

BIOMASSA PRODUZIDA DE FOLHAS DE MANDIOCA POR FUNGOS¹

MÁRIA ÂNGELA AMAZONAS ALMEIDA DA SILVA, GILDO ALMEIDA DA SILVA² e RODOLPHO DE CAMARGO³

RESUMO - Folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) foram testadas como fonte de nitrogênio para a produção de biomassa pelos fungos *Aspergillus niger* IZ-9, *Aspergillus wentii* IZ-1625 e *Fusarium* sp., na faixa de pH de 1 a 9, usando raízes de mandioca como fonte de carbono. Os resultados se mostraram promissores. Os melhores foram obtidos pelo *A. niger* IZ-9, nos valores de pH 3,0; 7,0; 8,0 e 9,0; pelo *A. wentii* IZ-1625, em pH 3,0; e pelo *Fusarium* sp., na faixa de pH de 3,0 a 9,0. Entretanto, estudos são ainda necessários para a otimização do processo.

Termos para indexação: *Manihot esculenta* Crantz, biomassa fúngica, nitrogênio/crescimento microbiano, pH/crescimento microbiano, transporte de metabólitos em microrganismos, amilase, protease.

BIOMASS PRODUCTION FROM CASSAVA LEAVES BY FUNGI

ABSTRACT - Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves were tested as nitrogen source for biomass production by the fungi *Aspergillus niger* IZ-9, *Aspergillus wentii* IZ-1625 and *Fusarium* sp., at pH 1 to 9, using cassava roots as carbon source. The results have been shown as promising. The best ones were obtained by *A. niger* IZ-9 at pH values 3.0; 7.0; 8.0 and 9.0; by *A. wentii* IZ-1625 at pH 3.0; and by *Fusarium* sp., at pH 3.0 to 9.0. However, studies are still necessary for the optimization of the process.

Index terms: *Manihot esculenta* Crantz, fungal biomass, nitrogen/microorganism growth, pH/microorganism growth, metabolite transport in microorganisms, amylase, protease.

INTRODUÇÃO

A necessidade crescente de alimentos de elevada qualidade nutritiva para atender à demanda populacional é um alerta constante para que o mundo se prepare para o surgimento de novas indústrias capacitadas para a produção de proteína de fontes não-convencionais.

Os microorganismos, apesar de usados desde a antiguidade, só nos últimos anos é que vêm assumindo uma posição de destaque como uma nova fonte potencial de alimento. Entre eles, os fungos filamentosos apresentam certas vantagens que resultam na diminuição dos custos de produção, tais como: maior facilidade de recuperação do micélio, não necessitando de equipamentos dispendiosos;

estrutura filamentosa, em culturas contínuas, que permite seu manufaturamento como produtos alimentícios texturados sem necessidade de extração da proteína; e baixo teor de ácidos nucléicos, ao contrário dos encontrados em bactérias e leveduras, que exigem um tratamento especial para reduzi-los a níveis aceitáveis.

As folhas de mandioca, apesar de possuírem um elevado teor protéico e um bom perfil de aminoácidos sulfurados, o que compromete a qualidade e a utilização líquida da proteína (Adegbola 1977 e Khajarern et al. 1977). Considerando que a transformação da proteína vegetal em microbiana pode melhorar a qualidade do alimento, este trabalho objetiva investigar a utilização de folhas de mandioca, como fonte de nitrogênio, por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*, tendo as raízes como fonte de carbono, bem como determinar o pH ótimo para seu crescimento em tal meio. A escolha do *Aspergillus* se deve ao fato de que este gênero tem sido usado para a fermentação da mandioca, por diversos pesquisadores, com bons resultados (Barton et al. 1969, Stanton & Wallbridge 1969, Venosa et al. 1975, Balagopal & Maini 1976,

¹ Aceito para publicação em 26 de agosto de 1982.

Parte do trabalho de dissertação apresentado pela primeira autora à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", na Univ. de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

² Bioméd., M.Sc., Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual (UEPAE) - EMBRAPA, Caixa Postal 130, CEP 95700 - Bento Gonçalves, RS.

³ Eng.^o Agr.^o, Ph.D., Prof. Adjunto do Depart. de Tecnologia Rural, ESALQ/USP, CEP 13400 - Piracicaba, SP.

Gregory et al. 1976 e Martins et al. 1976). O *Fusarium*, por sua vez, resultou de um isolamento a partir de raiz de mandioca em deterioração, onde uma linhagem, identificada como pertencente ao gênero, desenvolvia-se exuberantemente.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, São Paulo.

As folhas e as raízes de mandioca foram cedidas pela Estação Experimental de Piracicaba, sendo das variedades IAC-Jaçanã (X-352-7) e IAC-Yara (1416-67), respectivamente. As folhas foram desidratadas em estufa com circulação de ar forçada a 45°C, moídas e passadas em peneira de 150 meshes. Das raízes foi extraída a fécula, por via seca, tendo a desidratação se processado também a 45°C. Foi determinado o teor de nitrogênio total pelo método Kjeldahl.

Dois linhagens de *Aspergillus* (*A. niger* IZ-9 e *A. wentii* IZ-1625), da Coleção do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ, e uma isolada de raiz de mandioca em deterioração, pertencente ao gênero *Fusarium*, foram cultivadas em pH de 1,0 a 9,0, segundo esquema fatorial 3 x 9 com três repetições.

O meio de cultura foi preparado com folha em pó e fécula de mandioca, nas quantidades suficientes para fornecerem, respectivamente, 0,08% de nitrogênio e 3% de carboidrato. Foi gelatinizado entre 60-70°C durante quinze minutos, resfriado em água corrente e teve o pH ajustado para os valores de 1,0 a 9,0, com ácido sulfúrico 2N e hidróxido de sódio 2N. Em seguida, foi distribuído em frascos de Erlenmeyer de 250 ml (50 ml de meio/frasco), onde foi autoclavado.

Os inóculos foram obtidos de culturas de quatro dias, desenvolvidas em malte-ágar, em placas-de-petri, tomando-se discos de 5 mm de diâmetro da periferia das colônias.

Após a inoculação, os frascos foram colocados em agitador regulado para 120 batidas por minuto. A temperatura foi mantida entre 28 e 30°C. Após quatro dias de incubação, mediu-se o pH e as culturas foram filtradas em tela de náilon. Para determinação do peso seco, o micélio foi desidratado em estufa até peso constante, na temperatura de 60°C, de modo a garantir que não houvesse alteração no perfil de aminoácidos (Spicer 1971).

Na análise estatística, foram usados o teste F para a análise de variância e o teste de Student-Newman-Keuls para a comparação das médias.

RESULTADOS

Os teores de nitrogênio total na folha em pó e

na fécula de mandioca foram, respectivamente, 3,90% e 0,23%.

As duas linhagens de *Aspergillus* testadas apresentaram crescimento a partir do pH 2,0, enquanto que o *Fusarium* sp. apenas a partir do pH 3,0. Por este motivo, os tratamentos com os valores de pH 1,0 e 2,0 foram desprezados da análise estatística reduzindo, assim, o fatorial para 7 (valores de pH) x 3 (fungos). Os resultados foram tomados em relação ao peso seco expresso em gramas por litro (Tabela 1).

A análise de variância revelou diferença altamente significativa tanto entre fungos, como entre valores de pH. Houve também uma interação altamente significativa entre esses fatores. A análise do efeito do pH mostrou que *A. niger* IZ-9 e *A. wentii* IZ-1625 responderam ao pH com uma diferença altamente significativa, enquanto que o *Fusarium* sp. não apresentou nenhuma variação significativa. Através da comparação das médias, observou-se que os melhores resultados foram produzidos pelo *A. niger* IZ-9, nos valores de pH 3,0; 7,0; 8,0 e 9,0; pelo *Fusarium* sp., em todos os valores de pH analisados; e pelo *A. wentii* IZ-1625, no pH 3,0; não tendo havido diferença significativa entre esses tratamentos. Todos os demais apresentaram diferença altamente significativa quando comparados com a maior média, que foi alcançada pelo *A. niger* IZ-9 em pH 3,0. Ainda em relação aos melhores resultados, o *A. niger* IZ-9 em pH 4,0 não diferiu do *A. wentii* IZ-1625 em pH 3,0 nem do *Fusarium* sp. nos valores de pH 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 9,0.

Os resultados mostraram que os três fungos em teste reagem de maneira distinta à variação de pH. Assim, o *Fusarium* sp. foi o mais sensível ao pH excessivamente ácido e apresentou uma estabilidade na produção de biomassa na faixa de pH de 3,0 a 9,0, com uma tendência a neutralizar o meio. O *A. niger* IZ-9 apresentou um pico de produção em pH ácido (pH 3,0) e outro em pH neutro a alcalino (pH 7,0 a 9,0) com uma tendência a acidificar o meio, de modo que, no final do experimento, o pH dos dois picos foi o mesmo (pH 3,7). Além disso, embora não tenha havido diferença significativa entre os resultados obtidos nestes dois picos, observou-se, no desenrolar do experimento, que a fase "lag" ocorrida em pH neutro a alcalino foi

TABELA 1. Produção de biomassa, expressa em peso seco (gramas/litro), por *Fusarium* sp., *Aspergillus niger* IZ-9 e *Aspergillus wentii* IZ-1625, em meio de raiz e folha de mandioca, na faixa de pH de 1,0 a 9,0 e valores do pH final do meio (médias de três repetições).

pH inicial	<i>Fusarium</i> sp.		<i>A. niger</i> IZ-9		<i>A. wentii</i> IZ-1625	
	pH final	Peso seco (g/l)	pH final	Peso seco (g/l)	pH final	Peso seco (g/l)
1,0	1,3	0,00	1,4	0,00	1,3	0,00
2,0	1,7	0,00	1,8	7,98	1,8	4,04
3,0	4,1	13,55	3,7	15,16	4,2	12,18
4,0	6,2	11,29	4,6	8,62	5,5	4,00
5,0	6,8	10,47	5,1	7,35	5,5	5,75
6,0	7,0	12,75	6,7	5,47	5,7	4,48
7,0	7,1	13,82	3,7	13,34	5,8	5,32
8,0	7,3	11,19	3,6	13,24	5,8	6,99
9,0	7,3	11,69	3,7	13,34	6,2	7,01

mais pronunciada do que no pH ácido. O *A. wentii* IZ-1625, por sua vez, mostrou um comportamento geral, como produtor de biomassa, inferior, com um bom resultado apenas em pH 3,0 e uma tendência a levar o pH para cerca de 5,5.

DISCUSSÃO

A redução ou o não-crescimento dos fungos em determinados valores de pH pode ser explicada por uma ação sobre os sistemas de transporte de metabólitos. Embora seja um tema bastante discutido, não existe, até o momento, um consenso sobre o mecanismo de transporte de metabólitos através de membranas. Vários modelos têm sido propostos, muitos dos quais envolvendo proteínas como agentes transportadores (Harold 1972 e Hamilton 1975). Com base em tais modelos, algumas hipóteses para explicar a ação do pH sobre o processo podem ser aventadas, tais como: alteração no estado iônico das moléculas envolvidas, afetando a interação transportador-substrato ou, até mesmo, a solubilidade do substrato; alteração na mobilidade do complexo transportador-substrato ou do transportador livre através da membrana; bloqueio da dissociação do substrato na superfície interna da membrana; ou, ainda, redução na eficiência do sistema de produção de energia.

Outro modelo que tem merecido a atenção de

muitos pesquisadores é o que se baseia na hipótese quimiosmótica, segundo a qual o fluxo de metabólitos através da membrana é regulado por uma força próton-motiva (Δp), que é dependente de um gradiente de potencial de membrana ($\Delta \Psi$) e de um gradiente de pH (ΔpH). Segundo o modelo, o transporte de substratos neutros se efetua por um mecanismo de co-transporte ("proton-symport") e depende tanto de ΔpH como de $\Delta \Psi$. Os ânions são transportados pelo mesmo mecanismo, porém dependem de ΔpH , e os cátions são transportados isoladamente, dependendo somente de $\Delta \Psi$. As contribuições de ΔpH e de $\Delta \Psi$ para a força próton-motiva final variam com o organismo e com as circunstâncias (Harold 1972), o que apóia o fato de que cada fungo testado neste trabalho tenha reagido de maneira distinta à variação do pH.

Neste experimento, proteínas foliares foram utilizadas como principal fonte de nitrogênio, devendo ser hidrolisadas a aminoácidos, os quais, sendo substâncias anfóteras, seriam incorporados à célula como substratos neutros, ânions ou cátions, dependendo de seus pontos isoeletricos e do pH do meio. A fonte de carbono, fornecida como amido, teria que ser hidrolisada, sendo a glicose resultante incorporada como uma substância neutra. É provável que, em determinados valores de pH e com a esterilização do meio, algumas dessas hidrólises tenham ocorrido espontaneamente, como é sabido

ocorrer a hidrólise ácida de proteínas e amido a elevadas temperaturas. Nos valores de pH que não favorecem a hidrólise espontânea, os fungos teriam que liberar enzimas proteolíticas e amilolíticas a fim de tornar as fontes de nitrogênio e de carbono disponíveis. A produção de tais enzimas tem sido descrita tanto para o gênero *Aspergillus* (Mense et al. 1947, Erb et al. 1948, Tsuchiya et al. 1950, Lineback et al. 1966, Sadir 1966, Barton et al. 1969, Park 1969/70, Nakadai et al. 1973a, b e c, Sekine 1973a, b e c, Reade et al. 1974, Thorbek & Eplov 1974, Park 1975, Sekine 1976 e Ghildyal et al. 1980), como para o gênero *Fusarium* (Nakao et al. 1973 e Suzuki et al. 1976).

Considerando-se os melhores resultados obtidos, os três fungos podem ser igualmente utilizados para a produção de massa micelial. Similarmente ao encontrado por Christias et al. (1975) o *Fusarium* sp. revelou ser um ótimo produtor de biomassa e apresentou, ainda, a vantagem de se desenvolver bem em uma ampla faixa de pH. Ao contrário, do observado por Reade et al. (1974) para o *Fusarium graminearum* IM 154209, a linhagem testada cresceu bem em amido. A sua tendência a neutralizar o meio, no entanto, pode ser uma desvantagem, pois, a nível industrial, problemas com contaminação poderão advir. O *A. niger* IZ-9, com a evidência de que prefere pH ácido para o seu desenvolvimento, oferece a vantagem, a nível industrial, de uma redução nos custos com aeração e assepsia, pois, em pH ácido, a disponibilidade de oxigênio é maior que em pH alcalino e os problemas de contaminação são minimizados. A demora no início do desenvolvimento do fungo na faixa de pH de 7 a 9 e a acidificação do meio sugerem uma produção inicial de ácidos, a fim de tornar o pH favorável ao processo. É sabido que o *A. niger* é um bom produtor de ácido cítrico, sendo, inclusive, o fungo de eleição na sua produção industrial. A depressão entre os dois picos pode ser causada pela não-disponibilidade, dependente de pH, de um ou mais elementos inorgânicos, tais como ferro, zinco e cálcio, podendo o suprimento do elemento, em forma utilizável, eliminar esta depressão (Cochrane 1958). O *A. wentii* IZ-1625, por sua vez, apresentou um comportamento geral inferior, com um bom resultado apenas em pH 3,0 e uma queda brusca em pH 4,0.

Como visto, folhas de mandioca foram utilizadas por fungos na produção de biomassa, o que pode representar uma alternativa para a cultura da mandioca, uma vez que este material, geralmente, é desperdiçado. A nível industrial, esta fonte de nitrogênio poderia ser alternada com outras fontes naturais, tais como subprodutos de culturas ou resíduos industriais, a fim de garantir a continuidade do processo durante os períodos de entressafra. Estudos, no entanto, são ainda necessários para a otimização do processo. Uma outra aplicação prática, decorrente do presente estudo, seria a utilização de folhas de mandioca como meio de cultura natural para microorganismos, por constituírem um material rico em proteínas, vitaminas e sais minerais.

CONCLUSÕES

1. Folhas de mandioca podem ser utilizadas como fonte de nitrogênio para o crescimento de microorganismos, conforme ficou demonstrado pelo uso dos fungos *Fusarium* sp., *Aspergillus niger* IZ-9 e *Aspergillus wentii* IZ-1625.
2. Dentre os fungos ensaiados, o *Fusarium* sp. se mostrou o mais estável na faixa de pH de 3,0 a 9,0, tendo apresentado bons resultados, com uma tendência, porém, a neutralizar o meio, o que pode acarretar problemas de contaminação, quando o processo é transferido para escala industrial.
3. O *A. niger* IZ-9 apresentou bons resultados nos valores de pH 3,0; 7,0; 8,0 e 9,0, com a vantagem de acidificar o meio, o que reduz os custos de produção a nível industrial.
4. O *A. wentii* IZ-1625 foi, em termos gerais, o que apresentou resultados menos satisfatórios, tendo, porém, em pH 3,0, mostrado uma produção de biomassa similar aos melhores resultados obtidos com os outros dois fungos.

REFERÊNCIAS

- ADEGBOLA, A.A. Methionine as an additive to cassava-based diets. In: NESTEL, B. & GRAHAM, M. Cassava as animal feed., Ottawa, 1977. Proceedings of a workshop held at the University of Guelph. Ottawa, International Development Research Centre, 1977. p.9-17.

- BALAGOPAL, C. & MAINI, S.B. Evaluation of certain species of fungi for single cell protein and amylase production in cassava liquid medium. *J. Root Crops*, 2(2):49-51, 1976.
- BARTON, L.L.; LINEBACK, D.R. & GEORGI, C.E. The influence of nitrogen and carbon sources on the production of glucoamylase by *Aspergilli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15(3):327-44, 1969.
- CHRISTIAS, C.; COUVARAKI, C.; GEORGOPOULOS, S.G.; MACRIS, B. & VOMVOYANNI, V. Protein content and amino acid composition of certain fungi evaluated for microbial protein production. *Appl. Microbiol.*, 29(2):250-4, 1975.
- COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. New York, John Wiley & Sons, 1958. 524p.
- ERB, N.M.; WISTHOFF, R.T. & JACOBS, W.L. Factors affecting the production of amylase by *Aspergillus niger*, strain NRRL337, when grown in submerged culture. *J. Bacteriol.*, 55:13-21, 1948.
- GHILDYAL, N.P.; PREMA, P.; SRIKANTA, S.; SREEKANTIAH, K.R. & AMMED, S.Y. Studies on the production of α -amylase in submerged culture. *J. Food Sci. Technol.*, 17:165-7, 1980.
- GREGORY, K.F.; READE, A.E.; KHOR, G.L.; ALEXANDER, J.C.; LUMSDEN, J.H. & LOSOS, G. Conversion of carbohydrates to protein by high temperature fungi. *Food Technol.*, 30:30-5, 1976.
- HAMILTON, W.A. Energy coupling in microbial transport. *Adv. Microb. Physiol.*, 12:1-53, 1975.
- HAROLD, F.M. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriol. Rev.*, 36(2):172-230, 1972.
- KHAJARERN, S.; KHAJARERN, J.M.; KITPANIT, N. & MULLER, Z.O. Cassava in the nutrition of swine. In: NESTEL, B. & GRAHAM, M. Cassava as animal feed, Ottawa, 1977. Proceedings of a workshop held at the University of Guelph. Ottawa, International Development Research Centre, 1977. p.56-64.
- LINEBACK, D.R.; GEORGY, C.E. & DOTY, R.L. Glucoamylase (α -1,4-glucan glucohydrolase) production by *Aspergillus niger* as influenced by medium composition. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 12(1):27-38, 1966.
- MARTINS, V.M.N.C.; LESER, E.W.; SCHMIDELL NETO, W. & VENOSA, C.M.S. Cultivo de microrganismos em meios contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono (III). Influência de condições experimentais no cultivo de *Aspergillus oryzae* em frascos agitados. *R. Bras. Tecnol.*, 7: 361-6, 1976.
- MENSE, E.H. le; CORMAN, J.; LANEN, J.M. van & LANGLYKKE, A.F. Production of mold amylases in submerged culture. *J. Bacteriol.*, 54:149-59, 1947.
- NAKADAI, T.; NASUNO, S. & IGUCHI, N. Purification and properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agri. Biol. Chem.*, 37(12):2685-94, 1973a.
- NAKADAI, T.; NASUNO, S. & IGUCHI, N. Purification and properties of neutral proteinase I from *Aspergillus oryzae*. *Agri. Biol. Chem.*, 37(12):2695-701, 1973b.
- NAKADAI, T.; NASUNO, S. & IGUCHI, N. Purification and properties of neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Agri. Biol. Chem.*, 37(12):2703-8, 1973c.
- NAKAO, Y.; SUZUKI, M.; KUNO, M. & MAEJIMA, K. Production of alkaline protease from n-paraffins by a kabicidin resistant mutant strain of *Fusarium* sp. *Agri. Biol. Chem.*, 37(5):1223-4, 1973.
- PARK, Y.K. Influência da fonte de carboidrato sobre a produção de alfa-amilase fúngica. *Colet. Inst. Tecnol. Alim.*, 3:187-94, 1969/70.
- PARK, Y.K. Produção de enzimas. In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. & BORZANI, W. *Biotecnologia*. São Paulo, Edgard Blucher, Editora da Universidade de São Paulo, 1975. v.1, Cap. 9, p.182-211.
- READE, A.E.; GREGORY, K.F.; KHOR, G.L. & ALEXANDER, J.C. Single cell protein production. In: ANNUAL UNIVERSITY OF GUELPH NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 10, Guelph, 1974. Proceedings... Guelph, Canadian Food Manufacturers Association, 1974. p.6-9.
- SADIR, R. Produção de amilase fúngica. *Tecnol. Alim. Beb.*, 7:16-20, 1966.
- SEKINE, H. Neutral proteinase I and II of *Aspergillus sojae*. Preparation of water-insoluble enzyme. *Agri. Biol. Chem.*, 37(2):437-40, 1973a.
- SEKINE, H. Neutral proteinase II of *Aspergillus sojae*: an enzyme specifically active on protamine and histone. *Agri. Biol. Chem.*, 37(7):1765-7, 1973b.
- SEKINE, H. Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*: some physicochemical properties and amino acid composition. *Agri. Biol. Chem.*, 37(8):1945-52, 1973c.
- SEKINE, H. Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*: action on various substrates. *Agri. Biol. Chem.*, 40(4):703-9, 1976.
- SPICER, A. Protein production by micro-fungi. *Trop. Sci.*, 23(4):239-50, 1971.
- STANTON, N.R. & WALLBRIDGE, A. Fermented food processes. *Process Biochem.*, 4:45-51, 1969.
- SUZUKI, M.; KUNO, M. & NAKAO, Y. Characteristics of the kabicidin resistant mutant of *Fusarium* sp. having a high productivity of alkaline protease. *Agri. Biol. Chem.*, 40(2):365-71, 1976.
- THORBEK, L. & EPLOV, P. The formation, general characteristics and production of α -amylase in heterocaryons and diploids of *Aspergillus oryzae*. *J. Appl. Bact.*, 37:549-57, 1974.
- TSUCHIYA, H.M.; CORMAN, J. & KOEPESELL, H.J. Production of mold amylases in submerged culture II. Factors affecting the production of alpha-amylase and maltase by certain *Aspergilli*. *Cereal Chem.*, 27(4):322-30, 1950.
- VENOSA, C.M.S.; LESER, E.W.; MARTINS, V.M.N.C. & SCHMIDELL NETTO, W. Cultivo de microrganismos em meios contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. I. Influência de condições experimentais no cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 337 em frascos agitados. *R. Bras. Tecnol.*, 6:117-24, 1975.