

**Potencial de crescimento da *Candida Utilis* em vinhaça de bioetanol enriquecida**

**Growth potential of *Candida Utilis* in enriched bioethanol vinasse**

DOI:10.34117/bjdv6n11-173

Recebimento dos originais: 10/10/2020

Aceitação para publicação: 10/11/2020

**Maria Lúcia Fernandes Reis**

Graduada em Agronomia

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba, Diamantina/MG. CEP 39100-000

E-mail: marialuciafreis@gmail.com

**Juliana Rocha de Meira Pires**

Doutora em Biocombustíveis

Instituto Federal do Norte de Minas Gerais/ *Campus* Diamantina

Endereço: Fazenda Biribiri, s/n. Diamantina/MG. CEP: 39.100-000

E-mail: juliana.rocha@ifnmg.edu.br

**Paulo Henrique Graziotti**

Doutor em Ciência do Solo

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba, Diamantina/MG. CEP 39100-000

E-mail: grazziot@yahoo.com.br

**David Lee Nelson**

Doutor em Química

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba, Diamantina/MG. CEP 39100-000

E-mail: dleenelson@gmail.com

**Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto**

Doutora em Ciência dos Alimentos

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba, Diamantina/MG. CEP 39100-000

E-mail: nisiavillela@yahoo.com.br

**Arlete Barbosa dos Reis**

Doutora em Engenharia Química

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba, Diamantina/MG. CEP 39100-000

E-mail: abreys@gmail.com

**Marcus Henrique Canuto**

Doutor em Química

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba, Diamantina/MG. CEP 39100-000

E-mail: quimcanuto@gmail.com

**Carla Luiza Barbosa Borges**

Graduada em Farmácia

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba, Diamantina/MG. CEP 39100-000

E-mail: carlaluizarp@hotmail.com

**Daniela Cristina Silva Oliveira**

Mestre em Biocombustíveis

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba, Diamantina/MG. CEP 39100-000

E-mail: daniela.sa@ifnmg.edu.br

**RESUMO**

A aplicação da vinhaça em altas doses no solo, pode causar efeitos indesejáveis como salinização e poluição do lençol freático, podendo também lixiviar vários íons, sobretudo nitrato e potássio. Uma das possibilidades para o uso da vinhaça ocorre com o tratamento biológico feito pela levedura *Candida utilis* - Torula. O uso da *Candida utilis* se tornou favorável para tratar a vinhaça, pois essa levedura tem capacidade em assimilar hexoses, pentoses, ácidos, álcoois e aldeídos. Através do cultivo da *Candida utilis* na vinhaça, é possível obter um novo resíduo que deixa de ser contaminante e pode ser descartado e utilizado como fertilizante. Este trabalho teve como objetivos avaliar e otimizar o crescimento de *Candida utilis* em vinhaça com 1 % de glicose, enriquecida com extrato de malte ou extrato de levedura. O delineamento foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 5, sendo os aditivos extrato de levedura e extrato e malte adicionados a vinhaça à 1 % de glicose, nas concentrações 0,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12 g L<sup>-1</sup>, com quatro repetições. De acordo com as análises bromatológicas feitas anteriormente, os carboidratos totais contidos na vinhaça utilizada, são açúcares essenciais para o crescimento de células da *Candida utilis* tornando-se inviável a adição de extrato de levedura e extrato de malte, já que além das características desejáveis da vinhaça, a adição da glicose ao meio promoveu maior produção de proteínas celulares tornando a prática viável e menos onerosa.

**Palavras Chave:** Microrganismo, subproduto, proteína.

**ABSTRACT**

The application of vinasse in high doses to the soil can cause undesirable effects such as salinization and groundwater pollution, and can also leach several ions, especially nitrate and potassium. One of the possibilities for the use of vinasse occurs with the biological treatment made by the yeast *Candida utilis* - Torula. The use of *Candida utilis* has become favorable to treat vinasse, as this yeast has the capacity to assimilate hexoses, pentoses, acids, alcohols and aldehydes. Through the cultivation of *Candida utilis* in vinasse, it is possible to obtain a new residue that is no longer contaminating and can be discarded and used as a fertilizer. This work aimed to evaluate and optimize the growth of *Candida utilis* in vinasse with 1% glucose, enriched with malt extract or yeast extract. The design was completely randomized and the treatments were arranged in a 2 x 5 factorial scheme, with the additives yeast extract and extract and malt added to vinasse at 1% glucose, in concentrations 0.0; 2.0; 4.0; 8.0 and 12 g L<sup>-1</sup>, with four repetitions. According to the bromatological analyzes carried out previously, the total carbohydrates contained in the vinasse used are essential sugars for the growth of *Candida utilis* cells, making it impossible to add yeast extract and malt extract, since in addition to the desirable characteristics of the vinasse, the addition of glucose to the medium promoted greater production of cellular proteins making the practice viable and less costly.

**Key words:** Microorganism, byproduct, protein.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a colonização, o açúcar assume papel de destaque nas exportações do Brasil. Até a década de 60, o país dependia do aumento da demanda internacional pelo produto, iniciando assim, o processo de modernização da agroindústria canavieira sob a tutela do Estado. Na primeira fase de modernização do setor, houve um desenvolvimento baseado na mudança de sua base técnica, a utilização de tratores e insumos importados foi o grande diferencial. Em 1975, houve uma expansão ainda maior no setor, devido à criação do Proálcool (Programa Nacional do Álcool), que respondeu à crise do petróleo e à diminuição do preço do açúcar no mercado internacional. O Proálcool incentivou a indústria automobilística brasileira, com a produção de um combustível alternativo aos combustíveis fósseis, produzido a partir de matéria prima renovável, com cadeia produtiva mais sustentável: o bioetanol (ALVES, 1998).

O Brasil apresenta uma estrutura bem forte na atividade sucroalcooleira. É referência no domínio tecnológico do setor que vai desde a produção da cana-de-açúcar, até a fabricação do açúcar e do álcool para o consumo final, sendo também o maior produtor mundial de álcool e açúcar vindos a partir do processamento da cana de açúcar (SEBRAE, 2008).

A vinhaça também conhecida por vinhoto, restilo, caldo ou garapão é um subproduto da fabricação do álcool e da cachaça. Dos resíduos da fabricação destes, a vinhaça é, sem dúvida, o mais importante não só em termos do volume gerado, mas também pelo seu enorme potencial poluidor. Portanto, o descarte da vinhaça é preocupante, já que, frequentemente, tem sido descartada a céu aberto, sem qualquer tratamento. Sua força poluente chega a ser cerca de cem vezes maior que a do esgoto doméstico, decorrente da sua riqueza em matéria orgânica e as consequências da ação poluidora da vinhaça no meio ambiente são preocupantes nos setores ambientais, sanitários e econômicos. Estima-se que cada litro de álcool produzido em uma destilaria, gera entre 10 e 15 litros de vinhaça (MENEZES, 1980; ANCIÃES, 1981; POLACK et al., 1981). A aplicação da vinhaça em altas doses no solo, pode causar efeitos indesejáveis como salinização e poluição do lençol freático, podendo também lixiviar vários íons, sobretudo nitrato e potássio (GURGEL, 2012; SILVA et al., 2007; FREIRE & CORTEZ, 2003). Porém quando a vinhaça é aplicada em doses adequadas, pode favorecer as propriedades químicas e a disponibilidade de alguns elementos para as plantas (SILVA et al, 2007; RAMIREZ, 2013).

Com o aumento na produção de etanol no Brasil, houve um aumento na produção da vinhaça, surgindo a necessidade do controle desse efluente. (CORAZZA, 2006; GRANATO & SILVA, 2016). A legislação ambiental referente às esferas federal, estadual e municipal, proíbe o descarte da vinhaça diretamente nos cursos de rios, lagos, oceanos, e até mesmo em solos e ar aleatoriamente, sem os devidos cuidados quanto ao previsto nas leis (SCHNEIDER et al., 2012). Para o descarte ideal é

necessário o tratamento físico-químico e a normalização do produto, com o intuito de ajuste à capacidade de absorção de solos, evitando a contaminação de cursos d'água e mananciais subterrâneos (ROSSETO, 2004).

Uma das possibilidades para o uso da vinhaça ocorre com o tratamento biológico feito pela levedura *Candida utilis* - Torula. Esta tem sido estudada como fonte proteica na alimentação humana e na dieta para animais, devido às suas propriedades nutricionais. As leveduras são as fontes mais antigas de proteínas presentes em produtos naturais, bebidas e alimentos elaborados por processos fermentativos (COSTA, 2004). É também fonte biológica para obtenção de produtos de interesse na indústria farmacêutica e agrícola (WALKER, 1998).

O uso da *Candida utilis* se tornou favorável para tratar a vinhaça, pois tem capacidade em assimilar hexoses, pentoses, ácidos, álcoois e aldeídos (SANDRASEGARAMPILLAI & ARASARATNAM, 2011). Através do cultivo da vinhaça pela *Candida utilis*, é possível obter um novo resíduo que deixa de ser contaminante e pode ser descartado e utilizado como fertilizante. Além disso, a Torula é uma fonte proteica, com 35-45 % de proteína bruta e rica composição aminoacídica, com destaque para a lisina, metionina e cistina (PILOTO; MACÍAS, 2005). Na elaboração de rações para animais monogástricos, a levedura apresenta um conteúdo de lisina que supera amplamente o da farinha de soja, podendo substituir essa fonte proteica de alto custo (ROSTAGNO et al., 2007). Pesquisadores de Cuba foram os primeiros a desenvolver tecnologias para produzir leveduras utilizando como substrato base a vinhaça de destilarias, que permite reduzir a carga orgânica do resíduo e obter desta fonte, proteínas (OTERO et al., 2007).

Neste cenário, novos estudos se fazem necessários na busca por formas de aproveitamento de coprodutos advindos da indústria sucro-alcooleira, como a vinhaça, aliadas à geração de alimentos alternativos e à preservação ambiental. Este trabalho teve como objetivos avaliar e otimizar o crescimento de *Candida utilis* em vinhaça com 1 % de glicose, enriquecida com extrato de malte ou extrato de levedura.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

A vinhaça foi fornecida pela destilaria Agro Industrial de Pompéu S/A Açúcar, Etanol e Energia – Agropéu - na cidade de Pompéu, MG. Após filtrada em filtro de papel, a vinhaça foi acondicionada em garrafas pet previamente higienizadas com detergente e água em abundância. A amostra de levedura *Candida utilis*, previamente isolada, foi fornecida pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

## 2.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA

A caracterização da vinhaça foi feita no Laboratório de Tecnologia de Biomassas do Cerrado, localizado no Campus JK, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Os reagentes utilizados nas análises bioquímicas foram adquiridos nas casas comerciais de material para laboratório. As análises foram realizadas em triplicata e baseadas nos seguintes métodos: AOAC, 1990; IAL, 2008; Silva, 1981; Von De Kamer & Van Ginkel, 1952.

Para a determinação da acidez total titulável, foram adicionadas 3 gotas da solução fenolftaleína em erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 mL das amostras da vinhaça. Prosseguiu-se a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,01M. Após a filtragem da vinhaça por algodão, avaliou-se a quantidade de sólidos solúveis totais disponíveis nas amostras através de um refratômetro. O resultado foi expresso em °Brix.

A umidade foi determinada da seguinte forma: amostras de 20 mL de vinhaça foram aquecidas em estufa a 105 °C por 5 horas, obtendo-se o primeiro peso após 3 horas e os outros de 1h em 1h até seu peso constante. As amostras foram colocadas em dessecador até alcançar temperatura ambiente e logo após feita a pesagem dessas amostras.

Os açúcares redutores das amostras de vinhaça foram obtidos pelo método 3.5-dinitrosalicilato-DNS que baseia-se na determinação da atividade amilolítica pela hidrólise do amido catalisada por amilases (MILLER, 1959).

A determinação das cinzas contidas na amostra de vinhaça foi realizada pesando-se aproximadamente 5,0 g da amostra da vinhaça em cadinho previamente calcinado, incinerados a 550 °C em forno mufla por período de 4 h, aproximadamente, até obter cinzas claras (branco ou cinza claro). Esperou-se a temperatura da mufla baixar para 50-80 °C para retirada da amostra. As amostras foram colocadas em dessecador e após 1 hora, pesadas.

Os lipídeos das amostras de vinhaça foram extraídos com auxílio do éter etílico em extrator tipo Soxhlet. Em balões volumétricos de fundo chato, secos a 105 °C e pesados, foram acoplados cartuchos de papel contendo 0,5 g das amostras da vinhaça seca. Após a extração, os balões foram submetidos à secagem a 105 °C por 2 horas, colocados em dessecador por 20 minutos e pesados.

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com método de Lowry et al., (1951). Foram pesados 2,0 g de vinhaça desidratada a 60 °C até peso constante e diluídos em 10 mL de água destilada. Foram adicionados entre 20-50 µL da amostra diluída em tubos de ensaio de 10 mL e 1000 µL de reagente alcalino de cobre da (solução X), preparada com 10g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 50 mL de NaOH 0,5N; 0,1g de KC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> e 0,05g de CuSO<sub>4</sub>. O volume da solução foi completado para 100 mL com NaOH. Após 10 minutos foi adicionado 1000 µL do reagente Folin-Ciocalteau. O volume total foi completado para 3000 µL. Após 30 minutos, foi determinada a absorvância em Espectrofotômetro

a 660 nm. Para o cálculo da concentração de proteínas totais, foi elaborada uma curva analítica com concentrações conhecidas BSA, variando de 0 a 100 mg/L a partir de uma solução estoque 0,1%. Os resultados foram expressos em g/100 g.

A concentração de compostos fenólicos das amostras de vinhaça foram descritas pela metodologia de Singleton & Rossi, 1965. Essas amostras foram extraídas em metanol 80%. Foram adicionados 400 µL da amostra devidamente diluída em tubos de ensaio de 10 mL e 400 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após repouso de 5 minutos, foram adicionados 4 mL de carbonato de sódio 1 M e o volume total completado para 10 mL. Após 90 minutos, foi determinada a absorbância a 750 nm e elaborada uma curva analítica com concentrações conhecidas de ácido gálico, variando de 0 a 100 mg/L a partir de uma solução estoque de 100 mg L<sup>-1</sup>.

Para obtenção dos valores de carboidratos totais, os teores de cinzas, proteínas, lipídeos, fibra alimentar foram somados e depois subtraídos de cem e o pH da vinhaça foi medido com um pHmetro.

## 2.2 MANUTENÇÃO E CRESCIMENTO DA *CANDIDA UTILIS*

A levedura *Candida utilis* foi crescida em meio YMA (Yeast extract-malt agar) sólido composto por extrato de levedura (3,0 g L<sup>-1</sup>); extrato de malte (3,0 g L<sup>-1</sup>); peptona (6,0 g L<sup>-1</sup>); glicose (10,0 g L<sup>-1</sup>) e ágar (20,0 g L<sup>-1</sup>), no Laboratório de Microbiologia do Solo, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. E para conservação da cultura esta foi repicada mensalmente no mesmo meio YMA, incubada à 30 °C por 72 h e em seguida armazenada à 5 °C. Na conservação por congelamento, a levedura foi cultivada em meio YMA líquido, incubada por 24 h à 25 °C. Oito mililitros dessa cultura foram transferidos para tubos Eppendorf, adicionando-se 0,2 mL de glicerol esterilizado (SILVA et al., 1997), seguidos ao congelamento a -20 °C.

No processo de adaptação da levedura à vinhaça, uma alçada (alça de repicagem) da levedura crescida por 24 h em meio YMA sólido foi transferida para 50 mL de vinhaça previamente esterilizada, com pH ajustado para 5,5, e crescida por 24 h a 30 °C sob agitação orbital de 150 rpm, com três repetições. Em seguida, por duas vezes, sucessivamente, 100 µL da cultura da levedura foi transferido, novamente, para 50 mL da vinhaça esterilizada, pH 5,5 e crescida nas mesmas condições.

Para a determinação da curva de crescimento 100 uL da cultura previamente adaptada a vinhaça foi inoculado em 50 mL de vinhaça esterilizada a pH 5,5 e incubada a 30°C sob agitação orbital de 150 rpm. Durante 36 h, em intervalos de tempo de 4 em 4 horas, 400 µL da cultura foram retirados e submetidos à diluição seriada até 10<sup>-3</sup> e homogeneizadas. O corante azul de metileno (0,1%) foi adicionado para a distinção de células viáveis e inviáveis, e a contagem foi realizada em microscópio óptico com o uso da câmara de Neubauer após a adição da solução 0,1 % de azul de metileno, segundo a metodologia de Lee (1981).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 5, sendo os aditivos o extrato de levedura e o extrato e malte adicionados à vinhaça nas concentrações 0,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12 g L<sup>-1</sup>, com quatro repetições. Essas concentrações foram escolhidas com base na quantidade geralmente utilizada desses produtos nos meios de cultura.

### 2.3 OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DA *CANDIDA UTILIS*

Em todos os tratamentos foi adicionado 1 % de glicose à vinhaça, pois de acordo com testes preliminares, essa quantidade de glicose estimulou o crescimento da levedura. Após a adição dos aditivos nas concentrações pré-estabelecidas o pH foi ajustado para 5,5. Para o crescimento da levedura, 100 µL da cultura previamente adaptada à vinhaça foram adicionados em cada tratamento contendo 50 mL de vinhaça esterilizada. Os meios foram incubados por 36 h a 30 °C sob agitação orbital de 150 rpm. Em seguida, o número de células produzidas em cada tratamento foi avaliado determinando-se da curva de crescimento da *Torula*.

### 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância através do software SISVAR 5.6, e os dados de número de células de *Candida utilis* foram transformados em raiz quadrada de  $x+0,5$  por não apresentarem distribuição normal. Quando significativo, foram ajustadas curvas de regressão com auxílio do software TableCurve 5.01, e posteriormente testadas no Fcalcb32 com determinação do valor de F a 5% de probabilidade. Os gráficos foram confeccionados com o software SigmaPlot 10.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA

A composição físico-química da vinhaça advinda da indústria de bioetanol apresenta-se diferenciada dependendo da qualidade de solo em que a cana-de-açúcar foi plantada, da espécie de micro-organismo atuante na fermentação do substrato, da metodologia fermentativa adotada, dos equipamentos de destilação dentre outros (SILVA & ORLANDO FILHO, 1981). Neste trabalho, os resultados da caracterização físico-química da vinhaça foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores da média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos da vinhaça “in natura”

Parâmetro físico-químicos	Valores
Acidez Total Titulável %	2,5 ± 1,15
Sólidos Solúveis Totais %	1,2 ± 0,10
Umidade %	97,5 ± 0,09
Açúcares Redutores g/l *	10,61 ± 0,14
Cinzas % *	2,15 ± 0,11
Lipídios % *	9,5 ± 3,94
Proteínas totais g / 100 g *	16,39 ± 0,97
Compostos fenólicos g/100 g *	2,43 ± 0,08
Carboidratos totais % *	52,6 ± 5,99
pH	4,2 ± 0,03

\* Baseado em peso seco.

Arrigoni *et al.* (1993); Ferreira (2009); Mora *et al.* (2012) que desenvolveram suas pesquisas no uso da vinhaça como substrato para produção de biomassa proteica com fins alimentares, obtiveram resultados corroborados pelo presente trabalho para os seguintes parâmetros físico químicos da vinhaça *in natura*: sólidos solúveis totais (SST), umidade, açúcares redutores, proteínas totais e pH. De acordo com Cazetta & Celligoi (2005), a vinhaça bruta promoveu maior produção de biomassa por *RhodoTorula mucilaginosa* (7,05g L<sup>-1</sup>) e maior produção de proteína de biomassa foi atingida por *Saccharomyces cerevisiae* (2,29g L<sup>-1</sup>), sendo essa quantidade correspondente a 50,35% da biomassa total da levedura.

Os açúcares redutores são componentes essenciais aos bioprocessos realizados pelos microrganismos. No consumo desse substrato, os açúcares redutores são incorporados à biomassa proteica durante o cultivo das células da levedura. A produção de proteínas celulares é diretamente proporcional ao consumo de açúcares por leveduras como *RhodoTorula mucilaginosa*, *Candida lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae*. Essas espécies consomem 50% dos açúcares do meio composto por vinhaça bruta (MALTA, 2006).

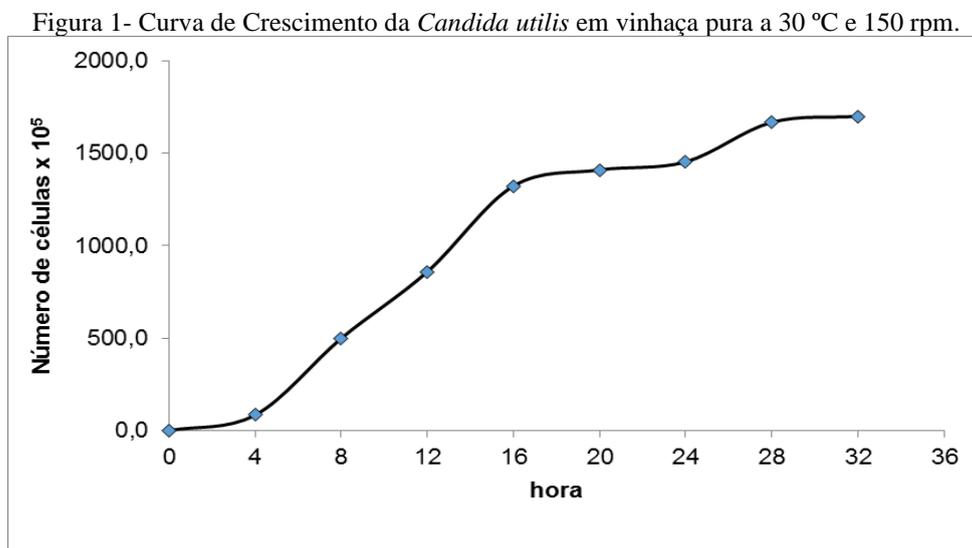
Com relação ao teor de umidade, a quantidade de água requerida pelos microrganismos é expressa em atividade de água disponível no substrato (RAIMBAULT, 1998). As leveduras apresentam maior demanda de água que os bolores e menor que as bactérias, sendo as condições mais favoráveis para as leveduras, a umidade em torno de 70% a 100% e temperaturas entre 28° C a 30° C.

Os lipídios presentes na vinhaça - resultado obtido com valor de 9,51 % - apresentaram-se em teor adequado à demanda da *Candida utilis*. Os triacilglicerois (TAG) e ésteres de esterois (EE), chamados num grupo de lipídios neutros, são lipídios requeridos pelas leveduras na estruturação da membrana das suas células. Estas depositam lipídios em corpúsculos hidrofóbicos delimitados por membrana fosfolipoproteica (ATHENSTAEDT *et al.*, 2006; BEOPOULOS *et al.*, 2011; BEOPOULOS *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Rodriguez et al. (2013) e Ferreira (2009) apontam a vinhaça como meio contendo propriedades adequadas ao cultivo de fungos pela alto teor de componentes orgânicos, como as proteínas. O valor de proteínas totais apontados nesta pesquisa corroboram com esta informação. O teor de proteínas totais na vinhaça é essencial na produção de biomassa proteica fúngica ou unicelular e de acordo com Silva et al. (2007), microrganismos produzidos a partir de matérias primas ricas em nitrogênio tendem a ter abundância em proteína, porque essa qualidade em nutrientes é diretamente proporcional à composição química do substrato.

### 3.2 OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DA *CANDIDA UTILIS*

O crescimento da *Candida utilis* em vinhaça in natura está representado graficamente de acordo com a Figura 1.

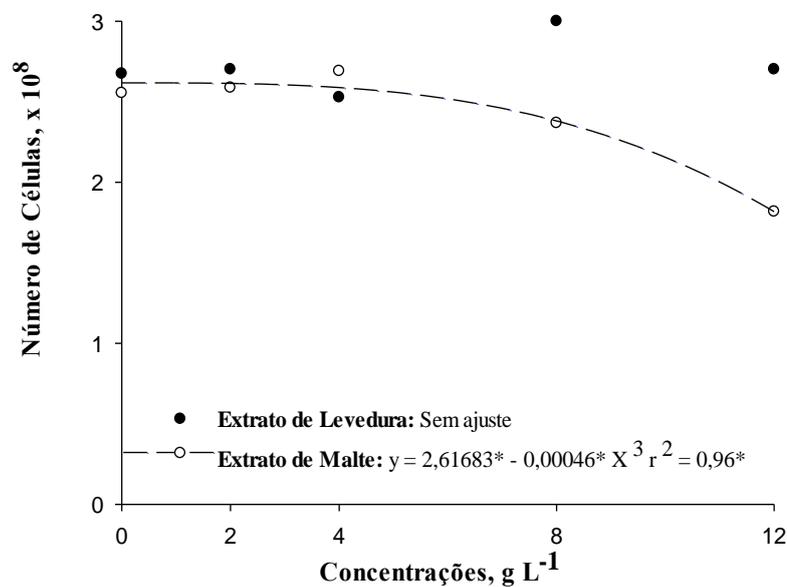


Verifica-se que as células da *Candida utilis* realizam um fenômeno chamado de diauxia, que significa a presença de dois açúcares diferentes no meio em que estão inseridas, neste caso a vinhaça. O primeiro crescimento exponencial das células da levedura (4h - 16h) indica a utilização de açúcares mais simples como fonte de energia, para aumento no número de células. Na fase Lag (16h-24h), as células entram na fase estacionária, interrompendo o seu crescimento e este intervalo aponta falta de fonte de energia de baixa complexidade para o consumo da levedura. A existência de uma segunda fase de crescimento exponencial sinaliza a utilização de fontes diferentes de energia, de acordo com a análise físico-química realizada, podendo ser um açúcar de cadeia mais longa que o primeiro utilizado, proteínas ou ainda lipídeos disponibilizados pela vinhaça (DE MEIRA et al., 2018). Do ponto 28 h em diante, as células voltam à fase estacionária de crescimento o que indica a relevância dos carboidratos totais contidos no substrato para o crescimento de células da *Candida utilis*. A fermentação tende a

acontecer em anaerobiose. No entanto, como o cultivo das leveduras foi realizado sob aeração fornecida pela agitação do shaker, a fermentação tornou-se restrita devido à presença do oxigênio, nas condições específicas do meio. A aeração induz à oxidação dos carboidratos através do processo de respiração realizado pelas células leveduriformes, e, em consequência, há decréscimo da produção de álcool e a multiplicação de células da levedura é favorecida (FURLETTI, 1987).

O crescimento da *Candida utilis* em vinhaça a 1% de glicose, enriquecida com extrato de levedura e com extrato de malte está representado graficamente de acordo com a Figura 2.

Figura 2 - Número de células de *Candida utilis* crescida em vinhaça a 1 % de glicose e adicionada de extrato de levedura e extrato de malte.



De acordo com a Tabela 2, verifica-se que não houve diferença significativa no crescimento das células entre a vinhaça pura (concentração  $0g L^{-1}$ ) e todas as concentrações de extrato de levedura e entre a vinhaça pura e as duas primeiras concentrações de extrato de malte (2 e  $4 g L^{-1}$ ). Ao utilizar extrato de levedura como suplemento proteico ao caldo de cana, foi obtido resultado positivo em rendimento de massa celular da levedura *Sacharomyces cerevisiae* (PULZATTO, 2000; JERONIMO *et al.*, 2008).

Tabela 2 - Valores obtidos para as médias do número de células de *Candida utilis* em cada concentração dos extratos testados, acrescentados à vinhaça com 1% de glicose.

Aditivo	Concentração					Média
	0	2	4	8	12	
	número de células x 10 <sup>6</sup>					
Extrato Levedura	267,33 Aa	270,00 Aa	252,67 Aa	300,00 Aa	270,00 Aa	272,00 A
Extrato Malte	255,33 Aa	258,67 Aa	269,00 Aa	236,67 Ba	181,67 Ba	240,27 B
<b>Média</b>	261,33 a	264,33 a	260,83 a	268,33 a	225,83 a	256,13

Valores seguidos de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não se diferenciaram estatisticamente pelo Teste Tukey ao nível de 5% de significância.

O extrato de malte nas concentrações 8 e 12 g L<sup>-1</sup> proporcionou menor produção de células do que a vinhaça a 1% de glicose e do que o extrato de levedura em todas as concentrações. A vinhaça merece destaque no que se refere ao seu emprego na fabricação de produtos biotecnológicos, sendo utilizada por microrganismos (ARNOLD, KNAPP & JOHNSON, 2000; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000). A vinhaça é rica em material orgânico e tem altos teores de nutrientes minerais. No aproveitamento de vinhaça bruta e melão da cana-de-açúcar como substratos na produção de biomassa proteica de *Rodotorula mucilaginosa*, a vinhaça bruta foi o meio que proporcionou maior produção tanto de biomassa quanto de proteína, com 72% e 77% de produtividade desses componentes, respectivamente quando comparadas às produzidas, usando melão. Na produção de biomassa das leveduras *Candida lipolytica*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida glutamicum*, não houve diferença entre a vinhaça bruta e o melão, porém o conteúdo proteico de *Sacharomyces cerevisiae* foi 40% maior no cultivo com vinhaça bruta do que no melão (CAZZETA & CELLIGOI, 2005).

A concentração de glicose no meio de cultura exerce uma função importante no metabolismo. Em meio de cultura que se utiliza glicose como fonte de carbono, a biomassa da *Candida utilis* pode apresentar elevado teor proteico, podendo chegar a 59,8% de proteína em relação ao peso seco, além de conter aminoácidos essenciais e vitaminas (GÉLINAS & BARRETTE, 2007). Portanto, a suplementação da vinhaça com glicose a 1% promoveu reprodução de células semelhante aos meios suplementados com extrato de levedura. Já em comparação com o extrato de malte, o crescimento proporcionado pela vinhaça e glicose a 1% foi mais satisfatório.

Considerando-se que a suplementação com extrato de levedura e extrato de malte torna o bioprocessamento de produção de proteínas celulares mais oneroso, a suplementação da vinhaça apenas com glicose foi mais viável.

#### 4 CONCLUSÃO

Não é necessário a adição de extrato de levedura e extrato de malte à vinhaça quando acrescida de glicose a 1%, nas concentrações acima citadas, para que o cultivo da *Candida utilis* aconteça de forma satisfatória. De acordo com as características bromatológicas, a vinhaça apresentou potencial suficiente para suprir as necessidades desses microrganismos, de forma que o produtor poderá realizar uma prática de baixo custo e ainda utilizar o subproduto do crescimento das células da levedura na fertirrigação.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, M.R.P.A. A dinâmica da cadeia de suprimento no setor sucroalcooleiro. 1998. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/ENEGEP1998\\_ART189\\_000fk4291cb02wyi v80sq98yqc2y714j.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/ENEGEP1998_ART189_000fk4291cb02wyi v80sq98yqc2y714j.pdf). Acesso em: 01 out 2020.
- ANCIÃES, A. W. *Avaliação tecnológica do álcool etílico*. 3 ed. Brasília: Editorial do CNPq, 1981.
- ANUPAMA, M., RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*, New York, v.18, n.6, p.459-479, 2000.
- ARNOLD, J. L.; KNAPP, J. S.; JOHNSON, C. L. The use of yeast to reduce the polluting potential of silage effluent. *Water Research*, New York, v.34, n.15, p. 3699-3708, 2000
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*. 13.ed. Washington: AOAC, 1984.
- ATHENSTAEDT, K.; JOLIVET, P.; BOULARD, C.; ZIVY, M.; NEGRONI, L.; NICAUD, J. M.; CHARDOT, T. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics*, v. 6, p.1450–1459, 2006.
- BEOPOULOS, A.; HADDOUCHE, R.; KABRAN, P.; DULERMO, T.; CHARDOT, T.; NICAUD, J-M. Identification and characterization of DGA2, an acyltransferase of the DGAT1 acyl-CoA:diacylglycerol acyl transferase family in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. New insights into the storage lipid metabolism of oleaginous yeasts. *Appl. Microbiol. Biot.*, v. 93, p. 1523–1537, 2012.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J-M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biot.*, v. 90, p. 1193–1206, 2011.
- CAZETTA M, CELLIGOI M. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para a produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactérias. *Semina*; 26:105-112, 2005
- COSTA, L. F. Leveduras na nutrição animal. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 1, n. 1, p.1-6, 2004.
- CORAZZA, R. I. Impactos ambientais da vinhaça: controvérsias científicas e lock-in na fertirrigação? XLIV CONGRESSO DA SOBER “Questões Agrárias, Educação no Campo e Desenvolvimento”, 2006. Disponível em: <<http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/147314/2/453.pdf>>. Acesso em: 01 out 2020.
- De Meira, J.R.M.P; Graziott, P. H.; Pinto, N. A. V. D.; Reis, A. B.; Reis, M. L. F.; Borges, C. L. B.; Nelson, D. L. Optimization of Protein Production By *Candida Utilis* In Industrial Vinasse With Applicability In Food. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, p. 13-26, 2018.
- FERREIRA, L.F.R. *Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos*. 2009. 135 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- FREIRE, W. J; CORTEZ, L. A. B. Vinhaça de cana-de-açúcar. Guaíba: Agropecuária, 203p. 2000. *Engineering Journal*, Lausanne, v.93, n.3, p.233-240, 2003.

FURLETTI, M.E.M. Fatores físicos químicos que interferem na fermentação alcoólica. In: DEANGELIS, D.F. (Org). *Microbiologia da Fermentação Alcoólica*. Rio Claro: UNESP, , p.72-79, 1987

GRANATO, E. F; SILVA, C. L. Geração de energia elétrica a partir do resíduo vinhaça. An. 4. *Enc. Energ. Meio Rural*, 2002.

Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/pdf/agrener/n4v2/074.pdf>. Acesso em: 01 out de 2020.

GÉLINAS, P.; BARRETTE, J. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresource Technology*, v. 98, 1138-1143, 2007.

GURGEL, M. N. A. *Tecnologia para aproveitamento de resíduos da agroindústria sucroalcooleira como biofertilizante organomineral granulado*. Tese de Doutorado em Engenharia Agrícola. Campinas, SP: [s.n.], 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 2.ed. São Paulo, 2008. v. 4, formato digital.

JERONIMO, E. M.; OLIVEIRA, E. S.; SOUZA, E. L. R.; SILVA, M. A.; SERRA, G. E. Addition of Proteic Nitrogen during Alcoholic Fermentation for the Production of Cachaça. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 65, n. 2, p. 161-168, 2008.

LEE, S. S.; ROBISON, F. F; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 11, p. 641-49, 1981.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MALTA, H. L. *Estudos de parâmetros de propagação de fermento (Saccharomyces cerevisiae) para produção de cachaça de alambique*. 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MENEZES, T. J. B. *Etanol: o combustível do Brasil*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. v.31, p. 426-428, 1959.

OTERO, M.A.; SAURA, G.; MARTÍNEZ, J.A.; et al. Fodder yeast production: a new approach for distillery vinasses treatment. *Proceedings International society of sugar cane technologists*, v.26, p.1127, 2007.

PILOTO, J.L.; MACÍAS, M. Studies on the chemical composition of Cuban Torula yeast grown on sugar cane molasses or from vinasse residues. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, (12)2: 111-115, 2005.

POLACK, J. A.; DAY, D. F.; CHO, Y. K. *Gasohol from Sugarcane-Stillage Disposition*. Louisiana: Audubon Sugar Institute, 1981.

PULZATTO, M. E. *Fatores que Influem na Obtenção de Biomassa de Levedura Seca (Saccharomyces Cerevisiae) da Fermentação Alcoólica*. 2000. 112 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.1, n.3, 1998.

RAMIREZ, N. N.V. *Estudo do crescimento da microalga Scenedesmus sp. em vinhaça*. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Porto Alegre. 109p. 2013.

RODRÍGUEZ, B.; VALDIVIÉ, M.; LEZCANO, P.; HERRERA, M. Evaluation of Torula yeast (*Candida utilis*) grown on distillery vinasse for broilers. *Cuban Journal of Agricultural Science*, Volume 47, Number 2, 2013.

ROSSETO, R.A cultura da cana, da degradação à conservação. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.1, n.1 p.8085, 2004.

ROSTAGNO, H. S.; BÜNZEN, S.; SAKOMURA, N. K. ; ALBINO, L.F.T. Avanços metodológicos na avaliação de alimentos e de exigências nutricionais para aves e suínos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, supl., p. 295, 2007

SANDRASEGARAMPILLAI, B.; ARASARATNAM, V. Palmyrah distillery spent wash for ethanol production by a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* S1 at 40°C. *Journal of the Institute of Brewing*, v.117, n.3, p. 451– 455, 2011.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Cadeia produtiva da indústria sucroalcooleira: *Cenários econômicos e estudos setoriais*. 2008. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br>. Acesso em: 12 Ago. 2016.

SCHNEIDER, C. F.; SCHULZ, D. G; LIMA, P. R; JÚNIOR, A. C. G. Formas de gestão e aplicação de resíduos da cana-de-açúcar visando redução de impactos ambientais. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró – RN, v. 7, n. 5, p. 08-17. 2012. (Edição Especial). Revisão de Literatura. ISSN 1981-8203.

SILVA, D.J.. *Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos*. Viçosa: UFV, Impr. Univers. 1981. 165p.

SILVA, G.M.A.; ORLANDO FILHO, J. - *Caracterização da composição química dos diferentes tipos de vinhaça no Brasil*. Boletim técnico PLANALSUCAR, Piracicaba, 3(8),1981.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.11, n.1, p.108-114, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos*. São Paulo, SP: Livraria Varela, 317 p, 1997.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

VON de KAMER, S. B.; VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.19, n.4, p.239-251, July/Aug. 1952.

WALKER, G.M. Yeast physiology and biotechnology. Chichester, New York: John Wiley, 1998. 350p.