



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
Departamento de Educação – Campus Senhor do Bonfim
Colegiado de Ciências Biológicas

DAIANE ALVES DE SOUZA

**CALDO DO MAMOEIRO (*Carica papaya*) COMO FONTE DE
NUTRIENTES PARA PROCESSOS FERMENTATIVOS**

Senhor do Bonfim – BA
Julho 2018

DAIANE ALVES DE SOUZA

CALDO DO MAMOEIRO (*Carica papaya*) COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA PROCESSOS FERMENTATIVOS

Monografia apresentada ao Colegiado de Ciências Biológicas do Departamento de Educação, Campus de Senhor do Bonfim, da Universidade do Estado da Bahia como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Gervásio Paulo da Silva

Senhor do Bonfim – BA

Julho 2018

DAIANE ALVES DE SOUZA

CALDO DO MAMOEIRO (*Carica papaya*) COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA PROCESSOS FERMENTATIVOS

Monografia apresentada ao Colegiado de Ciências Biológicas do Departamento de Educação, Campus de Senhor do Bonfim, da Universidade do Estado da Bahia como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

DATA DE APROVAÇÃO: ____/____/____

Banca examinadora

Gervásio Paulo da Silva (Orientador)

Henrique Reis Sereno

Jucilene Pinto da Silva

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me concedido saúde, disposição e forças para superar as dificuldades da vida acadêmica, permitindo que eu chegasse até aqui;

Agradeço aos meus pais Adonel e Benigna, minha irmã Daniela e toda a minha família que me deram apoio e incentivo para que eu não desistisse dos meus objetivos;

A esta universidade, direção, administração e demais funcionários, com quem convivi ao longo desses anos;

Aos meus professores, especialmente ao meu orientador Gervásio, pelos ensinamentos e pelo empenho dedicado à elaboração desse trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica, que despertou em mim o gosto pela área de microbiologia;

Aos meus colegas de laboratório, Maricleia, Bárbara, Fábio, Lorena e David pelas suas contribuições no desenvolvimento do meu trabalho, em especial minha amiga Queliane, que esteve comigo desde o início de minha pesquisa;

A todos os meus colegas de sala, aos que estão concluindo essa etapa junto comigo, aos que ainda concluirão, aos que desistiram ou mudaram de curso. Todos foram de fundamental importância na minha formação, especialmente minha amiga Milena pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis;

Sou grata aos meus amigos, que me estimularam a não desistir, particularmente minha amiga Gilmara pela força e torcida para que tudo desse certo;

À minha equipe de trabalho, pela compreensão quando precisei faltar por conta do TCC, principalmente à Simone Donatília;

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha vida acadêmica e de uma alguma forma me ajudaram a acreditar em mim, quero deixar um agradecimento eterno, porque sem essas pessoas não teria sido possível.

RESUMO GERAL

Os resíduos e subprodutos agroindustriais são considerados importantes substratos para a microbiologia industrial, com aplicação potencial em processos fermentativos. Entre esses substratos, a biomassa lignocelulósica e extratos vegetais vêm recebendo cada vez maior atenção, uma vez que representam fontes alternativas e promissoras de nutrientes para a produção de metabólitos microbianos. Diversos compostos economicamente importantes podem ser produzidos a partir de resíduos agroindustriais e de extratos vegetais, como o etanol. O caldo do mamoeiro (*Carica papaya*) contém açúcares e outros nutrientes que suportam o crescimento microbiano, assim pode ser empregado como fonte de nutrientes em processos fermentativos. Neste trabalho, foi avaliado o extrato líquido do mamoeiro como fonte de nutrientes para a produção de metabólitos microbianos, utilizando as leveduras *Aureobasidium pullulans* EBJ31, *Candida pseudointermedia* CAC01, *Rhodotorula mucilaginosa* CCC31, *Saccharomyces cerevisiae* comercial, *Trichosporon asahii* EPB13 e *Whickerhamomyces anomalus* CCC32.

Palavras-chaves: Inovação tecnológica; biotecnologia; substratos naturais.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	06
REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO I.....	13
RESUMO.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL DE MÉTODOS.....	17
Microrganismos e meios.....	17
Fermentação.....	17
Quantificação de crescimento.....	18
Determinação dos produtos da fermentação.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
Caracterização do caldo do mamoeiro.....	19
Produtos da fermentação.....	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
Referências.....	26

INTRODUÇÃO GERAL

A Biotecnologia remonta às culturas antigas, que utilizavam leveduras na fermentação de uvas e grãos para fabricar vinho e cerveja. Esses processos fermentativos, desde a preparação e estabilização de alimentos e bebidas, foram desenvolvidos muito antes da industrialização e sem os conceitos modernos de biotecnologia e química (ERTL; GLOYNA, 2003).

Com o desenvolvimento de novas técnicas, surgiu a biotecnologia industrial, também conhecida como biotecnologia branca, que compreende a aplicação moderna da biotecnologia. O processamento biotecnológico envolve a utilização de enzimas e microrganismos para geração de produtos químicos, materiais e combustíveis úteis a uma vasta gama de setores industriais a partir de fontes renováveis (WOHLGEMUTH, 2009).

Devido a sua associação com o consumo reduzido de energia, emissões de gases de efeito estufa e geração de resíduos, muito interesse foi gerado neste campo principalmente porque a biotecnologia industrial pode permitir a mudança do paradigma de produção baseada em combustível fóssil para obtenção de produtos químicos com valor agregado (TANG; ZHAO, 2009).

Desde o século XVIII, após a primeira revolução industrial, os seres humanos vêm explorando os recursos naturais de maneira insustentável. Isso causou alguns impactos irreversíveis ao meio ambiente (FASCIOTTI, 2017). A redução das reservas de combustíveis fósseis e seu crescente custo, aquecimento global, preços das matérias-primas, políticas governamentais, conscientização dos consumidores e avanço tecnológico adicional estão entre os fatores que influenciam grandemente o crescimento da biotecnologia industrial. Assim, a demanda crescente por energia e a intensa busca pela sustentabilidade tem se tornado um grande desafio para a sociedade atual. O desenvolvimento tecnológico necessário para estabelecer uma matriz de energias renováveis se mostrou crucial. Na agricultura, melhorias na área da genética asseguraram a produção de variedades de cana-de-açúcar mais resistentes e com mais sacarose. Os avanços da bioquímica nas últimas décadas proporcionaram a visão de uma nova maneira de produzir etanol (RAELE et al., 2014).

Atualmente, a produção de etanol é feita a partir de matérias-primas como a cana-de-açúcar e o milho. Entretanto, a comunidade científica tem se esforçado no

desenvolvimento de novos processos utilizando a biomassa lignocelulósica, proveniente da indústria agrícola; tais substratos têm demonstrado alto potencial em processos fermentativos, além de serem economicamente viáveis (THAMMASITTIRONG et al., 2017), uma vez que paralelamente à contribuição da produção de biocombustíveis, o aumento no preço dos alimentos tem sido objeto de debate (ROSEGRANT, 2008). Isto é atribuído ao uso de culturas alimentares, particularmente do milho na produção de biocombustíveis. Diante disso, materiais lignocelulósicos, matérias-primas não alimentares, atraem uma enorme atenção à pesquisa como substratos alternativos para a produção microbiana de bioetanol e produtos de valor agregado (ROSA; GARCIA, 2009). Com isso, as pesquisas relacionadas à possibilidade de produzir etanol a partir da celulose vegetal, isto é, a conversão da celulose em açúcares simples, através da ação de enzimas e processos bioquímicos, possibilitando a fermentação. Este novo modo de produção é chamado de produção de etanol de segunda geração ou etanol celulósico (WYMAN et al., 2004).

A biomassa lignocelulósica, como os resíduos agrícolas e remanescentes florestais, são considerados materiais potenciais para a produção comercial de etanol de segunda geração (2G). Estas matérias-primas são rentáveis em comparação com amido e açúcar, ricos em carboidratos de primeira geração (1G) e são fundamentalmente não comestíveis por humanos devido a lignocelulose, evitando assim o conflito entre alimentos e combustível. Além disso, certas variedades de biomassa lignocelulósica são ricas em toxinas e, portanto, não podem ser usadas como material forrageiro (ALTHURI; GUJJALA; BANERJEE, 2017).

A lignocelulose consiste principalmente em celulose, hemicelulose e lignina. A efetiva aplicação desse tipo de material requer uma série de reações que promovam a hidrólise de seus constituintes. Então, métodos de pré-tratamento bioquímico para conversão de celulose em açúcares têm se tornado alternativas atraentes do ponto de vista econômico e ambiental (ZHANG; JIN; KELLY, 2007).

A utilização de resíduos agroindustriais é uma boa opção na produção de metabólitos microbianos, pois além de gerar resultados tão bons ou superiores aos de outras fontes de nutrientes também acarreta um impacto positivo no ciclo produtivo da agroindústria, gerando valor também aos seus subprodutos (OLIVEIRA, et al., 2013).

O glicerol, por exemplo, é usado em fermentações microbianas para produção de diversos produtos químicos valiosos, incluindo 1,3-propanodiol, di-hidroxiacetona, etanol e succinato. Neste contexto, o glicerol é utilizado como um substituto para

substratos tradicionais comuns, tais como sacarose, de glicose e amido (SUHAIMI, 2012), esse substrato é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10% do volume total do biodiesel produzido corresponde a glicerol (DASARI et al., 2005) e apesar de possuir inúmeras aplicações industriais, o glicerol bruto das usinas de biodiesel representa um problema para estas indústrias, pois não encontra aplicações no mercado, sendo desta forma uma promissora fonte de carbono para a microbiologia industrial (da SILVA et al., 2009). A conversão microbiana do glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e moléculas bioativas, é uma alternativa relevante para maior valorização da produção de biodiesel (PAPANIKOLAU et al., 2002).

Diversos resíduos têm sido estudados pela microbiologia industrial e muitos destes têm demonstrado ser ricas fontes de carbono e outros nutrientes; o resíduo de soja, por exemplo, quando investigado como fonte de nitrogênio, acrescido na fermentação do melaço de cana-de-açúcar, demonstrou ser uma fonte viável e barata com grande potencial para a produção de etanol (SALAKKAM et al., 2017). Outro substrato utilizado na produção de etanol é a manipueira (SUMAN et al., 2011), resíduo líquido resultante do processamento da farinha de mandioca.

A avaliação da produção de etanol a partir de syngas pela linhagem *Clostridium* P11 utilizando milhocina (Água de Maceração de Milho, AMM) como substituto para o extrato de levedura demonstrou que a AMM pode ser usada como uma fonte de nutrientes de baixo custo na fermentação de syngas. Alta densidade celular e fase estacionária foram alcançadas no fermentador de 7,5 L com 10 e 20 g/L de milhocina, o que resultou em 40% mais produção de etanol em comparação ao extrato de levedura (MADDIPATI et al., 2011).

Além dos resíduos provenientes da indústria agrícola, os extratos naturais também têm demonstrado ser excelentes matérias primas como fonte de nutrientes em fermentações microbianas para produção de etanol, como o caldo de beterraba (TAN et al., 2015), caldo de sorgo (APPIAH-NKANSAH et al., 2018) e caldo do tubérculo de alcachofra (MATÍAS et al., 2015).

Em um estudo utilizando *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bioetanol e biobutanol a partir do extrato de milho suplementado com 3 g de extrato de levedura/L, foi produzido 45,6 g de etanol/L em 72 h de fermentação. Para a fermentação de biobutanol, uma cepa esporogênica de *Clostridium beijerinckii* foi cultivada anaerobicamente no mesmo meio, obtendo-se uma concentração de butanol

de 8,3 g/L em 257 h. O grão de milho é um novo cultivo de energia canadense e uma fonte de açúcares prontamente fermentáveis, que tem o potencial de economizar energia e custos de enzimas (GOMEZ-FLORES et al., 2018).

O caldo de beterraba sacarina também pode servir como matéria-prima para a produção de etanol, devido ao seu alto teor de açúcares fermentáveis. A fermentação etanólica, em batelada, por *Saccharomyces cerevisiae* do caldo bruto e do caldo concentrado (*thick juice*), suplementado com cloreto de cálcio, potássio fosfato e sulfato de magnésio, mostrou que a adição de nutrientes minerais não melhora a concentração final de etanol, mas poderia acelerar a velocidade de fermentação. Os resultados de concentração, rendimento e produtividade de etanol em caldo bruto foram de 70,7 g/L, 89,8% e 21,2 g/L/h, respectivamente, enquanto que em caldo suplementado foi de 80 g/L, 82,5% e 8,8 g/L/h, respectivamente (TAN et al., 2015).

Além de etanol, outros compostos podem ser produzidos a partir de extratos naturais, um exemplo é a produção de biomassa com alto teor de lipídeos por *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15 a partir de hidrolisados de inulina e extrato de tubérculos de alcachofra de Jerusalém (ZHAO et al., 2010).

Outro estudo utilizando meio de extrato de mamão fermentado por *S. cerevisiae* para produção de proteína celular mostrou que o substrato é rico em nutrientes para a formação de biomassa com alto teor de sacarídeos e após análises químicas da biomassa seca evidenciaram que a proteína produzida possui alto valor nutricional, que pode ser usado na alimentação de gado e de aves de capoeira (MARAGATHAM; PANNEERSELVAM, 2011).

Dessa forma, a utilização de extratos naturais e materiais lignocelulósicos, provenientes da indústria agrícola resultaria em ganhos ambientais e econômicos, permitindo a produção de compostos de valor industrial, principalmente etanol de segunda geração, que vem sendo objeto de estudo nos últimos anos, além da possibilidade de substituir o petróleo por fontes renováveis.

REFERÊNCIAS

- ALTHURI, A.; GUJJALA, L. K. S.; BANERJEE, R. Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 245, n. August, p. 530–539, 2017.
- APPIAH-NKANSAH, N. B. et al. Ethanol production from mixtures of sweet sorghum juice and sorghum starch using very high gravity fermentation with urea supplementation. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. October 2017, p. 247–253, 2018.
- DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G.J.; **Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol**, **Applied Catalysis A: General**, v. 281, p. 225-231, 2005.
- da SILVA, G. P.; Mack, M.; Contiero, J. Glycerol: **A promising and abundant carbon source for industrial microbiology**. *Biotechnol. Adv.* 27 (1), p. 30–39, 2009.
- ERTL, G.; GLOYNA, T. Katalyse: Vom stein der weisen zu wilhelm ostwald. **Zeitschrift fur Physikalische Chemie**, v. 217, n. 10, p. 1207–1219, 2003.
- FASCIOTTI, M. Perspectives for the use of biotechnology in green chemistry applied to biopolymers, fuels and organic synthesis: from concepts to a critical point of view. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, n. September, p. 82–89, 2017.
- GOMEZ-FLORES, R. et al. Bioethanol and biobutanol production from sugarcorn juice. **Biomass and Bioenergy**, v. 108, n. November 2017, p. 455–463, 2018.
- MADDIPATI, P. et al. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6494–6501, 2011.
- MARAGATHAM, C.; PANNEERSELVAM, A. Production of Single Cell Protein from Yeast using Papaya Extract Medium. **Pelagia Research Library**, v. 2, n. 2, p. 14–18, 2011.
- MATÍAS, J. et al. Optimisation of ethanol fermentation of Jerusalem artichoke tuber juice using simple technology for a decentralised and sustainable ethanol production. **Energy for Sustainable Development**, v. 25, p. 34–39, 2015.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Utilização de Resíduos da Agroindústria para a Produção de Enzimas Lipolíticas Por Fermentação Submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, n. 41, p. 19–26, 2013.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, L.; AGGELIS, G.; Marc, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 737-744. (2002).

RAELE, R. et al. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 87, p. 205–223, 2014.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, v. 32, p. 117–156, 2009.

ROSEGRANT, M. Biofuels and grain prices: impacts and policy responses. **International Food Policy Research Institute**, p. 1–4, 2008.

SALAKKAM, A. et al. Bioconversion of soybean residue for use as alternative nutrient source for ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 125, p. 65–72, 2017.

SUHAIMI Sheril Norliana; PHANG Lai-Yee; MAEDA Toshinari; ABD-AZIZ Suraini; WAKISAKA Minato; SHIRAI Yoshihito. **Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated *escherichia coli* ss1**. *Brazilian Journal of Microbiology* 506-516, 2012.

SUMAN, P. A. et al. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 4, p. 379–384, 2011.

TAN, L. et al. Production of ethanol from raw juice and thick juice of sugar beet by continuous ethanol fermentation with flocculating yeast strain KF-7. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 265–272, 2015.

TANG, W. L.; ZHAO, H. Industrial biotechnology: Tools and applications. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 12, p. 1725–1739, 2009.

THAMMASITTIRONG, S. N. R. et al. Evaluation of ethanol production from sugar and lignocellulosic part of energy cane. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n.

June, p. 598–603, 2017.

WOHLGEMUTH, R. The locks and keys to industrial biotechnology. **New Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 204–213, 2009.

WYMAN, C. et al. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. **Polysaccharides**, v. 43, p. 1–39, 2004.

ZHANG, Z. Y.; JIN, B.; KELLY, J. M. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 3, p. 251–263, 2007.

ZHAO, C. H. et al. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1121–1126, 2010.

CAPÍTULO 1

CALDO DO MAMOEIRO (*Carica papaya*) COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA PROCESSOS FERMENTATIVOS

Daiane Alves de Souza, Gervásio Paulo da Silva. Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Senhor do Bonfim, Bahia, Brasil.

Resumo

Os problemas ambientais relacionados aos combustíveis fósseis têm provocado a busca por fontes de energia e de matérias primas mais sustentáveis. Os substratos naturais e os resíduos agroindustriais são fontes alternativas e promissoras de nutrientes para a produção de metabólitos microbianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do caldo do mamoeiro como fonte de nutrientes em processos fermentativos. As leveduras *Aureobasidium pullulans* EBJ31, *Candida pseudointermedia* CAC01, *Rhodotorula mucilaginosa* CCC31, *Trichosporon asahii* EPB13, *Wickerhamomyces anomalus* CCC32 e *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann) foram utilizadas neste estudo. O caldo do mamoeiro foi utilizado puro e suplementado com 20 g de glicerol/L. Todos os isolados cresceram no caldo de mamoeiro puro e suplementado. *W. anomalus* CCC32 apresentou o maior consumo de glicerol (11 g/L em 120 h). O principal produto da fermentação foi o etanol e a maior produção foi por *S. cerevisiae* comercial, *C. pseudointermedia* CAC01 e *W. anomalus* CCC32, sendo de 3,85, 3,26 e 3,19 g/L em caldo de mamoeiro puro e de 7,36, 5,84 e 7,70 g/L em caldo de mamoeiro suplementado com glicerol, respectivamente. O caldo do mamoeiro demonstrou ser rico em nutrientes essenciais ao desenvolvimento microbiano e com potencial aplicação na biotecnologia de microrganismos.

Palavras-chaves: Inovação tecnológica; biotecnologia; substratos naturais.

INTRODUÇÃO

A preocupação com o meio ambiente vem motivando diversos segmentos industriais a buscarem novas formas de produção que atenda aos requisitos exigidos pelas políticas ambientais, de modo a minimizar os impactos causados à natureza. A biotecnologia de microrganismos, uma área que vem se desenvolvendo de forma significativa ao longo dos anos, busca por substratos de baixo custo para obtenção destes produtos, como por exemplo, o etanol, uma vez que a busca por combustíveis alternativos ao petróleo é, atualmente, um grande desafio mundial, devido a este ser um combustível fóssil, não renovável e altamente poluente.

A indústria de alimentos é responsável por uma produção significativa de resíduos e a utilização adequada dos mesmos ajuda a minimizar problemas ambientais e, além disso, pode gerar produtos com relevantes aplicações. Nos últimos anos, uma diversidade de resíduos da indústria agrícola têm sido estudados pela microbiologia industrial. Tais substratos representam uma fonte abundante de carboidratos, com potencial aplicação em processos de conversão microbiana em produtos de interesse comercial.

A limitação de fontes de primeira geração levaram pesquisadores a explorar novas matérias-primas na produção de bioetanol.¹ A utilização dos biocombustíveis objetiva a substituição de combustíveis fósseis, como a gasolina e conseqüentemente, a diminuição do uso de recursos não renováveis, permitindo a redução das emissões de gases poluentes. A demanda atual por fontes energéticas eficientes e sustentáveis projeta a necessidade de aumentar significativamente a produção nos próximos anos. Esse aumento poderá ser alcançado com a utilização de materiais lignocelulósicos, provenientes da indústria agrícola para produção de etanol e outros combustíveis renováveis, uma vez que, atualmente, o etanol está presente na matriz energética de muitos países como um dos biocombustíveis mais promissores para diminuir a dependência pelos combustíveis fósseis.

Os resíduos lignocelulósicos têm demonstrado ser excelentes matérias-primas para processos de bioconversão microbiana, devido principalmente à sua abundância e caráter renovável. Esses fatores têm despertado um grande interesse por esses substratos, uma vez que são fontes de energia que não contribuem para o acúmulo de gases de efeito estufa na atmosfera.² Outros resíduos também são promissores. O

glicerol é um resíduo das indústrias produtoras de biodiesel, que representa uma fonte de carbono potencial em processos da microbiologia industrial.³

A cana-de-açúcar é uma das maiores culturas do mundo e também uma das principais contribuintes para a diversificação energética e no desenvolvimento sustentável.⁴ Além da cana-de-açúcar, o etanol pode ser produzido por fermentação de várias culturas como sorgo⁵ e arroz.⁶ Alguns extratos naturais têm demonstrado alto potencial em processos fermentativos. A seleção do substrato adequado e barato é um importante componente de custo para a produção industrial de etanol. Substratos de base agrícola são substratos mais econômicos e alternativos. O caju, por exemplo, é um produto agrícola com alta concentração de açúcares redutores. O suco de caju pode ser utilizado diretamente para a produção de etanol sem qualquer pré-tratamento.⁷ Frutas ácidas, como a laranja, possuem menor teor de açúcares, e conseqüentemente menor rendimento na produção de etanol.⁸

A beterraba é também uma alternativa para produção de energia renovável. O processo de produção do etanol a partir da beterraba açucareira é o mesmo que o etanol de cana-de-açúcar, pois a beterraba é uma matéria-prima sacarina, sendo o etanol produzido a partir da sacarose.⁹ Um substrato não avaliado em outros trabalhos é o caldo do caule do mamoeiro, um extrato rico em nutrientes e com potencial para aplicações biotecnológicas.

A utilização de extratos naturais oriundos da indústria agrícola resulta em ganhos ambientais e econômicos, permitindo a produção de metabólitos industriais de valor. Dessa forma, considerando a necessidade de agregar valor aos resíduos agroindustriais e substratos agrícolas, contribuir para a redução da poluição ambiental e para o desenvolvimento econômico, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do caldo do mamoeiro como fonte de nutrientes e de carbono para a fermentação por leveduras, puro e suplementado com glicerol.

MATERIAL DE MÉTODOS

Microrganismos e meios

Foram avaliadas as leveduras *Aureobasidium pullulans* EBJ31, *Candida pseudointermedia* CAC01, *Rhodotorula mucilaginosa* CCC31, *Trichosporon asahii* EPB13, *Whickerhamomyces anomalus* CCC32, pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos (LBM) da UNEB, Campus Senhor do Bonfim, e *Saccharomyces cerevisiae* comercial (Fleischmann). Todos os isolados são mantidos em placas e tubos inclinados, em meio ágar batata dextrose (BDA) e também congelados em glicerol 40%. Periodicamente são feitas transferências para novo meio, visando manter a viabilidade das leveduras.

Foi avaliado o caldo do mamoeiro (*Carica papaya*), um extrato obtido a partir do caule desta planta. Para a obtenção do caldo do mamoeiro, a casca foi removida e a medula caulinar foi ralada e prensada manualmente para extração do líquido, com auxílio de flanelas e/ou filtro de café de polipropileno. O caldo foi transferido para garrafas de plástico e congelado até o momento de utilização. Uma parte da biomassa celulósica resultante da extração do caldo foi seca e guardada em sacos de polietileno. Outra parte da biomassa fresca e úmida foi congelada em sacos de polietileno, para estudos posteriores de aproveitamento dessa biomassa em processos da microbiologia industrial.

Fermentação

O caldo de mamoeiro foi descongelado no momento da utilização. Além da avaliação do caldo puro, sem adição de quaisquer reagentes e nutrientes, também foi avaliado a fermentação do caldo suplementado com glicerol puro.

Preparo dos inóculos: O inóculo foi preparado em meio YM, composto de extrato de levedura (3 g/L), extrato de malte (3 g/L), peptona (5 g/L) e glicose (10 g/L), autoclavado à 121 °C/15 min. Após inoculados com as leveduras, os frascos foram incubados (~16-18 h) em shaker rotatório a 150 rpm e 28 °C. O volume de inóculo utilizado foi de 5% (v/v) em relação ao volume final de fermentação.

Fermentação do caldo de mamoeiro: A fermentação foi conduzida em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio. Para a fermentação do caldo de mamoeiro puro, 95 mL do extrato foi autoclavado nos frascos. Para a fermentação do extrato suplementado, foi adicionado o glicerol (20 g/L) e o volume foi completado para 95 mL com o caldo de mamoeiro. Os frascos foram autoclavados a 121 °C/15 minutos e finalmente foi adicionado de 5 mL de inóculo. Os frascos foram incubados em shaker rotatório a 28 °C, sob agitação de 150 rpm. Amostras foram retiradas periodicamente para determinar o crescimento e quantificar os produtos da fermentação. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Quantificação de crescimento

Inicialmente, o crescimento celular foi determinado por espectrofotometria a 600 nm (DO_{600}). Considerando as dificuldades em determinar o crescimento com precisão por espectrofotometria, passou-se a utilizar a câmara de Neubauer para quantificar o número de células. Para quantificar os produtos da fermentação, aproximadamente um mL de amostra foi centrifugado a 9.167 g/5 min e o sobrenadante foi congelado para posterior análise e identificação dos produtos fermentativos.

Determinação dos produtos da fermentação

Os produtos da fermentação foram determinados por cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando HPLC Dionex (Ultimate 3000) equipado com degaseificador, amostrador automático e com detector UV/VIS para análise de ácidos orgânicos e detector RI para análise de álcoois e polióis, dispostos em série. Foi utilizada a coluna Rezex ROA organic acids (300 x 7,8 mm, Phenomenex) em temperatura de 55 °C e eluente H_2SO_4 0,005 M a 0,6 mL/min, previamente degaseificado em banho ultrassônico. As amostras foram diluídas no próprio eluente e filtradas em filtros de 13 mm em membrana de acetato celulose (0,22 μm). Um volume de 20 μl foi automaticamente injetado no HPLC e os dados integrados pelo programa Chromeleon 6.8 (Dionex). Os resultados foram plotados em planilha, construindo-se gráficos, relacionando-se o tempo de fermentação (h) x produtos da fermentação e substrato (g/L).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do caldo do mamoeiro

A avaliação dos constituintes do caldo bruto demonstrou que o mesmo apresenta em sua composição os açúcares sacarose, glicose e frutose, com valores de 7,08, 3,64 e 0,95 g/L, respectivamente. O caldo de mamoeiro apresenta °brix igual a 4,0 e pH 5,58. Considerando ser este um substrato natural, a composição e características podem variar por vários motivos, como variedade, idade da planta, partes do caule, tipo de solo, clima etc. O rendimento médio de caldo foi de 75,3 mL para 100 g de caule sem casca, enquanto que 100 g de caule rendeu 19,48 g de bagaço úmido. O peso do caldo foi de 99,64 g para 100 mL de caldo.

O potencial do caldo do mamoeiro em processos fermentativos foi determinado, utilizando-se o caldo puro ou suplementado com 20 g de glicerol/L, como fonte de nutrientes e de carbono para a fermentação pelas leveduras *Aureobasidium pullulans* EBJ31, *Candida pseudointermedia* CAC01, *Rhodotorula mucilaginosa* CCC31, *Trichosporon asahii* EPB13, *Whickerhamomyces anomalus* CCC32 e *Saccharomyces cerevisiae* comercial.

Na figura 1 estão apresentados os dados de crescimento das leveduras no caldo puro. A DO₆₀₀ mostrou-se alta no tempo inicial. Por se tratar de um substrato natural bruto, a alta concentração de partículas oriundas do processo de extração levou a leituras muito altas da densidade óptica, além de grande variação entre as amostras. Assim, nos experimentos posteriores foi adotada a contagem de células em câmara de Neubauer. As leveduras *W. anomalus* CCC32, *R. mucilaginosa* CCC31 e *S. cerevisiae* comercial apresentaram maior crescimento no caldo puro, atingindo DO₆₀₀ de 14,57, 13,80 e 8,21, respectivamente. A DO₆₀₀ para os demais microrganismos foi relativamente menor, sendo de 3,40 para *T. asahii* EPB13, 4,69 para *A. pullulans* EBJ31 e 4,49 para *C. pseudointermedia* CAC01.

Diversos estudos evidenciaram que *W. anomalus* (anteriormente *Pichia anomala*) possui boa capacidade de crescimento em uma gama de condições ambientais, como diferentes temperaturas e pH, além de conseguir assimilar uma variedade de fontes de carbono e nitrogênio. Esses são fatores que contribuem para a capacidade competitiva da levedura.¹⁰

A produção de biomassa por *Rhodotorula sp.* em meios de cultura de baixo custo foi observada em outros estudos^{11,12}. Essa levedura mostra-se promissora para a produção de biomassa em meio sintético atingindo altas concentrações de células em poucos dias.¹³

No extrato líquido do mamoeiro suplementado com glicerol, o maior crescimento foi observado com *W. anomalus* CCC32; o número total de células foi de $1,4 \times 10^9$ células/mL. *R. mucilaginosa* CCC31 apresentou $1,1 \times 10^9$ células/mL; *C. pseudointermedia* CAC01 e *A. pullulans* EBJ31, $7,0 \times 10^8$ células/mL; *S. cerevisiae* comercial, $6,1 \times 10^8$ células/mL e *T. asahii*, $4,4 \times 10^8$ células/mL, conforme mostrado na figura 2. O glicerol, subproduto das usinas de biodiesel, é considerado uma fonte versátil de carbono e energia com muitas aplicações na fermentação industrial.³

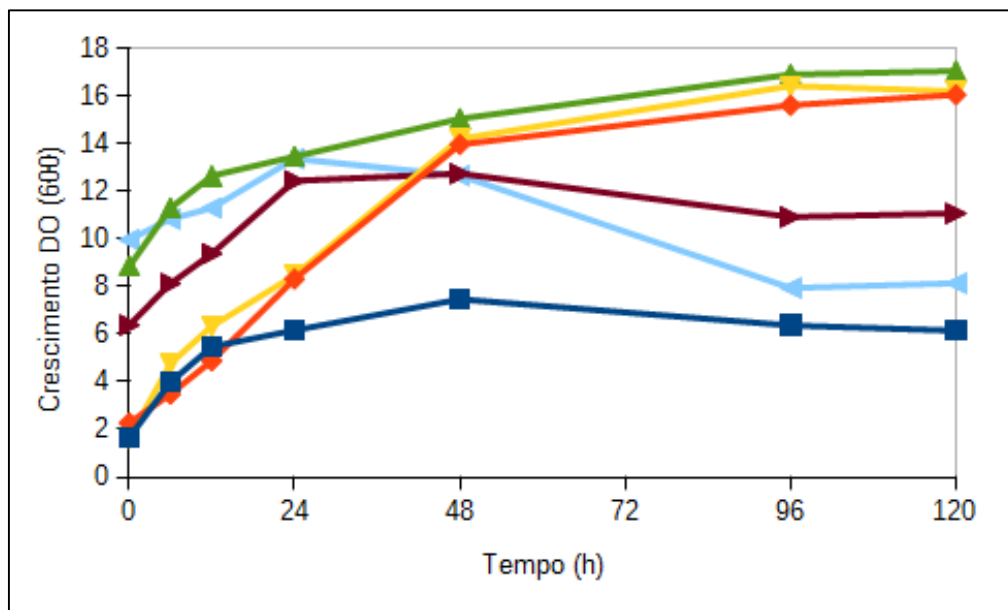


Figura 1. Crescimento das leveduras *C. pseudointermedia* ■, *R. mucilaginosa* ◆, *W. anomalus* ◇, *S. cerevisiae* ▲, *A. pullulans* ▲ e *T. asahi* ▲ em extrato líquido do mamoeiro puro, em shaker a 150 rpm e 28 °C.

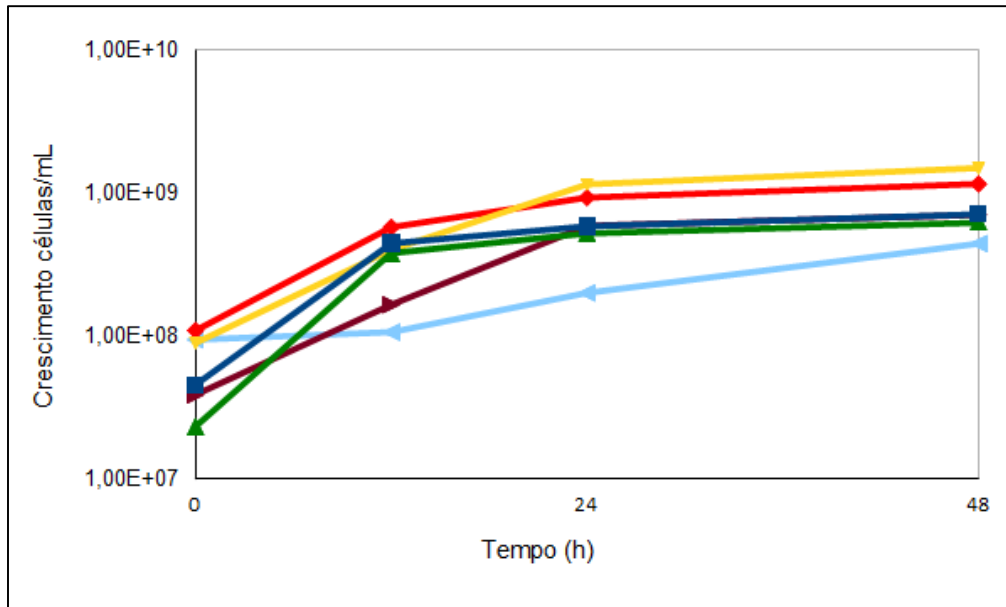


Figura 2. Crescimento das leveduras *C. pseudointermedia* —■—, *R. mucilaginosa* —♦—, *W. anomalus* —▲—, *S. cerevisiae* —◆—, *A. pullulans* —▲— e *T. asahi* —◆— em extrato líquido do mamoeiro suplementado com glicerol, em shaker a 150 rpm e 28 °C.

Produtos da fermentação

Em caldo de mamoeiro puro, etanol foi o principal produto da fermentação. As leveduras que produziram etanol mais eficientemente em caldo puro foram *S. cerevisiae* comercial (figura 3 A), *C. pseudointermedia* CAC01 (figura 3 B) e *W. anomalus* CCC32 (figura 3 C) correspondendo a 3,85 g/L; 3,26 g/L e 3,19 g de etanol/L, respectivamente, em um período de 12 horas. Essa eficiência de etanol em poucas horas de fermentação sugere a absorção acelerada dos açúcares. A levedura é afetada por condições de ambiente, nutrição e tipo de gene, portanto, tentam manter sua viabilidade e atividade metabólica quando excessivamente exposta a qualquer um desses fatores.¹⁴

Houve também uma pequena produção de glicerol durante a fermentação alcoólica, além de outros compostos como ácidos orgânicos, porém, em pequenas quantidades, fato comum, uma vez que as leveduras durante o processo fermentativo produzem além de etanol e gás carbônico, compostos secundários como glicerol, álcoois superiores, ácidos pirúvico e succínico, sendo que o glicerol pode ser considerado como o mais importante componente do ponto de vista quantitativo.¹⁵ As

leveduras *A. pullulans* EBJ31, *R. mucilaginosa* CCC31 e *T. asahi* EPB13 não produziram etanol no caldo do mamoeiro puro.

Em outros estudos realizados com *Saccharomyces cerevisiae* comercial seca, a levedura mostrou ter alto potencial para uso na produção de bioetanol a partir de outros substratos naturais como, por exemplo, da polpa de banana. Os rendimentos médios em bioetanol obtidos com a polpa ($0,48 \pm 0,05 \text{ g/g}^{-1}$) e com a casca ($0,34 \pm 0,11 \text{ g/g}^{-1}$), ambos in natura, possibilitaram a eficiência do processo de conversão, da ordem de 95% do rendimento teórico. A produtividade máxima alcançada em bioetanol foi de $3,0 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com o uso da polpa e de $1,32 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com a casca.¹⁶

Verificou-se que *R. mucilaginosa* CCC31, apesar de ter alcançado um bom crescimento (DO_{600} de 13,80), não produziu um volume significativo de etanol. Essa levedura possui boa aplicação em estudos para produção de carotenóides porque o rendimento geral dos carotenóides está diretamente relacionado com o rendimento total de biomassa.¹⁷

A levedura ascomicética *Wickerhamomyces anomalus*, já conhecida por suas aplicações na biorremediação,¹⁸ vem se mostrando eficiente em processos fermentativos. Recentemente foi analisado o genoma de *W. anomalus* e verificou-se a base genética de atividades antimicrobianas muito importantes para a biotecnologia.¹⁹

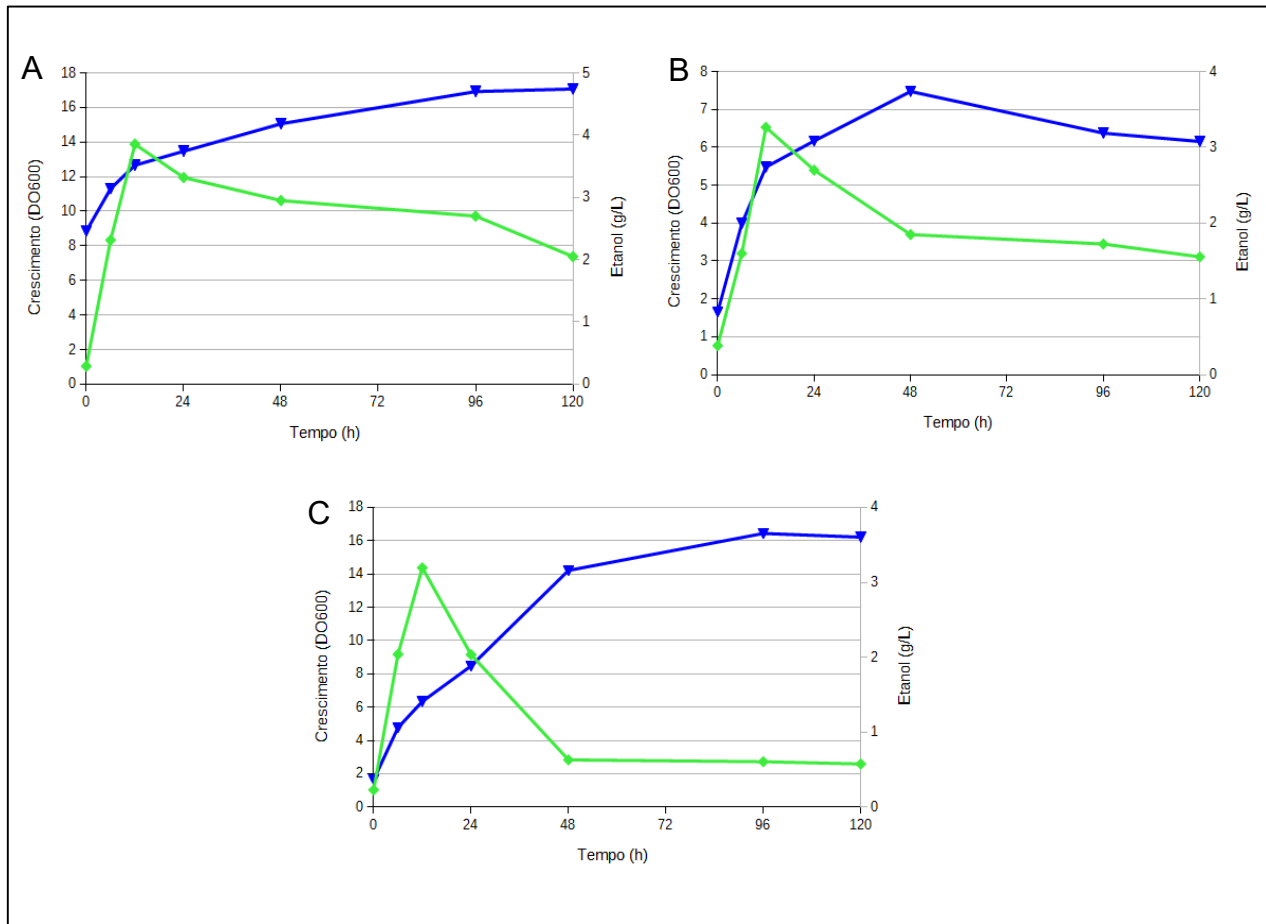


Figura 3. Crescimento (—▲—) e produção de etanol (—◆—) pelas leveduras *S. cerevisiae* (A), *C. pseudointermedia* (B) e *W. anomalus* (C) em extrato líquido do mamoeiro puro em shaker a 150 rpm e 28 °C.

Na figura 4 é apresentado o crescimento, consumo de glicerol e produção de etanol pelas leveduras *S. cerevisiae* comercial (A), *C. pseudointermedia* CAC01 (B) e *W. anomalus* CCC32 (C) em caldo do mamoeiro suplementado com 20 g de glicerol/L. A levedura *W. anomalus* CCC32 apresentou o maior consumo de glicerol, correspondendo a 11 g/L em 120 h, enquanto que *S. cerevisiae* comercial e *C. pseudointermedia* CAC01 consumiram apenas 2 g/L do substrato no mesmo período. *W. anomalus* CCC32 apresentou também a maior produção de etanol, 7,70 g/L em 12 horas de fermentação. *S. cerevisiae* comercial, apesar de não ser eficiente no consumo de glicerol, produziu um volume significativo de etanol, 7,36 g/L também em 12 horas, demonstrando que o extrato do mamoeiro é rico em nutrientes. *C. pseudointermedia* CAC01 produziu 5,84 g de etanol/L em 48 h de fermentação. Não houve consumo de glicerol e nem produção de etanol pelas leveduras *A. pullulans*

EBJ31, *R. mucilaginosa* CCC31 e *T. asahi* EPB13 em caldo do mamoeiro suplementado com 20 g de glicerol/L.

Em um estudo utilizando o bagaço do pedúnculo do caju por *saccharomyces cerevisiae*, verificou-se que a produção média de etanol para bagaço de pedúnculo de caju pode chegar a aproximadamente 21,80 g de etanol celulósico por litro de licor, ou seja, 0,13 g de etanol/g de bagaço. O rendimento e eficiência do processo de obtenção de etanol celulósico a partir do processamento do bagaço do pedúnculo do caju seco máximo foi, respectivamente, de 0,445 g de etanol/g de bagaço e 87,1% para o licor hidrolisado com a adição do suco de caju.²⁰ *S. cerevisiae* é a levedura mais utilizada em pesquisas de produção industrial de etanol devido a sua alta produtividade e tolerância ao etanol. *S. cerevisiae* do tipo selvagem, levedura de padeiro e *S. cerevisiae* tipo II podem tolerar etanol até 15%, que é a maior tolerância ao etanol entre as cepas isoladas de leveduras desse tipo.²¹

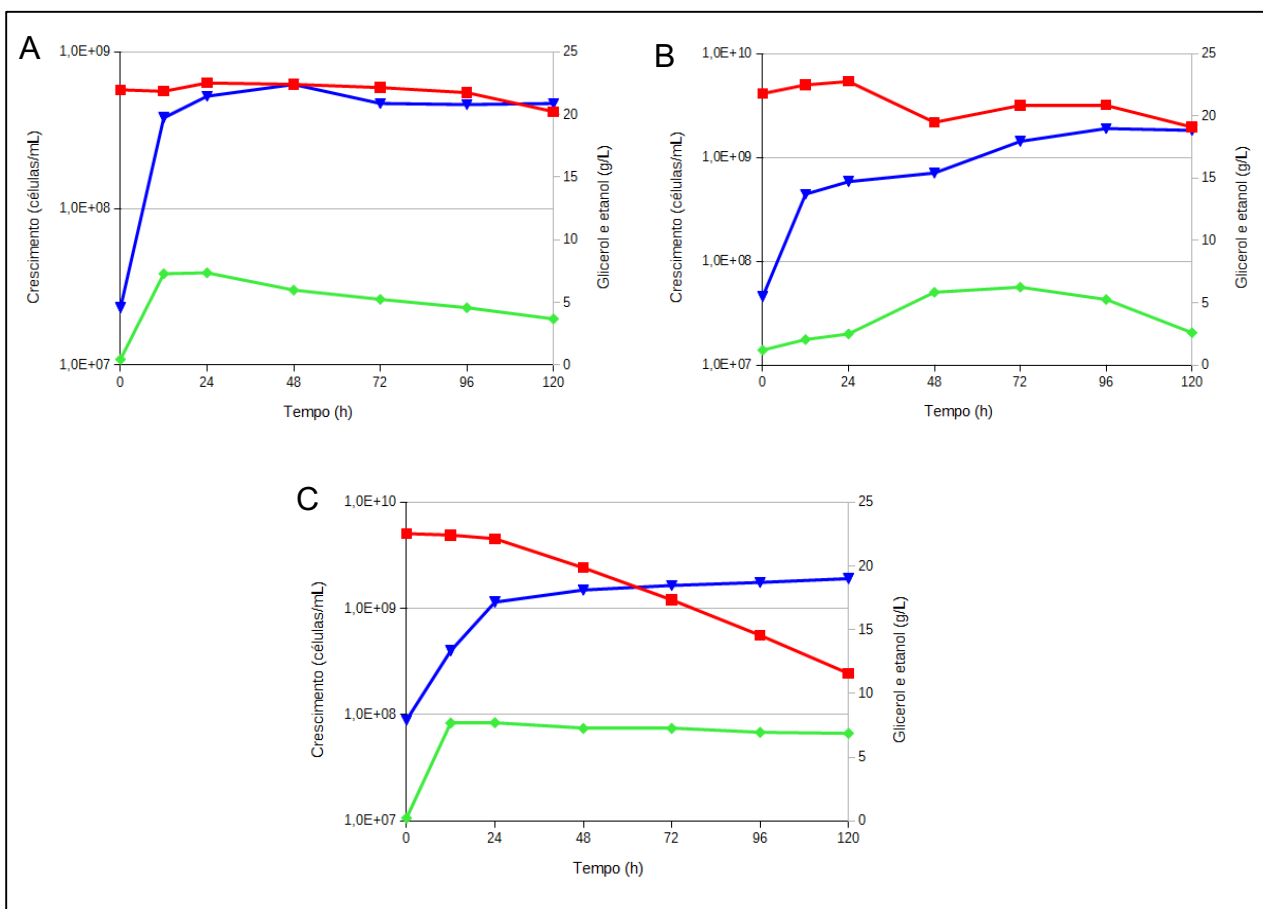


Figura 4. Crescimento (—▲—), consumo de glicerol (—■—) e produção de etanol (—◆—) pelas leveduras *S. cerevisiae* (A), *C. pseudointermedia* (B) e *W. anomalus* (C) em extrato líquido do mamoeiro suplementado com 20 g/L de glicerol, em shaker a 150 rpm e 28 °C.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo realizado a avaliar o caldo do caule do mamoeiro como fonte de carbono e outros nutrientes para microrganismos em processos fermentativos. Esse substrato natural demonstrou ser rico em nutrientes, adequado ao desenvolvimento microbiano, suportando o crescimento mesmo sem a adição de quaisquer outras fontes. Todas as leveduras utilizadas nesse estudo cresceram bem neste substrato.

As leveduras *S. cerevisiae* comercial, *C. pseudointermedia* CAC01 e *W. anomalus* CCC32 produziram etanol como principal produto da fermentação, tanto em extrato puro como em extrato suplementado com glicerol, sendo que a maior produção de etanol foi no meio com suplementação.

É necessário determinar a composição nutricional do caldo de mamoeiro. Novos estudos estão sendo feitos visando avaliar a fermentação do caldo de mamoeiro suplementado com diferentes fontes de carbono e por diferentes microrganismos industriais. Para o aproveitamento integral da matéria-prima, estudos sobre a utilização da biomassa celulósica do caule de mamão também devem ser feitos, estudos estes que estão em desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

1. Sebayang, A. H. *et al.* A perspective on bioethanol production from biomass as alternative fuel for spark ignition engine. *RSC Adv.* **6**, 14964–14992 (2016).
2. Rubin, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **454**, 841–845 (2008).
3. da Silva, G. P., Mack, M. & Contiero, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* **27**, 30–39 (2009).
4. Bechara, R. *et al.* Review of design works for the conversion of sugarcane to first and second-generation ethanol and electricity. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **91**, 152–164 (2018).
5. Tan, L. *et al.* Production of ethanol from raw juice and thick juice of sugar beet by continuous ethanol fermentation with flocculating yeast strain KF-7. *Biomass and Bioenergy* **81**, 265–272 (2015).
6. Sharma, M. & Kumar, A. Promising biomass materials for biofuels in India's context. *Mater. Lett.* **220**, 175–177 (2018).
7. B, S., BVV, R., S, S., M, N. & C, A. Ethanol production from cashew apple juice using statistical designs. *J. Biochem. Microb. Technol.* **1**, 8–15 (2013).
8. Joner, Gabriela Chiele, Juliane de Freitas Battisti, Mayara Rohenkohl Ricci, N. C. S. obtenção de etanol a partir da biomassa de frutas. *XXXII Encontro Nac. Eng. Prod.* **4**, 1–7 (2012).
9. Oliveira, L. M., Serra, J. C. V. & Magalhães, karine B. Estudo Comparativo Das Diferentes Tecnologias Utilizadas Para Produção De Etanol. *Geoambiente ISSN 1679-9860* **3**, 01–23 pág. (2013).
10. Fredlund, E., Druvefors, U., Boysen, M., Lingsten, K. & Schnurer, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast J121. *FEMS Yeast Res.* **2**, 395–402 (2002).
11. Aksu, Z. & Tuğba Eren, A. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem.* **40**, 2985–2991 (2005).

12. Li, M., Liu, G. L., Chi, Z. & Chi, Z. M. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy* **34**, 101–107 (2010).
13. T. B. SIMÕES, F. L. H. da SILVA, A. DOMICIANO, J. SILVA, L. L. M. e J. E. S. R. Avaliação da capacidade de produção de biomassa por levedura do gênero *rhodotorula* utilizando a manipueira como substrato. *XXI Congr. Bras. Eng. Química* 8 (2016).
14. Udeh, O. Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation. *J. Brew. Distill.* **4**, 19–45 (2013).
15. Gutierrez, L. E. Produção de Glicerol por Linhagens de *Saccharomyces* Durante Fermentação Alcoólica. *An. Esalq* **48**, 55–59 (1991).
16. Souza, O., Schulz, M. A., Fischer, G. A. A., Wagner, T. M. & Sellin, N. Energia alternativa de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* **16**, 915–921 (2012).
17. Marova, I. *et al.* Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *J. Environ. Manage.* **95**, S338–S342 (2012).
18. Teixeira Souza, K. S. *et al.* Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. *J. Hazard. Mater.* **346**, 152–158 (2018).
19. Schneider, J. *et al.* Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. *FEMS Yeast Res.* **12**, 382–386 (2012).
20. LIMA, et al. Produção de etanol de segunda geração proveniente do bagaço de pendúculos do caju. *Rev. Caatinga* **2125**, 26–35 (2015).
21. Mohd Azhar, S. H. & Abdulla, R. Bioethanol production from galactose by immobilized wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **14**, 457–465 (2018).