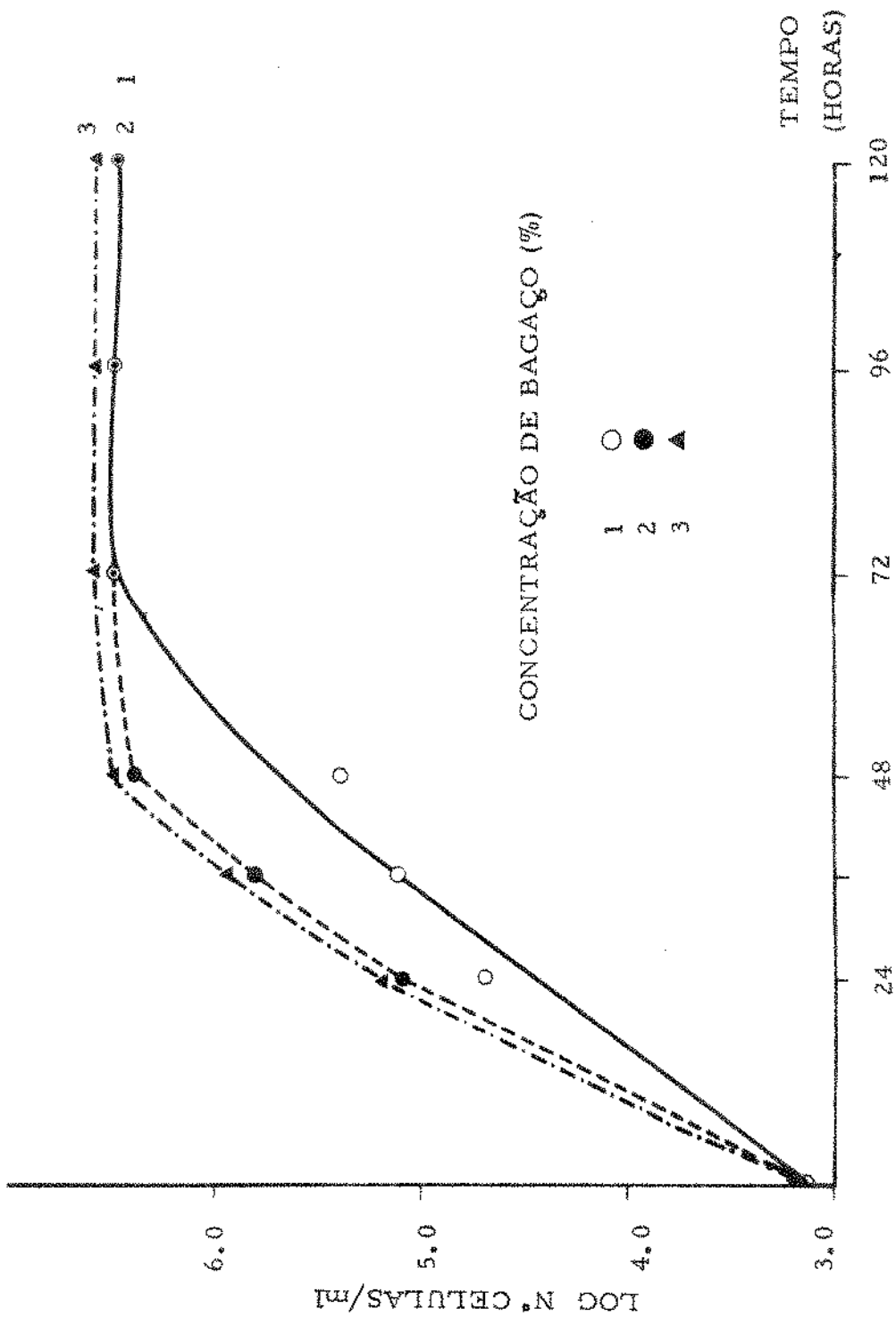


FIGURA 10. - DETERMINAÇÃO DE MASSA CELULAR POR CONTA GEM DIRETA AO MICROSCOPIO

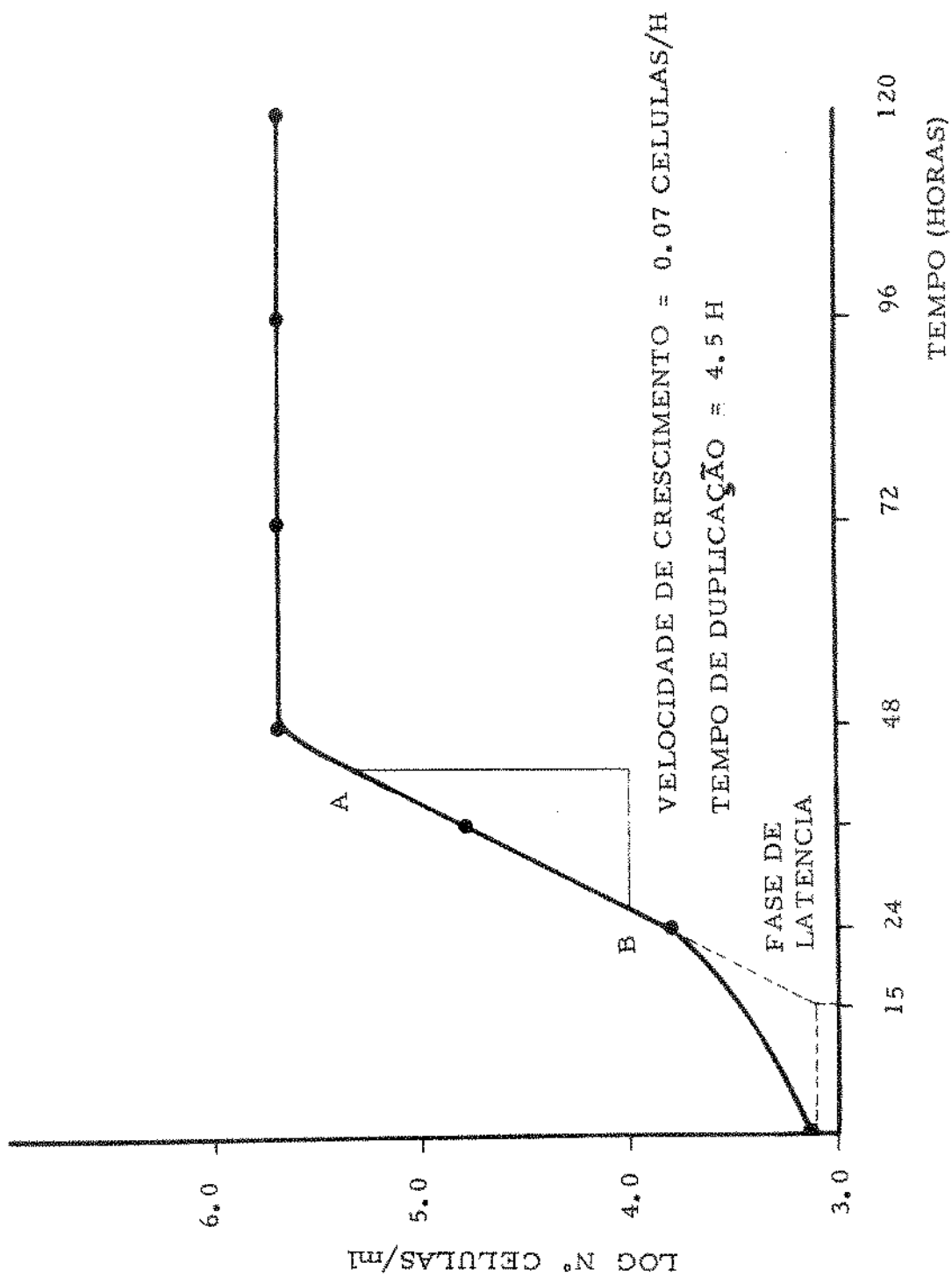


FIGURA 11.- CALCULO DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DA LEVEDURA NO MEIO BAGAÇO - 3% -SAIS, TEMPO DE DUPLICAÇÃO E FASE DE LATENCIA



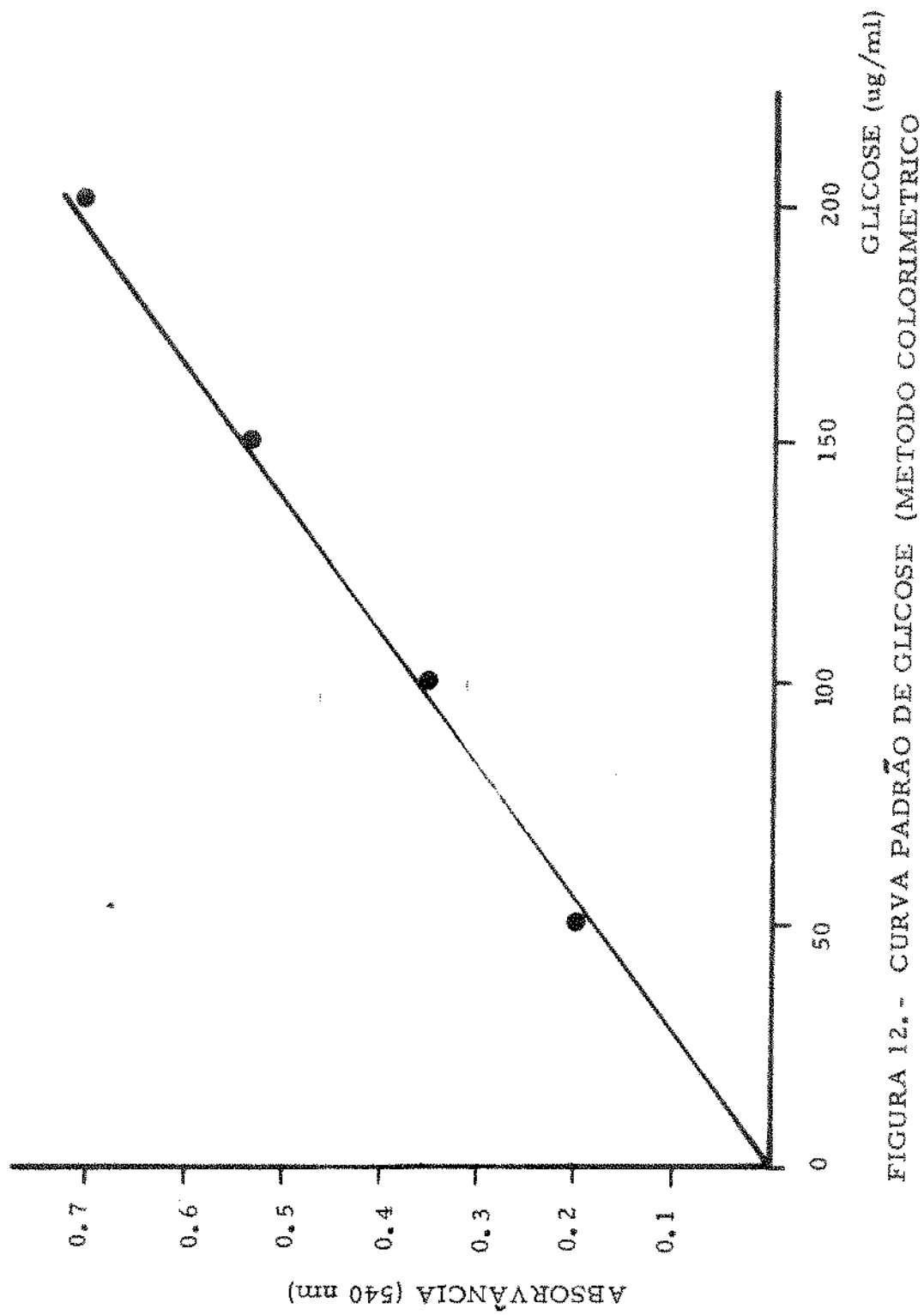


FIGURA 12.- CURVA PADRÃO DE GLICOSE (MÉTODOS COLORIMÉTRICO DE SOMOGYI-NELSON)

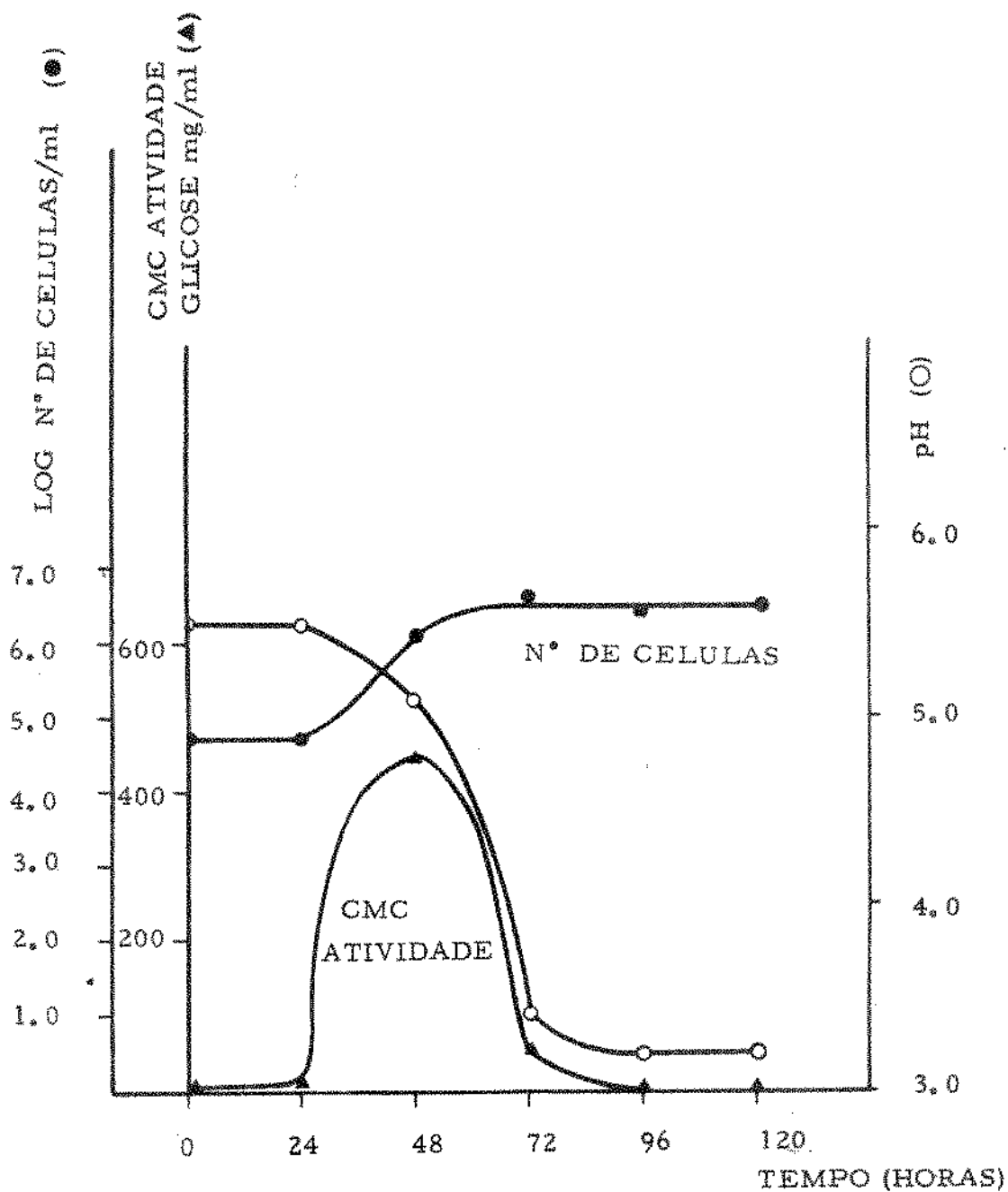


FIGURA 13. - RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE CELULOLÍTICA, MULTIPLICAÇÃO DAS CELULAS E pH NO MEIO BAGAÇO 3% - SAÍS A 27° C

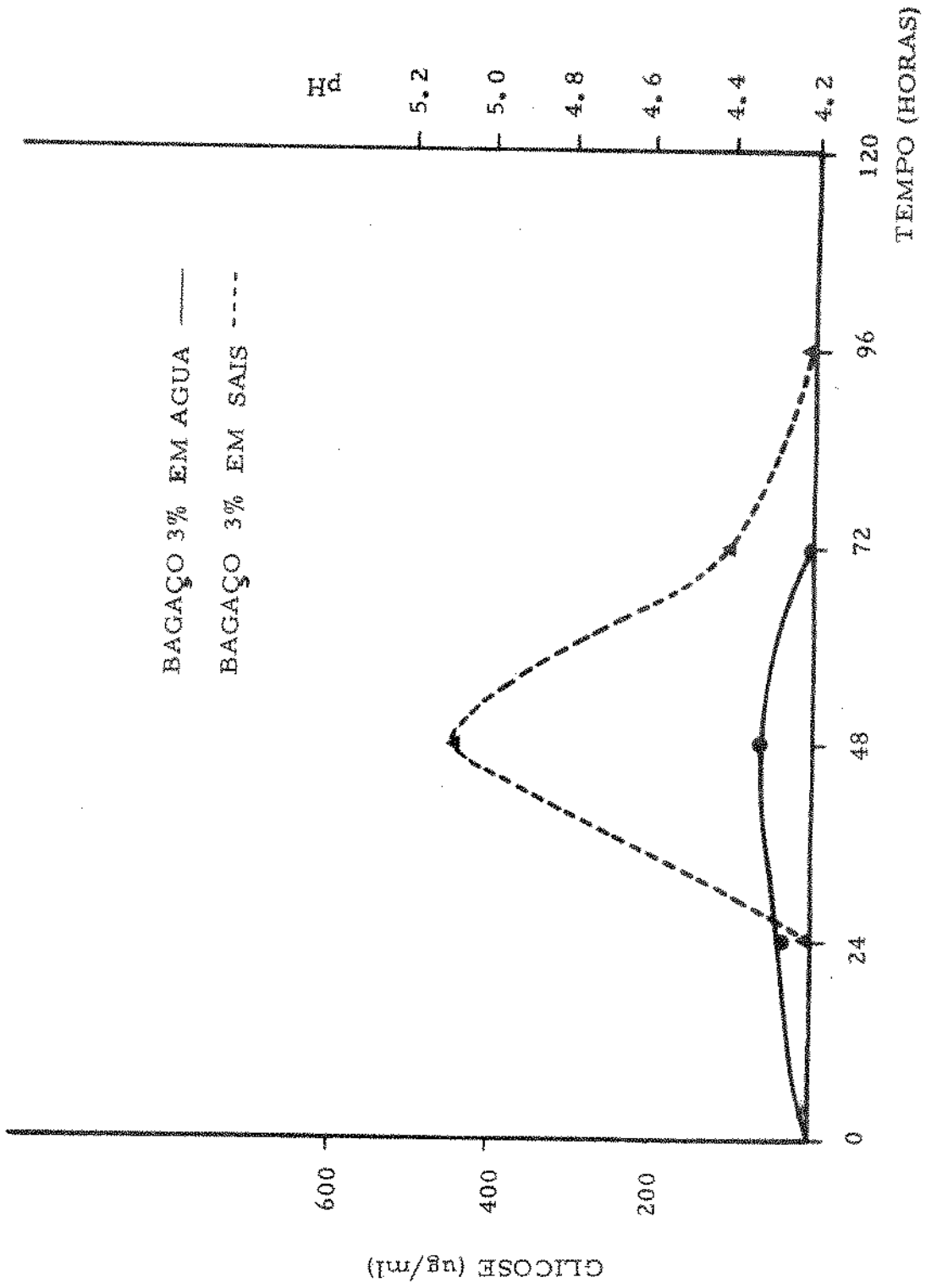


FIGURA 14.- DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE CELULOLÍTICA (Cx)

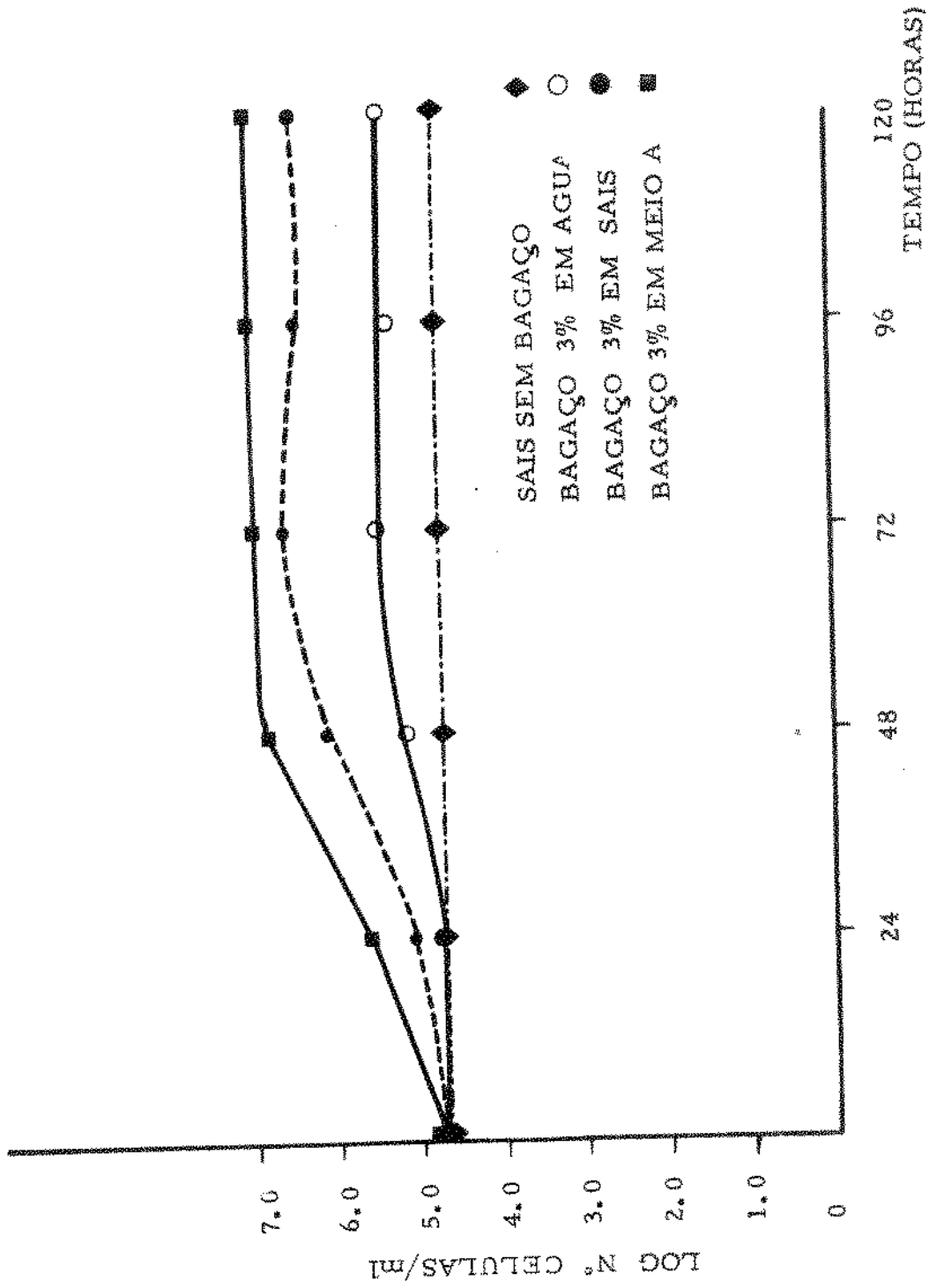


FIGURA 15. - DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR (COM TAGEM DIRETA AO MICROSCOPIO)

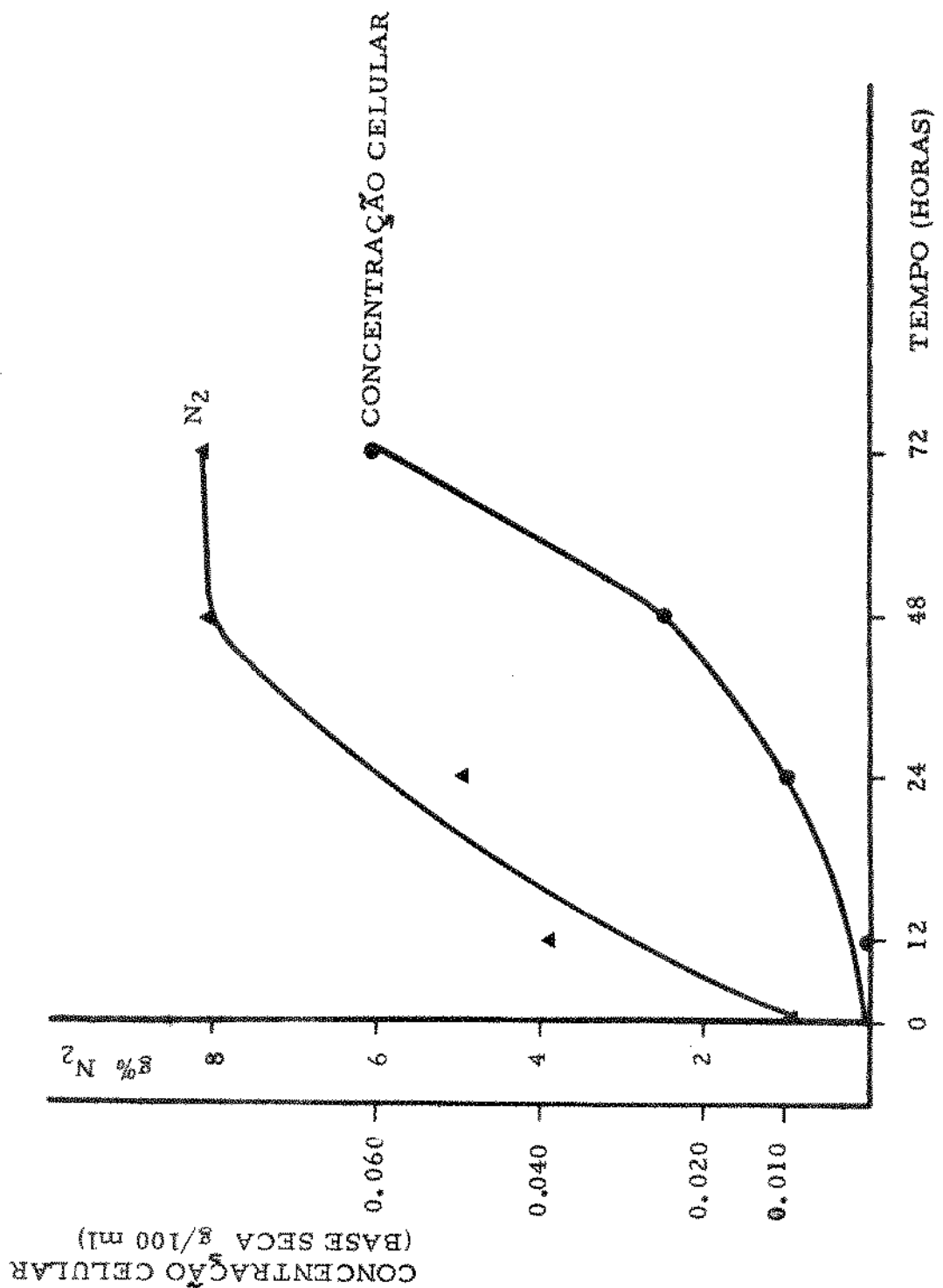


FIGURA 16. - RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO CELULAR E PORCENTAGEM DE NITROGÊNIO NO AUREOBA-SIDIUM PULLULANS

TABELA 1

Valores de  $k \times 10^3$  correspondentes às temperaturas de incubação de *Aureobasidium pullulans*

t (°C)	$k \times 10^3$	$\log k \times 10^3$	T	$1/T \times 10^3$
20	1.5	0.18	293	3.41
21	2.7	0.43	294	3.40
24	5.9	0.77	297	3.36
25	11.5	1.06	298	3.35
22	12.2	1.09	300	3.33
28	2.7	0.43	301	3.32
29	4.2	0.62	302	3.31
30	2.0	0.30	303	3.30

Nota: Os valores de K às temperaturas de 34, 36, 38°C não foram calculadas por serem valores desprezíveis.

TABELA 2

Relações entre Massa seca, Nitrogênio e N<sup>o</sup> células/ml

Tempo (h)	Massa seca (base seca, g/100 ml)	Nitrogênio (g%)	N <sup>o</sup> de células / ml
0	0.0002	0.74	$1.4 \times 10^4$
12	0.0020	3.90	$1.2 \times 10^5$
24	0.0100	5.00	$5.6 \times 10^5$
48	0.0250	8.12	$1.4 \times 10^6$
72	0.0610	8.16	$3.4 \times 10^6$

APÊNDICEMeios de cultura1. Meio de sais

	%
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0.2
$\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ *	0.2
KCl	0.08
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.06
NaCl	0.01
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0001
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0001

Ajustar a pH 5 - 5.5. Esterilizar a 15 lbs x 20 min.

\*Esta sal foi usada em substituição de  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$  da fórmula ori



ginal (37)

<u>2. Agar malte - levedura</u>	
Extrato de levedura	0.3
extrato de malte	0.3
peptone	0.5
glicose	1.0
agar	2.0

Esterilizar a 15 lbs x 20 min. Ajustar o pH após a esterilização, com ácido tartárico a 10% esterilizado por filtração.

3. Agar para estudo da morfologia de leveduras

(Bacto - yeast morphology agar - Difco)

Disolver 35 g do meio desidratado em 1000 ml de água destilada. Ferver até dissolução completa. Repartir 5 ml em tubos de 16 x 160 mm, esterilizar a 15 lbs x 15 min. Resfriar em posição inclinada. O pH final é 5.6 a 25°C.

4. Meio bagaco 2% - sais

Bagaco moído, tratado com NaOH e secado	2 g
Meio de sais	100 ml

Ajustar a pH 5.5. Esterilizar a 15 lbs x 20 min.

5. Agar farinha de milho

(Corn Meal Agar - Difco)

Disolver 17 g de meio desidratado em 1.000 ml de água destilada. Ferver até dissolução completa. Esterilizar a 15 lbs x 15 min. O pH final é 6.0.

6. Caldo malte - levedura

Extrato de levedura	0.3
---------------------	-----

extrato de malte	0.3
peptone	0.5
glicose	1.0

Ajustar a pH 5.5. Esterilizar a 15 lbs x 20 min.

7. Solução de AgNO<sub>3</sub> em acetona

Disolver AgNO<sub>3</sub> em um ml de água até saturação. Medir 200 ml de acetona, adicionar a solução saturada de AgNO<sub>3</sub> com agitação. Logo adicionar água até eliminação do precipitado branco.

8. Solução de NaOH 0.5 N em álcool

Disolver 20 g de NaOH na mínima quantidade de água destilada. Completar o volume até 1000 ml com etanol u com metanol.

9. Meio A

	%
Extrato de levedura	0.3
peptone	0.5
glicose	1.0

Ajustar a pH 5.5. Esterilizar a 15 lbs x 20 min.

10. Meio caseiro LACTRIMEL

Farinha de trigo	20 - 30 g
leite integral	200 - 250 ml
mel de abelhas	10 g
água	1.000 g
agar	20 g
cloranfenicol	250 mg

Esterilizar a 20 lbs x 20 min. (4)

CAPITULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARNAUD (de Bary)- Aureobasidium pullulans.  
Ann. My col. 8 : 475. 1910.
2. BELLAMY, W.D.- Single Cell Protein from Cellulosic Wastes.  
Biotech. and Bioengr. 16 : 869 - 880. 1974.
3. BINKLEY, W.- Reducing sugar methods. In: Carbohydrates.  
Chemistry and Biochemistry. Pigman W. and Horton D. ed.  
v. II B, cap. 45, p. 760 - 763.
4. BORELLI, D. - Medios caseros para micología.  
Arch. Ven. Med. Trop y Parasit. 4 (2): 301-302, 1962.
5. BROCK, T. - Population growth. In: Biology of microorganisms.  
Prentice Hall Inc. 1974, Cap. 7, pag. 228-231.
6. COOKE, B. e MATSURA, G. - Physiological Studies in the Black  
Yeasts. Mycopathol. Mycol. Appl. 21 : 15 - 271, 1963
7. DUNLAP, C.E. - Proteins from waste cellulose by chemical-  
microbial processing. Dissertation Abstracts Interna-  
tional. The Sciences and Engineering. 30 (4), 1653,  
1969.
8. \_\_\_\_\_ - Production of Single Cell Protein from In-  
soluble Agricultural Wastes by Mesophiles. In: Single  
Cell Protein II Tannenbaum S.R. and Wang Q.I.C. MIT  
Press. 1975. cap. 2, p. 244 - 262.
9. DURREL, L.W. - Studies of Aureobasidium pullulans (de Ba-  
ry) Arnaud. Mycopathol. Mycol. Appl. 35 : 113 - 114.  
1968.

10. GARCIA, D. et al - Hydrolytic degradation of Bagasse by enzymes produced by *Penicillium variable*. J. Ferm. Tech. 52 : 378 - 387, 1974.
11. GHOSE, T. - A note on the value of Cellulose. Notes. Mexico City, 1975.
12. GHOSE, T. and PATHAK, A. - Cell Division. In: Growth Function and Regulation in Bacterial Cells. Dean A. and Hinshelwood S. ed. Oxford Press. 1966.
13. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ - Cellulases I: Technology. Proc. Biochem. 8 (4); 35 - 38, 1973.
14. HAN, Y.W. and SRINIVASAN, V.R. - Isolation and Characterization of a Cellulose - utilizing Bacterium. Appl. Microbiol. 16 (8): 1140 - 1145, 1968.
15. \_\_\_\_\_ ; DUNLAP, C.E. and CALLIHAN, C.D. - Single Cell Protein from Cellulosic Wastes. Food Technol. 25: 130 - 133, 1971.
16. \_\_\_\_\_ ; and CALLIHAN, C.D. - Cellulose Fermentation: Effect of Substrate Pretreatment on Microbial Growth. Appl. Microbiol. 27 (1): 159 - 165, 1974.
17. HENDERSON, S. and PERRY, R. - Agricultural Process Engineering. In: Henderson and Perry ed. University of California. 2nd. ed. 1968, cap. 6, p. 128 - 133.
18. HODGE, J.E. and HOPREITER, B.T. - Determination of Reducing Sugars and Carbohydrates. In: Methods in Carbohydrate Chemistry. Whistler R. and Wolfrom M. ed. Academic Press. 1962, v.1, section 4, analyses, p. 383-386.

19. JANNINI, P. e JANNINI, P. filho - Interpretação Clínica do Hemograma, 7a. edição, cap. 2, p. 43 - 51.
20. LAMAMNA, C. and MALLETTE, M.F. - Growth of Bacteria. In: Basic Bacteriology. Willians and Wilkins ed. 3rd. ed. 1965. cap. 8, p. 374 - 376.
21. LODDER, J. & KREGER-VAN RIJ, N.J.W. - The yeasts. A taxonomical study. North Holland Publ. Co. Amsterdam. 1952.
22. MANDELSTAN, J. and Mc QUILLEN, K. - Growth: Cells and Populations. In: Biochemistry of Bacterial Growth. Mandelstan J. and Mc Quillen K. ed. cap. 2, p. 137 - 159.
23. MENEZES, H.; MENEZES, T. and VILLAS, H. - Fungal cultures and culture mediums for the Production of Cellulase. Biotech. Bioengr. 15: 1123 - 1129 . 1973.
24. NELSON, N. - A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153 : 375, 1944.
25. NISIZAWA, K. - Mode of the action of Cellulases. J. Ferment. Technol. 51 (4) : 267 - 304, 1973.
26. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C, 11 th ed. 1970. p. 533 - 535.
27. PAREDES, O. y GONZALEZ, Y. - Utilization of waste paper by mixed cultures for biomass production. J. Ferment. Tech. 51 (8): 619 - 623, 1973.
28. PEITERSEN, N. - Production of Cellulase and Protein from Barley Straw by *Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng.

- 12: 361 - 374, 1975.
29. PEITERSEN, N. - Cellulase and Protein production from mixed cultures of *Trichoderma viride* and a Yeast. *Biotech. Bioengr.* 17 : 1291 - 1299 , 1975.
30. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel. Reactivos Merck. E. Merck A.G. Darmstadt. Alemania. 1972.
31. REESE, E.T. ; Sin, R. & LEVINSON, H.S. - The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 59 : 485, 1950.
32. SOMOGYI, M.J. - A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160: 61, 1945.
33. \_\_\_\_\_ - Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195 : 19, 1952.
34. Sugar Cane Factory Analytical Control. The Official Methods of the Hawaiian Sugar Technologists. John H. Payne ed. 1968.
35. Tablas auxiliares para el Laboratorio químico. E. Merck A.G. Darmstadt. Alemania.
36. TONG, P.Q. ; SIMARD, R.E. & RIEL, R.R. - Selection d'une souche de *Rhodotorula* pour la production de proteines sur pomme de terre. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.* 6 (4) : 239 - 243, 1973.
37. UENO, K. et al. - Cell production from n-paraffin by *Candida kofuensis* MT-Y-8 at 37°C and pH 3.5 *J. Ferment.*

Technol. 52 (2): 867 - 872 . 1974.

38. UPDEGRAFF, D. - Utilization of cellulose from waste paper by *Myrothecium verrucaria*. *Biotechnol. Bioeng.* 13 : 77 - 97, 1971.
39. VASQUEZ, E.A. - Celulosa y Levadura del Bagazo de la Caña de Azúcar. Em: Utilización de los residuos de la Industria Azucarera. Editorial Técnico Azucarera. La Habana. 1a. ed. 1951, p. 83 - 102.
40. WICKERHAM, L.J. & BURTON, K.A. - Carbon assimilation test for the classification of yeasts. *J. Bacteriol.* 56 : 363 - 371. 1948.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Young Kun Park pelo entusiasmo e orientação para dirigir esta tese.

A Professora Sonia Salaberg do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

Aos Professores, pessoal técnico, administrativo e serventes da FEAA.

A Professora Norma de Castro da Faculdade de Farmácia da Universidade Central de Venezuela.

A Professora Mildred de Feo do Instituto de Medicina Tropical da Universidade Central de Venezuela.

A Faculdade de Farmácia da Universidade Central da Venezuela.

A meus colegas e amigos.