

ELOIZE CRISTINA VASSÃO



Enriquecimento Protéico da *Manihot esculenta*  
Crantz por Fermentação Sólida em Sistema  
Estático Utilizando Fungos Filamentosos

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre.

CURITIBA

1989

ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DA **Manihot esculenta** CRANTZ  
POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA EM SISTEMA ESTÁTICO  
UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS

por

ELOIZE CRISTINA VASSÃO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do  
título de mestre no curso de Pós-Graduação em Tecnolo  
gia Química, pela Comissão formada pelos professores:

ORIENTADOR:

---

Prof. LÉO DA ROCHA LIMA

---

Prof. ALCEU SCHWAB

---

Prof. BONIFÁCIO JOSÉ GALLOTTI

Curitiba, 11 de agosto de 1989.

A Deus, pela Luz e Força  
que me acompanharam a ca  
da passo desta existên-  
cia.

À minha família, pelo in  
condicional apoio e com-  
preensão.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Léo da Rocha Lima, pela orientação e estímulo para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Ms. Carlos Ricardo Soccol, pela co-orientação, dedicação e integral apoio dispensado.

Ao Prof. Dr. Alceu Schwab, por sua imprescindível colaboração.

Ao Prof. Dr. Renato João Sossela de Freitas, pelo incentivo durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química, pela amizade e incentivo.

Às colegas Rosana Ernestina Siqueira de Carreño e Cristina Maria del Socorro Ramirez, pela amizade e auxílio.

Aos colegas das Usinas Piloto de Tecnologia Química da Universidade Federal do Paraná, pela compreensão e estímulo.

Aos funcionários da Biblioteca do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, em especial à Bibliotecária Eliane Maria Stroparo.

À minha irmã Ana Lucia Vassão Gouveia, pela realização dos serviços de datilografia.

À NUTRIMENTAL S/A - Indústria e Comércio de Alimentos, em particular a Divisão de Controle Físico-Químico pela realização das determinações de aflatoxina.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
1       INTRODUÇÃO.....	1
2       REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1     A MANDIOCA.....	7
2.2     FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES).....	20
2.2.1   Definição do termo.....	20
2.2.2   Vantagens e desvantagens da FES.....	21
2.2.3   Tipos de fermentadores.....	24
2.2.4   Características de processo.....	34
2.2.4.1 Substrato.....	34
2.2.4.2 Microrganismos.....	36
2.2.4.3 Condições de cultivo.....	40
2.3     A MANDIOCA E A FES.....	43
2.4     ALIMENTOS FERMENTADOS.....	49
3       MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.1     MATERIAIS.....	52
3.1.1   Matéria-prima.....	52
3.1.2   Microrganismos.....	52
3.1.3   Nutrientes.....	53
3.1.4   Fermentador.....	53
3.2     MÉTODOS.....	55

	Página
3.2.1	Preparo da matéria-prima..... 55
3.2.2	Obtenção dos inóculos..... 57
3.2.3	Obtenção da farinha de mandioca enriquecida... 59
3.2.4	Análises físico-químicas..... 62
3.2.4.1	Coleta de amostras para análise..... 62
3.2.4.2	Determinação da umidade..... 62
3.2.4.3	Determinação eletrométrica do pH..... 62
3.2.4.4	Determinação das Proteínas..... 63
3.2.4.5	Determinação do amido..... 63
3.2.5	Análises microbiológicas..... 63
3.2.5.1	Contagem total de bactérias..... 63
3.2.5.2	Contagem de bolores e leveduras..... 64
3.2.5.3	Número mais provável de bactérias do grupo co- liforme..... 64
3.3.6	Determinação da aflatoxina..... 64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 65
4.1	PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA..... 65
4.2	INÓCULO..... 66
4.3	NUTRIENTES..... 68
4.4	ESPESSURA DA CAMADA DE SUBSTRATO..... 73
4.5	SELEÇÃO DO MICRORGANISMO..... 80
4.6	FERMENTADOR..... 100
4.7	FERMENTAÇÃO..... 102
5	CONCLUSÕES..... 114
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 115

# LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Evolução da área plantada, rendimento e produção da mandioca, 1982-1984.....	10
TABELA 2. Principais culturas brasileiras, 1985-1988	11
TABELA 3. Produção brasileira de mandioca e os principais Estados produtores, 1980-1984.....	12
TABELA 4. Estimativa de área e produção de produtos selecionados, no Paraná, 1988-1989.....	13
TABELA 5. Teor de ácido cianídrico na mandioca.....	15
TABELA 6. Composição química da planta <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	17
TABELA 7. Principais produtos amiláceos de importância mundial.....	18
TABELA 8. Composição centesimal de diversas farinhas.	19
TABELA 9. Tipos de fermentadores utilizados em fermentação no estado sólido.....	26
TABELA 10. Composição média de fungos filamentosos....	37
TABELA 11. Composição em aminoácidos de diferentes fontes de proteínas (g/100g de proteínas).....	38

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Regiões de cultivo da mandioca.....	9
FIGURA 2. Seção transversal da raiz de mandioca.....	16
FIGURA 3. Câmara de fermentação: lâmpadas ultravioleta.....	54
FIGURA 4. Fluxograma do preparo da mandioca para processo fermentativo.....	55
FIGURA 5. Fluxograma de obtenção do inóculo.....	57
FIGURA 6. Fluxograma de obtenção da farinha de mandioca enriquecida.....	60
FIGURA 7. Influência da adição de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ no teor de proteínas, mantendo-se a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 2%.....	70
FIGURA 8. Influência da adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{KH}_2\text{PO}_4$ na proporção de 2 : 1, no teor de proteínas.	71
FIGURA 9. Influência das adições de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{KH}_2\text{PO}_4$ na produção de proteínas pelo <b>A. oryzae</b> ATCC 46244.....	72
FIGURA 10. Variação da umidade em função da espessura da camada. <b>A. oryzae</b> cepa nº 46244.....	75
FIGURA 11. Variação do pH em função da espessura da camada. <b>A. oryzae</b> cepa nº 46244.....	76
FIGURA 12. Elevação do teor de proteínas em função da espessura da camada.....	77

FIGURA 13.	Influência da espessura da camada na umidade, no pH e no teor de proteínas. <b>A. oryzae</b> cepa nº 46244.....	78
FIGURA 14.	Variação da umidade do substrato com o tempo de fermentação. <b>A.oryzae</b> cepa nº 46244..	82
FIGURA 15.	Variação da umidade do substrato com o tempo de fermentação. <b>A. oryzae</b> cepa nº ETF-20	83
FIGURA 16.	Variação da umidade do substrato com o tempo de fermentação. <b>R. stolonifer</b> cepa nº276	84
FIGURA 17.	Variação da umidade do substrato com o tempo de fermentação.. <b>A. niger</b> cepa nº 2003...	85
FIGURA 18.	Variação do pH com o tempo de fermentação. <b>A. oryzae</b> cepa nº 46244.....	87
FIGURA 19.	Variação do pH com o tempo de fermentação. <b>A. oryzae</b> cepa nº ETF-20.....	88
FIGURA 20.	Variação do pH com o tempo de fermentação. <b>R. stolonifer</b> cepa nº 0276.....	89
FIGURA 21.	Variação do pH com o tempo de fermentação. <b>A. niger</b> cepa nº 2003.....	90
FIGURA 22.	Elevação protéica com o tempo de fermentação. <b>A. oryzae</b> cepa nº 46244.....	92
FIGURA 23.	Elevação protéica com o tempo de fermentação. <b>A. oryzae</b> cepa nº ETF-20.....	92
FIGURA 24.	Elevação protéica com o tempo de fermentação. <b>R. stolonifer</b> cepa nº 0276.....	93

FIGURA 25.	Elevação protéica com o tempo de fermentação. <b>A. niger</b> cepa nº 2003.....	93
FIGURA 26.	Modificações de umidade, pH e proteínas em função do tempo de fermentação. <b>A.oryzae</b> cepa nº 46244.....	95
FIGURA 27.	Modificações de umidade, pH e proteínas em função do tempo de fermentação. <b>A. oryzae</b> cepa nº ETF-20.....	96
FIGURA 28.	Modificações de umidade, ph e proteínas em função do tempo de fermentação. <b>R.stolonifer</b> cepa nº 0276.....	97
FIGURA 29.	Modificações de umidade, pH e proteínas em função do tempo de fermentação. <b>A. niger</b> cepa nº 2003.....	98
FIGURA 30.	Variação da umidade em função do tipo de fermentador utilizado, em relação ao tempo de fermentação.....	101
FIGURA 31.	Fermentação da mandioca em peneira.....	102
FIGURA 32.	Fermentador coberto durante o processo fermentativo.....	105
FIGURA 33.	Mandioca Fermentada em bandejas de alumínio	106
FIGURA 34.	Variação da umidade em função do tempo de fermentação. <b>A. oryzae</b> cepa nº 46244.....	107
FIGURA 35.	Variação do pH em função do tempo de fermentação. <b>A. oryzae</b> cepa nº 46244.....	108

FIGURA 36. Consumo de amido com o tempo de fermentação	109
FIGURA 37. Variação do teor de nitrogênio com o tempo de fermentação.....	110
FIGURA 38. Modificações nos teores de umidade, pH, am <u>i</u> do e proteínas durante a fermentação.....	111

## LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1. Composição química da mandioca cozida.....	65
QUADRO 2. Número de esporos viáveis dos inóculos e te- ores de umidade.....	67
QUADRO 3. Efeito da adição de vários sais na produção de proteínas pelo fungo <i>A. oryzae</i> cepa nº 46244 da ATCC.....	69
QUADRO 4. Influência da espessura da camada na umida- de, pH e proteínas.....	74
QUADRO 5. Condições de cultivo para o enriquecimento protéico da mandioca.....	80
QUADRO 6. Determinações de aflatoxina na farinha de mandioca enriquecida.....	94
QUADRO 7. Condições de processo para o enriquecimento da mandioca.....	103
QUADRO 8. Composição química da farinha de mandioca enriquecida pelo <i>A. oryzae</i> cepa nº 46244 da ATCC.....	104
QUADRO 9. Microrganismos presentes na farinha de man- dioca enriquecida e os permitidos na fari- nha de mandioca pela legislação vigente....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	- American Type Culture Collection
atm	- pressão em atmosferas
B.S.	- base seca
B.U.	- base úmida
°C	- temperatura em graus centígrados
cal	- calorias
CIAT	- Centro Internacional de Agricultura Tropical
cm	- centímetro
esporos/g	- esporos por grama
et alii	- e colaboradores
FES	- fermentação no estado sólido
FML	- fermentação em meio líquido
g	- grama
h	- hora
ha	- hectare
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kcal	- quilocaloria
kg	- quilograma
kg/ano	- quilograma por ano
kg/ha	- quilograma por hectare
l	- litro
m	- metro
mg	- miligrama
min	- minuto
°N	- graus ao norte
Nº e nº	- número
N.M.P.	- número mais provável

NPU	- net protein utilization
∅	- diâmetro
pol	- polegada
%	- porcentagem
% P/P	- porcentagem peso por peso
% V/P	- porcentagem volume por peso
rpm	- rotações por minuto
°S	- graus ao sul
sp	- espécie
t	- tonelada
t/ha	- tonelada por hectare
µg	- micrograma
V	- volt
W	- watt
>	- maior

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos mais sérios problemas com que se defronta o mundo de nossos dias é resultante da combinação de dois fatores adversos: a insuficiência e a inadequabilidade de suprimento alimentar. Esse problema adquire aspectos realmente dramáticos nos chamados países sub-desenvolvidos, ou como querem outros, em desenvolvimento, onde o suprimento alimentar por pessoa vem diminuindo, enquanto a subnutrição protéico—calórica dissemina-se, consequência inevitável do rápido crescimento populacional, do emprego de práticas agrícolas primitivas e de economia realmente pobre<sup>37,56</sup>.

Parece, atualmente, haver poucas dúvidas da responsabilidade da desnutrição protéica como a mais disseminada doença de deficiência do mundo moderno<sup>59, 95, 1221 125</sup>. Há uma evidência crescente de que a carência de proteínas é a causa da maior parte dos óbitos de crianças no período compreendido entre a lactação e a idade escolar, superando mesmo, o que as estatísticas comprovam, outras importantes doenças de carência como a anemia nutricional, as deficiências vitamínicas e o bócio endêmico<sup>93, 95</sup>. Esta situação somente foi reconhecida há alguns anos atrás, porque os efeitos da falta de proteínas permaneceram eclipsados pela ocorrência das doenças infecciosas. Foi recentemente apontado como absolutamente necessário considerar não somente o efeito da nutrição sobre as infecções, mas também o efeito inverso, isto é, das infecções sobre a nutrição<sup>94</sup>. Assim sendo, a subnutrição protéica pode resultar na morte de uma criança por uma doença infecciosa, que não seria fatal se o estado nutricional dessa criança fosse conhecido. De outro

lado, infecções, paralelamente com outros problemas, parecem agir como fatores de precipitação na ocorrência de subnutrição protéica severa ou edema da fome<sup>11</sup>. Conclui-se que a criança poderá ser afetada, até a morte, tanto por subnutrição como pelos efeitos da infecção, embora o problema básico em ambos os casos seja a carência de proteínas, ou melhor, de certos aminoácidos essenciais.

SCRIMSHAW & BEHAR<sup>93</sup>, em 1961, estimaram que a deficiência em proteína já existia em 62% das áreas habitadas do mundo e, que era quase impossível visitar a África e a Ásia sem evidenciar tal deficiência. Embora uma relação específica com o consumo da mandioca não tenha sido comprovada, a subnutrição protéica severa é predominante em áreas nas quais a mandioca é o item principal da dieta alimentar<sup>11</sup>.

É difícil, em um país como o Brasil, poder oferecer dados reais sobre o consumo de alimentos. Contudo, os estudos e as investigações levados a cabo mostram que na ordem de importância quantitativa de carboidratos está, em primeiro lugar, a mandioca, seguida do arroz, milho, trigo e feijão. Dependendo da região, essa ordem chega a se modificar, podendo-se afirmar que na região sul predomina o arroz e o trigo sobre a mandioca<sup>107</sup>. Sob o aspecto nutritivo, deve-se ressaltar que a mandioca é o mais pobre em proteínas, quando comparada com o trigo e o milho. Dos alimentos industrializados, segundo TOSSELLO<sup>108</sup>, 60% são representados por farinhas, raízes, tubérculos e grãos.

O preço da farinha de trigo tem sido um dos maiores problemas brasileiros, tanto que, desde 1788, estudos envolvendo a mistura de farinha de mandioca à de trigo vêm sendo

desenvolvidos. Em 1932, foi nomeada a Comissão do Pão Mixto que, após dois anos de estudos, concluiu ser até 20% perfeitamente tolerável a mistura da farinha de mandioca a de trigo na fabricação do pão, e de 30% na elaboração do macarrão<sup>82</sup>. Esses estudos prosseguiram até nossos dias, acrescentando-se a essas farinhas as de milho e soja, buscando sempre uma farinha mixta mais econômica<sup>27,65,79,118</sup>. Deve-se ressaltar ainda, que com a retirada do subsídio estabelecido pelo governo, o custo da farinha de trigo foi consideravelmente elevado. Com isso, a mistura da farinha de mandioca tornou-se economicamente viável para uso na panificação, situação que somente poderá favorecer a competitividade relativa da mandioca. Dentro desse quadro, volta-se a defender, em nível nacional, que se adicione farinha de mandioca à farinha panificável.

A partir da constatação da má alimentação e das doenças ocasionadas por ela, na década de 60, foram iniciados estudos visando suprir a deficiência em proteínas. Nessa época um novo campo estava se desenvolvendo, o da produção de alimentos por microrganismos. Procurando uma solução para o problema, a atenção dos pesquisadores voltou-se então para os microrganismos, que juntamente com a mandioca, poderiam vir a minimizar o problema. A mandioca passou, então, a ser estudada como substrato em processos fermentativos, visando um incremento na taxa de proteínas, pela incorporação dos microrganismos. O enriquecimento protéico da mandioca foi inicialmente estudado pela fermentação em meio líquido aerado (ou submersa).

Datando de mesma época, os tradicionais alimentos orientais despertaram particular atenção, por sua simplicidade de

elaboração, pelo seu elevado teor em proteína e pelas suas características organolépticas. Esses alimentos orientais, obtidos principalmente por fermentação no estado sólido, trouxeram novos dados para o enriquecimento protéico da mandioca.

Novos estudos foram realizados, utilizando agora o processo fermentativo no estado sólido, comparando os resultados obtidos com os encontrados pela fermentação em meio líquido aerado.

Revisões no assunto, mostrando as vantagens e desvantagens de cada método foram efetuadas por diversos autores: AIDOO<sup>3</sup>, CANNEL<sup>20</sup>, DURAND<sup>26</sup>, HESSELTINE<sup>44, 46, 48</sup>, LONSANE<sup>68</sup>, PAMMENT<sup>78</sup>, TREVELYAN<sup>109</sup>. As vantagens da fermentação de substratos no estado sólido, em relação ao processo convencional de líquidos agitados e aerados, foram também ressaltadas pelos mesmos autores. Condições de fermentação não assépticas (pH de 3,5 e 40°C), substratos relativamente simples e baratos, utilização da flora natural na fermentação, rendimentos comparáveis aos da fermentação convencional, concentração do produto no substrato; e, finalmente, menor complexidade e custo dos equipamentos, com um menor espaço requerido pelos fermentadores, foram as vantagens mais evidenciadas pelos autores para a FES. Uma das principais desvantagens seria a limitação dos microorganismos àqueles que podem se desenvolver em baixos níveis de umidade. Contudo, essa limitação mais tarde mostrou-se benéfica. Das classes de microrganismos, selecionadas pela baixa umidade do substrato, a dos fungos, revelou-se ser de grande importância. Com a utilização de substratos amiláceos, sem hidrólise prévia, a utilização de fungos filamentosos, termotolerantes e amilolíticos, trouxe mais algumas vantagens ao processo ferment

tativo no estado sólido. O emprego dos fungos tem sido realçado pelo seu tempo de geração extremamente curto, o qual possibilita um rápido aumento celular. Pelo seu perfil de proteína e pela variedade de substratos que podem ser utilizados, torna possível a sua produção em diferentes regiões e condições climáticas.

Dentro desse escopo, a mandioca passou a ser encarada com otimismo pelos pesquisadores, tanto que STRASSER<sup>104</sup>, na década de 70, enfatiza a importância do seu enriquecimento com biomassa microbiana, indicando a incorporação desse processo à elaboração da farinha de mandioca.

É sabido que a mandioca, produzida em quantidades consideráveis no mundo, e que o Brasil é o seu principal produtor, tem como destino, basicamente, o consumo humano, cozida ou processada na forma de farinha.

Dessa maneira, iniciaram-se rigorosos estudos científicos visando o aproveitamento da mandioca na elaboração de alimento rico em proteína. Novos tipos de fermentadores surgiram, melhorados quanto seus aspectos de engenharia e automação do processo. Os tipos de fermentadores, suas principais características construtivas e necessidades de controle, passaram a ser abordados. Em 1985, LONSANE et alii<sup>68</sup>, sumaram os principais tipos de reatores, relacionando seus aspectos de engenharia e as necessidades de controle com o crescimento dos microrganismos em substratos sólidos.

Em 1986, o Centro de Informação sobre Mandioca, do CIAT<sup>23</sup>, com o fim de contribuir na elaboração de tais estudos, elaborou uma revisão bibliográfica da industrialização da mandioca, no período de 1902-1984. O compilado bibliográfico con-

tém 250 referências de documentos publicados e foi estruturado segundo às necessidades de informações dos usuários, com base nas consultas recebidas. As referências citadas foram agrupadas nos seguintes títulos: a indústria da mandioca a nível mundial, utilização dos resíduos do processamento da mandioca, microbiologia industrial e proteína unicelular, e ainda comércio e especificações dos produtos da mandioca. Entre os produtos que provêm da industrialização da mandioca, a produção de proteína microbiana apresentou-se entre os que mais se destacaram.

Apesar do enriquecimento protéico da mandioca ter sido indicado como uma das soluções para atenuar as deficiências protéicas do terceiro mundo, a maior parte dos estudos desenvolvidos se concentram na sua obtenção pelo método convencional de fermentação submersa. O alto custo dos equipamentos e as necessidades de automação podem inviabilizar a utilização desses processos, pois a atual situação econômica desses países, ditos em desenvolvimento, não permite a implantação de plantas, senão a nível laboratorial, quanto mais a nível comercial ou semi-comercial.

O objetivo deste trabalho foi o do enriquecimento protéico da mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, por processo fermentativo estático, em meio sólido, utilizando fungos filamentosos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A MANDIOCA

A mandioca, também denominada pelos brasileiros, como: aipi, aipim, aimpim, castelinha, uaipi, macaxeira, mandioca-doce, mandioca-mansa, maniva, maniveira, pão-de-pobre, entre outros<sup>30,88</sup>. Algumas vezes o termo tapioca, um dos seus produtos manufaturados, é usado como nome comum<sup>9,51</sup>. PECKOLT, citado por RANGEL<sup>82</sup>, denomina a mandioca como "pão dos trópicos". E ainda, nos estados do Norte, onde constitui quase que o único alimento, foi justamente chamada "o pão brasileiro"<sup>82</sup>. Outros nomes comuns para a mesma planta são cassava, manioc, yuca, cazabe, balinghoy, cu san tau, kaspé, kelala, mangahaso e ubi singkong<sup>2,11,51</sup>.

A sistematização de nomes e características das mandiocas brasileiras têm sido uma das solicitações mais importantes por parte dos pesquisadores e interessados no assunto. O Banco do Nordeste do Brasil, em 1968, registrou somente na Região Nordeste, cerca de 419 diferentes nomes pelas quais as mesmas são conhecidas<sup>13</sup>. É assim bastante variada a nomenclatura regional da mandioca, podendo um mesmo cultivar ter diferentes nomes e um mesmo nome ser comum a mais de um cultivar.

Encarada sob o ponto de vista agrônômico, as cultivares em exploração podem ser agrupadas conforme a sua toxicidade em mandioca brava (amarga ou venenosa) e mandioca mansa (doce, inócu, de mesa, aipim ou macaxeira)<sup>9,13,24,30,35,38,51,87,88</sup>. Os caracteres morfológicos da planta são muito semelhantes, residindo na maior ou menor riqueza de ácido cianídrico a diferença fundamental entre as duas formas<sup>9,13,14,24,30,55,71,73,106</sup>.

A mandioca brasileira e o aimpim pertencem a uma única espécie **Manihot esculenta** Crantz. Conforme a moderna taxionomia, a mandioca se enquadra na seguinte classificação científica<sup>24</sup>:

DIVISÃO	- Spermatophyta
Subdivisão	- Magnoliophytina (Angiospermae)
CLASSE	- Magnoliatae (Dicotiledoneae)
Subclasse	- Magnoliidae (Polycarpicae)
ORDEM	- Euphorbiales
FAMÍLIA	- Euphorbiaceae
GÊNERO	- <b>Manihot</b> (Adanson et Mill, 1763)
ESPÉCIE	- <b>Manihot esculenta</b> Crantz

Os primeiros estudos da origem da planta cultivada consideram o Brasil o país no qual a **Manihot esculenta** foi primeiro cultivada<sup>24,86,87,88</sup>. Botânicos, ecologistas e etnologistas mundiais concordam em afirmar que a mandioca é planta de origem americana, embora alguns considerem o estudo de sua história bastante vasto e complexo. A exploração da mandioca no Brasil é mais antiga do que sua própria história, pois é sabido que os nossos colonizadores a encontraram entre os indígenas. Distribui-se por todo o território brasileiro, sendo cultivada em todos os Estados<sup>9,24,82,85,86</sup>. Divulga-se que cerca de 88 países produzem mandioca, sendo que 2/3 da produção mundial localizam-se em cinco países: Brasil, Tailândia, Zaire, Índia e Nigéria. As regiões nas quais a mandioca é cultivada são indicadas na FIGURA 1. As latitudes 30°N e 30°S limitam o cultivo da espécie, sendo que a maior parte dos campos de cultura parece estar limitada pelos paralelos 20°N e 20°S<sup>24,38,51</sup>,

os quais compreendem os trópicos e sub-trópicos. As razões de sua difusão se deve, indubitavelmente, à sua capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo, à facilidade de cultivo, ao seu rendimento e às variadas formas de utilização.

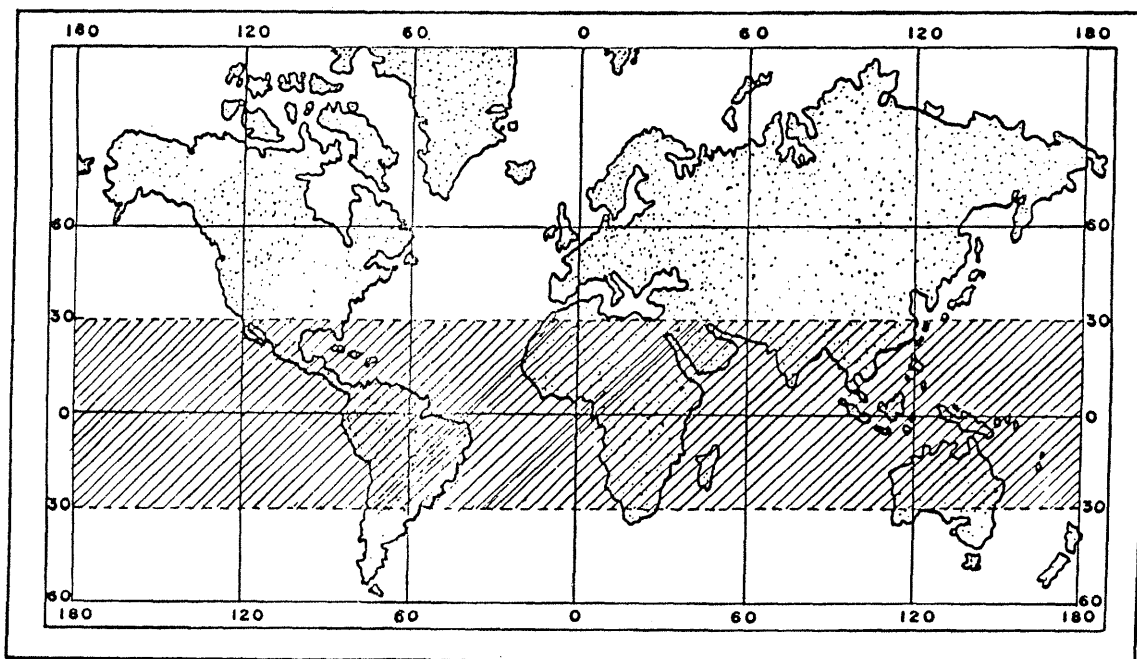


FIGURA 1. Regiões de Cultivo da Mandioca.

FONTE: CONCEIÇÃO<sup>24</sup>

A mandioca assume posição de destaque na conjuntura sócio-econômica mundial, face aos fatores acima expostos. Os maiores produtores do mundo, com produção acima de dois milhões de toneladas, são considerados países em desenvolvimento ou do terceiro mundo, caracteristicamente pobres, o que induz ser essa cultura de subsistência, sem valor comercial significativo em termos mundiais. A Tabela 1 mostra a relação dos doze maiores produtores de mandioca do mundo de 1982 a 1984, apresentando a área, rendimento e produção<sup>85</sup>. Em área plantada, pela mes-

TABELA 1. Evolução da Área Plantada, Rendimento e Produção da Mandioca, 1982-1984

PAÍSES	ÁREA 1.000 ha			RENDIMENTO kg/ha			PRODUÇÃO 100t		
	1982	1983	1984	1982	1983	1984	1982	1983	1984
Brasil	2.122	2.023	1.817	11.344	10.662	11.711	24.072	21.569	21.275
Tailândia	1.087	1.018	1.335	16.362	18.653	14.970	17.788	18.989	19.985
Zaire	2.026	2.086	2.150	6.999	6.999	6.884	14.810	14.600	14.800
Indonésia	1.324	1.242	1.420	9.812	9.845	9.859	12.988	12.229	14.000
Nigéria	1.250	1.150	1.250	9.360	8.652	9.440	11.700	9.950	11.800
Tanzânia	450	450	450	11.111	12.000	12.444	5.000	5.400	5.600
Índia	310	302	305	17.060	17.709	19.041	5.292	5.341	5.800
China	249	252	252	14.933	15.398	16.139	3.718	3.880	4.067
Vietnam	480	485	500	5.552	5.567	5.800	2.665	2.700	2.900
Paraguai	141	145	150	14.972	14.483	14.667	2.111	2.100	2.200
Colômbia	207	207	210	9.662	9.662	10.000	2.174	2.180	2.100
Filipinas	224	210	250	8.871	9.524	8.000	1.987	2.000	2.000
Mundo	15.283	14.879	14.151	8.547	8.277	9.117	130.627	123.153	129.020

FONTE: REIS<sup>85</sup>

ma Tabela 1, o Brasil apresentava segunda maior área cultivada, permanecendo nesta posição de 1982 a 1984. Com relação ao rendimento, o País ocupava o sexto lugar. Segundo pesquisas do IBGE em todo o território brasileiro, publicada em Agnoanalysis<sup>2</sup>, dezembro de 1988, a produção nos anos 1985 e 1986 foram de, respectivamente, 23.124.782t e 25.620.600t. Os dados preliminares do comportamento das safras de 1987 e 1988 apresentam uma queda na produção, passando do 3º para o 4º lugar entre as principais culturas, conforme mostra a Tabela 2.

TABELA 2. Principais Culturas Brasileiras, 1985-1988

CULTURA	PRODUÇÃO t			
	1.985	1.986	1.987	1.988
Arroz <sup>2</sup>	9.024.555	10.374.030	10.425.100	11.816.985
Cana-de-açúcar	247.199.474	239.178.319	268.584.836	276.592.760
Laranja <sup>1</sup>	71.071.533	66.872.216	73.352.391	76.615.131
Mandioca	23.124.782	25.620.600	23.499.957	21.418.422
Milho <sup>3</sup>	22.018.180	20.530.960	26.786.647	24.714.182
Soja <sup>3</sup>	18.278.585	13.330.225	16.978.832	18.060.002
Trigo <sup>3</sup>	4.320.267	5.689.680	6.099.111	5.479.781

FONTE: AGROANALYSIS<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>mil frutos;

<sup>2</sup>em casca;

<sup>3</sup>em grão.

Os Estados brasileiros maiores produtores de mandioca, em número de onze, estão relacionados na Tabela 3, com suas respectivas produções no período de 1980 a 1984. Bahia, Maranhão, Pará e Pernambuco foram os quatro maiores produtores; em 1984, produziram 43,03% da produção nacional. O Paraná, neste ano ocupou a quinta posição com 6,80% da produção nacional e uma área plantada de 73.688 ha. A safra de 1987 no Paraná foi de

1.853.950t, representando um aumento de 28,19% em relação a safra de 1984 com uma área cultivada de 85.445ha (representa um aumento de 15,96% em área cultivada), o que evidencia um maior rendimento (kg/ha). A estimativa de área e produção para 1988/89 é de, respectivamente, 90.000 ha e 1.845.000/2.000.000t, segundo avaliação feita pelo IBGE em 30/11/88, como mostra a Tabela 4. Dentro desta previsão, a mandioca se situa em quarto lugar, sendo precedida pela cana-de-açúcar, milho e soja<sup>2</sup>. Paraná, São Paulo e Bahia, nesta ordem são os estados brasileiros que têm apresentado maiores produtividades. O Paraná apresentou em 1987, 21678 Kg/ha, como rendimento.

TABELA 3. Produção Brasileira de Mandioca e os Principais Estados Produtores, 1980-1984

ESTADOS	PRODUÇÃO t				
	1980	1981	1982	1983	1984
Bahia	4.880.000	5.600.000	4.439.200	3.960.000	4.350.804
Maranhão	3.279.641	3.112.240	3.493.621	2.439.249	1.647.785
Pará	1.239.392	1.524.046	1.681.529	1.647.765	1.645.339
Pernambuco	1.508.649	1.442.776	1.666.248	1.356.612	1.516.320
Paraná	907.310	1.100.380	1.218.470	1.383.000	1.446.258
Rio Grande do Sul	1.700.198	1.685.198	1.685.263	1.672.264	1.410.255
Minas Gerais	1.939.585	1.864.622	1.362.729	1.281.279	1.103.060
Santa Catarina	995.195	1.274.881	1.141.097	999.746	1.090.968
Amazonas	827.403	835.680	860.748	882.264	908.736
Ceará	1.085.000	800.000	577.214	442.088	884.197
Piauí	833.966	884.684	1.048.950	580.992	673.376
Outros (15)	4.269.310	4.391.853	4.897.251	4.923.498	4.612.049
Brasil	23.465.649	24.516.360	24.072.320	21.568.757	21.298.147

FONTE: REIS<sup>85</sup>

No mundo, a mandioca é mais utilizada na alimentação humana, sendo que em cerca de 14 países ela é alimento predominante na dieta de 700 milhões de pessoas<sup>17,24,57</sup>. No Brasil, constitui hábito alimentar em todas as regiões, principalmente as do Norte e Nordeste. A forma preponderante de aproveitamen-

to da cultura é a farinha de mandioca, ou de mesa, sendo utilizada "in natura" e no preparo de raspas, farinha de raspas, péletes, farelo, flocos de mandioca, sagu, fécula ou polvilho, tapioca, aguardente, bem como, no preparo de rações para animais 24,72,85,88

. Em escala bem menor são obtidos diversos outros produtos, incluindo alguns nitidamente indígenas, tais como o Tarubá e o Carimã<sup>5</sup>. De todos os produtos da mandioca, apenas um se destaca do ponto de vista comercial, a farinha de mesa 24,72,85,88

TABELA 4. Estimativa de Área e Produção de Produtos Seleccionados (\*), no Paraná, 1988-1989

PRODUTO	ÁREA ha		PRODUÇÃO t	
	1987/88	1988/89	1987/88	1988/89
Algodão	470.000	410.000	903.107	720.000/820.000
Arroz de Sequeiro	171.100	157.000	242.300	235.000/225.000
Cana-de-açúcar	165.000	170.000	12.200.000	13.000.000/14.000.000
Feijão (águas)	705.800	500.000	420.600	330.000/370.000
Milho (safra normal)	2.075.000	2.000.000	5.305.000	5.000.000/5.500.000
Mandioca	86.600	90.000	1.850.000	1.845.000/2.000.000
Soja	2.120.000	2.320.000	4.800.000	5.000.000/5.400.000

FONTE: AGROANALYSIS<sup>2</sup>

\*a) segundo avaliação em 30/11/88

b) produtos cujo calendário agrícola já permite realizar estimativas.

A farinha de mesa é obtida, na sua maior parte, em centenas de "fabriquetas" caseiras de fundo de quintal, ou seja, sob processos rudimentares e primitivos. As indústrias são de pequena e média capacidade, e localizam-se, principalmente, na Região Centro-Sul do país. Na época da 2ª Guerra Mundial (1939/45) a produção de fécula alcançou, no Brasil, apreciável expansão, graças ao interesse dos norte-americanos em adquiri-la.

Esse fato determinou a implantação de várias fecularias nos Estados de São Paulo e Santa Catarina, sendo que esse último passou a liderar a produção e exportação de fécula. Contudo, os nossos produtos de exportação não têm constantemente alcançado os requisitos mínimos de qualidade e a difícil posição de sua competição se deve também aos custos de produção. O comércio internacional de derivados (farinha, fécula, raspa e péletes), embora pequeno, apresentou um movimento de 6,5 milhões de toneladas de raspa, farinha e fécula, em 1978, tendo a Tailândia exportado 6 milhões<sup>17,24,72,85,117</sup>.

Sob o ponto de vista de uso, as cultivares de mandioca podem ser classificadas em industriais, para mesa, para forragem e mistas. As cultivares do grupo das bravas são preferidas para uso industrial, porque são as mais difundidas e que geralmente<sup>5,24</sup> acusam maior produtividade que os aipins. O maior ou menor teor de ácido cianídrico é considerado de importância secundária em certas indústrias, desde que este é eliminado no armazenamento, na descortiçação, cozimento, secagem e nas operações de extração do amido. ADRIAENS, citado por JOHNSON<sup>55</sup>, em estudos sobre a toxicidade da mandioca, conclui que 12% e 60% de 800 mg de ácido cianídrico presente em 1 Kg de mandioca são eliminados após armazenagem, respectivamente, em 1 e 24 horas, a 25-27°C. VITTI et alii<sup>119</sup> consideram que em 15 minutos de fervura o teor de ácido cianídrico diminui consideravelmente. As peles, periderme e casca primária, segundo WOOD<sup>124</sup>, possuem até dez vezes mais ácido cianídrico do que a polpa. A maioria dos autores<sup>5,14,24,35,51,73,88,106,124</sup> concordam que as operações de processamento que envolvam ação do calor são suficientes para eliminar a maior parte do ácido cianídrico presente na man-

dioca, e para a variedade mansa, usada como alimento, sem processamento, basta ser cuidadosamente descascada e cozida. A proporção de ácido cianídrico por quilo de raízes frescas varia de autor para autor, ficando posicionada na faixa de 15 a 400 mg. COURSEY, em citação de HOHNHOLZ<sup>51</sup>, diz que em casos excepcionais o limite máximo da faixa pode chegar a 2000 mg. A Tabela 5 mostra os teores de ácido cianídrico presentes nas partes da planta de mandioca amarga e da mandioca doce.

TABELA 5. Teor de Ácido Cianídrico na Mandioca.

PARTE DA PLANTA	ÁCIDO CIANÍDRICO %	
	Mandioca Amarga	Mandioca Doce
Folhas adultas	0,0410	0,0216
Caule verde	0,0240	0,0144
Caule lenhoso adulto	0,1130	0,0430
Porção interna do lenho	0,0027	0,0072
Medula	0,0760	0,0190
Raiz fresca (casca)	0,0055	0,0147
Raiz fresca (parte interna)	0,0530	0,0048

FONTE: TELES<sup>106</sup>

A dose letal para um adulto, de acordo com os autores, é de 60 mg de ácido cianídrico. Segundo TELES<sup>106</sup> sabe-se apenas que comumente o gado sofre acidentes fatais com o uso da mandioca fresca, e mesmo as pessoas, ainda que raramente, sofrem intoxicações com a ingestão dessa raiz. Em ambos os casos isso ocorre se a

mandioca for usada sem os cuidados necessários.

A parte mais importante da raiz da mandioca é a polpa ou parênquima que está basicamente constituída de vasos de xilema, distribuídos em forma de estrias nas quais se encontra o amido. No centro da raiz encontram-se os vasos xilogenos e fibra, e na periferia se localiza o córtex ou casca, constituída por capas superpostas de tecidos, fibras esclerenquimatosas, vasos com lá tex e câmbio (Figura 2)<sup>24,57</sup>.

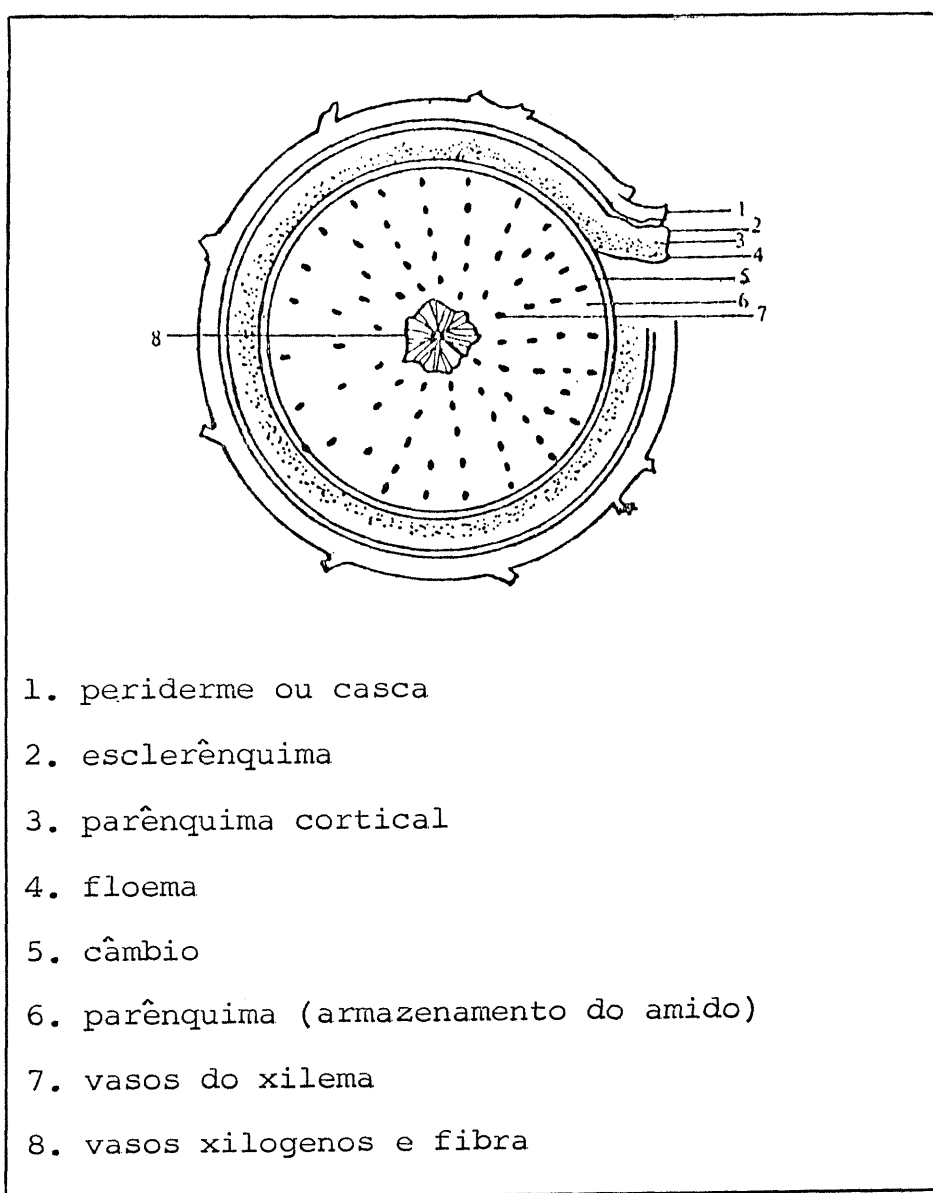


FIGURA 2. Seção Transversal da raiz de mandioca.

FONTE: KATO<sup>57</sup>.

A composição química da planta *Manihot esculenta* Crantz é dada na Tabela 6, bem como a composição da farinha e do amido, seus derivados. Seu valor como sexto mais importante alimento básico no mundo é devido ao fato de que suas raízes contêm 20-30% amido (quando fresca) e que 63 a 85% da massa seca de mandioca é comestível comparada com 36% no caso do trigo<sup>51</sup>. A raiz é rica em amido mas pobre em proteína. Para o amido da mandioca foi evidenciado por VITTI et alii<sup>117</sup>, pH entre 4,5 e 6,9 e temperaturas de gelatinização de 60 a 65°C.

TABELA 6. Composição Química da Planta *Manihot esculenta* Crantz

COMPOSIÇÃO POR 100g	TUBÉRCULO			FARINHA	AMIDO	FOLHA VERDE
	Fresco	Seco	Fermentado			
Calorias, cal	135	335	174	363	354	60
Umidade, %	65,5	15,7	56,1	9,1	12,0	81,0
Proteínas, g	1,0	1,4	0,5	1,1	0,5	6,9
Lipídios, g	0,2	0,5	0,1	0,5	0,5	1,3
Amido, g	32,4	80,6	42,5	88,2	86,9	9,2
Fibras, g	1,0	1,2	-	2,2	-	2,1
Cinzas, g	0,9	1,8	0,8	1,1	0,3	1,6
Cálcio, mg	26	96	30	84	0	144
Fósforo, mg	32	81	30	37	0	68
Ferro, mg	0,9	7,9	0	1,0	0	2,8
Sódio, mg	2	-	-	11	-	4
Potássio, mg	394	-	-	926	-	409
Vitamina A, µg	-	-	-	-	-	8.280
Tiamina, mg	0,05	0,06	0,07	0,02	0	0,16
Vitamina B <sub>2</sub> , mg	0,04	0,06	-	0,03	0	0,32
Niacina, mg	0,6	0,8	-	0,6	0	1,8
Vitamina C, mg	34	0	-	-	0	82

FONTE: HOHNHOLZ<sup>51</sup>.

Segundo o IBGE<sup>53</sup>, os cinco principais produtos tropicais ricos em fécula, de importância mundial, são a mandioca, inhame, cará, batata inglesa e batata doce. Seus valores nutritivos são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. Principais Produtos Amiláceos de Importância Mundial.

COMPOSIÇÃO POR 100g (parte co- mestível)	MANDIOCA	INHAME	CARÁ	BATATA INGLESA	BATATA DOCE
Calorias, kcal	149	135	120	75	116
Proteínas, g	0,8	2,3	2,0	1,8	1,3
Lipídios, g	0,3	0,	0,1	0,1	0,3
Carboidratos, g	36,0	31,	28,4	17,9	28,6
Cálcio, mg	35,0	28,0	22,0	0,6	31,0
Fósforo, mg	46,0	52,0	39,0	40,0	37,0
Ferro, mg	1,1	1,6	1,0	0,8	1,0
Vitamina A, mg	2,0	2,0	2,0	-	300
Vitamina B <sub>1</sub> , mg	0,06	0,05	0,10	0,09	0,11
Vitamina B <sub>2</sub> , mg	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04
Niacina, mg	0,70	0,05	0,07	1,50	0,08
Vitamina C, mg	39,0	12,0	8,0	16,0	31,0

FONTE: IBGE<sup>53</sup>.

A composição centesimal de diversas farinhas é mostrada na Tabela 8. A farinha de mandioca, sob o aspecto nutritivo, é a mais pobre das cinco tabeladas, sendo que seu consumo total interno está em torno de 5,6 milhões de toneladas, e seu consumo "per capita" de 55,9 Kg/ano, segundo a SECRETARIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, em 1981, citada por VILELA & JUSTE JUNIOR<sup>116</sup>.

TABELA 8. Composição Centesimal de Diversas Farinhas.

COMPONENTES	TRIGO	MILHO	ARROZ	MANDIOCA	SOJA
Carboidratos	72 - 76	73 - 75	74 - 75	82 - 84	12-18 <sup>*</sup>
Protídios	10 - 11	6 - 8	7 - 8	1,5-2,5	41-44
Lipídios	1,1-1,2	2 - 3	1,5-2,5	0,1-0,5	18-21
Cinzas	0,5-1,0	06 - 14	-	1,2-2,0	4-6
Umidade	12,0-13,0	10,0-12,0	11,0-12,0	12,0-15,0	7-8

\* 18-28% se for incluído o teor de celulose, hemicelulose, pentosanas, etc.

FONTE: CONCEIÇÃO<sup>24</sup>

Datando de época mais recente, surgem as qualidades até então inexploradas dos alimentos orientais, como um campo com grande potencial, como salientam BORZANI<sup>16</sup>, DABBAH<sup>25</sup>, GRAY<sup>36</sup>, HESSELTINE<sup>44,49</sup>, KHILBERG<sup>58</sup>, SALES<sup>89</sup>, SALES & MENEZES<sup>90</sup>, SOCCOL L<sup>101</sup>, TANNENBAUM<sup>105</sup>, VAN VEEN<sup>114</sup>, VENOSA<sup>115</sup>, dentre outros autores de diferentes partes do mundo. Os trabalhos que evidenciam a importância tecnológica da mandioca se sucedem, dando relevância cada vez maior ao estudo ao enriquecimento protéico da mandioca mediante fermentação. Esse processo de enriquecimento da mandioca para alimento humano virá suprir, ou ajudar a suprir, a nossa carência de proteínas.

Evidencia-se, portanto, que a mandioca é abundante como matéria-prima para o fornecimento de proteínas em nosso país, estabelecendo essa abundância como ponto de partida deste trabalho.

## 2.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

### 2.2.1 Definição do termo

A fermentação constitui a classe de reações biológicas de oxidação-redução produtoras de energia nas quais os compostos orgânicos servem de receptores finais de elétrons. Os compostos orgânicos receptores de íons dão origem a produtos de fermentação, que se acumulam no meio de cultivo. Esses produtos são numerosos e determinados pelo tipo de microrganismo que realiza a fermentação, pela natureza do composto orgânico e, em alguns casos, por fatores ambientais como temperatura e pH<sup>66</sup>.

Na terminologia industrial, segundo o mesmo autor, a palavra fermentação é usada para referenciar a todos os processos nos quais ocorre uma modificação de estrutura química por enzimas de origem microbiana. Assim, por exemplo, o processo de produção do ácido glucônico de glucose por bolores é descrito livremente como fermentação.

Fermentação no estado sólido, fermentação em meio sólido e fermentação de substrato sólido são termos utilizados por diversos autores, mas, eles são essencialmente o mesmo.

O termo fermentação no estado sólido tem sido aplicado para diferentes tipos de processo, tornando seu significado exatamente obscuro. No correto uso do termo, fermentação no estado sólido refere-se ao crescimento de microrganismos em materiais sólidos, sem a presença de água livre<sup>3,20,48,60,68</sup>.

Enquanto a presença de água é necessária na fermentação no estado sólido, ela existe na forma de água de constituição ou complexada na massa matriz.

FES não se refere a fermentação de substrato sólido em

um meio líquido nem também se refere a fermentação de "slurries". CANNEL<sup>20</sup> apresenta uma definição para o termo "slurry": líquidos com altos teores de sólidos insolúveis.

Para o propósito deste trabalho o termo significa fermentação que tem lugar em substrato sólido, o qual serve de principal fonte de nutrientes para um microrganismo, que se associa nas superfícies e interstícios do material.

### 2.2.2 Vantagens e Desvantagens da FES

Em comparação com fermentação em meio líquido aerada ou agitada (FML), a FES oferece as seguintes vantagens<sup>3,20,26,42,46,48,68,78,109</sup>.

- 1) O volume do meio por grama de substrato é sensivelmente reduzido, devido à ausência de água livre.

Esse fato traz óbvios benefícios:

- o espaço ocupado pelo equipamento de fermentação é pequeno, relativamente ao superior rendimento do produto;
- geralmente não são produzidos líquidos residuais;
- em vários casos não há necessidade de filtração, pois o produto é concentrado no substrato e pode ser usado diretamente;
- sendo necessária a extração do produto do substrato, menos solvente é requerido;
- área de armazenagem utilizada imediatamente após a fermentação é grandemente reduzida.

- 2) Desde que bactérias requerem água livre para se desenvolver, a FES reduz grandemente o problema da con

taminação bacteriana. A maior parte dos processos em FES não requerem medidas de esterilização.

- 3) O meio é relativamente simples como o é usualmente um natural, enquanto que a FML utiliza meios elaborados. Eventualmente, outros nutrientes podem ser adicionados.
- 4) Desde que os esporos podem ser usados diretamente no material a fermentar, tanques semente não são necessários.
- 5) A aeração é facilmente obtida pela passagem do ar entre os espaços deixados pelas partículas do substrato. Mistura (revolvimento) contínua não é frequentemente necessária; um ocasional revolvimento é suficiente.
- 6) O produto desejado pode ser prontamente removido do vaso fermentador e há melhora na recuperação do produto.
- 7) Eliminação do problema da formação de espuma.
- 8) Gastos com controle rigoroso de poucos parâmetros são eliminados.
- 9) Na disposição dos resíduos sólidos, o volume do material é reduzido. O produto é também fisicamente mais

estável do que o material original.

- 10) A FES é adaptável para os processos contínuos e de batelada, e a complexidade não é maior que a requerida para a FML.

Contudo, existem algumas importantes desvantagens em FES, que devem ser trazidas a luz<sup>3,20,26,42,45,48,68,78,109</sup>.

- 1) Os tipos de microrganismos que podem ser usados são limitados àqueles que podem crescer em reduzidos teores de umidade, como os fungos e algumas leveduras. Se o organismo requer água livre, como as bactérias, por exemplo, então a FML deve ser usada.
- 2) Em produção em grande escala, o calor gerado pela respiração do microrganismo deve ser removido, Isso pode ser mais difícil na FES do que em FML.
- 3) Na FML, o fator limitante é comumente a transferência de oxigênio para o volume do meio. Para um certo volume, essa é uma variável controlada. Pelo aumento da velocidade de agitação e/ou taxa de alimentação de oxigênio, a transferência de oxigênio. Na FES, contudo, a transferência de massa intra-partícula é usualmente o fator limitante.
- 4) O substrato deve ser pré-tratado antes da fermentação (p.ex: moagem, descasque ou cozimento), como em outros casos.

- 5) Os controles de umidade, pH, taxa de oxigênio, taxa de dióxido de carbono e estimativa do crescimento do micélio são mais difíceis na FES.

No todo, a FES é aplicada quando a demanda para o produto é limitado, como é o caso de algumas enzimas industriais. Recentemente, tem havido um renovado interesse de vários grupos de pesquisadores pela FES, com o intuito de produzir alimentos fermentados.

### 2.2.3 Tipos de Fermentadores

Diversos pesquisadores têm usado diferentes equipamentos para executar a FES. HESSELTINE<sup>46</sup>, em 1972, sugere que a FES pode ser classificada naqueles onde o substrato é conduzido a fermentar sem agitação, com ocasional agitação e continuamente agitado, o que definirá o tipo de fermentador a ser utilizado.

CANNEL<sup>21</sup>, em 1980, sumariza os diferentes tipos de reatores, que podem ser utilizados em FES, da seguinte maneira:

- a) bandeja;
- b) pilhas;
- c) torres;
- d) leitos com reciclagem de ar;
- e) cilindro rotativo;
- f) tanque agitado.

Os três primeiros tipos são sistemas de batelada, enquanto os três últimos são convenientes para operações contínua ou em batelada.

A escolha entre esses tipos básicos de reator, segundo o mesmo autor, pode ser feita da seguinte maneira:

- a) listagem dos objetivos da fermentação em questão e então avaliar cada tipo de reator e sua capacidade para alcançar os objetivos propostos;
- b) conduzir trabalho de laboratório para selecionar qual reator é mais conveniente para o microrganismo em questão;
- c) avaliação econômica para determinar qual reator é factível com respeito ao capital e custos de operação;
- d) decisão de quanto de controle de processo é necessário.

LONSANE et alii<sup>68</sup> fazem uma revisão dos aspectos de engenharia dos nove maiores tipos de fermentadores já utilizados, apontando suas vantagens e desvantagens. Existem vários tipos de fermentadores para escala de laboratório, mas o problema com a maioria deles é a mudança de escala (scale up).

AIDOO<sup>3</sup> sumariza os diferentes tipos de reatores com os diferentes tipos de processos de FES (Tabela 9).

Segundo DURAND<sup>26</sup>, em escala de laboratório, é possível o uso de diferentes equipamentos, mas para plantas semi-comercial e comercial, alguns fatores importantes devem ser considerados:

TABELA 9. Tipos de Fermentadores Utilizados em Fermentação no Estado Sólido.

FERMENTADOR	CAPACIDADE	PROCESSO FERMENTATIVO
Bandeja de madeira	----	Fermentação tipo Koji com <i>A. oryzae</i>
Cilindro rotativo	208 l	Compostagem
	20 l	Fermentação tipo Koji com <i>A. oryzae</i> Produção de enzima com <i>A. oryzae</i>
Frasco fernbach	2-8 l	Produção de aflatoxina com <i>A. parasiticus</i> Produção de esporos fúngicos
Panela de alumínio	3-4 l	Produção de enzima com <i>A. oryzae</i>
Vaso horizontal	26 l	Produção de ochratoxina com <i>A. ochraceus</i>
Cilindro Horizontal	----	Contínuo, utilizando resíduos de forragem e milho
Misturador de cimento	70 l	Grande escala, utilizando resíduos de forragem e milho
	114 l	Fermentação de palha com <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Candida utilis</i> e <i>Trichoderma viride</i>
Misturador de massa de pão	10 Kg	Enriquecimento protéico de materiais amiláceos com <i>A. niger</i>
Caixa ou cela	5,5 m de Ø contendo 1.266 bushels* de milho	Produção de aflatoxina com <i>A. flavus</i>
Vaso horizontal com pás	20 l	Fermentação tipo Koji com <i>A. oryzae</i>

\* bushel - medida de cereais, correspondente a 35,2381 l

3  
FONTE: AIDOO.

- 1) Homogeneidade do meio de cultura é importante para prevenir aglomeração das partículas do substrato durante a fermentação.
- 2) Agitação conveniente para o substrato, não destrutiva, para os microrganismos.
- 3) Redução em áreas pelos incrementos de altura da camada e transferência de calor e oxigênio.
- 4) Esterilização.
- 5) Inoculação.
- 6) Monitoramento e controle dos parâmetros da fermentação, pH, umidade e aeração.

As características construtivas e de processo dos principais tipos de vasos fermentadores, levantadas por LONSANE et alii<sup>68</sup>, são mostradas a seguir:

a) Cilindro rotativo

Cilindro construído em vidro, aço inox ou cerâmica, de capacidade de até 114 litros, 70 Kg, ou do tamanho conveniente para produção em escala industrial. Dotado de sistema de rotação, com velocidade variando desde 1 rpm até 188 rpm. Equipado com entrada e saída de ar. Altas velocidades de rotação implicam em menor crescimento do microrganismo, e altos fluxos de ar conduzem a grande esporulação, de acordo com os experimentos realizados por SILMAN<sup>100</sup>. A aeração, segundo DURAND<sup>26</sup>,

é necessária para manter as condições aeróbicas, regular a temperatura e a umidade do substrato durante o curso da fermentação. Para manter o equipamento em temperatura constante, SILMAN<sup>100</sup> o manteve em sala com temperatura controlada e NISHIO<sup>76</sup>, em banho termostático.

HAN<sup>40</sup> utilizou como vaso fermentador um misturador de cimento de 115 litros de capacidade, com velocidade de rotação de 1 rpm, mantidos em ambiente com temperatura controlada.

LINDENFELSER<sup>67</sup> utilizou um cilindro rotativo de 33cm de diâmetro, composto de quatro seções de 7,6 cm, espaçadas entre si, munidas de passagem para ar estéril e velocidades de rotação variando de 1 a 40 rpm. As unidades do fermentador podem ser prontamente desmontadas para limpeza e esterilização.

GRAJEK<sup>34</sup> utilizou uma unidade de fermentação composta de seis fermentadores, com 60 litros de volume cada. Os cilindros continham vasos internos, removíveis, com fundo falso, com camadas de até 40 cm.

O crescimento microbiano em cilindro rotativo mostrou-se rápido e uniforme. Dificuldades foram encontradas na mudança de escala, devido a destruição do microrganismo durante os primeiros estágios de crescimento causada pelo tombamento das partículas. Os problemas aumentaram com o aumento do tamanho do cilindro. Outros fatores como o controle da temperatura, agregação do meio e retardamento do crescimento, devido ao atrito entre as partículas, também ocasionam problemas.

#### b) Caixa ou cela

Caixa de madeira de 12x12x12 pol (4,72x4,72x4,72 cm), com camadas de até 10 pol (3,94 cm), provida de fundo falso,

entrada e saída de ar e infraestrutura para saturação do ar com umidade a temperatura desejada. Essa caixa pode ser também inclinada, em um ângulo de até 45°, de forma a eliminar o problema de empacotamento do substrato na cela, facilitando a alimentação e a retirada do material, que foram evidenciados na cela anterior, principalmente, nas de maior dimensão.

NARAHARA<sup>75</sup> colocou o fermentador dentro de outra caixa para manter a temperatura constante. DURAND<sup>26</sup> utilizou um reator de 2 m de comprimento, 0,8 m de largura e 2,3 m de altura, construído em aço inox. O fundo falso inclui duas telas de diferentes aberturas. A malha mais fina, inferior, serve para distribuir igualmente o ar através do fermentador, enquanto a segunda, mais grosseira, sustenta 1,0 m de camada de substrato.

O uso de fermentador tipo caixa, é associado com bom crescimento e melhor reprodutibilidade. As celas inclinadas foram utilizadas satisfatoriamente em bateria em uma planta semi-comercial, mas não satisfatória para uso industrial.

### c) Panela coberta

Construída em alumínio com dimensões de 7 pol (2,75 cm) de diâmetro e 4 1/2 pol (1,77 cm) de altura, tendo fundo perfurado, usualmente equipada para aeração sobre pressão e fácil reversão do fluxo de ar e controle de temperatura. O fermentador é mantido coberto por tecido de algodão para prevenir contaminação. A panela coberta oferece várias vantagens, tais como: necessidade de menos espaço, crescimento mais uniforme, alto e consistente rendimento e eliminação das necessidades de rotação. Contudo, esse tipo de fermentador não é conveniente para outras escalas que não seja a de laboratório.

Bandejas contendo 1 a 2 pol (2,54 a 5,08 cm) de camada de substrato são mantidas em uma sala ou câmara onde os parâmetros ótimos de crescimento são mantidos para obtenção de elevado rendimento. O fermentado é umidificado pela passagem de ar úmido. Bandeja, com carcaça de madeira e com fundo em tela metálica ou bandeja metálica com fundo perfurado são comumente empregadas. A malha (ou abertura) que segura o substrato, tem os fios metálicos pintados com verniz de baquelite para proteção contra corrosão. As aberturas permitem a aeração da superfície inferior do substrato nas bandejas. A sala ou câmara de fermentação pode ser similar às aquelas dos secadores por circulação forçada de ar. Estes fermentadores são usados com sucesso em escala de laboratório, planta piloto, planta semi-comercial, bem como em planta comercial.

As bandejas fermentadores são de operação simples (se comparada com celas com aeração forçada) e dão um produto final mais uniforme em natureza e com elevada atividade enzimática. Contudo, a necessidade de uma grande área é uma de suas desvantagens.

PAMMENT<sup>78</sup> utilizou bandejas em aço inox, de dimensões 40x32x8 cm, com tampa e fundo perfurado e camada de 1 cm. Ar úmido e estéril era introduzido através do fundo falso.

MARTINELLI & HESSELTINE<sup>69</sup> fizeram usos de bandejas de madeira e de aço inox (com ou sem fundo perfurado), cobertas com diversos tipos de materiais (folha de alumínio, tecido de algodão, folhas de plástico) para prevenir a perda de umidade e a contaminação durante o curso da fermentação.

SHIBASAKI<sup>98</sup> recomenda, ao se usar bandejas de madeira,

que essas sejam umedecidas antes de preenchê-las com o substrato, para evitar a perda da umidade junto a madeira e,consequen-  
temente, a inibição do fungo nessa região.

LAUKEVICS<sup>53</sup> utilizou bandejas com fundo perfurado, acon-  
dicionadas em câmara climatizada e equipadas com ventilador.

No fermentador tipo bandeja o acesso de oxigênio é faci-  
litado, frequentemente, pelo revolvimento periódico. Uma cons-  
tante mistura pode prejudicar a transferência de oxigênio, e  
além disso diminuir a porosidade (espaços vazios) do substrato  
e prejudicar o micélio do fungo. A mistura, por outro lado, a-  
juda na remoção do calor e distribuição de aditivos, tal como a  
água para controle de umidade ou soluções nutritivas.

#### e) Correias transportadoras

O método envolve o uso de uma série de correias trans-  
portadoras no decorrer da fermentação. A tecnologia desenvolvi-  
da envolve as seguintes etapas:

- elevação da temperatura do substrato ao redor de 85°C  
mantendo-o nessa temperatura por 15 minutos, na pri-  
meira correia transportadora;
- resfriamento dos sólidos à temperatura desejada pela  
passagem de ar frio e estéril, na segunda correia  
transportadora;
- inoculação do material resfriado pela pulverização de  
esporos ou por alimentação mecânica contínua de inócu-  
lo seco;
- distribuição dos sólidos inoculados em bandejas metá-  
licas com fundo perfurado através de um espalhador me-  
cânico;

- disposição das bandejas em vagonetes e seguindo para o túnel de crescimento;
- umidificação do túnel de crescimento pela circulação de ar úmido à temperatura desejada;
- transferência do vagonete para túnel de secagem, de dois estágios, trabalhando em contra-corrente e corrente paralela de ar de secagem;
- esterilização das bandejas vazias pela passagem através de um forno a 155°C/3min antes de reutilizá-las.

O sistema tem as óbvias vantagens de alto grau de mecanização, se comparada com outros métodos, mas as desvantagens incluem a incompleta esterilização do substrato a 85°C/15 min e a dificuldade no controle da temperatura.

#### f) Coluna

Esse tipo de fermentador consiste de uma coluna de vidro ou plástico, munidas de entrada e saída de ar. Para controle da temperatura, a coluna é mantida em ambiente com temperatura controlada ou pela passagem de água através da camisa da coluna. É utilizada para trabalhos em pequena escala, e pode ocorrer sérios problemas em mudança de escala.

CARRIZALEZ et alii<sup>22</sup> manteve seu fermentador em banho termostático para controle da temperatura.

RAIMBAULT<sup>80</sup> construiu uma unidade incubadora composta por 24 colunas, mantidas em um banho de água com temperatura regulada.

São torres com 2 a 6 divisões, onde o material é transferido de uma divisão à seguinte, do topo ao fundo, fermentado por um período de tempo específico em cada divisão (comumente um dia). O material descarregado é amontoado por 2 a 4 semanas. A aeração é realizada pela transferência de uma divisão a outra. O processo é mais utilizado para a elaboração de compostagem.

Seja qual for o tipo de fermentador, o importante é que os aspectos de engenharia sejam levados em consideração. Pois, destes, dependerão o desenho do fermentador, monitoramento e controle de parâmetros e a automação da fermentação.

As condições sócio-econômicas de cada país definirão quais os aspectos de engenharia que lhes serão mais convenientes.

Dentre os fermentadores estudados, o que apresenta uma maior simplicidade quanto aos aspectos de engenharia e requer um baixo investimento em capital para montagem de uma planta, é o tipo bandeja, em sistema estático. Plantas em escala semi-comercial, já em operação em vários países que utilizam este tipo de reator, têm conduzido a obtenção de um produto final rico em proteína, como consequência de um crescimento uniforme e consistente de microrganismos.

Visto que, os países do terceiro mundo são os que apresentam uma evidente carência em proteínas, torna-se necessário então a obtenção de um produto rico em proteínas a um baixo custo.

Aliando-se a abundância da mandioca como matéria-prima com a simplicidade deste tipo de fermentador, pode-se obter um

produto de elevado teor protéico, acessível a este contingente de países do terceiro mundo.

## 2.2.4 Características de Processo

### 2.2.4.1 Substrato

A utilização das matérias-primas como substrato de processos fermentativos em meio sólido, de acordo com a sua evolução, pode ser dividido em dois períodos: pré-Pasteur e pós-Pasteur.

No período pré-Pasteur, os substratos restringiam-se ao uso do trigo, da soja, do leite, do peixe, do chá, enfim, àqueles envolvidos nos tradicionais processos orientais de fermentação.

A utilização de maior diversificação de substratos iniciou-se por volta de 1960, ou seja, no Período pós-Pasteur. Entre 1860 e 1900 os efluentes domésticos passaram a ser utilizados em uma variante do processo conhecido como "gerador de vinagre" (Mc LOUGHLIN<sup>70</sup>). A produção de ácidos orgânicos trouxe o uso da polpa de beterraba ou de cana de açúcar para o rol dos substratos sólidos.

Mas, a diversificação do uso, para a produção de alimentos surgiu na década de 60. Cereais, grãos, amidos de fontes diversas, são alguns dos principais substratos sólidos que são preparados e usados para fermentações no estado sólido. A fermentação do cacau, usada em vários países, incluso o Brasil, é um exemplo de alimento fermentado por FES.

A fermentação da mandioca, em meio sólido, é processo comum de obtenção de alimentos fermentados em vários países da África Oriental<sup>3,10</sup>. AKINRELE<sup>4</sup>, em 1964, iniciou os estudos ci

entíficos da FES da mandioca, determinando as condições de processo envolvidas na obtenção do "gari", um dos alimentos fermentados.

Outros exemplos de substratos, mais recentemente utilizados em FES, para obtenção de alimentos ricos em proteína, visando o uso na alimentação humana e animal, são obtidos de resíduos industriais e da agricultura, tais como: palha de centeio<sup>40</sup>, hidrolisados de celulose e serragem<sup>78</sup>, resíduo de processamento de frutas<sup>76</sup>, palha de trigo<sup>42,64,68</sup>.

Os substratos sólidos em FES são poliméricos em natureza e se caracterizam por suas insolubilidades em água, uma inabilidade à penetração e ao ataque do microrganismo nos estágios iniciais de crescimento. Assim, em FES, se faz necessário o pré-tratamento do substrato, de maneira a atenuar a modificação microbiana, pela formação de pequenas moléculas permeáveis, para aumentar os sítios de ataque microbiano, para dar estrutura fibrosa ou trazer gelatinização e inchamento<sup>68</sup>. O pré-tratamento pode ser físico ou químico, ameno ou drástico, e inclui, maceração, cozimento, moagem, perolamento, quebra, picagem, fragmentação, trituração, peneiramento e tratamento com alcali ou cloreto de sódio<sup>1,3,26,46,60,63,68,102</sup>.

Peritos em Tecnologia da Fermentação, Microbiologia e Nutrição, oriundos de diversas partes do mundo, reuniram-se para formar um Comitê das Nações Unidas, e o denominaram de Protein Advisory Group (PAG). Em encontro realizado em Moscou, em 1971, o Comitê concluiu, baseado em extensivas evidências, que três substratos são, pelo menos nos próximos anos, seguros para produção de alimento humano: etanol, metanol e carboidratos<sup>102</sup>. Baseado nesta conclusão, SPICER<sup>102</sup> direcionou seus estu-

dos para o uso de carboidratos como substratos, selecionando as três principais fontes para suas investigações: polímeros da glucose (ocorrendo como amido em plantas como a mandioca, batata, grãos, etc), sacarose (melaços) e lactose (soro de leite).

#### 2.2.4.2 Microrganismos

Durante séculos, os microrganismos têm sido utilizados pelo homem nos processos fermentativos de alimentos. Contudo, somente nos últimos 50 anos, em virtude das dificuldades de se produzir alimentos em quantidade suficiente para atender às necessidades básicas da população, é que os microrganismos começaram a ser realmente investigados como fontes de proteínas<sup>36, 49</sup>.

Os estudos desenvolvidos em FES para produção de biomassa protéica fazem uso dos fungos e de algumas leveduras e bactérias. Esse fato é uma decorrência do baixo teor de umidade disponível no substrato sólido<sup>20,47</sup>.

A classe de microrganismo mais comumente utilizada é a dos fungos. Com a utilização de substrato amiláceo, sem hidrólise prévia, os estudos se concentraram nos fungos filamentosos, termotolerantes e amilolíticos.

Segundo SPICER<sup>102</sup>, os fungos filamentosos têm as seguintes vantagens sobre os demais microrganismos:

- a) cresce na natureza em substratos sólidos;
- b) possui melhor perfil de proteínas (Tabelas 10 e 11);
- c) a obtenção do produto final é mais fácil e menos custosa do que para os demais microrganismos;
- d) na fase de crescimento constante, a estrutura filamentosa permite a elaboração de alimentos texturiza-

dos sem necessidade de extração, como no caso de outras formas de proteínas;

e) os fungos, como parte integrante da dieta alimentar diária, são aceitos em várias partes do mundo;

f) O NPU\* da proteína da levedura está em torno de 35-40%; enquanto que, o NPU das proteínas fúngicas atinge 70-75%, que suplementada com 0,2% de metionina, alcança o equivalente a 100%, padrão de qualidade da proteína do ovo.

TABELA 10. Composição Média de Fungos Filamentosos.

COMPONENTES	g/100g de material celular seco
Nitrogênio	5 a 8
Gordura	2 a 8
Cinza	9 a 14

FONTE: KHILBERG<sup>58</sup>.

---

\*NPU - net protein utilisation (coeficiente de utilização proteica).

TABELA 11. Composição em Aminoácidos de Diferentes Fontes de Proteínas (g/100g de proteínas)

AMINOÁCIDOS	(1) S. cerevisiae	(2) A.oryzae	(1) trigo integral	(1) ovo inteiro	(2) FAO
Lisina	7,7	7,1	2,8	6,5	4,2
Treonina	4,8	4,3	2,9	5,1	2,8
Metionina	1,7	1,3	1,5	3,2	2,2
Cistina	-	0,9	2,5	2,4	2,0
Triptofano	1,0	1,0	1,1	1,6	1,4
Isoleucina	4,6	4,5	3,3	6,7	4,2
Leucina	7,0	7,2	6,7	8,9	4,8
Valina	5,3	5,2	4,4	7,3	4,2
Fenilalanina	4,1	4,2	4,5	5,8	2,8

(1) 58  
FONTES: KIHLBERG ,  
(2) SPICER 102 ,

Os gêneros de microrganismos mais utilizados para a produção de biomassa protéica<sup>19,58</sup> são:

- bactérias: Bacillus, Hydrogenomonas, Methanomonas, Methylomonas, Pseudomonas;
- leveduras: Candida, Rhodoturula, Saccharomyces, Endomycopsis;
- fungos: Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Neurospora, Rhizopus e Mucor.

A produção de esporos para inoculação da FES, segundo DURAND<sup>26</sup>, é muito atrativa por várias razões:

- oferece padronização do inóculo; com esporos, o nível de inóculo pode ser controlado;
- esporos podem ser preservados por vários meses.

Os processos para preparação do inóculo de forma a permitir a inoculação direta podem ser realizados em meio líquido<sup>10,80</sup> e em meio sólido, como no tradicional processo do "tane-koji"<sup>\*1,98,99</sup>.

A sequência de crescimento microbiano em FES, em condições ótimas de processo, envolve as seguintes fases<sup>61,110</sup>:

- a) fase lag ou de indução;
- b) fase de crescimento exponencial ou fase log;
- c) fase constante ou estacionária;
- d) fase de declínio.

Relacionando a sequência do crescimento microbiano com o tempo de fermentação, sob as mesmas condições, tem-se a fase lag com duração de 16-18h, onde a germinação dos esporos

---

\* tane-koji - iniciador ou starter

ocorre nas 3-4h iniciais; um gradual aumento de temperatura depois de 5-6h devido ao início do metabolismo; um gradual aumento da taxa nas próximas 15-20h; seguida pela fase exponencial com duração de 20-22h, prosseguindo com as fases estacionárias e de declínio<sup>12,68</sup>.

As fases de crescimento podem ser também relacionadas com a visualização do micélio a olho nu. Nenhum crescimento é visualizado até 16h, algum crescimento é notado após 16h. Depois de 20h o substrato fica quase totalmente coberto pelo micélio. A formação de esporos não é perceptível no produto fermentado por 40h e alguma esporulação é evidenciada depois de 43h<sup>12,121</sup>.

#### 2.2.4.3 Condições de cultivo

Devido às condições altamente seletivas de crescimento dos fungos filamentosos, termotolerantes e amilolíticos, o sistema de fermentação não asséptica pode ser usado<sup>39,96</sup>. A propriedade desses fungos trazem grandes vantagens para a produção de proteína de biomassa microbiana, a partir de substratos amiláceos em processos descontínuos de FES, sem o uso de condições assépticas<sup>103</sup>.

A FES raramente requer extensiva preparação do meio. Usualmente, o substrato contém todos os nutrientes necessários para a fermentação. Em adição, algumas vezes, certos compostos - comumente amônia ou nitratos - são acrescentados<sup>21</sup>.

O teor de umidade do substrato é um dos fatores chave da FES, e é governado pela natureza do substrato, o tipo de produto final e pelas necessidades do microrganismo. A umidade dos substratos em FES varia de 30 até quase 80%. Uma umidade alta resulta em um decréscimo da porosidade, baixa difusão de oxigênio

nio, um risco de contaminação por bactérias e aumento de formação de micélio aéreo. Uma baixa umidade leva a um crescimento sub-ótimo, um baixo grau de intumescimento e alta tensão de água<sup>8,68,75</sup>.

A capacidade de retenção de água pelos substratos amiláceos é pobre e geralmente não excede a 1,0 - 1,2g água/g de sólidos (50 a 55% de umidade)<sup>77</sup>. Para evitar a perda de umidade do substrato durante a fermentação, o fermentador deve ser mantido em atmosfera umidificada entre 90-97% de umidade relativa<sup>68</sup>.

A porosidade do meio de cultura é influenciada pela homogeneidade do substrato. Se a homogeneidade não é alcançada, haverá aglomeração do meio em grumos, diminuindo, consequentemente, a porosidade do meio. O tamanho da partícula e a porosidade do meio governam a área de superfície acessível ao microrganismo e a proximidade do organismo. O grão inteiro de arroz é o tipo ideal de partícula<sup>26,46,60</sup>.

A temperatura de incubação em FES varia de 20 a 35°C, dependendo da utilização do fungo e da natureza do substrato<sup>68</sup>. As temperaturas baixas, em torno de 20°C, favorecem a produção de protease<sup>120</sup>. O crescimento microbiano é um processo exotérmico, e o calor gerado deve ser dissipado, visto que, altas temperaturas não são favoráveis ao crescimento do microrganismo<sup>109</sup>. O calor metabólico é diretamente relacionado com as atividades metabólicas do microorganismo e a espessura da camada de substrato; um gradiente de 3°C/cm tem sido observado em um fermentador com 6,5 cm de espessura de camada<sup>68</sup>.

O pH dos sólidos em FES se situa na faixa de 3,5-5,0 pelo ajustamento durante a preparação do meio. Quando a adição

de sais nutritivos se faz presente, há necessidade de acidificação do meio para correção do pH, principalmente quando esses sais são básicos. O monitoramento e controle do pH durante a FES não é usualmente realizado<sup>19,68,80</sup>.

Os sistemas de FES são altamente aeróbicos em natureza. Dessa maneira, a fração de vazios, o grau de mistura e aeração são fatores importantes. A fração de vazios é a fração de volume que é ocupada pelo ar dentro da massa do substrato e é função da umidade e da natureza do substrato. Para uma dada fração de vazio, a transferência de oxigênio intrapartícula é obtida pela mistura e aeração. Em FES, essas operações ocorrem simultaneamente e em alguns processos são termos sinônimos (ex bandeja). Se a fração de vazios é suficientemente alta, contínuas mistura e aeração não são necessárias, pois os vazios contêm oxigênio suficiente para suportar o crescimento celular. Periódicas mistura e aeração são necessárias para expelir o dióxido de carbono e realimentar os vazios com ar fresco<sup>21,47</sup>. Pequena espessura de camada do substrato no fermentador, uso de bandejas perfuradas ou vaso fermentador com fundo falso em tela, também facilitam a transferência de oxigênio. A mistura (ou revolvimento) traz outros efeitos benéficos a massa fermentante, tais como: prevenção de formação de agregados, exposição de partículas individuais a atmosfera de fermentação, efetiva distribuição do inóculo e promoção de crescimento em partículas individuais do substrato<sup>46,68</sup>.

O consumo de oxigênio e a formação do dióxido de carbono são muito mais altos em FES. Em vasos fermentadores com sistema de aeração fechado e estático, o oxigênio deve ser admitido conforme consumido, e de acordo com sua formação, o dióxido de

carbono deve ser eliminado<sup>12,32</sup>.

Ressaltada foi a importância da mandioca como matéria-prima para a obtenção de um produto rico em proteína, utilizando um vaso fermentador simples quanto aos seus aspectos de engenharia e econômico, como a bandeja.

Necessário torna-se agora, adaptar as condições de cultura a estes, dentro das efetivas disponibilidades de cada país.

### 2.3 A MANDIOCA E A FES

A utilização da mandioca como substrato sólido para processo de fermentação iniciou-se nos países da África Oriental. O "Kokonte" (Ghana), o "Lafun" (Nigéria), o "Tape Ketella" (Indonésia) e o "Gari" (Nigéria) são exemplos de alimentos fermentados tendo como base a mandioca. O "Gari", é componente da dieta alimentar diária de vários países da costa oriental da África<sup>3,42</sup>.

A fermentação da mandioca para produção do "Gari" segundo AKINRELE<sup>4</sup>, tem sido muito estudada, pois ela promove a redução da toxidez da mandioca (pela liberação do ácido cianídrico a pH baixos, combinado com a atividade fúngica), e também pelo desenvolvimento de sabor característico. O trabalho desenvolvido pelo autor, em 1964, procura estabelecer as condições ótimas nas quais a mandioca poderia ser utilizada em uma indústria moderna, baseada na FES. A fermentação ocorre melhor à temperatura próxima de 35°C, e com polpa inoculada com suco fermentado de mandioca. Durante a fermentação, a desinfecção do meio ocorre gradualmente, pela formação dos ácidos fórmico e láctico. A mistura da massa e a exposição a luz parecem acelerar a fermentação.

tação, obtendo-se satisfatório produto em aproximadamente 15h. Essas foram as condições identificadas pelo autor no processo de obtenção do "Gari".

O primeiro trabalho publicado sobre experimentos com mandioca visando o seu emprego como uma possível fonte de proteína de baixo custo, para os países sub-desenvolvidos, deve-se a GRAY & ABOU-EL-SEOUD<sup>38</sup>, em 1966.

Os autores reportaram-se ao fato de que a deficiência protéica evidencia-se nas áreas de cultivo da mandioca e à sua grande produtividade, baseando seus experimentos nestes fatores. Os resultados obtidos no trabalho, mostraram ser a mandioca uma fonte de carboidrato de considerável potencial em um processo envolvendo a síntese de proteína, pelo fungo, onde se evidencia ser mais econômico o uso da raiz fresca em relação ao uso da farinha, e também pela apresentação de melhores rendimentos em proteína.

Em 1969, BROOK et alii<sup>19</sup>, utilizando a mandioca como substrato para a síntese de proteína, compararam os dois processos de fermentação: FES e FML. A mandioca enriquecida por uma derivação do processo de obtenção do "Tempeh"<sup>\*</sup>, da tradicional FES, é indicada para direta incorporação na alimentação, e a implantação do processo é recomendada como indústria artesanal, onde os equipamentos, trabalho e capital necessários estão na mais simples forma.

A revista NEW SCIENTISTS<sup>28</sup> publicou, em 1970, um artigo sobre o enriquecimento protéico da mandioca por FES. Análises dos "queijos" de mandioca obtidos pelo Tropical Products Institute, de Londres, indicaram que as concentrações de proteína no "queijo" final podem alcançar 3,25% em comparação com 0,5% da

---

<sup>\*</sup>Tempeh - queijo vegetal obtido a partir da fermentação da soja.

farinha inicial.

A composição de lipídios foi estudada na mandioca e no produto fermentado por HARRIS<sup>41</sup>, em 1970, concluindo o autor que o conteúdo total de lipídios cai com a fermentação, enquanto que o glicosídeo esterol presente na matéria original não é metabolizado e torna-se o maior componente da composição dos lipídios no produto final.

As vantagens do enriquecimento da mandioca com biomassa protéica foram enfaticamente enumeradas por STRASSER<sup>104</sup>, em 1970. O autor salientou que apesar da longa lista de vantagens, poucos estudos têm sido desenvolvidos no campo do enriquecimento protéico da mandioca, propondo a utilização desse processo de elevação protéica na elaboração da farinha de mandioca.

Uma descrição sucinta do processo de obtenção do "Gari" foi dada por AYRES<sup>9</sup>, em 1972. A importância de pesquisas no método de fermentação controlada e o uso de cultura pura para produção do "Gari" e outros produtos similares foram enfatizadas.

TREVELYAN<sup>109</sup>, em 1974, apresentou uma crítica sobre as recomendações de que a mandioca, mediante tecnologia apropriada, pode-se transformar em um alimento nutritivo e rico em proteína, de textura e sabor atrativos. Fatores esses que se lograriam mediante a FES com fungos. Dois pontos foram investigados experimentalmente: que nível de proteína podia ser estabelecido mediante a FES e que a eficiência da conversão do carboidrato em proteína microbiana. Verificou que fermentando-se farinha de mandioca com um teor original de 0,6% de proteína, obtinha-se um produto com, 4,3% de proteína; e, que a conversão do carboidrato à proteína microbiana foi tão eficiente como em FML, porém só demonstrando a metade da eficiência quando

realizada em cultivo contínuo.

Um processo simples, não asséptico, de baixo custo para conversão do amido da mandioca em proteína microbiana, para uso na alimentação animal, foi estudado por READE & GREGORY<sup>39</sup>, em 1975. Os resultados desse estudo sugeriam que os fungos filamentosos, termotolerantes e amilolíticos, os quais são capazes de crescer a altas temperaturas e a baixo pH, podem ser utilizados, com sucesso, na produção de biomassa protéica.

O uso de tais microrganismos resulta em economia, pois a hidrólise do amido de mandioca antes da fermentação não se faz necessária. A assepsia durante a fermentação também é desnecessária.

Procedimento para direto enriquecimento protéico da mandioca pela FES foi descrito por SENEZ<sup>96</sup>, em 1979. O fungo selecionado foi o **Aspergillus niger** devido à sua alta atividade amilolítica e sua composição em aminoácidos. Os dados obtidos mostraram que em 30h de incubação, o produto fermentado apresenta em média 20% de proteína e 25% de açúcar redutor residual. Comparando, sobre o aspecto agro-econômico, a produtividade de proteína por hectare, o autor concluiu, baseado em resultados experimentais, que a mandioca enriquecida está na relação de quatro para um com a soja.

RAIMBAULT & ALAZARD<sup>80</sup>, em 1980, estudaram o crescimento microbiano em FES, utilizando a farinha de mandioca cozida como substrato. A influência dos fatores ambientais e as condições ótimas de processo foram determinadas. A temperatura de incubação e a umidade do material influíram na produção de proteína, a quantidade de esporos e de nutrientes também influíram. Durante o processo fermentativo, evidenciou-se variações

de pH e na umidade do material. A taxa de crescimento e o rendimento mostraram-se quase similar àqueles descritos para FML em condições ótimas, de acordo com a avaliação dos autores.

A determinação do crescimento específico de fungo em FES foi realizada, em 1982, por CARRIZALEZ et alii<sup>22</sup>, através do cultivo de *Aspergillus niger* em farinha de mandioca gelatinizada e peletizada. Os resultados obtidos no trabalho demonstraram a influência da adição de sais de amônia como nutrientes no crescimento microbiano, e que a altas concentrações desses sais o sistema exibe inibição do substrato.

VANNESTE<sup>112</sup>, em 1984, comparou quatro métodos de fermentação da mandioca, utilizando fungos filamentosos, quanto à sua eficácia de enriquecer a mandioca em proteínas e à possibilidade de sua utilização a nível de aldeia. Foram comparados os dois processos fermentativos, FML e FES, sendo que nesse último foram utilizados três métodos diferentes: em barris, em betoneira e estático em bandejas. Dos métodos estudados, a fermentação estática em bandejas apresentou um melhor rendimento em proteína.

Fungos isolados de tradicionais alimentos fermentados foram selecionados por RAIMBAULT et alii<sup>81</sup>, em 1985, pela sua habilidade em converter amido em proteína, em cultura líquida, tendo como fonte de amido a farinha de mandioca. Dos 32 fungos inicialmente selecionados, somente 24 tiveram observável crescimento em cultivo líquido. Os fungos selecionados dessa maneira foram testados no enriquecimento protéico da mandioca pela FES. Tipicamente, mais de 18 cepas podem crescer bem em mandioca cozida. A composição da mandioca enriquecida variou de 10,9 a 16,5% em proteína e de 28,2 a 45,2% em açúcares residuais.

Onze dessas cepas aumentaram o conteúdo de proteína acima de 14%. Os resultados indicaram que o processo de enriquecimento da mandioca através da FES pode ser aplicado, com sucesso, para várias cepas de fungos. Essencialmente cepas de **Aspergillus sp** dão os melhores resultados, nas condições padrão de estudo, concluíam os autores.

Estudos envolvendo a utilização da mandioca como substrato solúvel têm sido desenvolvidos paralelamente aos estudos como substrato sólido, visando a utilização dos resíduos de f<sup>e</sup>cularias de mandioca na produção de concentrados protéicos microbianos: SALES<sup>89</sup>, 1972; BORZANI<sup>16</sup>, 1975; VENOSA<sup>115</sup>, 1975; GREGORY et alii<sup>39</sup>, 1976; SALES & MENEZES<sup>90</sup>, 1976; MEIERING & GREGORY<sup>71</sup>, 1978; AZOULAY et alii<sup>10</sup>, 1980; REVUZ & VOISIN<sup>84</sup>, 1980; FERNANDES & NICOLO<sup>29</sup>, 1981; MUINDI & HANSEN<sup>74</sup>, 1981; SANTOS & GOMEZ<sup>91,92</sup>, 1983; STEVENS & GREGORY<sup>103</sup>, 1987.

## 2.4 ALIMENTOS FERMENTADOS

Um alimento fermentado, de acordo com a definição de VAN VEEN<sup>113</sup>, é aquele alimento que teve alterado quimicamente um ou mais de seus componentes, pela ação de microrganismo. Alimentos fermentados contêm significativa quantidade de massa celular de microrganismos, tão diversos como bactérias, leveduras e fungos.

Assim, é importante reconhecer que algumas formas de proteína microbiana têm sido utilizadas como alimento humano por milênios.

No passado, os microbiologistas devotavam a maior parte de seus esforços na consideração dos danos que os microrganismos poderiam causar ao homem. Entretanto, eles deveriam aproveitar esses organismos de maneira positiva, investigando como eles poderiam ser utilizados para servir aos interesses do homem. Essa era a idéia que GRAY<sup>36</sup>, em 1962, defendia. A deficiência protéica, o aumento da população mundial e o decréscimo das áreas agriculturáveis, eram os pontos bases para defender o aproveitamento racional dos microrganismos, como futura fonte de proteína.

Uma listagem dos alimentos fermentados, com cerca de 180 denominações, foi divulgada por HESSELTINE<sup>44</sup>, em 1965. Nessa publicação, o autor descreveu as fermentações de alimentos, realçando a melhora do sabor, textura e digestibilidade e salientando que a fermentação é uma maneira de preservar os alimentos por vários meses.

Em 1966, GRAY<sup>37</sup>, voltou a defender seu ponto de vista, dessa vez, recomendando o uso de proteína microbiana diretamen-

te na alimentação humana, principalmente, nos países subdesenvolvidos, onde a deficiência protéica era evidente. A Serra Leoa foi citada como exemplo desse quadro. Uma das possíveis matérias-primas para substrato da fermentação foi apontada como sendo a farinha de mandioca, principal alimento do país.

BRESSANI<sup>18</sup> sugeriu uma série de critérios que devem ser seguidos para o desenvolvimento e introdução de novos alimentos ricos em proteínas. Primeiramente, que os materiais básicos em pregados devem:

- ser disponíveis ou produzidos no local;
- ser produtos que ainda não estejam satisfazendo o seu potencial máximo como alimento humano;
- ter as especificações exatas nas qualidades e condições de processamento.

Finalmente, que os alimentos envolvidos e processados devem:

- estar dentro dos recursos econômicos da população que se pretende servir;
- ser facilmente transportados e ter vida longa de armazenamento nas condições ambientes normais;
- ser isentos de materiais tóxicos ou nocivos;
- possuir proteínas de qualidade nutritiva relativamente certa;
- possuir sabor e aroma agradáveis, assim como outras características físicas que os tornem aceitáveis e de fácil preparo.

Os trabalhos que evidenciam a importância das fontes não convencionais de proteína se sucederam incluindo sempre e dando

importância cada vez maior ao estudo dos alimentos fermentados enriquecidos em proteínas e à produção de biomassa protéica: AU & FIELDS<sup>7</sup>, BEUCHAT<sup>15</sup>, DABBAH<sup>25</sup>, HESSELTINE<sup>49,50</sup>, KHILBERG<sup>58</sup>, SPICER<sup>102</sup>, STRASSER<sup>104</sup>, TANNENBAUM<sup>105</sup> e VAN VEEN<sup>114</sup>.

Infelizmente, porém, ainda permanece um obstáculo a ser superado, a barreira sociológica. Apesar dos alimentos orientais fermentados terem alcançado grande popularidade, atualmente, no mundo Ocidental, a aceitação do microrganismo como parte integrante do alimento, ou mesmo como alimento, não foi alcançada.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Matéria-Prima

Os estudos foram conduzidos usando tubérculos de mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, como substrato sólido da fermentação.

A mandioca, proveniente das zonas agrícolas próximas à cidade de Curitiba e colhida nos anos de 1988/1989, foi adquirida junto ao comércio local, na forma de raízes frescas.

##### 3.1.2 Microrganismos

A escolha das cepas de fungos foi realizada com base na sua capacidade de utilização da mandioca, como única fonte de carbono e pelo seu elevado conteúdo em proteína.

Desse modo, foram empregadas as seguintes cepas:

**Aspergillus oryzae** 1) cepa nº ETF-20, do Acervo do Laboratório de Microbiologia Industrial da Universidade Federal do Paraná.

2) cepa nº 46244 (NRRL 3485), da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland - USA.

**Aspergillus niger** cepa nº 2003, da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

**Rhizopus stolonifer** cepa nº 0276 (NRRL 1478), da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello".

### 3.1.3 Nutrientes

Sais nutritivos foram utilizados como fontes de enxofre, fósforo, nitrogênio e potássio.

A adição dos nutrientes verificou-se pelo emprego dos seguintes sais:

- fosfato de amônio secundário:  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$
- fosfato de potássio primário:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- sulfato de amônio:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- uréia:  $\text{O}=\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{NH}_2 \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$

Esses sais foram adicionados em diferentes proporções, sobre o peso da mandioca cozida.

### 3.1.4 Fermentador

O tipo de fermentador selecionado para o desenvolvimento deste trabalho foi o tipo bandeja, em sistema estático.

Bandejas em alumínio, com dimensões de 22,4x17,0x3,0 cm e 60x40x10 cm foram empregadas. Também, utilizou-se uma bandeja de madeira com dimensões de 100x60x10 cm. Peneiras de uso corrente, nos diâmetros de 22 e 50 cm, malha 16, foram usadas.

Quando da necessidade de amostras menores, fez-se uso de placas de Petri e de copos de bquer como recipientes de fermentação, sendo que esses recipientes mostraram-se excelentes para ensaios de laboratório.

Nos ensaios de laboratório, o processo fermentativo foi desenvolvido em estufa de incubação FANEN.

Em escala piloto, o processo fermentativo foi desenvolvido em câmara de fermentação, construída nas dimensões de 3,00x1,70x2,20 m, com suas paredes e tetos totalmente azulejados, o que proporcionou facilidade de limpeza e assepsia. Os pontos de energia constituem-se em tomadas de 110 e 200 V.

O sistema de iluminação, está composto de quatro lâmpadas, duas fluorescentes e duas ultravioletas, dispostas no centro do teto. As lâmpadas ultravioletas, GERMICIDAL GL-30, de 30 W de potência, servem ao intuito de se obter ambiente estéril antes do início da fermentação (Figura 3).



FIGURA 3. Câmara de incubação: lâmpadas ultravioletas.

Durante o curso da fermentação, os fermentadores foram cobertos por um tecido leve de algodão.

Para acompanhamento da temperatura e umidade relativa do ar, na câmara, fez-se uso de um higrômetro de cabelo PRAZISONS. A manutenção das condições ambientais foi realizada pela evaporação de água (para umidade relativa do ar), pelo auxílio de aquecedor ambiental elétrico BRITÂNIA (para temperatura) e ventilador BRITÂNIA (para troca da atmosfera gasosa).

Quando da mudança da atmosfera gasosa da câmara, pela movimentação do ar através de ventilador, a porta era mantida aberta. Nessa ocasião, os fermentadores eram cobertos com papel de embrulho e a luz ultravioleta mantida ligada.

### 3.2 MÉTODOS

#### 3.2.1 Preparo da Matéria-Prima

O preparo da mandioca, para posterior utilização no processo fermentativo, consistiu basicamente da sequência de operações mostrada no fluxograma da Figura 4.

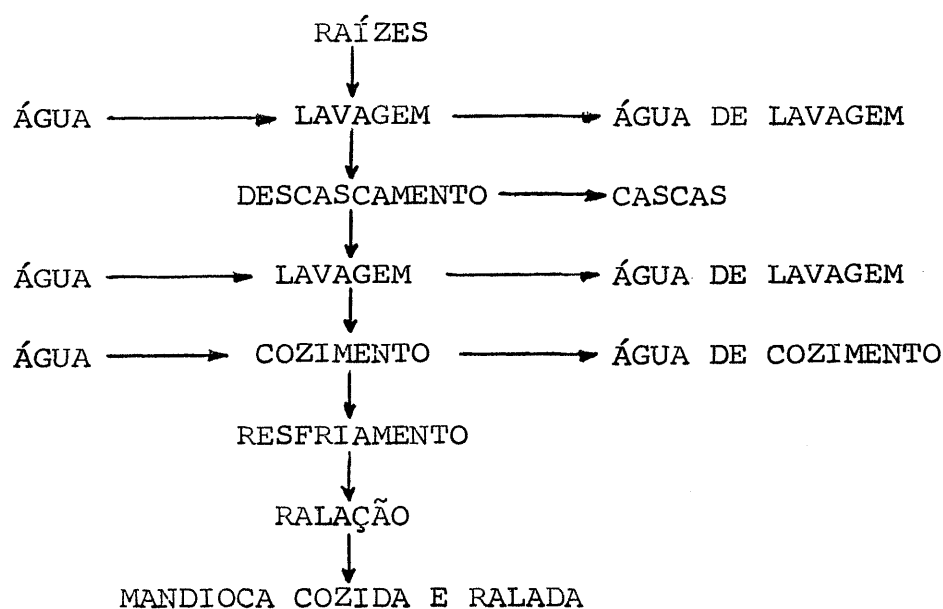


FIGURA 4. Fluxograma do preparo da mandioca para processo fermentativo

O método de preparo da mandioca é o mesmo utilizado domesticamente para o consumo da mandioca "in natura", incluindo-se as etapas de resfriamento e ralação. Uma descrição sucinta do método é dada a seguir:

- 1) As raízes foram lavadas, sob água corrente, para remoção da terra.
- 2) Após a lavagem, as raízes foram descascadas, utilizando-se facas em aço inox, removendo-se totalmente a casca.
- 3) Para remoção das sujeiras remanescentes e dos resíduos de casca, as raízes foram novamente lavadas. As raízes foram então cortadas em pedaços de aproximadamente 10 cm.
- 4) Os pedaços de raízes foram levadas a cozimento em panela de alumínio, com volume de água necessário para cobrir todas as raízes, sob pressão ambiente.
- 5) Terminado o cozimento, a água foi drenada, e a panela coberta com tecido de algodão e resfriada.
- 6) Após o resfriamento, a operação seguinte foi a ralação, levada a efeito através de um multiprocessador doméstico. As partículas produzidas foram semelhantes às aquelas do queijo parmesão, grosseiramente ralado. A mandioca, assim obtida, foi utilizada diretamente no processo fermentativo.

### 3.2.2 Obtenção dos Inóculos

Para a obtenção dos inóculos foi seguida a técnica descrita por SHIBASAKI & HESSELTINE<sup>97</sup>, já disciplinada por SOCCOL<sup>101</sup>.

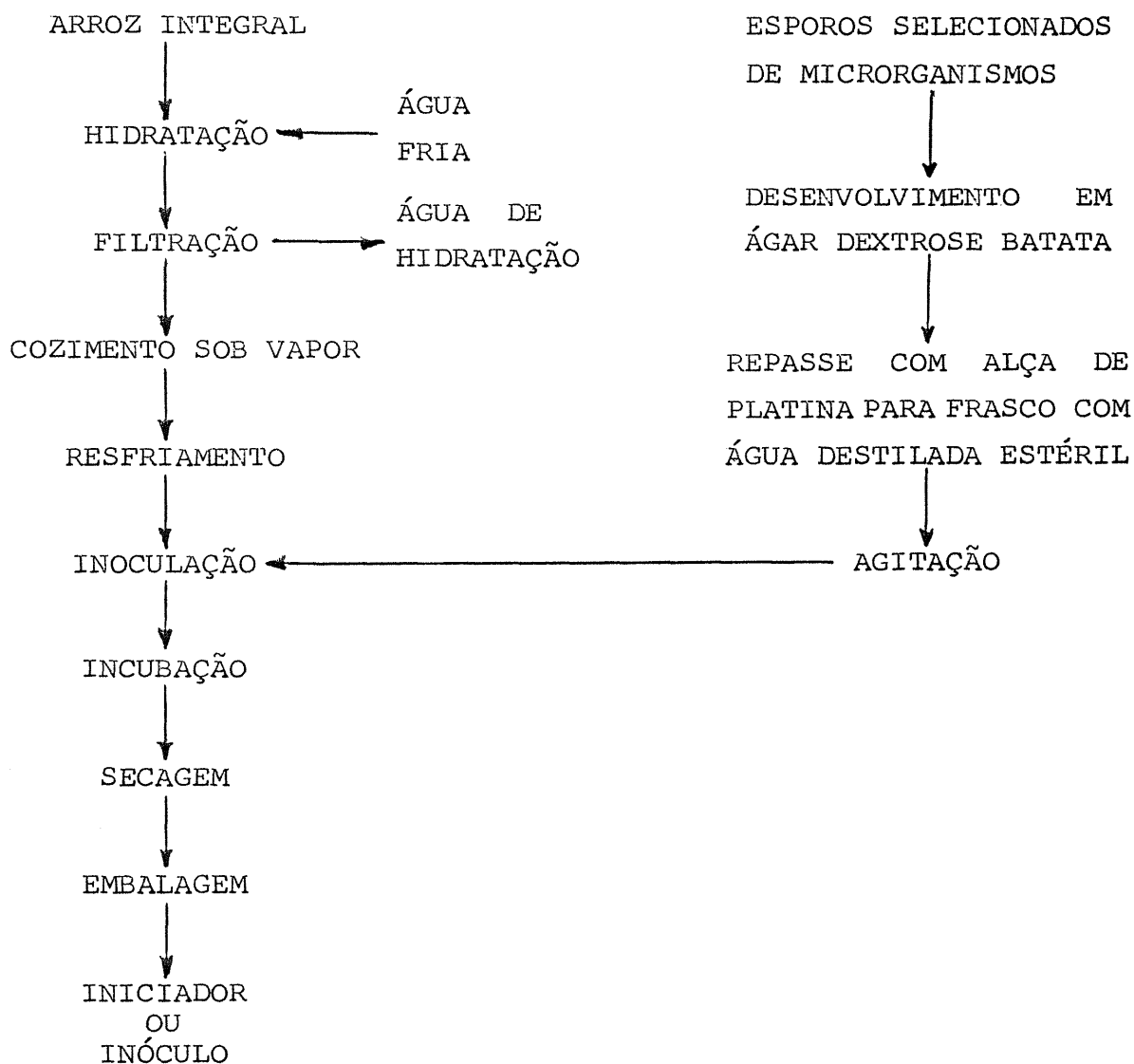


FIGURA 5. Fluxograma de obtenção do inóculo.

Todos os materiais envolvidos na preparação do inóculo foram previamente esterilizados em autoclave por 15min e 1 atm de pressão.

Em linhas gerais, obteve-se o inóculo como segue:

- 1) Esporos selecionados do microrganismo foram desenvolvidos em tubos inclinados contendo ágar dextrose batata, com pH 3,5. Os tubos foram incubados em estufa a 28°C por 5 dias. Os esporos, assim obtidos, foram transferidos, com o auxílio de alça de platina, para frasco contendo água estéril.
- 2) Arroz integral, bem lavado em água corrente, foi hidratado por cerca de 16h, à temperatura ambiente, em volume de água 5 vezes maior que o seu próprio. A hidratação foi necessária para fornecer ao arroz uma umidade de 35%.
- 3) O arroz, após eliminação da água de hidratação, foi levado a cozimento sob vapor, a 96°C de temperatura e a pressão ambiente, contando-se 130min após o início da operação.
- 4) Após cozimento, os grãos de arroz foram recebidos em bandeja de alumínio e dispostos em camada de até 2 cm. A bandeja foi então coberta com tecido de algodão.
- 5) Os grãos de arroz, assim preparados, foram deixados até que a temperatura caísse próximo a 30°C, ponto em que teriam perdido o excesso de umidade, prejudicial à fermentação.
- 6) Os grãos de arroz resfriados foram então inoculados com água contendo esporos (do item 1). A distribuição efetiva dos esporos foi obtida pelo revolvimen-

to uniforme do material.

- 7) O material inoculado foi imediatamente conduzido à incubação a 28°C e 92% de umidade relativa, por 5 dias. Durante a incubação o material foi revolvido 2 vezes ao dia.
- 8) Findo esse período, onde há o desenvolvimento e esporulação do microrganismo, o produto foi levado à secagem em estufa a 50°C por 72h.
- 9) O produto seco, acondicionado em embalagens de vidro, constitui-se no inóculo ou iniciador.

Os microrganismos selecionados para a elaboração deste trabalho tiveram sua preparação conforme a metodologia descrita.

### 3.2.3 Obtenção da Farinha de Mandioca Enriquecida

Para a obtenção da farinha de mandioca enriquecida foi seguido o método descrito para a obtenção do iniciador, porém, com algumas modificações. Substitui-se o preparo do arroz pelo da mandioca, e a água estéril com esporos fúngicos pelo inóculo. Acrescentou-se, ainda, as etapas de adição de nutrientes e esterilização. O fluxograma da Figura 6 mostra o método de obtenção da farinha de mandioca enriquecida.



FIGURA 6. Fluxograma de Obtenção da Farinha de Mandioca Enriquecida.

As primeiras etapas do processo constam do preparo da matéria-prima (item 3.2.1). Com as modificações efetuadas, o método apresentou a seguinte linha de preparação:

- 1) Preparo da matéria-prima, com a consequente obtenção da mandioca cozida e ralada.
- 2) Sais nutritivos foram adicionados diretamente à mandioca cozida e ralada, e o material, bem misturado, para a distribuição uniforme desses sais.
- 3) O material foi então levado a desinfecção, pela exposição a luz ultravioleta, em um período de 15 min.
- 4) O material desinfetado constituiu-se no substrato, que recebeu o inóculo.
- 5) O substrato, após inoculação, foi coberto com tecido leve de algodão e deixado a fermentar.
- 6) A fermentação foi encerrada quando do desenvolvimento abundante de micélio, compactando a massa toda.
- 7) O produto fermentado foi então seco, em estufa a 60°C, até umidade próxima a 6%.
- 8) O produto seco foi moído, em moinho de discos, e embalado em saco de polietileno, constituindo-se na farinha de mandioca enriquecida.

### 3.2.4 Análises Físico-Químicas

#### 3.2.4.1 Coleta de Amostras para Análise

Amostras foram coletadas desde as primeiras etapas do processo.

Durante o tempo de fermentação, foram retiradas amostras, em intervalos registrados, para posterior avaliação de suas variações no decorrer do processo.

Tratando-se então de uma avaliação das variações ocorridas no decurso da fermentação, necessário evidenciou-se padronizar as amostras. Para as determinações analíticas, excetuando-se umidade e pH, as amostras recolhidas foram preliminarmente secas em estufa a 60°C por 48 horas, moídas, embaladas e catalogadas.

As amostras para determinação de umidade e pH, quando não analisadas imediatamente, eram embaladas, rotuladas e congeladas.

#### 3.2.4.2 Determinação da Umidade

A umidade foi determinada por dessecação em estufa a 105°C até peso constante<sup>6,31</sup>.

#### 3.2.4.3 Determinação Eletrométrica do pH

Dez gramas de amostras foram suspensas em 100 ml de água destilada, e deixadas em repouso por 30 minutos. O pH foi determinado no líquido sobrenadante, através de potenciômetro marca PROCYON<sup>31</sup>.

#### 3.2.4.4 Determinação das Proteínas

Sendo a avaliação das alterações sofridas no conteúdo de proteínas um dos principais objetivos a serem alcançados neste trabalho, necessário se fez a diferenciação entre os diferentes tipos de nitrogênio.

Para a determinação do nitrogênio total, utilizou-se o método de KJELDAHL, como descrito por FREITAS et alii <sup>31</sup>.

O nitrogênio inorgânico, ou seja, aquele proveniente do sulfato de amônia, foi determinado pelo método já citado, porém sem a prévia digestão<sup>22</sup>.

O nitrogênio orgânico foi obtido efetuando-se a diferença entre os valores do nitrogênio total e do inorgânico.

A multiplicação do nitrogênio orgânico ou protéico pelo fator 6,25 resultou no conteúdo de proteínas.

#### 3.2.4.5 Determinação do Amido

Essa determinação foi realizada através do emprego do licor de Fehling, conforme método descrito por FREITAS et alii <sup>31</sup>.

### 3.2.5 Análises Microbiológicas

#### 3.2.5.1 Contagem Total de Bactérias

Na farinha de mandioca enriquecida procedeu-se à avaliação da população de bactérias, segundo técnicas do Bacteriological Analytical Manual<sup>111</sup>.

### 3.2.5.2 Contagem de Bolores e Leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi efetuada nos inóculos e na farinha de mandioca enriquecida, pela contagem padrão em placas<sup>54,62,111</sup>.

### 3.2.5.3 Número mais Provável (N.M.P.) de Bactérias do Grupo Coliforme.

Foi utilizada a técnica descrita por GELLI<sup>33</sup> para as determinações do número mais provável de bactérias do Grupo Coliforme. Essa determinação foi realizada por tratar-se de um dos indicativos de contaminação, exigidos por lei, para alimentos, conforme publicação no Diário Oficial da União de 12 de Fevereiro de 1987, citado em MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E COMÉRCIO<sup>72</sup>.

### 3.2.6 Determinação da Aflatoxina

A farinha de mandioca enriquecida foi analisada, pelo método de cromatografia delgada, para verificação da aflatoxina.<sup>52</sup>

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

As determinações analíticas realizadas na mandioca cozida, obtida pelo processo artesanal mostrado na Figura 4 (item 3.2.1), são apresentadas no Quadro 1.

QUADRO 1. Composição Química da Mandioca Cozida.

COMPONENTES	MATERIAL ÚMIDO	MATERIAL SECO
	%	%
Umidade	60 - 70	- - -
Amido	21 - 33	70,00 - 82,50
Proteínas	0,36 - 1,16	1,20 - 2,90
Lipídios	0,16 - 0,25	0,53 - 0,62
Fibras	0,30 - 0,72	1,00 - 1,80
Cinzas	0,26 - 0,60	0,87 - 1,50

Na realização deste trabalho, o substrato apresentou umidades que variaram de 60 a 70%. Devido a esse fato, a composição química da mandioca foi determinada como o mostrado no Quadro 1.

Em todos os métodos de preparo da mandioca, descritos nas literaturas consultadas<sup>22,80,81,96,109</sup>, a umidade foi conseguida pela posterior adição de água a valores de 50 - 55%. O cozimento ou o tratamento térmico utilizado visava promover a esterilização, a gelatinização parcial do amido e tornar o ma-

terial suscetível ao ataque das enzimas fúngicas.

Em ensaios de laboratório, realizados anteriormente, verificou-se que o cozimento é uma das operações mais importantes do preparo da matéria-prima. Mandioca crua, com e sem secagem; mandioca cozida, em diferentes tempos, maiores e menores do que o selecionado, foram testadas em processo fermentativo para verificação de sua influência no desenvolvimento do microrganismo. Dos ensaios realizados, resultou ser a mandioca cozida em um tempo de 20 min a única que possibilitava o crescimento fúngico. As demais, em maior ou menor grau, mostraram-se negativas ao crescimento fúngico. Colocando-as em uma escala decrescente, quanto ao crescimento fúngico, obteve-se:

cozida: 20 min > cozida: 30 min > cozida: 10 min >  
> crua: com secagem > crua: sem secagem.

A mandioca selecionada foi cozida em panela de alumínio em um tempo médio de 20 min, contados a partir da ebulição da água de cocção. O final do cozimento foi dado quando as raízes se abriam em duas metades.

#### 4.2 INÓCULO

Os inóculos obtidos, conforme processo anteriormente descrito no item 3.2.2, após a etapa de secagem, apresentaram os números de esporos viáveis, pelo método dos esporos viáveis, e teores de umidades mostrados no Quadro 2.

QUADRO 2. Número de Esporos Viáveis dos Inóculos e Teores de Umidade.

Microrganismo	Inóculo Nº esporos/g	Umidade %
<i>Aspergillus oryzae</i> cepa ETF-20	$38 \times 10^7$	5,1
<i>Aspergillus oryzae</i> cepa 46244	$74 \times 10^7$	4,4
<i>Aspergillus niger</i> cepa 2003	$33 \times 10^8$	4,1
<i>Rhizopus stolonifer</i> cepa 0276	$13 \times 10^8$	4,2

Os esporos de *A. oryzae* cepa nº ETF-20, na forma de inóculo, foram obtidos há três anos e conservados em recipiente de vidro, na ausência de luz. A redução observada no número de esporos foi da ordem de 5%, baixando de  $40 \times 10^7$  para  $38 \times 10^7$  esporos/g de inóculo. SOCCOL<sup>101</sup> havia observado essa redução com o envelhecimento.

Os inóculos utilizados, nos diferentes experimentos de enriquecimento protéico da mandioca, se encontravam na forma de suspensão. Os inóculos eram mantidos refrigerados, a 4°C, com um período máximo de validade por 6 meses. Esses estudos indicaram ser a adição de  $2 \times 10^7$  esporos/g de substrato o nível ideal<sup>22,26,76,77,80,81,83</sup>.

Estudos foram conduzidos para verificação do nível ideal de inóculo. Os resultados obtidos mostraram ser elevada a adição de  $2 \times 10^7$  esporos/g substrato. Com esse valor, a contagem do número de unidades formadoras de colônia (esporos) resultava alta no produto final. Reduções sucessivas desse valor e contagens dos esporos remanescentes na farinha de mandioca per

mitiram a identificação de  $1 \times 10^6$  esporos/g substrato, para a inoculação.

Valores entre  $2 \times 10^7$  e  $1 \times 10^6$  conduziram a fermentações normais, sem a inibição do meio pelo excesso do inóculo e sem contaminação do substrato pelo baixo nível de esporos. Segundo BROOK et alii<sup>19</sup>, pequena quantidade de inóculo possibilita a contaminação do meio e grande quantidade de inóculo a inibição do substrato. RAIMBAULT et alii<sup>80</sup> encontrou, para o *A.niger*, valores da ordem de  $4 \times 10^6$  a  $4 \times 10^7$  esporos/g de substrato, sendo que no limite máximo já era notada uma pequena quantidade no teor de proteínas final, pela inibição do meio.

#### 4.3 NUTRIENTES

Os sais nutritivos, fosfato de amônio secundário, fosfato de potássio primário, sulfato de amônio e uréia, foram testados quanto à sua influência na produção final de proteínas, e em que níveis se obteria um ótimo rendimento.

Todos os ensaios elaborados com uréia, sozinha ou associada, mostraram-se negativos. Com o decorrer da fermentação, o pH elevou-se consideravelmente, atingindo valores de até 8,6, que associado com uma umidade de 63,33%, possibilitava contaminação do substrato por bactérias. Testes com adição de 1% V/P de ácido láctico e abaixamento da umidade até 54,6% e com adição de 1% P/P de uréia, apresentaram 3,93% como valor final em proteínas. Dessa maneira, a uréia foi descartada para uso como fonte de nitrogênio.

Os resultados obtidos para os demais sais encontram-se sumarizados no Quadro 3.

Para a obtenção dos dados constantes do Quadro 3, o pro

QUADRO 3. Efeito da Adição de Vários Sais na Produção de Proteínas pelo Fungo *A. oryzae* ATCC cepa 46244

SAIS %			NITROGÊNIO %			PROTEÍNAS
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	total	inorgânico	orgânico	(N x 6,25) %
-	-	-	0,7776	-	0,7776	4,86
1	-	-	0,9776	-	0,9776	6,11
2	-	-	1,1696	-	1,1696	7,31
2	0,5	-	1,4992	-	1,4992	9,37
2	1,0	-	1,9168	-	1,9168	11,98
2	1,5	-	1,9520	-	1,9520	12,20
2	2,0	-	1,9760	-	1,9760	12,35
5	2,5	-	2,7328	-	2,7328	17,08
10	5,0	-	3,0320	0,7232	2,3088	14,43
20	10,0	-	3,4469	2,3280	1,1216	7,01
2,5	2,5	2,5	1,9680	0,1568	1,8112	11,32
-	5,0	2,5	1,9280	0,1808	1,7472	10,92

cesso fermentativo foi desenvolvido em estufa de incubação: a 28°C e 92-95% de umidade relativa; com substrato contendo 60,19% de umidade e 1,23% de proteínas; inóculo de  $1 \times 10^6$  esporos /g substrato e tempo de fermentação de 40h. O produto fermentado foi seco a 60°C por 72 horas, moídos e analisados.

As Figuras 7, 8 e 9 mostram o efeito da adição de sais no rendimento final de proteína, da farinha de mandioca enriquecida. A Figura 7 apresenta a influência da adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  no conteúdo protéico final, mantendo-se constante a adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Pela figura, observou-se que adições de 1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  proporcionavam um aumento em torno de 1,64 vezes, enquanto que adições de 2% elevam em 1,67 vezes o teor de proteínas. A adição de mais 1% desse sal ao meio não trouxe considerável aumento em proteínas (0,37%), estabelecendo-se assim a relação de 5%: 2,5%, para adições de, respectivamente,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Estabelecida essa relação, estudou-se a elevação protéica pela variação desses sais.

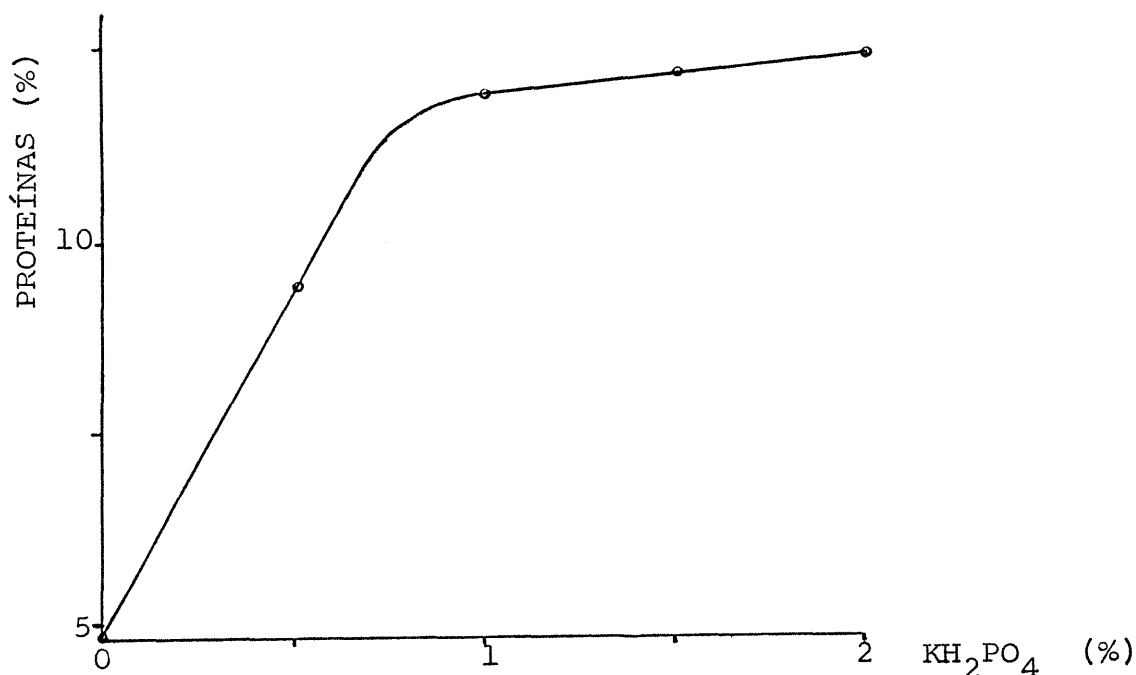


FIGURA 7. Influência da Adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  no Teor de Proteínas, Mantendo-se a Adição  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 2%.

Observando-se a Figura 8, verificou-se ser benéfica adições de até 5% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mantida a relação de 2 : 1 com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ao substrato. Valores acima de 5% não conduziram a considerável aumento de proteínas, sendo que para o valor máximo de adição (20%) o teor de nitrogênio inorgânico representou 67,48% do teor de nitrogênio total.

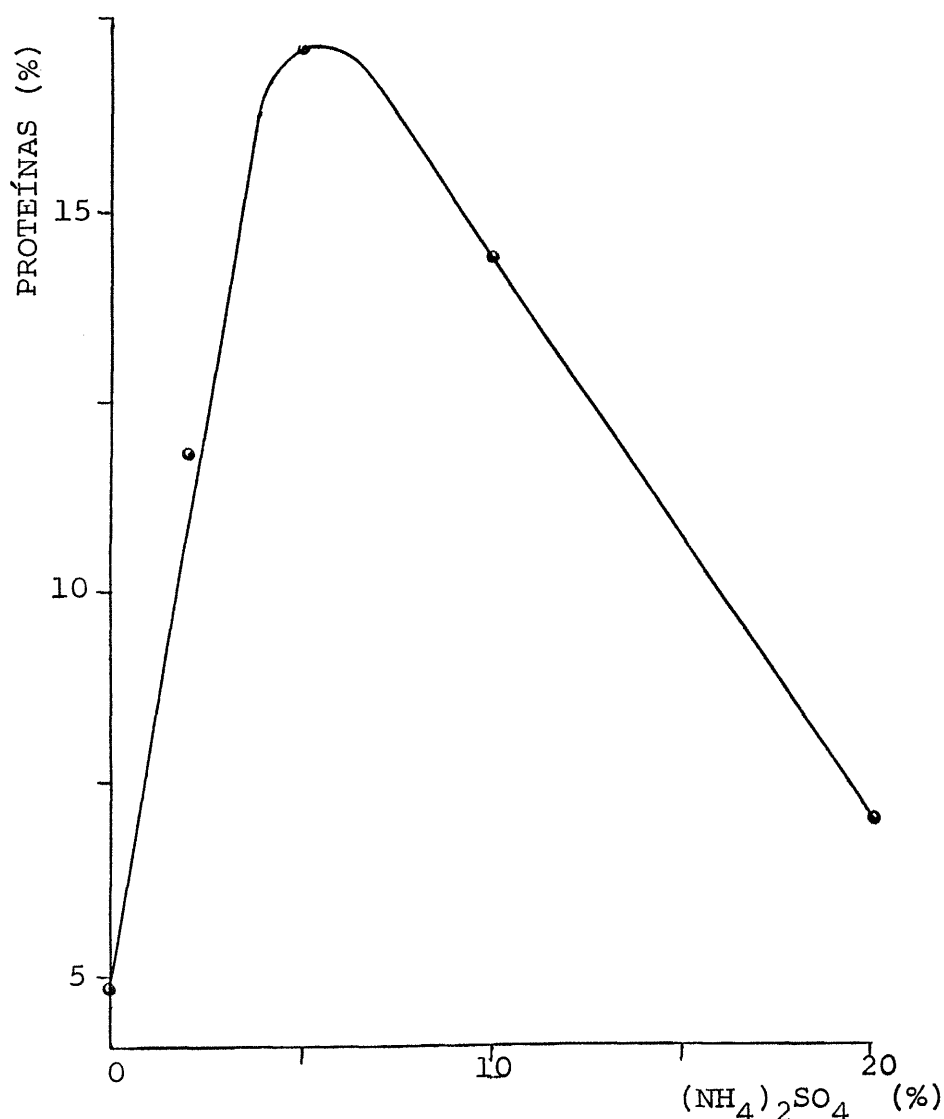


FIGURA 8. Influência da Adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , na Proporção de 2 : 1, no Teor de Proteínas.

A Figura 9 resume as variações sofridas pelo teor em proteínas, mostradas nas Figuras 7 e 8.

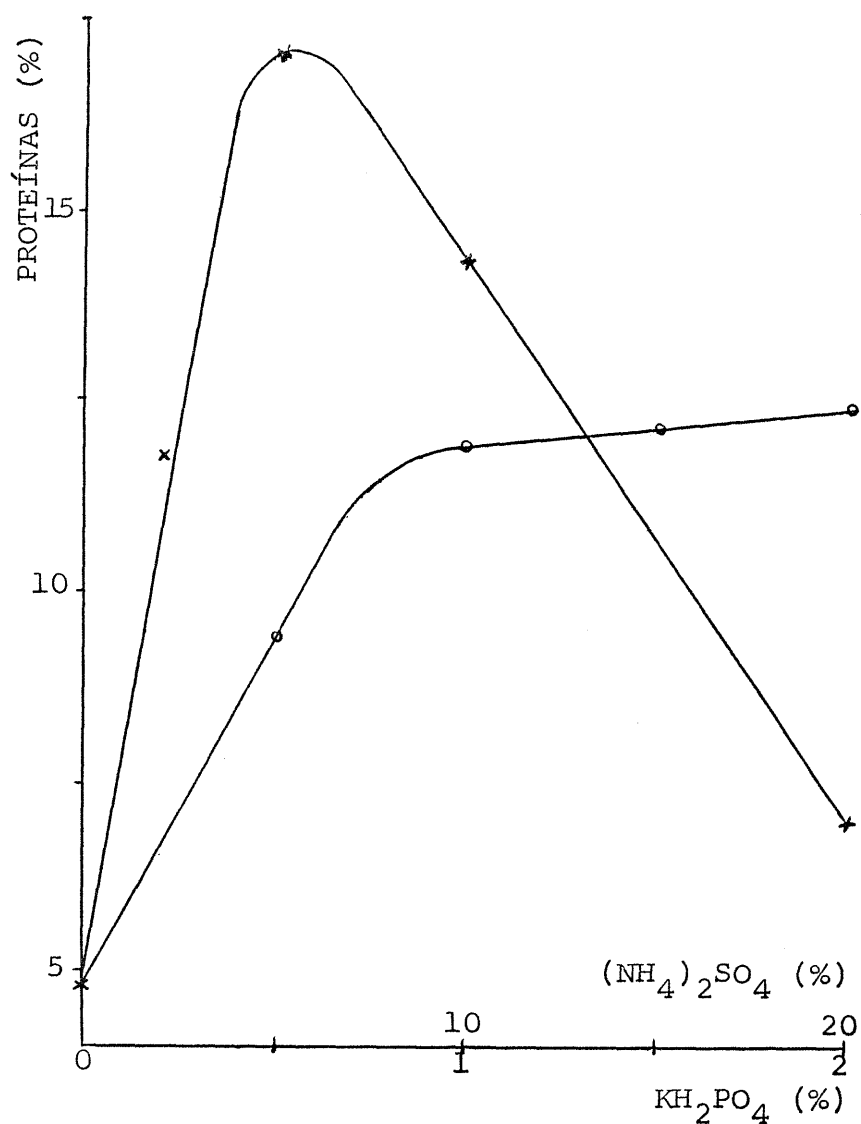


FIGURA 9. Influência das Adições de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na Produção de Proteínas pelo *A. oryzae* ATCC 46244.

o-o:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0-2%.

x-x:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na relação de 2:1, com variações desde 0 até 20% para o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e de 0 a 10% para o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

A adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  também mostrou-se benéfica. Comparações nas mesmas proporções que o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram efetuadas. 5%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e 2,5% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  proporcionaram um teor em proteínas de 10,92%. Esse valor foi 36,07% menor do que o obtido com a adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (17,08%). Adicionando 2,5% de cada sal  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  obteve-se um aumento de 3,66% (de 10,92% para 11,32%) no teor de proteínas.

Dessa maneira, ficou evidenciado que quando houve adição de 5% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 2,5% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sobre o peso da mandioca cozida, a elevação do conteúdo em proteínas foi mais acentuada. De acordo com os valores mostrados no Quadro 3, a elevação de 1,23% para 17,08%, representou um aumento de 1388 vezes para o teor de proteínas nas condições do experimento.

Esses sais foram utilizados por diversos pesquisadores 19,22,80,81,83,86,96,109,112, nas mais variadas proporções, sendo que o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  normalmente foram empregados associados com a uréia.

#### 4.4 ESPESSURA DA CAMADA DE SUBSTRATO

Ensaio envolvendo a espessura da camada de substrato foram desenvolvidos. Os resultados obtidos para umidade, pH e proteínas são apresentados no Quadro 4.

QUADRO 4. Influência da Espessura da Camada na Umidade, pH e Proteínas.

CAMADA cm	UMIDADE %	pH	PROTEÍNAS %
(-)*	60,55	5,80	2,42
1	38,70	2,37	12,88
2	54,63	2,38	12,80
3	59,02	2,40	12,67
4	60,95	2,47	11,77
5	62,58	2,78	10,72

\*Condições iniciais do substrato

A partir dos dados constantes do Quadro 4 foram construídos os gráficos das Figuras 10 a 13.

Pela observação da Figura 10, verificou-se que a umidade em camadas de 1 cm caiu até próximo de 38%, e de 5 cm elevou-se em torno de 63%. Da visualização da Figura 11, verificou-se que quanto menor a espessura da camada, mais baixo era o pH. O teor de proteínas, dado pela Figura 12, é menor para espessuras maiores. Colocando as três curvas em um único gráfico (Figura 13) obteve-se uma visão melhor do efeito da camada sobre os itens estudados. Pela Figura 13, poderia se inferir ser a camada de 1 cm a ideal para o desenvolvimento do microrganismo, mas deve-se acrescentar a essas as observações decorrentes da visualização do processo fermentativo. Em camadas de 1 cm, a perda

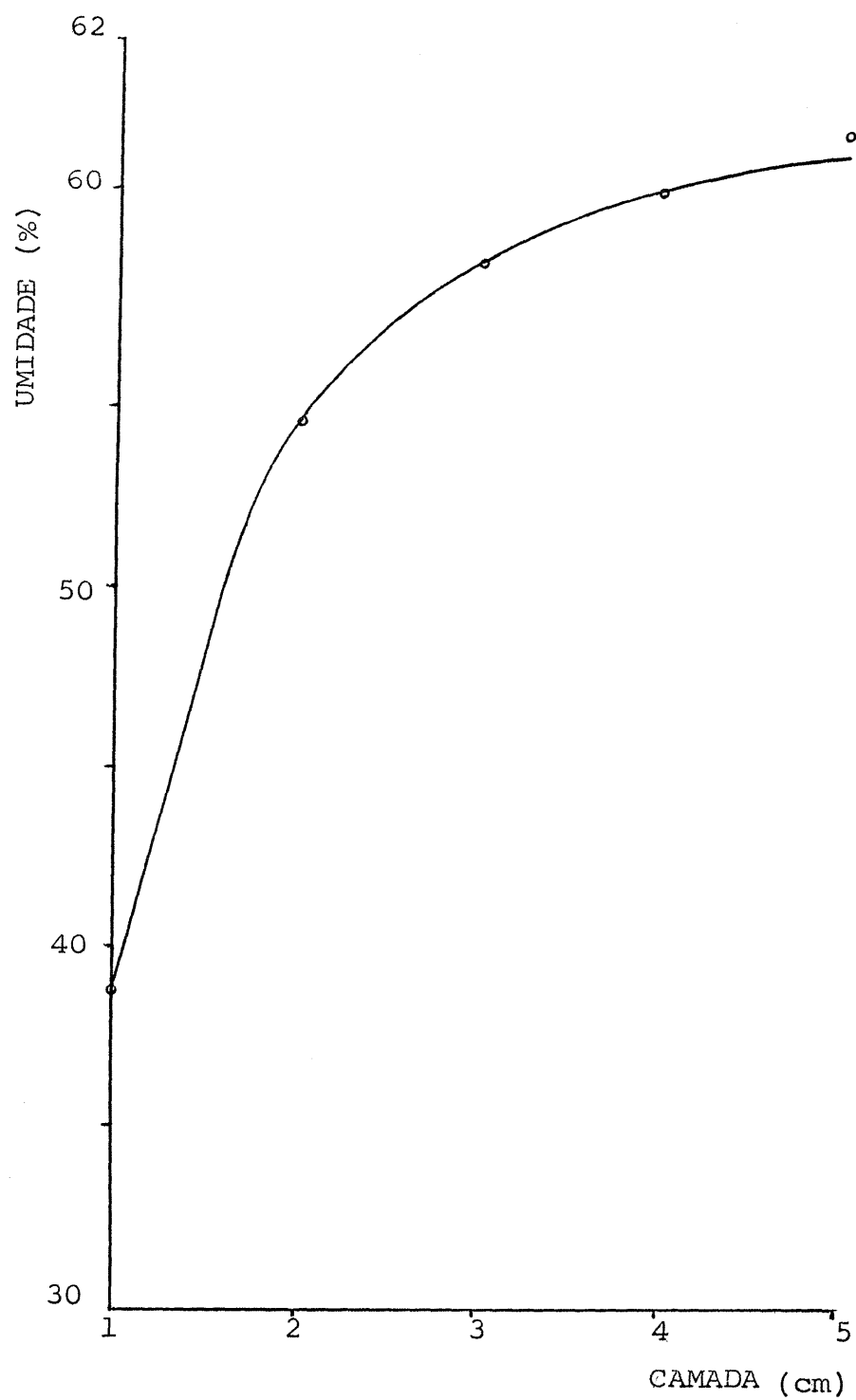


FIGURA 10. Variação da Umidade em Função da Espessura da Camada.

*A. oryzae* cepa nº 46244.

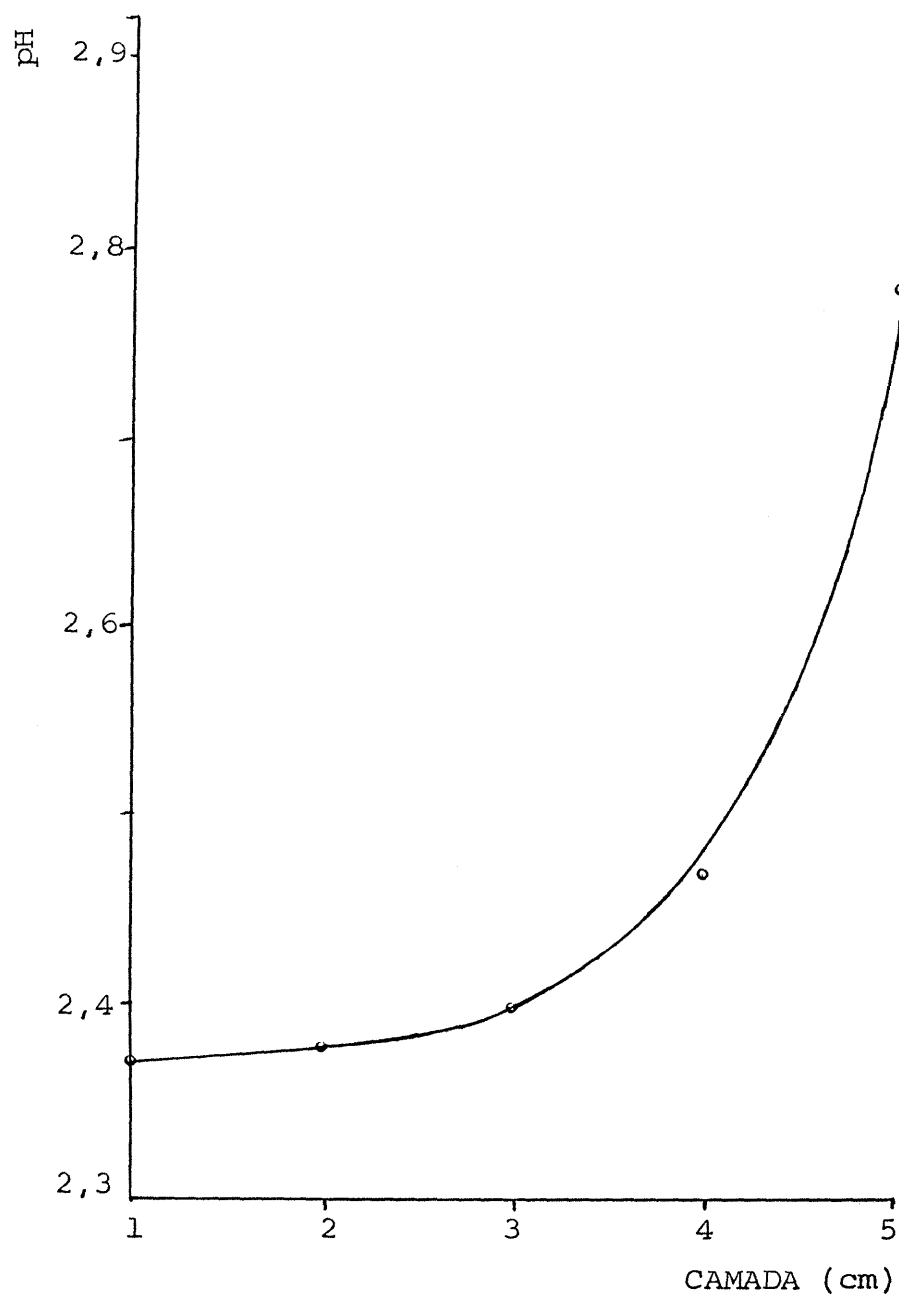


FIGURA 11. Variação do pH em Função da Espessura da Camada.

***A. oryzae*** cepa nº 46244.

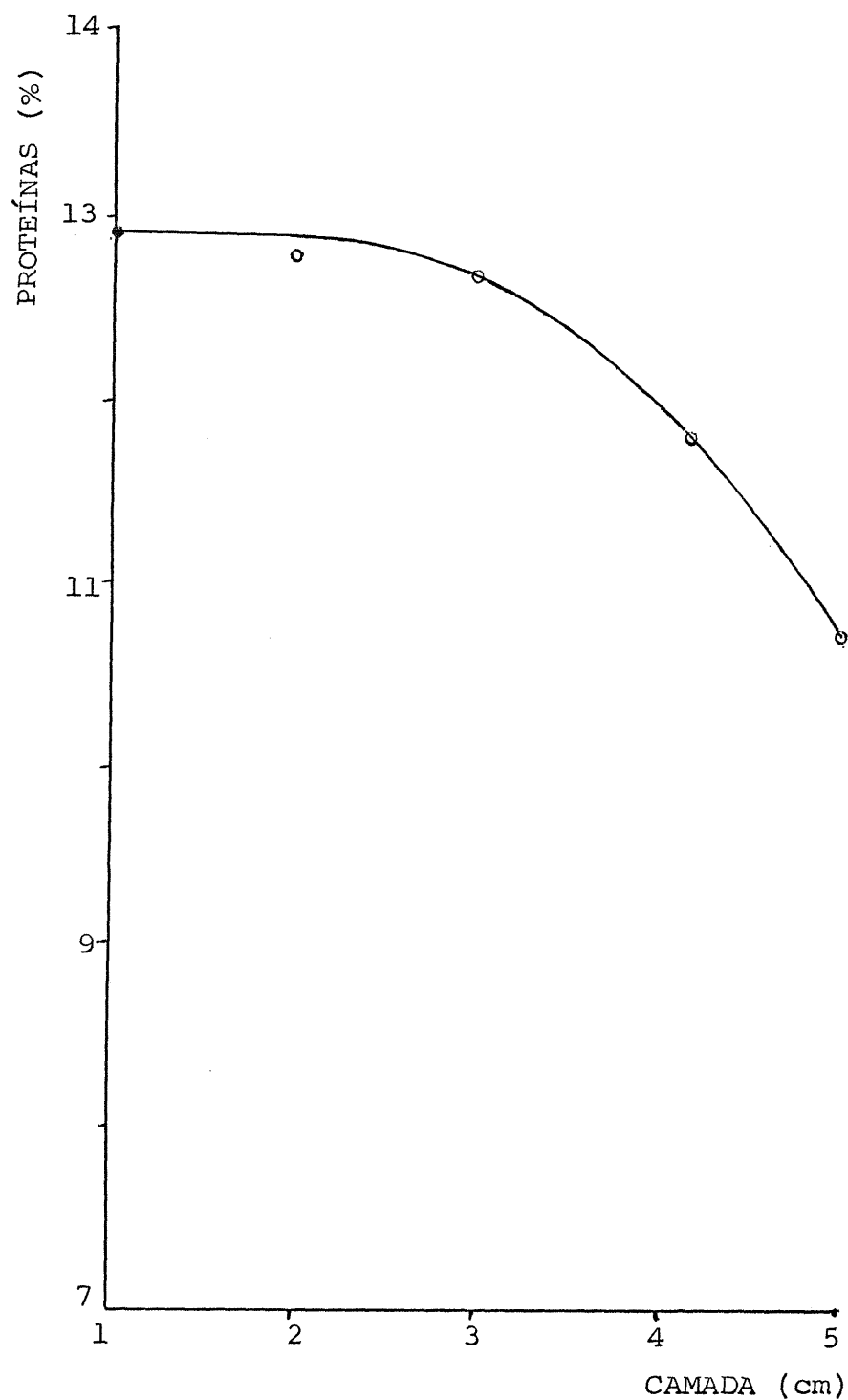


FIGURA 12. Elevação do Teor de Proteínas em Função da Espessura da Camada.

*A. oryzae* cepa nº 46244

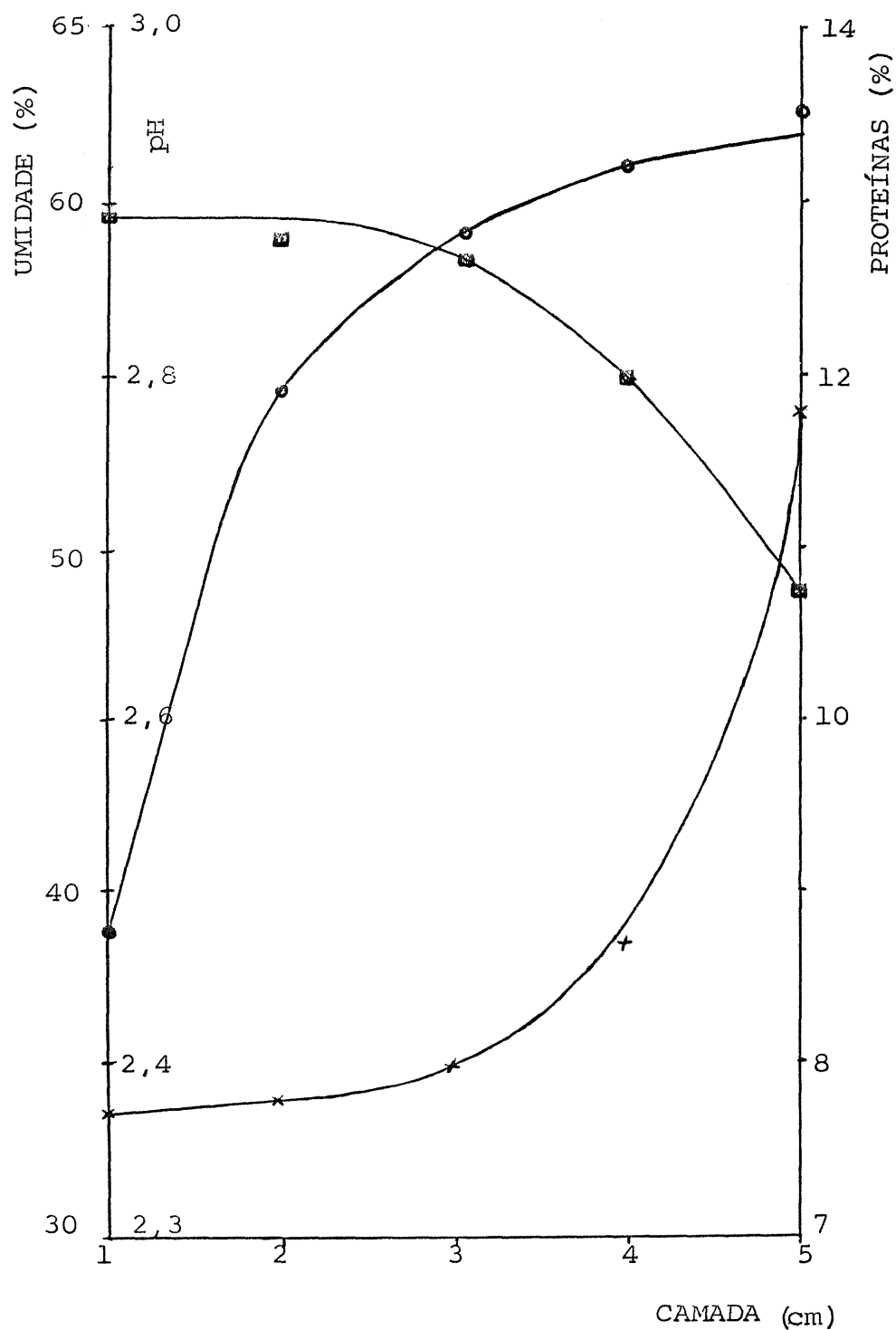


FIGURA 13. Influência da Espessura da Camada na Umidade, no pH e no Teor de Proteínas.

*A. oryzae* cepa nº 46244.

o-o: umidade

x-x: pH

□-□: proteínas

excessiva de umidade conduz a uma esporulação em tempo menor, em prejuízo do produto final. As camadas de 2 e 3 cm proporcionaram crescimento ótimo e conduziram a uma maior elevação proteica. Camadas acima de 3 cm não conduziram todo substrato à fermentação, devido ao fungo crescer nas superfícies mais externas do substrato, permanecendo a parte mais interna sem se evidenciar o crescimento fúngico.

Dos resultados e observações decorrentes dos ensaios, optou-se por camada de 2 a 3 cm de espessura, devido a conduzirem a uma maior elevação proteica sem esporulação e diminuindo o risco de contaminação.

#### 4.5 SELEÇÃO DO MICRORGANISMO

O microrganismo selecionado foi aquele que mostrou acentuada elevação protéica associada com uniformes modificações na umidade, pH e ainda, com a produção de uma farinha de mandioca de coloração clara.

Os ensaios foram conduzidos em câmara de incubação e tiveram a manutenção das condições ambientais conforme anteriormente descrito no item 3.1.4. O Quadro 5 mostra as condições de cultivo para a fermentação estática em meio sólido, utilizando bandejas de alumínio como fermentador.

QUADRO 5. Condições de Cultivo para o Enriquecimento Protéico da Mandioca.

---

##### COMPOSIÇÃO DA MANDIOCA COZIDA:

Umidade	-	60 - 70%
Proteínas	-	0,36-1,16%
Amido	-	21 - 33%

##### COMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO:

Mandioca Cozida	-	100g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	5g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	-	2,5g
Camada(espessura)	-	2-3 cm

##### CONDIÇÕES DE CULTIVO:

Temperatura	-	20-30°C
Umidade Relativa	-	85-100 %
Inóculo	-	$1,0 \times 10^6$ esporos/g
pH	-	4,5 - 5,5

---

Sob as condições de processo constantes do Quadro 5, foram elaborados ensaios simultâneos com os quatro microrganismos. Os resultados obtidos encontram-se representados nas Figuras 14 a 29.

As Figuras 14 a 17 referem-se as variações de umidade do substrato durante a fermentação. A fermentação pelo **A. oryzae** cepa nº 46.244, Figura 14, mostrou-se relativamente uniforme no decorrer do processo, apresentando uma curva descendente para a variação da umidade. Pela observação da Figura 15, verificou-se que com o uso do **A. oryzae** cepa nº ETF-20 ocorreram variações irregulares durante o processo fermentativo, mantendo, em média, a umidade inicial e aumentando no final.

Durante o processo fermentativo com o **R. stolonifer**, Figura 16, a umidade apresentou-se como para o **A. oryzae** cepa nº ETF-20, permanecendo um pouco acima da média e decrescendo levemente no final. Na Figura 17, durante a fermentação com o **A. niger**, evidenciou-se um decréscimo de umidade na primeira metade do processo, seguido de uma elevação nas próximas 12 h e finalmente um decréscimo mais acentuado nas últimas 17h.

Dos quatro fungos testados, o que apresentou maior variação na umidade do substrato em relação ao teor inicial, foi o **A. niger** (9,1%). A cepa nº ETF-20 de **A. oryzae** apresentou uma variação negativa, isto é, aumentou o teor de umidade do substrato em 1,2%.

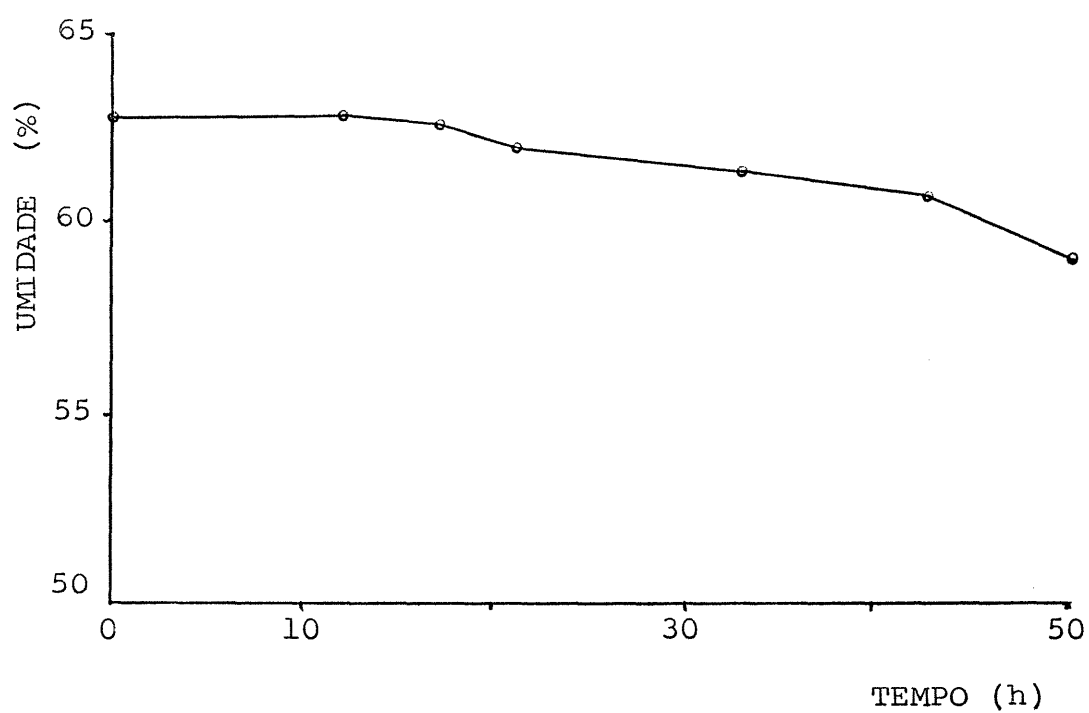


FIGURA 14. Variação da Umidade do Substrato com o Tempo de Fermentação.

**A. oryzae** cepa nº 46.244

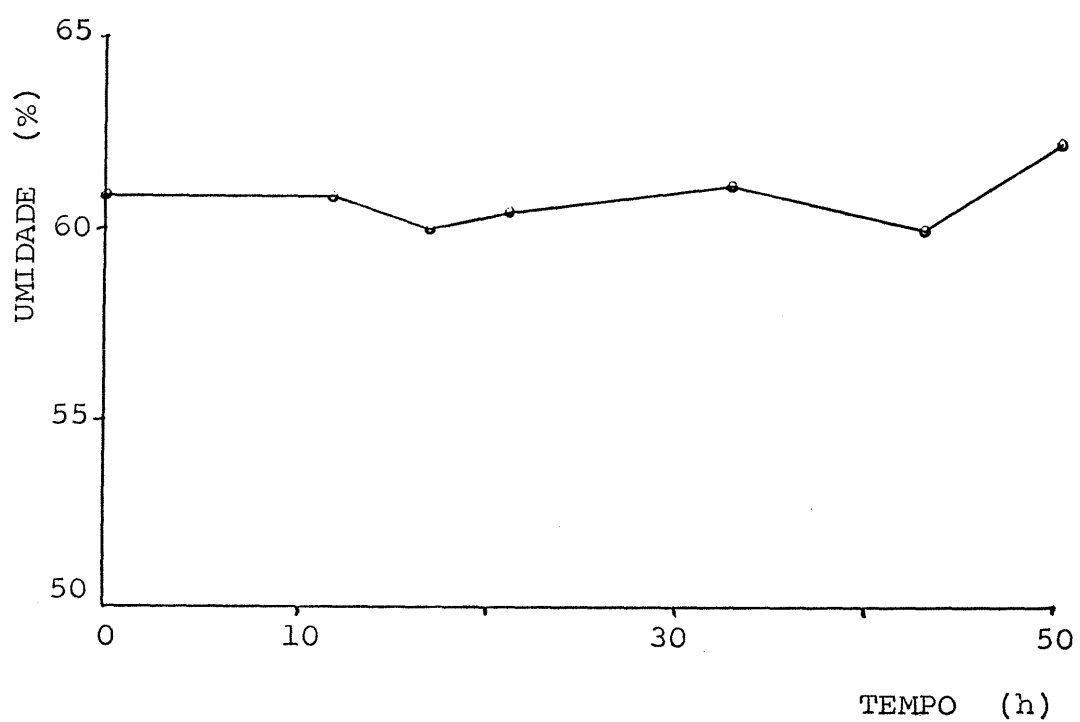


FIGURA 15. Variação da Umidade do Substrato com o Tempo de Fermentação.

*A. oryzae* cepa nº ETF-20.

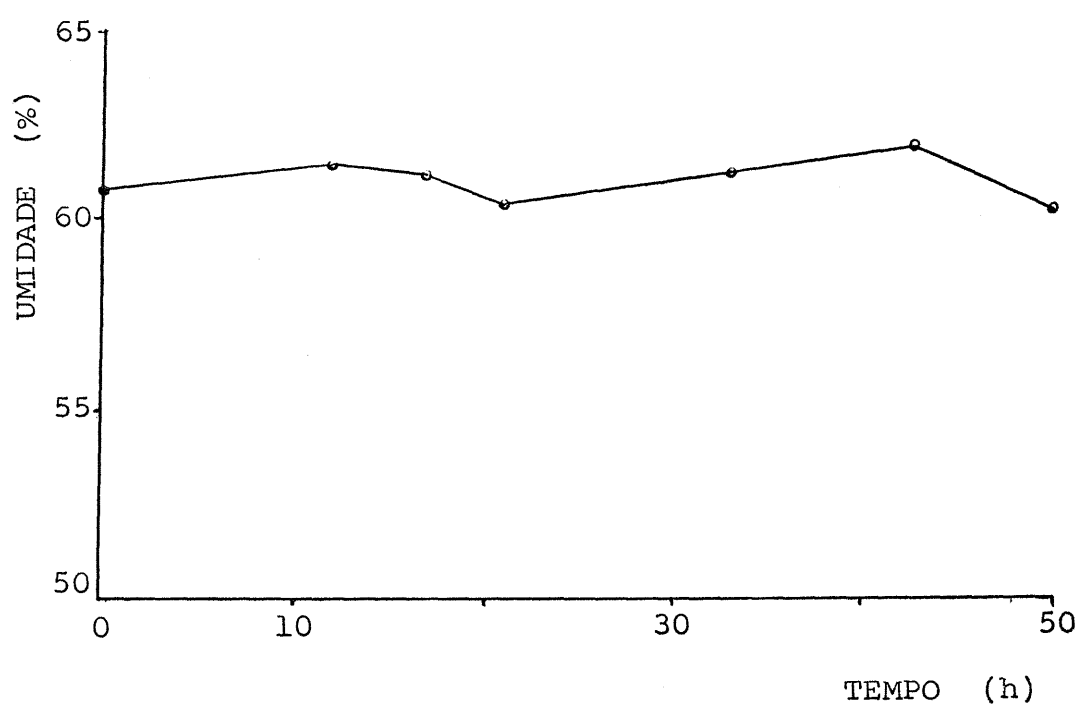


FIGURA 16. Variação da Umidade do Substrato com o Tempo de Fermentação.

*R. stolonifer* cepa nº 0276

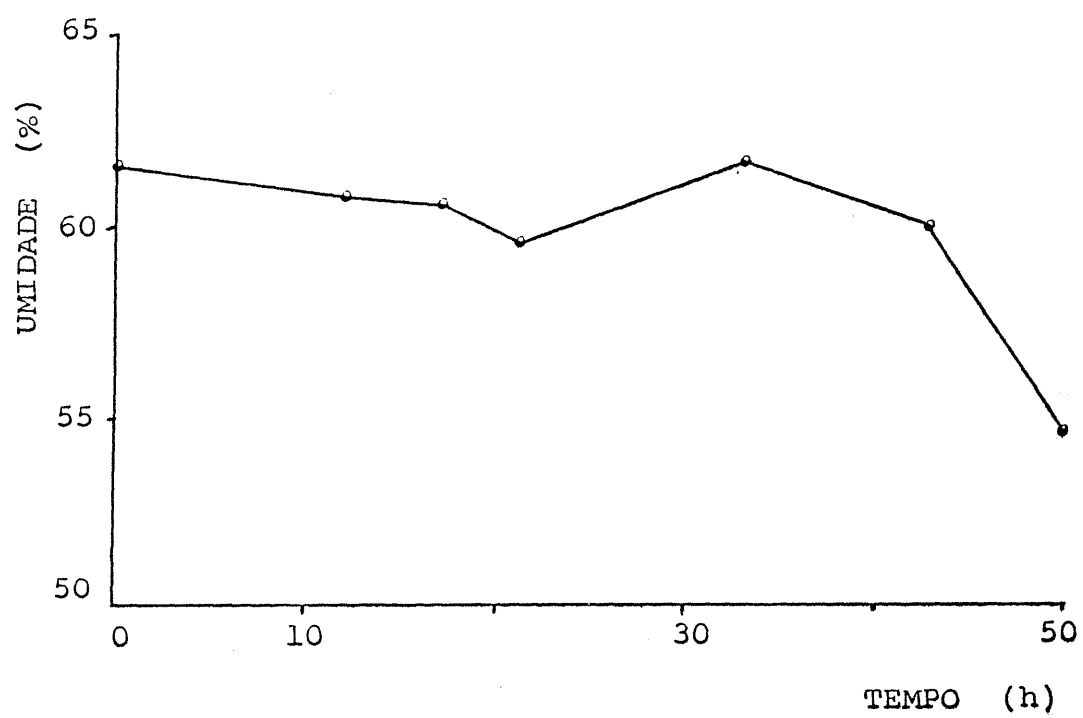


FIGURA 17. Variação da Umidade do Substrato com o Tempo de Fermentação.

*A. niger* cepa nº 2003.

As Figuras 18 a 21 relacionam o pH com o tempo de fermentação. Em todos os processos, o pH final resultou menor que o inicial. Na Figura 18, durante o processo fermentativo com o **A. oryzae** cepa nº 46244, o pH permaneceu constante nas primeiras 12h, caindo levemente nas próximas 9h, e abruptamente nas 23h seguintes. Nas últimas 7h, permaneceu praticamente constante. Para o processo com o **A. oryzae** cepa nº ETF-20, Figura 19, o pH permaneceu igualmente constante nas 12h iniciais, nas seguintes 19h elevou-se, para depois decrescer. A variação do pH, na Figura 20, na fermentação com o **R. stolonifer**, nas 12h iniciais o pH decresceu levemente, ficando constante por 5h, para depois cair sensivelmente, até o final do processo. O **A. niger** em processo fermentativo, Figura 21, conduziu a pequeno abaixamento do pH em 21h e grande em 16h; nas 6h seguintes a variação foi menor, para nas 7h finais aumentar levemente.

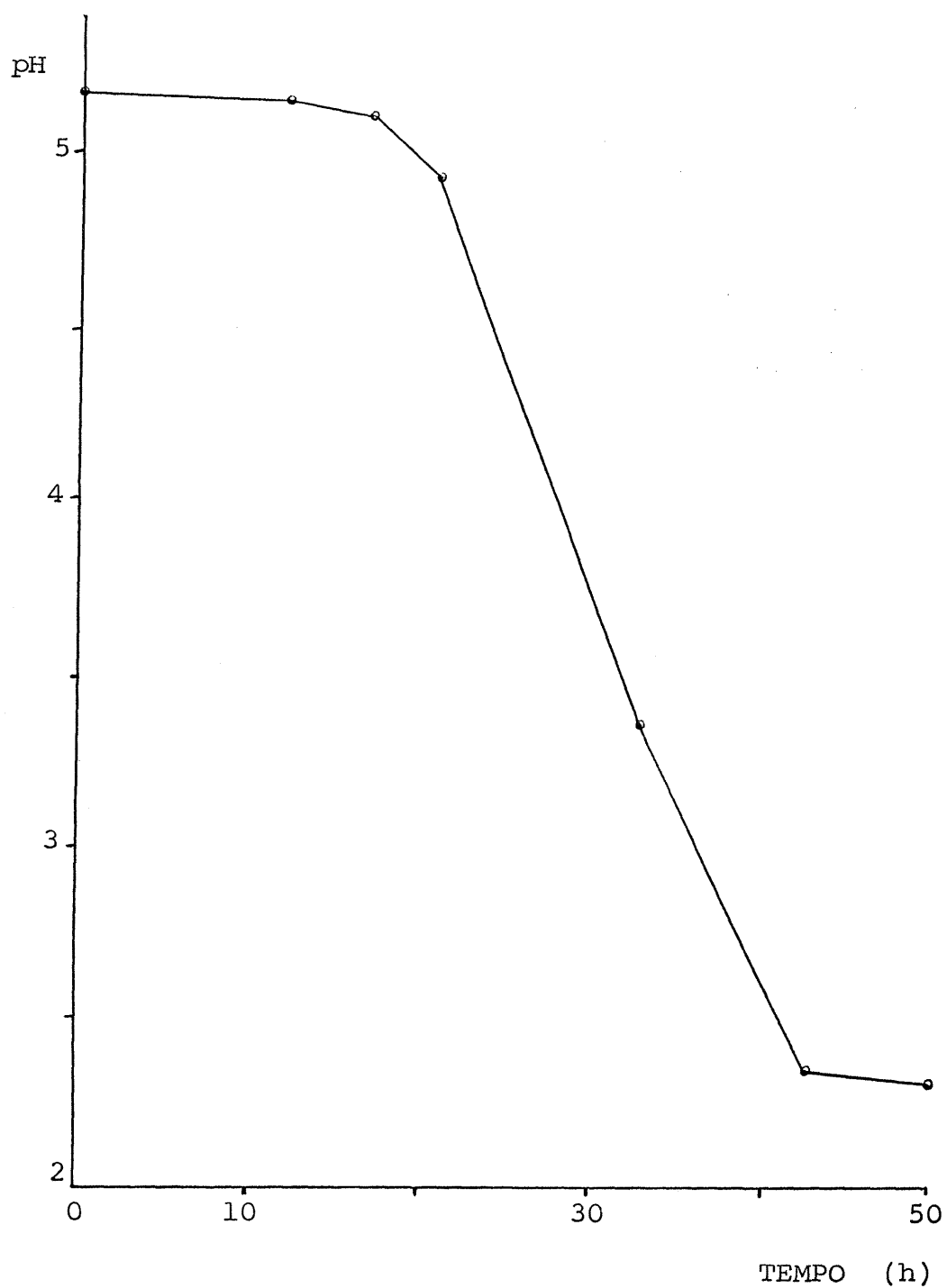


FIGURA 18. Variação do pH com o Tempo de Fermentação.

**A. oryzae** cepa nº 46244.

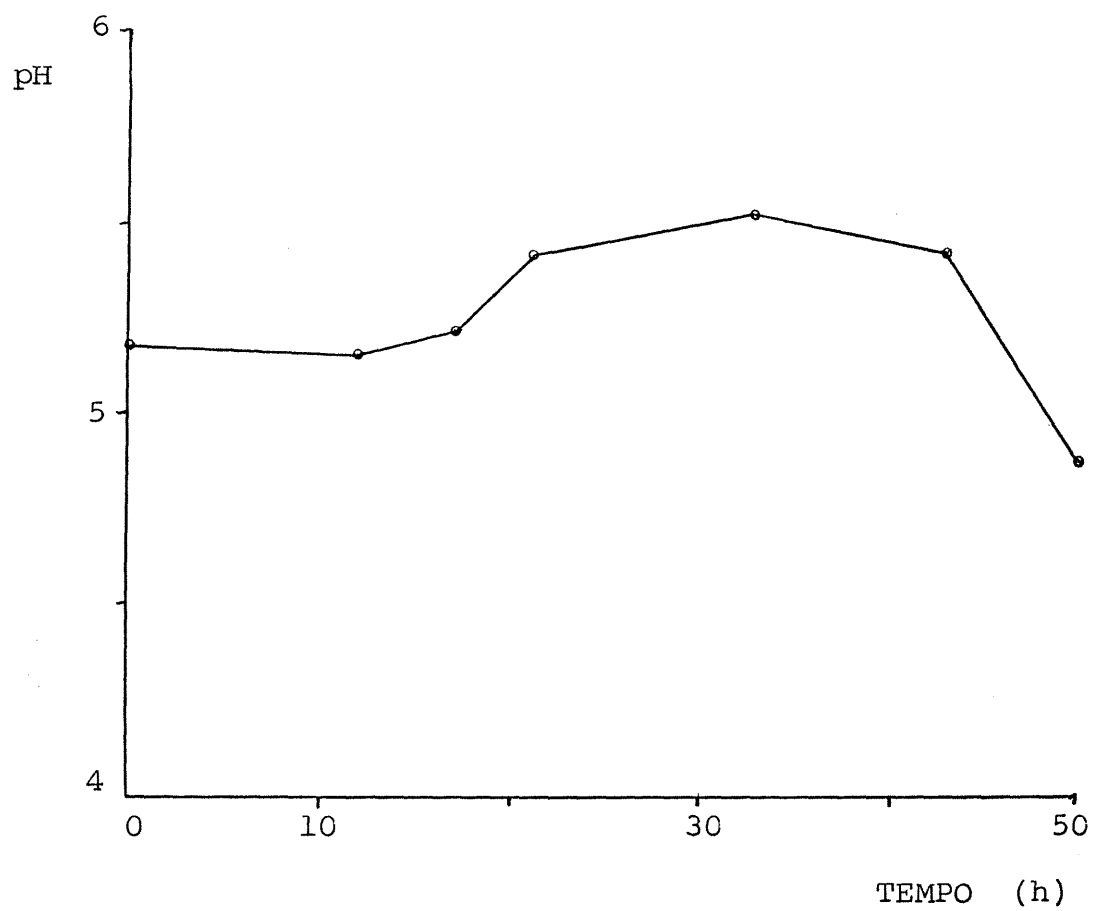


FIGURA 19. Variação do pH com o Tempo de Fermentação.

*A. oryzae* cepa nº ETF-20.

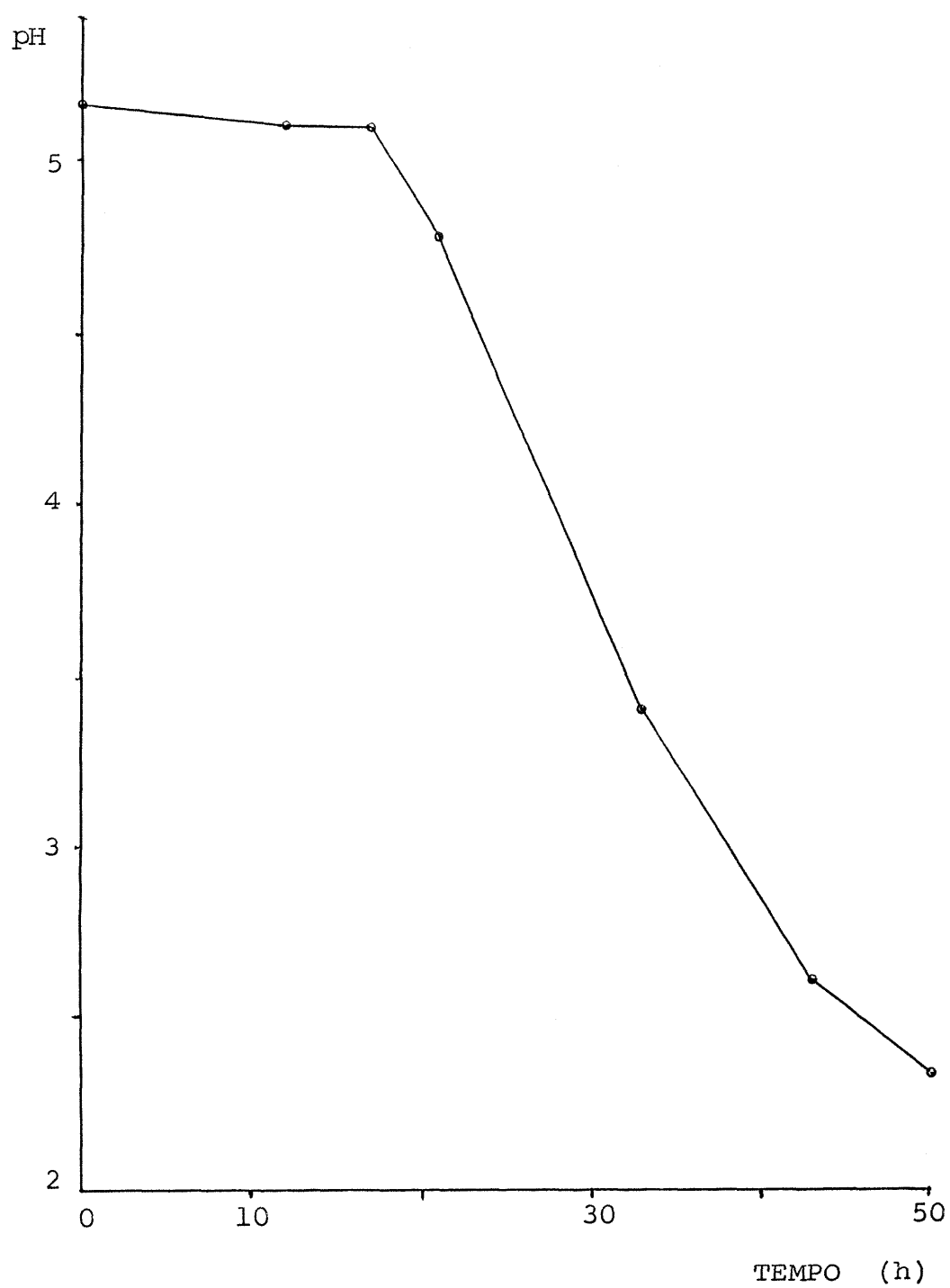


FIGURA 20. Variação do pH com o Tempo de Fermentação.

*R. stolonifer* cepa nº 0276.

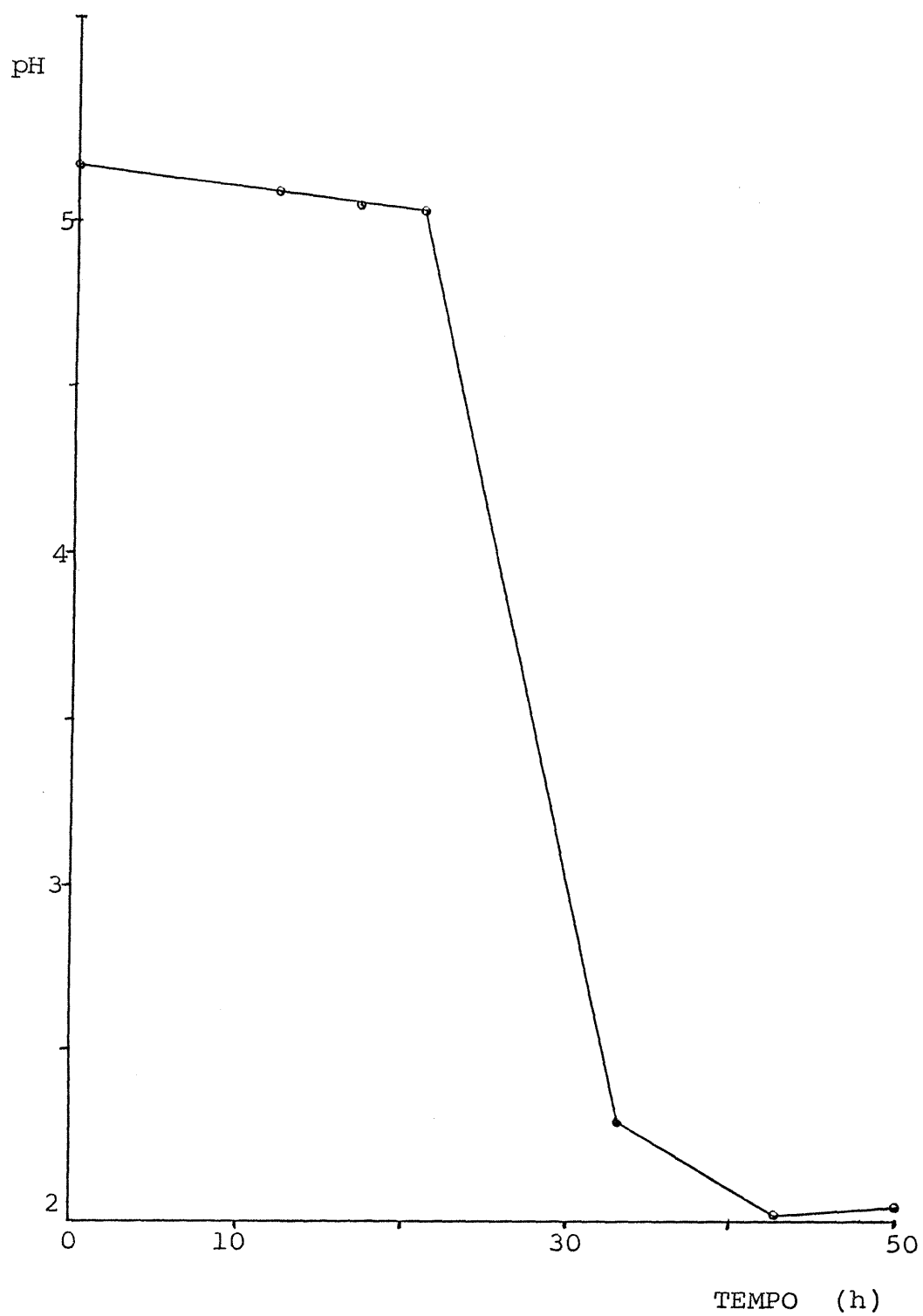


FIGURA 21. Variação do pH com o Tempo de Fermentação.

*A. niger* cepa nº 2003.

As Figuras 22 a 25 referem-se ao enriquecimento protéico obtido a partir dos diversos fungos. A farinha de mandioca enriquecida pelo uso do *A. oryzae* cepa nº 46244 apresentou o maior teor em proteínas, como mostra a Figura 22. O valor obtido foi de 14,98%, enquanto que para os demais fungos foram: *A. oryzae* cepa nº ETF-20, 4,56% (Figura 23); *R. stolonifer*, 11,43% (Figura 24); *A. niger*, 12,80% (Figura 25).

A elevação do conteúdo protéico é uma consequência do crescimento do microrganismo no substrato. Assim, quanto menor o teor em proteínas, menor terá sido o desenvolvimento do fungo. Dessa forma, o *A. oryzae* cepa nº ETF-20 foi o que menos se desenvolveu e o *A. oryzae* cepa nº 46244 o que mais cresceu.

As diversas fases do crescimento microbiano puderam ser identificadas somente através da observação dessas figuras. Em termos de visualização do micélio, a olho nu, nada se pode concluir, pois para os fungos *A. niger* e *R. stolonifer* não houve formação perceptível, enquanto que para as cepas de *A. oryzae* houve visualização do micélio. Entre essas duas cepas, a de nº 46244 apresentou abundante formação de micélio, que cobriu todo o substrato; e a de nº ETF-20 apresentou formação apenas perceptível. Quanto ao *A. niger*, o crescimento microbiano foi evidenciado pela mudança de coloração do substrato, que passou do creme-claro para o amarelo-cinzento. Mudança de coloração também foi evidenciada para o *R. stolonifer*, passando do creme-claro ao amarelo esverdeado.

As Figuras 26 a 29 mostram as modificações ocorridas nos valores de umidade, pH e proteínas para os quatro fungos.

As fases do crescimento microbiano, para cepas de

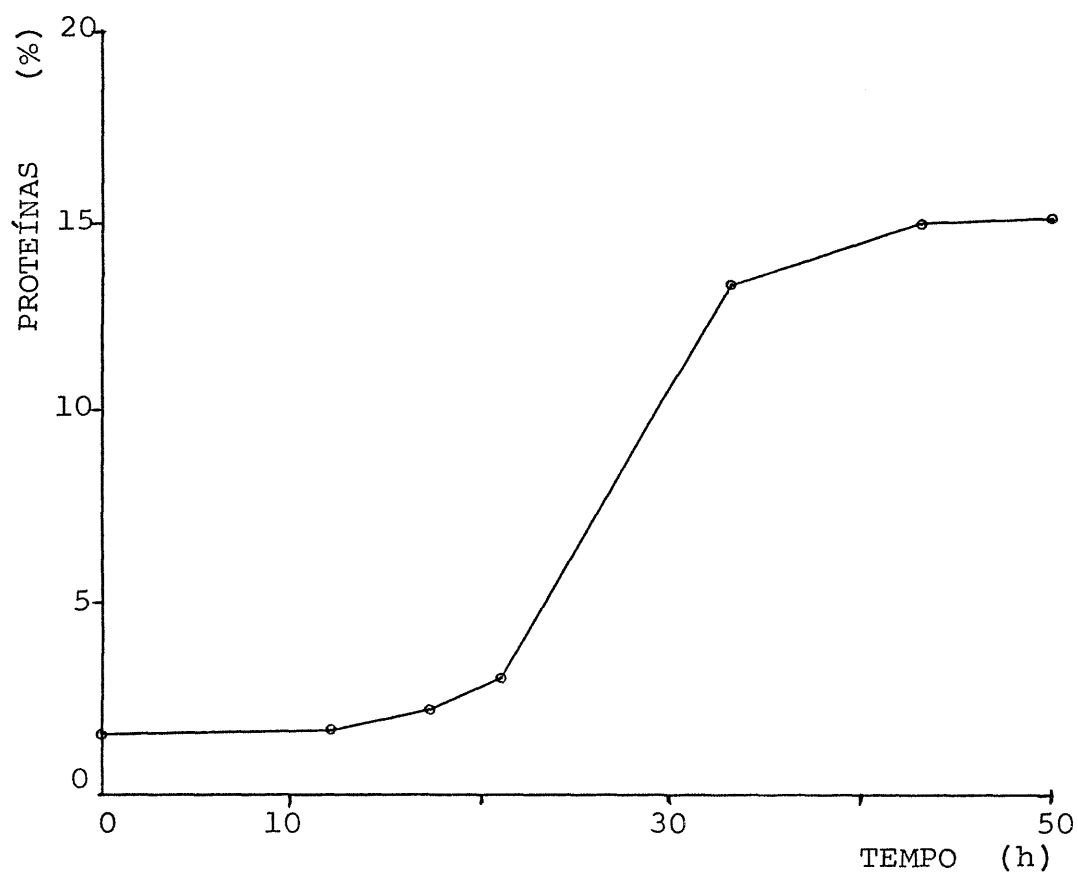


FIGURA 22. Elevação Protéica com o Tempo de Fermentação.

**A. oryzae** cepa nº 46244.

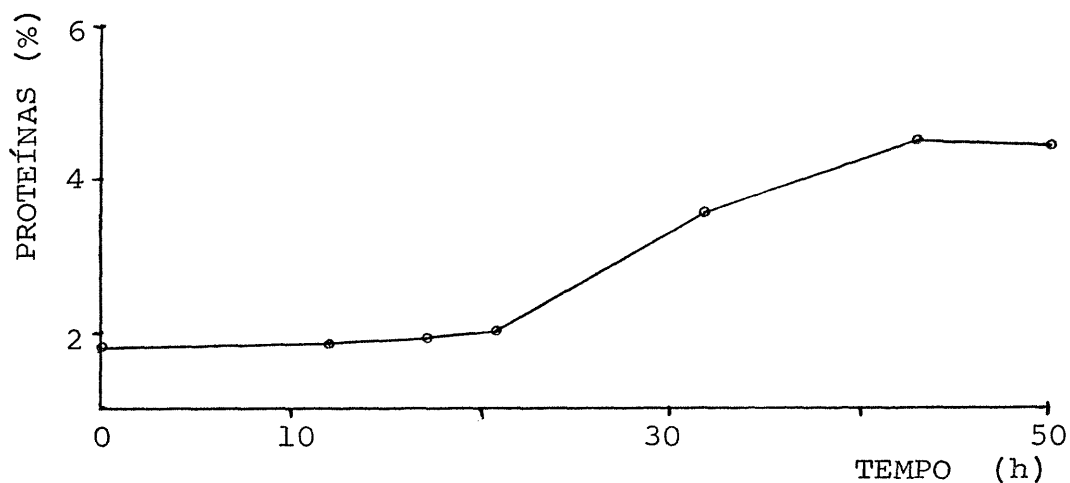


FIGURA 23. Elevação Protéica com o Tempo de Fermentação.

**A. oryzae** cepa nº ETF-20.

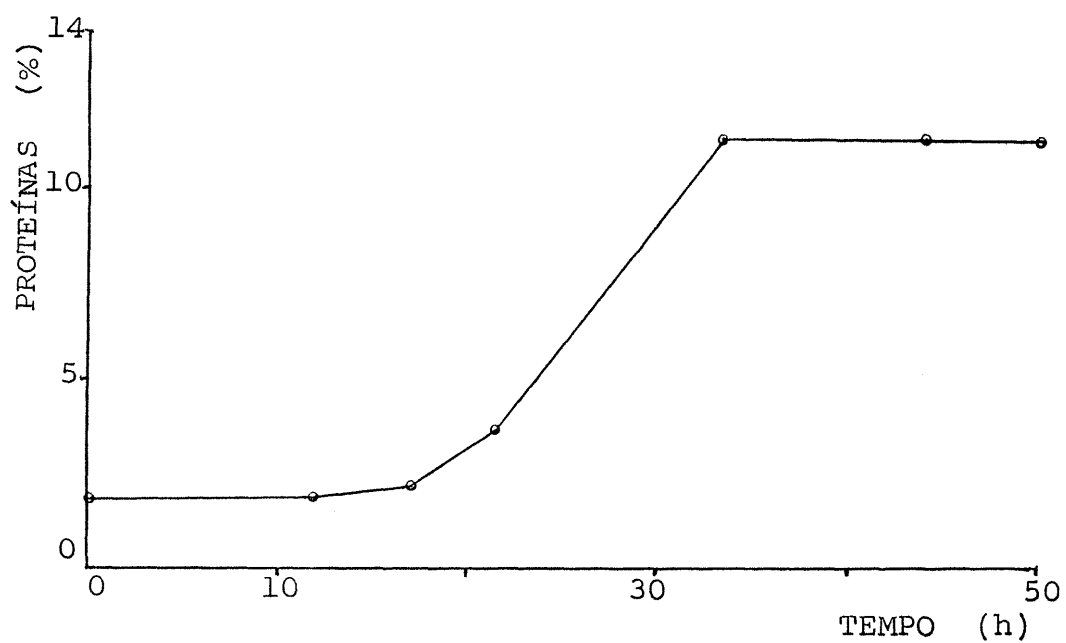


FIGURA 24. Elevação Protéica com o Tempo de Fermentação.

*R. stolonifer* cepa nº 0276.

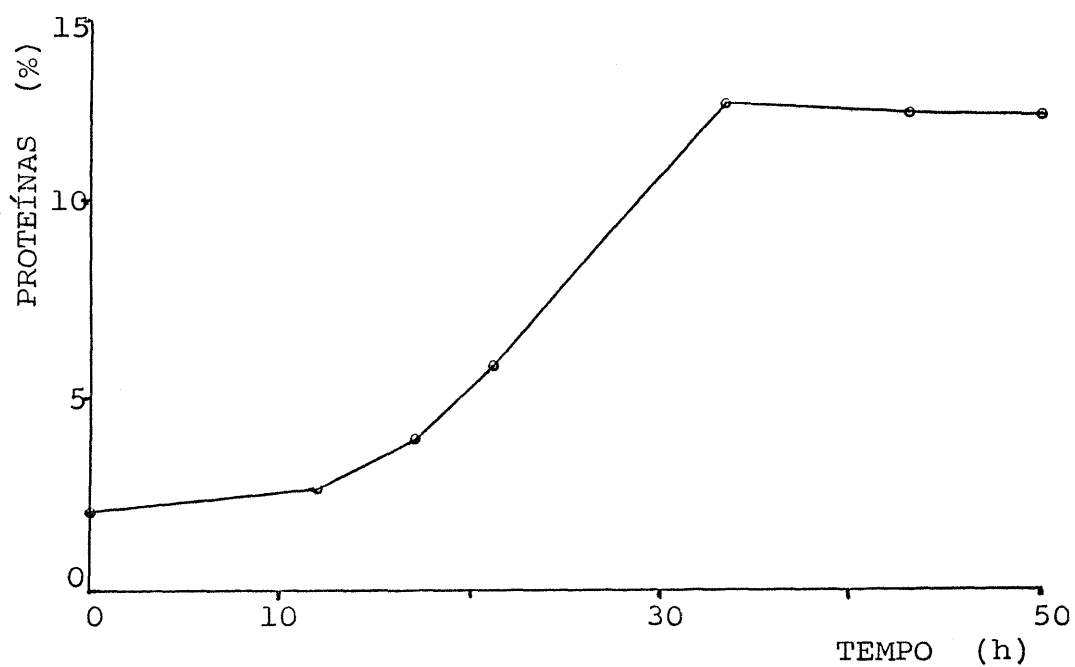


FIGURA 25. Elevação Protéica com o Tempo de Fermentação.

*A. niger* cepa nº 2003.

**A. oryzae** nº 46244, de **A. niger** e **R. stolonifer**, puderam ser identificadas pelo abaixamento do pH durante o processo fermentativo. Na Figura 26, fazendo-se comparações das modificações ocorridas no pH e no teor de proteínas durante o tempo de fermentação, foram evidenciadas serem modificações proporcionais nas primeiras 12h. Tanto o pH, como as proteínas permaneceram praticamente constantes; das 12h até as 21h, houve ligeiro abaixamento do pH e elevação das proteínas; a partir das 21h, o pH caiu rapidamente e a proteína elevou-se consideravelmente. Esse abaixamento em pH e elevação em proteínas prosseguiram até próximo de 43h, quando iniciou uma fase quase constante. Após 48h, houve um ligeiro acréscimo no pH e decréscimo das proteínas. Nas Figuras 28 e 29, evidenciou-se as mesmas fases, com mudança de poucas horas, em relação ao ocorrido na Figura 26.

Determinações de aflatoxina, nas farinhas de mandioca enriquecidas, pelos quatro microrganismos, foram realizadas. Os resultados obtidos são mostrados no Quadro 6.

QUADRO 6. Determinações de Aflatoxina na Farinha de Mandioca Enriquecida.

FARINHA DE MANDIOCA ENRIQUECIDA	
	AFLATOXINA
Microrganismo utilizado	
<b>Aspergillus oryzae</b> cepa nº 46.244	negativo
<b>Aspergillus oryzae</b> cepa nº ETF-20	negativo
<b>Aspergillus niger</b> cepa nº 2003	negativo
<b>Rhizopus stolonifer</b> cepa nº 0276	negativo

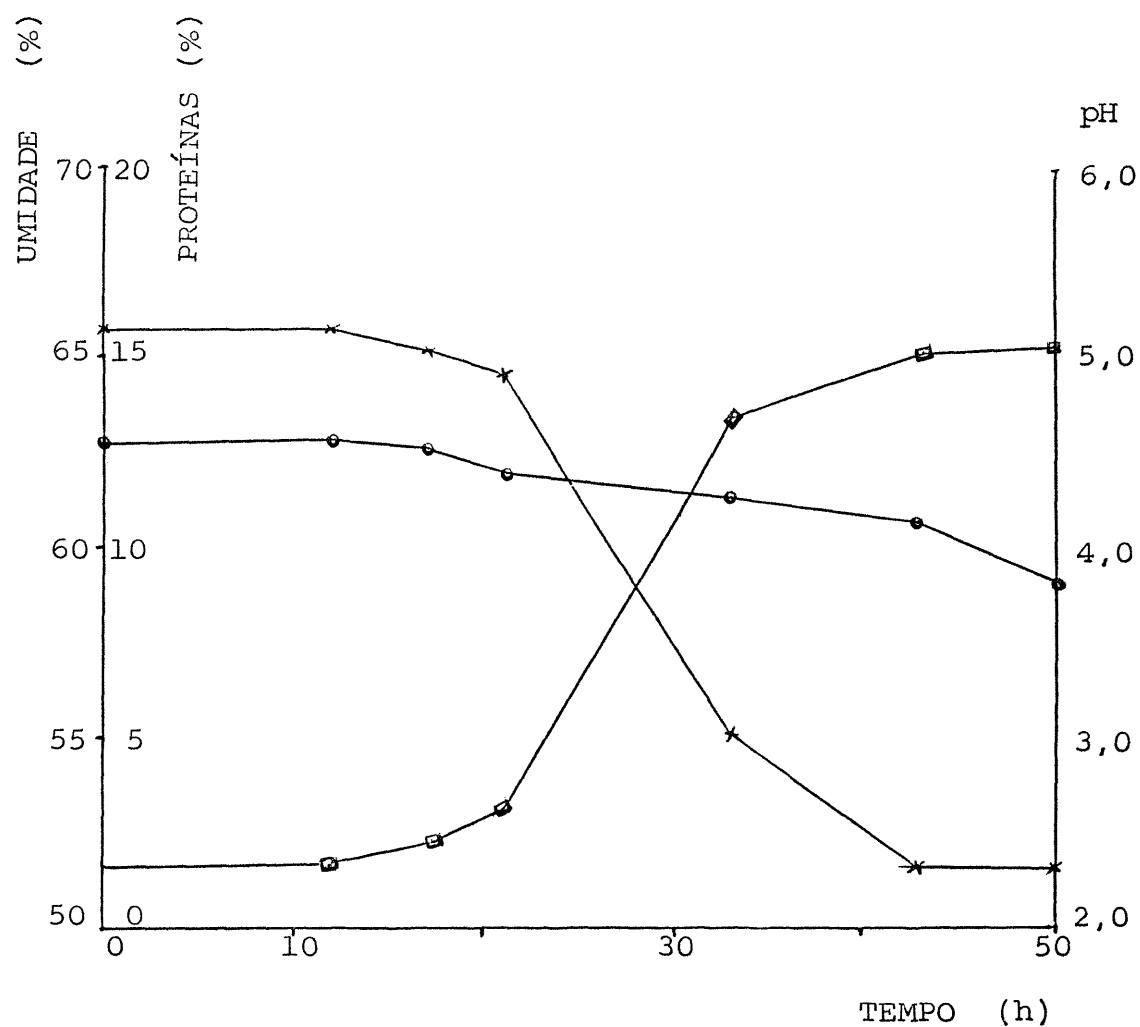


FIGURA 26. Modificações de Umidade, pH e Proteínas em Função do Tempo de Fermentação.

**A. oryzae** cepa nº 46244.

○-○-○ : Umidade

x-x-x : pH

□-□-□ : Proteínas

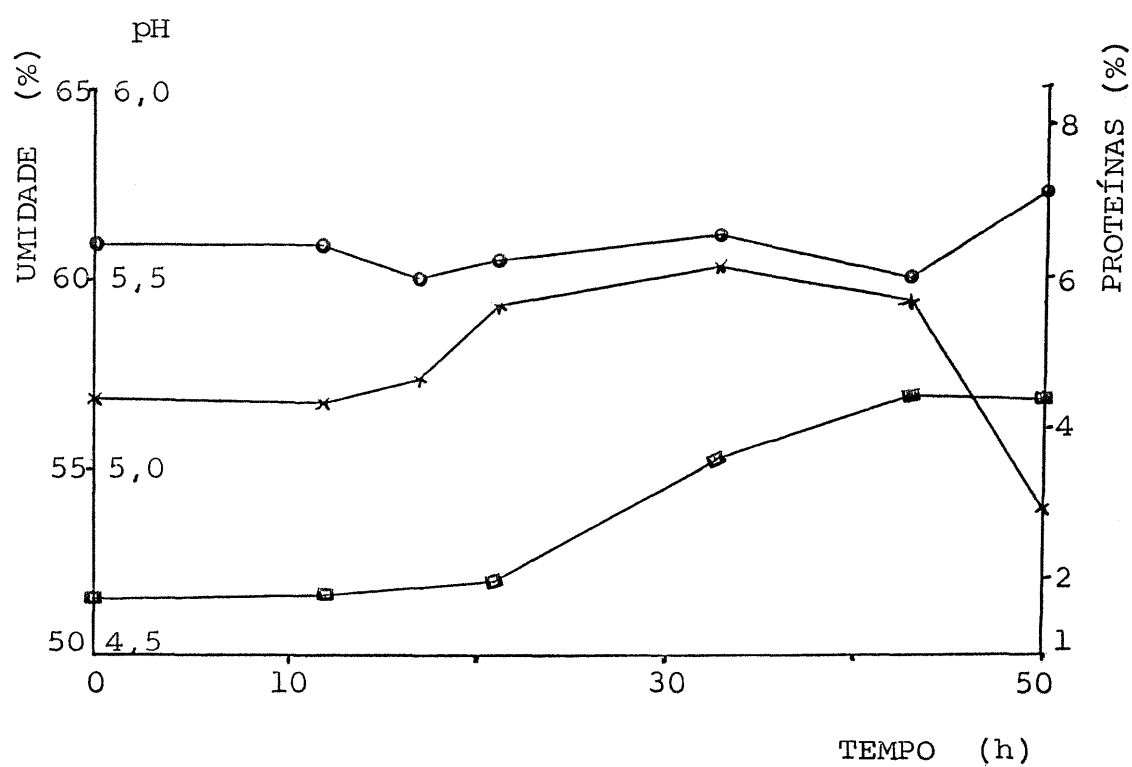


FIGURA 27. Modificações de Umidade, pH e Proteínas em Função do Tempo de Fermentação.

*A. oryzae* cepa ETF-20.

○-○-○ : Umidade

x-x-x : pH

■-■-■ : Proteínas

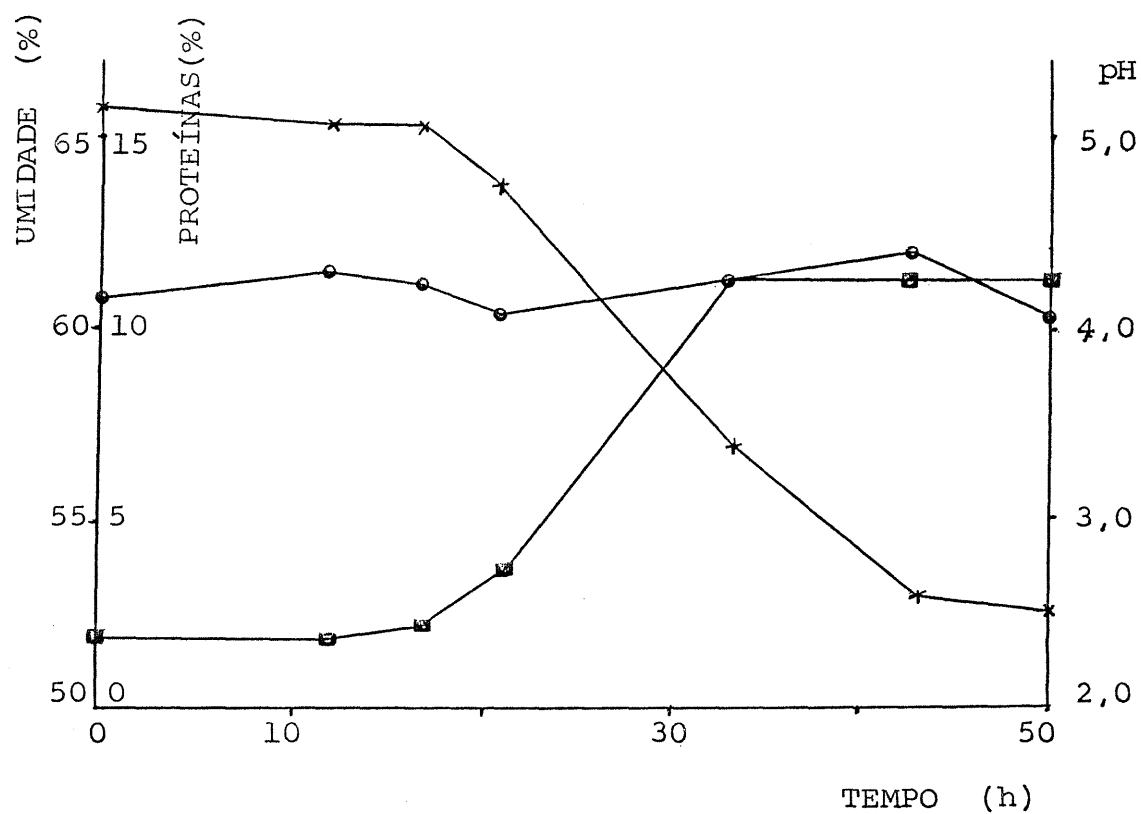


FIGURA 28. Modificações de Umidade, pH e Proteínas em Função do Tempo de Fermentação.

**R. stolonifer** cepa nº 0276.

○-○-○ : Umidade

x-x-x : pH

□-□-□ : Proteínas

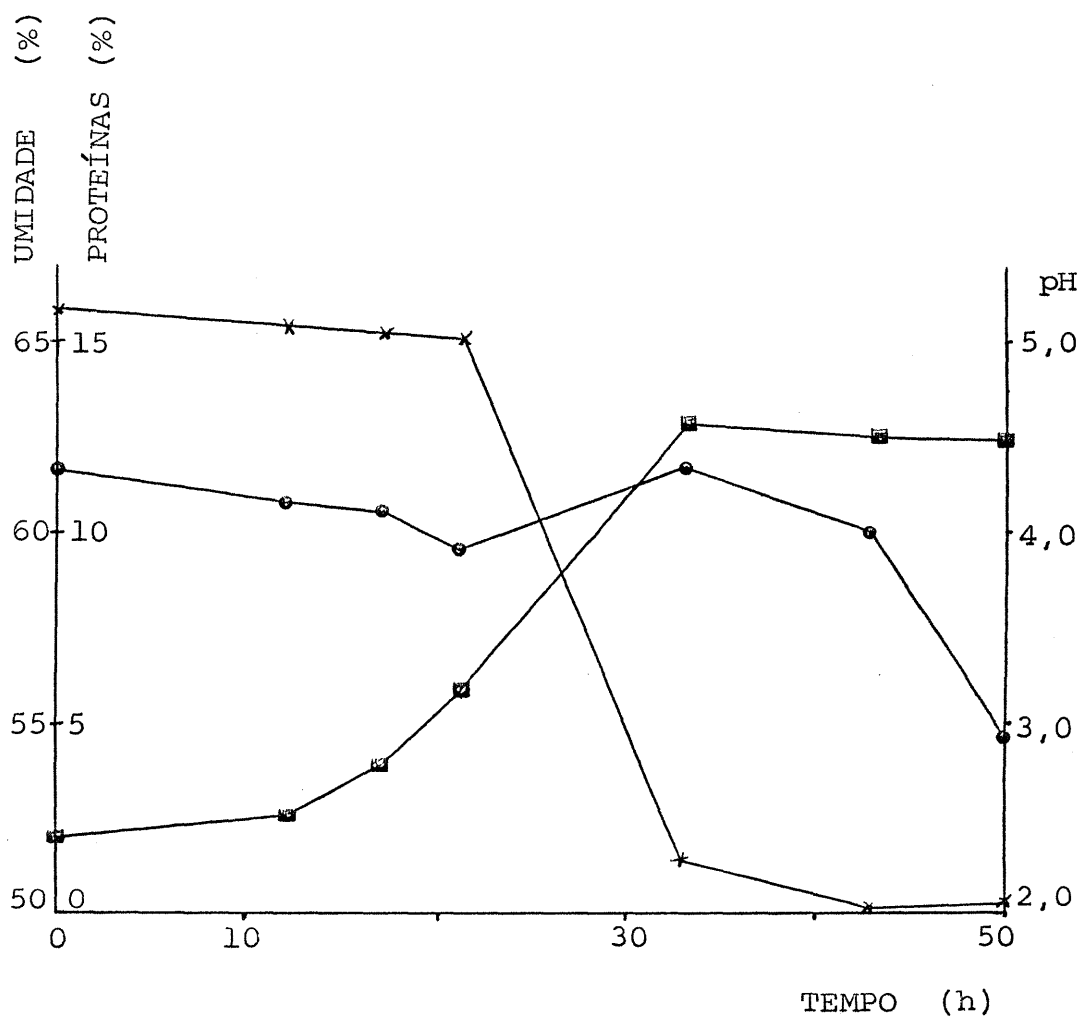


FIGURA 29. Modificações de Umidade, pH e Proteínas em Função do Tempo de Fermentação.

*A. niger* cepa nº 2003.

●-●-● : Umidade

x-x-x : pH

■-■-■ : Proteínas

Tratando-se de fungos utilizados tradicionalmente em alimentos fermentados, esses resultados foram os previstos.

WILSON et alii<sup>123</sup> estudaram 29 espécies de fungos, encontrando somente a síntese de aflatoxina para o **Aspergillus flavus** e **A. parasiticus**.

Os resultados obtidos evidenciaram que, dentre todos os fungos ensaiados, o **Aspergillus oryzae** cepa nº 46.244 mostrou maior uniformidade dos resultados, embora todos os fungos tenham apresentado elevação protéica.

Dessa maneira, a seleção do **A. oryzae** não foi, portanto, senão a escolha do que mostrou maior uniformidade dos resultados, associada a acentuada elevação protéica, dentro das condições de cultivo pré-fixadas.

#### 4.6 FERMENTADOR

A realização de ensaios com os diversos tipos de fermentadores selecionados, para processo em escala piloto, possibilitaram resultados pouco diversos entre si. A elevação proteica, obtida em bandejas de madeira e de alumínio, foram semelhantes, não resultando em diferença expressiva (0,3%). Comparando a fermentação em bandeja com a em peneira, obteve-se uma diferença de no máximo 1% no conteúdo protéico, em favor da peneira. Como as diferenças não foram acentuadas, analisou-se em função da recuperação do produto final e da facilidade de assepsia do fermentador. Nesse sentido, as bandejas de alumínio apresentaram-se mais vantajosas, pois além de permitirem a secagem direta do material após a fermentação, possibilitaram pronta remoção do material e fácil assepsia.

Deve-se ressaltar ainda que o uso de peneiras conduzem a uma perda de umidade, de até 8% de diferença, em relação a bandeja, no final da fermentação, como mostra a Figura 30.

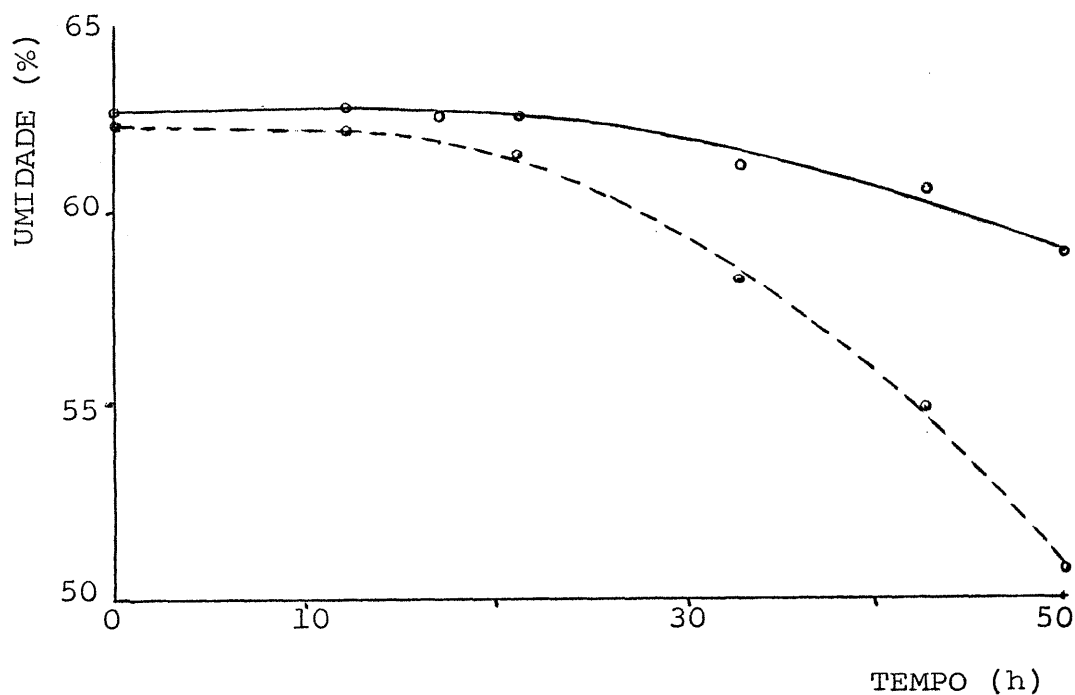


FIGURA 30. Variação da Umidade em Função do Tipo de Fermentador Utilizado, em Relação ao Tempo de Fermentação.

— bandeja de alumínio  
 --- peneira

Essa diferença tornou-se significativa quando da utilização de substratos com umidade inicial próxima a 60%. A esporulação do fungo iniciou-se em 38h de fermentação, enquanto que, no exemplo da Figura 30, a esporulação iniciou após 44h. Com o uso de bandeja, a esporulação só foi evidenciada após 48h de fermentação.

A mandioca fermentada em peneira é mostrada na Figura 31.



FIGURA 31. Fermentação da Mandioca em Peneira.

**A. oryzae** cepa nº 46.244

#### 4.7 FERMENTAÇÃO

As condições de processo para o enriquecimento protéico da mandioca são mostradas no Quadro 7.

QUADRO 7. Condições de Processo para o Enriquecimento Protéico da Mandioca.

---

COMPOSIÇÃO DA MANDIOCA COZIDA:

Umidade (B.U.)	60-70%
Proteínas (B.S.)	1,40-2,90%
Amido (B.S.)	70-82,5%

COMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO:

Mandioca cozida	100g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,5g
Camada (espessura)	2-3cm

FERMENTADOR:

Bandeja de alumínio

MICROORGANISMO:

**Aspergillus oryzae** cepa 46244 da ATCC

CONDIÇÕES DE CULTIVO:

Temperatura	20-30°C
Umidade Relativa	85-100%
Inóculo	$1 \times 10^6$ esporos/g
pH	4,5-5,5
Tempo de fermentação	40h

COMPOSIÇÃO DA FARINHA ENRIQUECIDA:

Umidade	5-8%
Proteínas	10-17%

---

Sob as condições de processo constantes do Quadro 7, desenvolveu-se processo fermentativo que permitiu a elaboração do Quadro 8.

QUADRO 8. Composição Química da Farinha de Mandioca Enriquecida pelo *A. oryzae* cepa nº 46.244 da ATCC.

COMPONENTES	%
Umidade	7,32
Proteínas	16,98
Amido	48,38
Lipídios	2,00
Fibras	7,68
Cinzas	3,82

As condições iniciais do substrato foram:

- umidade: 60,55%
- proteínas: 2,42%
- amido: 81,58%

A fermentação foi desenvolvida em bandeja de alumínio, mantida coberta durante o desenvolvimento do processo, como mostra a Figura 32.

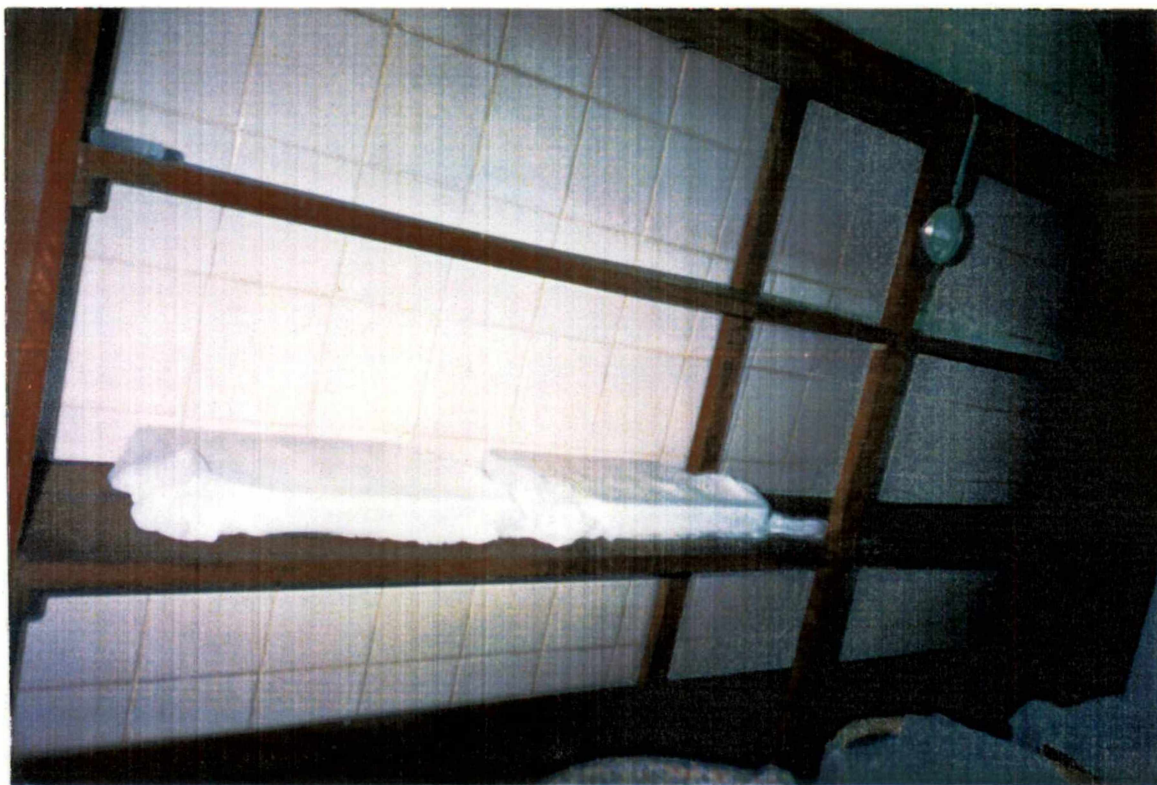


FIGURA 32. Fermentador Coberto Durante o Processo Fermentativo.

A cada 12 horas, o material foi revolvido e a atmosfera gasosa trocada.

Após 40h de fermentação, o material se encontrava pronto, como na Figura 33, bastando ser seco e moído.

Durante essas 40h, foram retiradas amostras, que depois de analisadas permitiram a construção das curvas de variação da umidade, do pH, das proteínas e do amido durante o processo fermentativo. Essas curvas encontram-se nas Figuras 34 a 38.

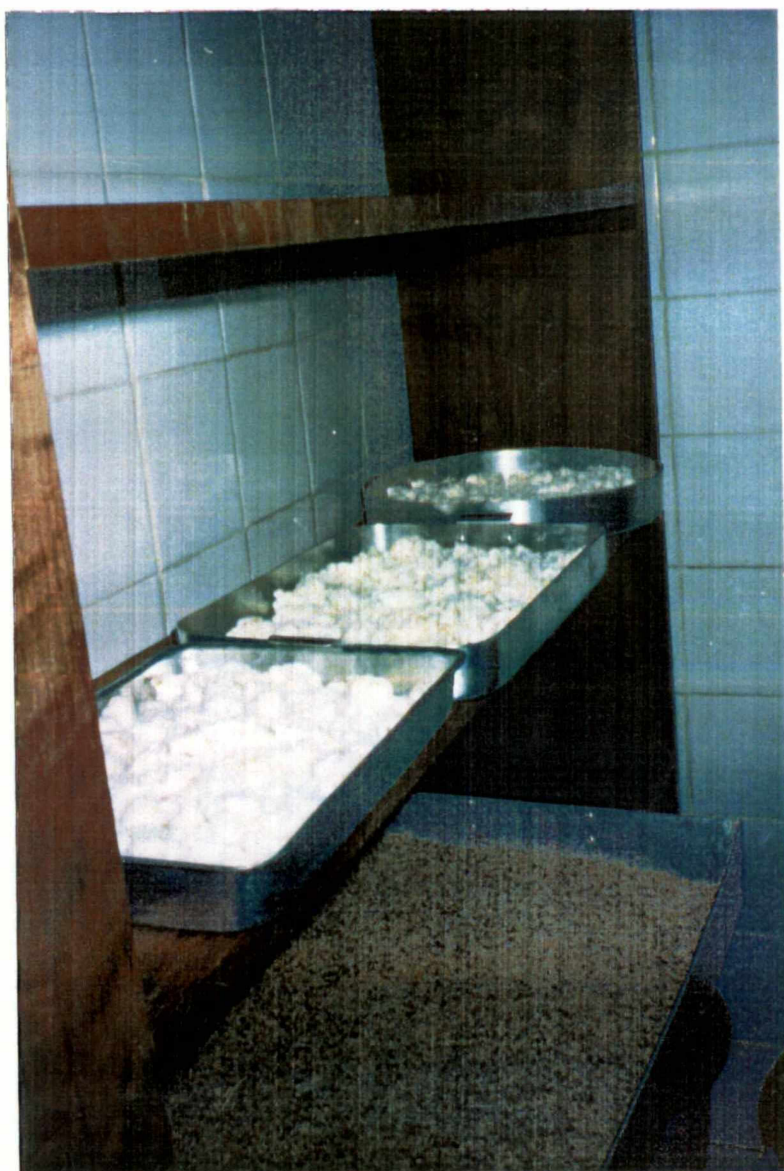


FIGURA 33. Mandioca Fermentada.

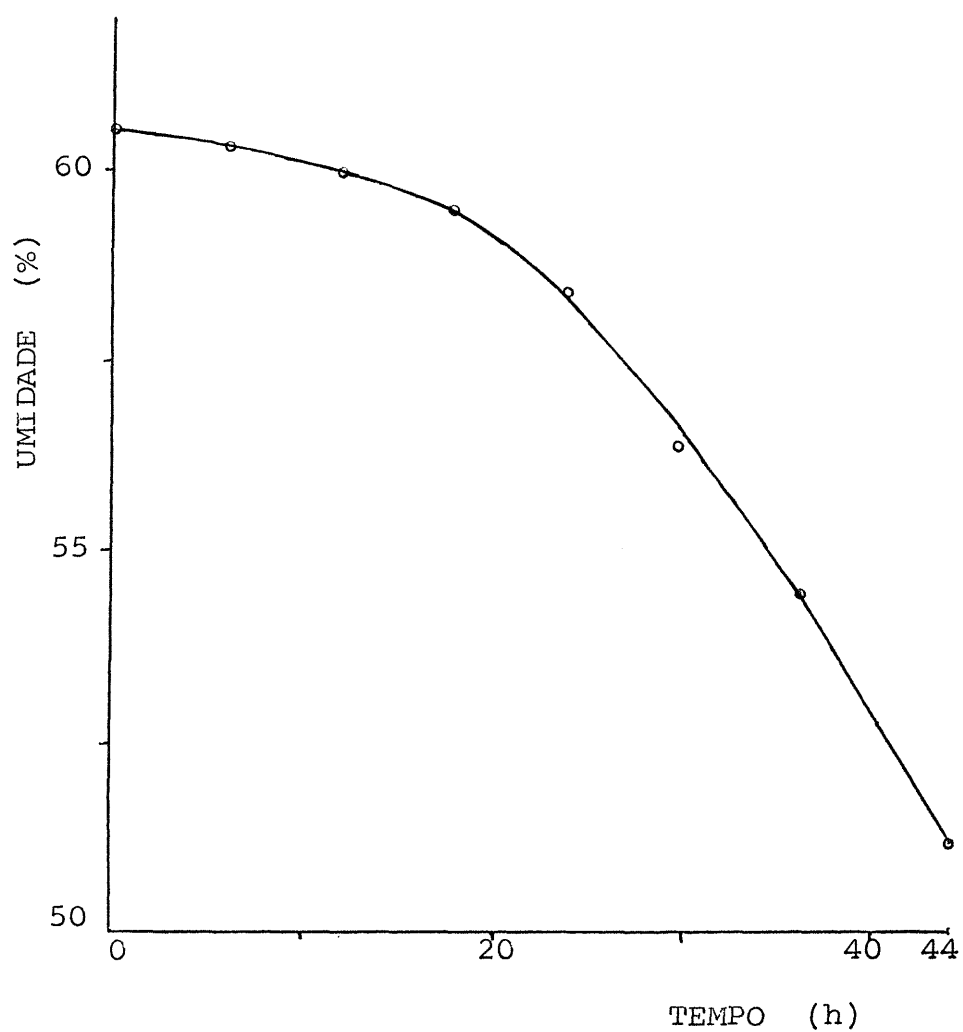


FIGURA 34. Variação da Umidade em Função do Tempo de Fermentação.

*A. oryzae* cepa nº 46244.

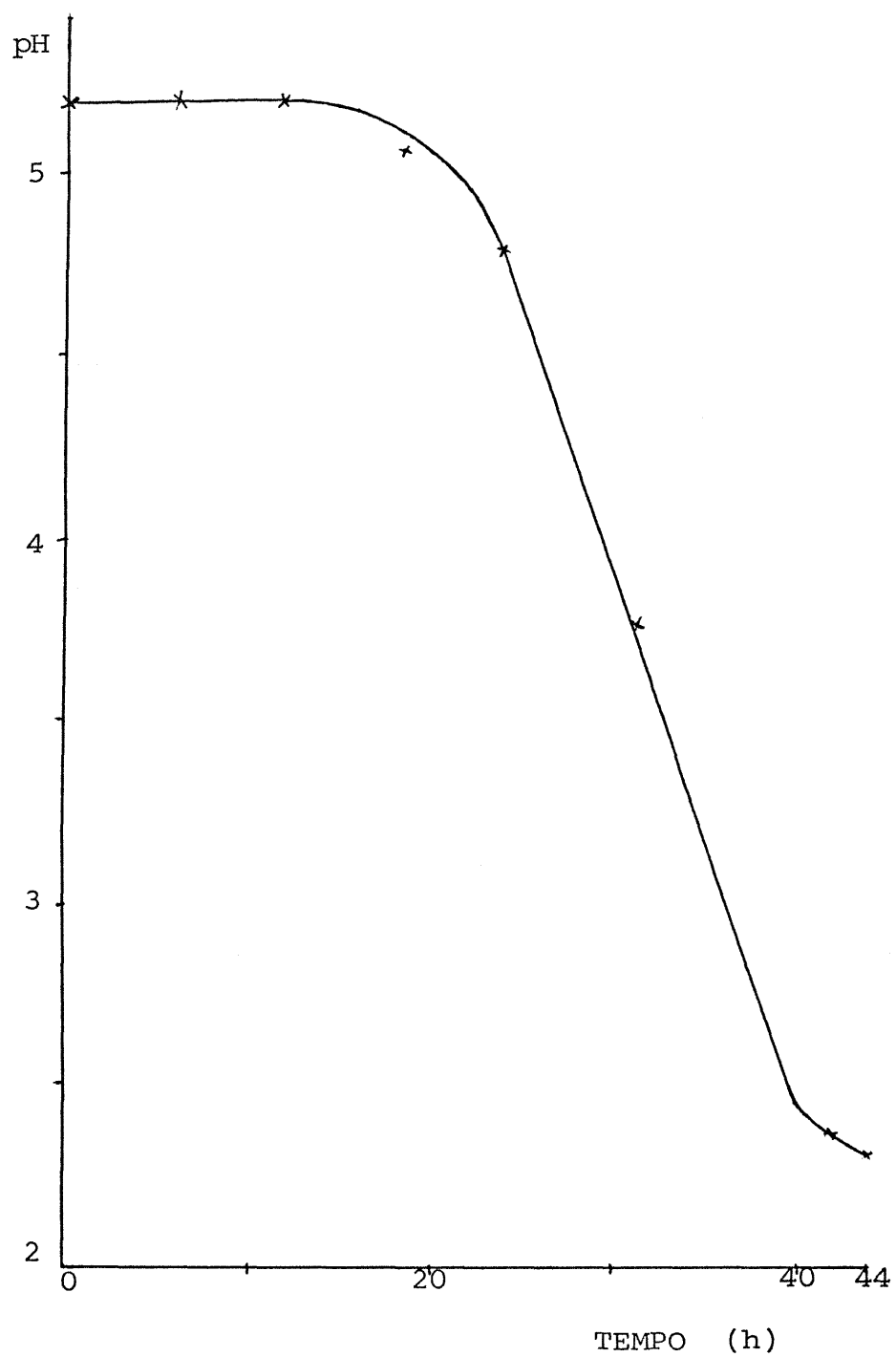


FIGURA 35. Variação do pH em função do Tem  
po de Fermentação.

*A. oryzae* cepa nº 46244.

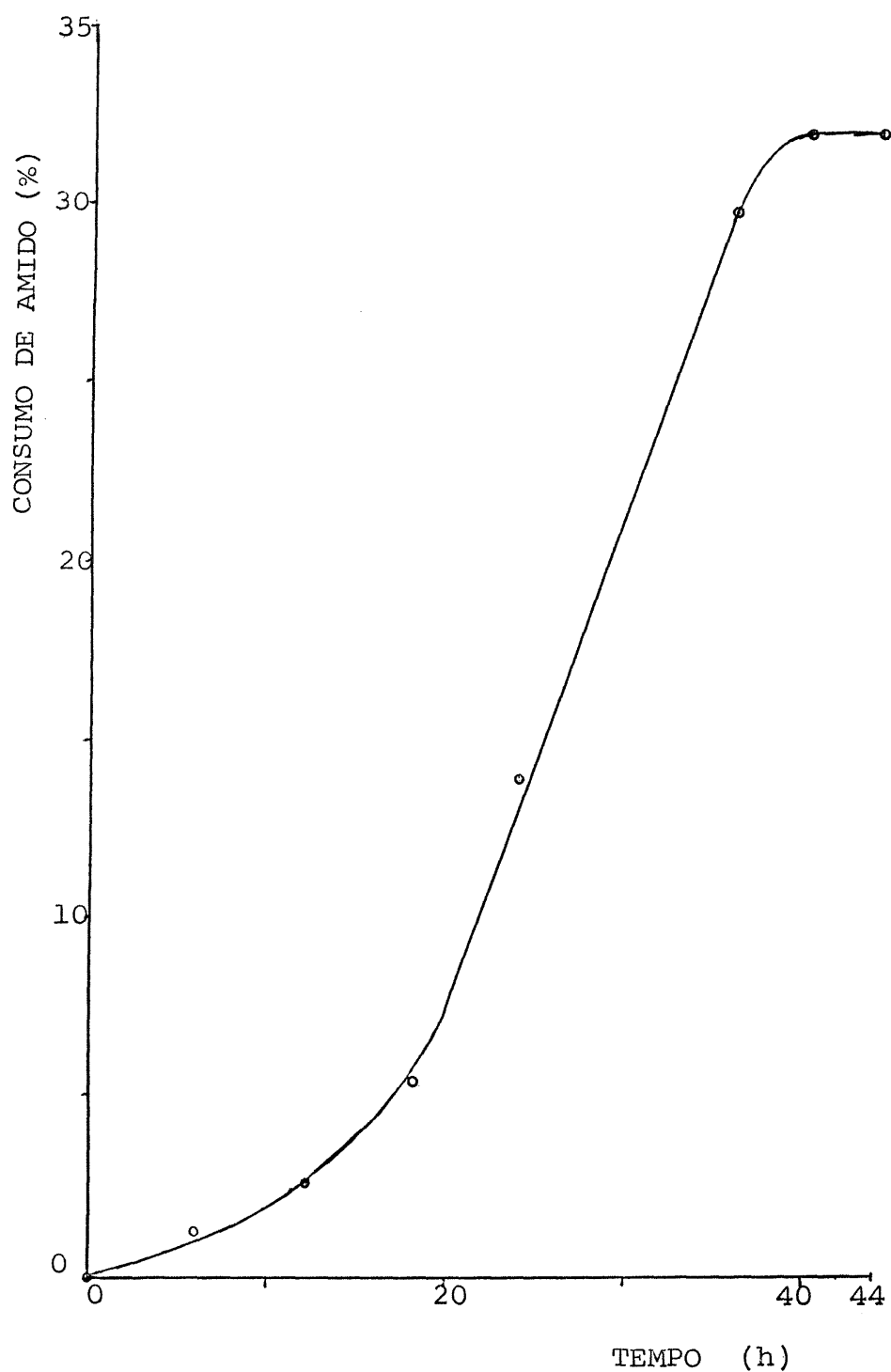


FIGURA 36. Consumo do Amido com o Tempo de Fermentação.

***A. oryzae*** cepa nº 46244.

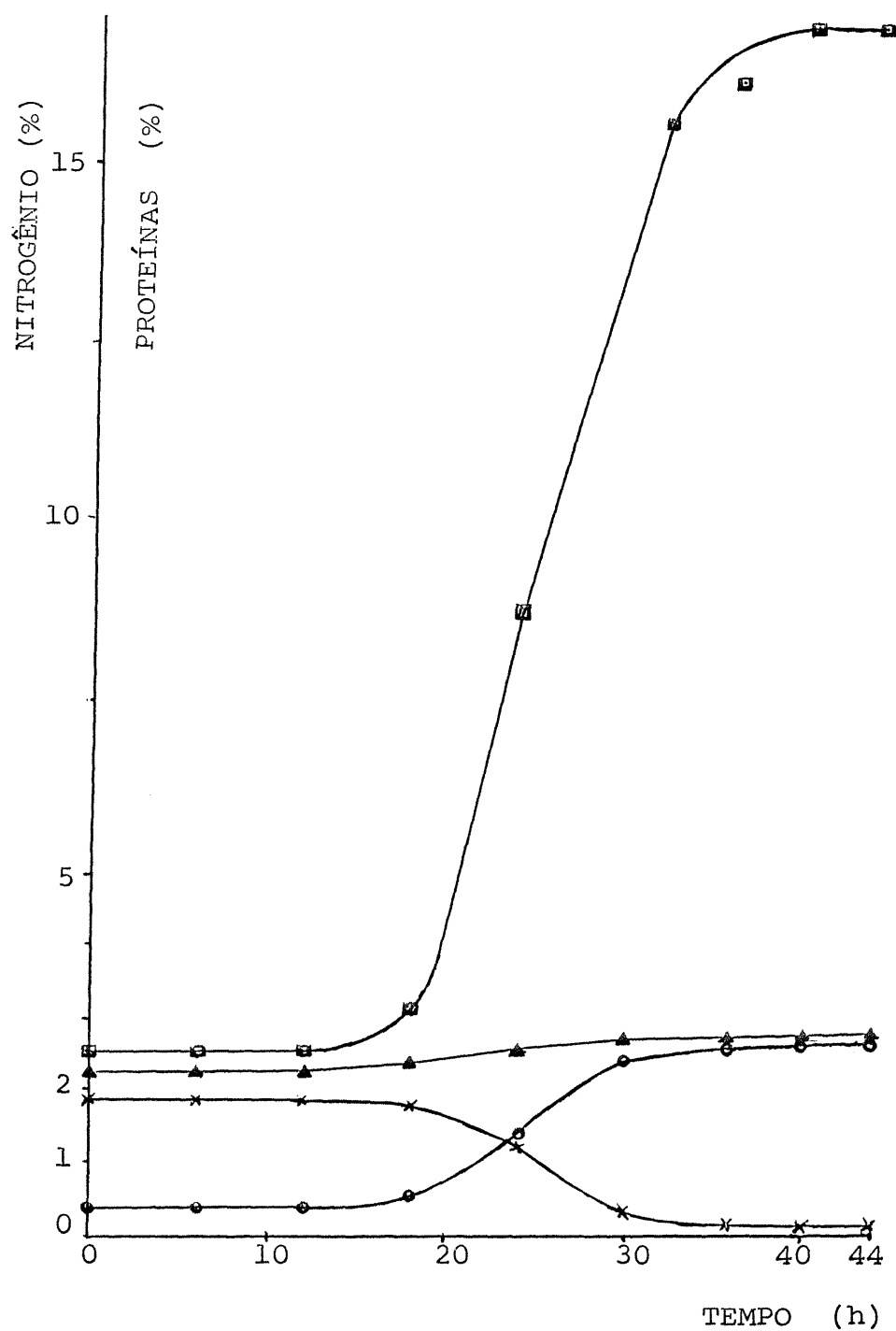


FIGURA 37. Variação do Teor de Nitrogênio com o Tempo de Fermentação.

▲-▲-▲: Nitrogênio Total

x-x-x: Nitrogênio Inorgânico

●-●-●: Nitrogênio Orgânico

■-■-■: Proteínas

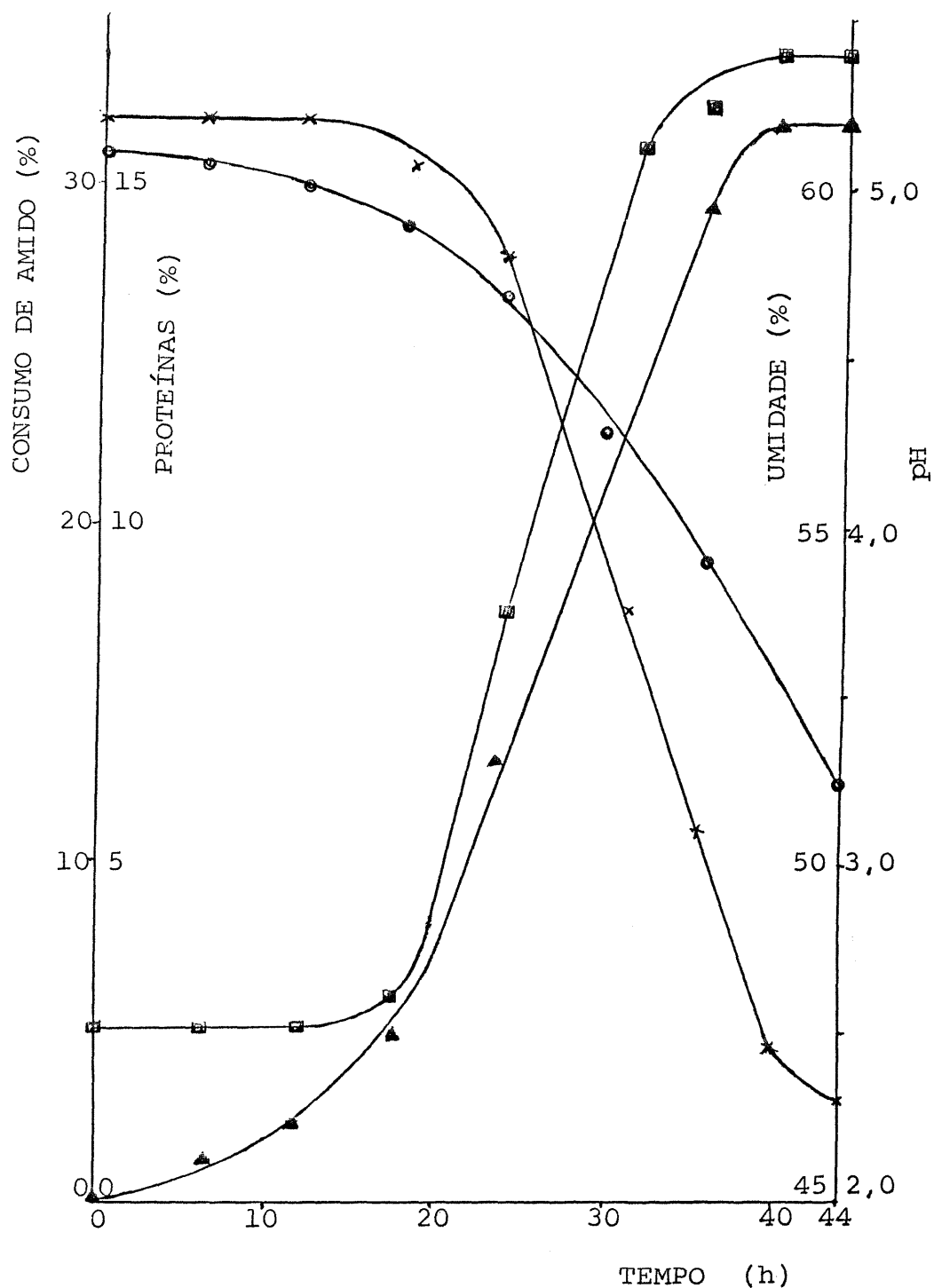


FIGURA 38. Modificações nos teores de Umidade, pH, Amido e Proteínas durante a Fermentação.

●-●-●: Umidade

x-x-x: pH

▲-▲-▲: Amido

■-■-■: Proteínas

A mandioca fermentada foi seca em estufa a 60°C, até umidade inferior a 10%, e moída.

A farinha de mandioca enriquecida foi então avaliada quanto a população de fungos e bactérias. A determinação do número mais provável de bactérias do grupo coliforme fecal foi também realizada. Os resultados obtidos são apresentados no Quadro 9, juntamente com os valores fixados por lei.

QUADRO 9. Microrganismos Presentes na Farinha de Mandioca Enriquecida e os Permitidos na Farinha de Mandioca pela Legislação Vigente.

FARINHA DE MANDIOCA	FUNGOS Esporos/g Farinha	BACTÉRIAS Esporos/g Farinha	BACTÉRIAS DO GRUPO COLIFOR <u>ME</u> FECAL N.M.P./g farinha
Comum*	$1 \times 10^4$	--	10
Enriquecida	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	ausente

\* FONTE: MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E DO COMÉRCIO<sup>72</sup>.

O tratamento em luz ultravioleta, por 15 min, permitiu a redução de 10% do número de esporos viáveis de fungos e de bactérias. Com essa redução obteve-se as seguintes contagens, para os fungos e bactérias:

Fungos =  $1 \times 10^3$  esporos/g de farinha  
 Bactérias =  $1 \times 10^4$  esporos/g de farinha

Dessa maneira, o número de esporos fúngicos presentes na farinha de mandioca enriquecida se enquadrava no padrão legal.

Quanto ao número de esporos de bactérias presentes, nada consta no dispositivo legal. Procedendo-se a identificação da bactéria, constatou-se a presença do **Bacillus subtilis**. Segundo ROSEMBERG<sup>88</sup>, essa bactéria é forma comum do solo, podendo permanecer na farinha de mandioca após processamento.

## 5 CONCLUSÕES

A mandioca, uma das principais culturas brasileiras, possui relevante importância no contexto nacional, mais pelo seu emprego como alimento humano do que para outros fins.

Tratando-se de um tubérculo de baixo teor em proteínas, este trabalho procurou estudar o seu enriquecimento protéico pela fermentação sólida, em sistema estático, utilizando fungos filamentosos.

Para a obtenção deste enriquecimento, procurou-se a simplificação do método, utilizando a mandioca cozida diretamente, como substrato. Foram utilizados equipamentos simples, como aquecedor ambiental, higrômetro, lâmpadas ultravioleta, bandejas de alumínio, entre outros.

Os valores obtidos para o enriquecimento protéico da mandioca foram a níveis de 10 a 17%, nas condições de processo identificadas.

O acréscimo no teor de proteínas foi de 558,54%, em média, passando de 2,05% da farinha de mandioca cozida para 13,50% na farinha de mandioca enriquecida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIOSE, S.H. et alii. Microbiology and Biochemistry of miso (soy paste fermentation). Advances in Applied Microbiology, 28:239-65, 1982.
2. AGRICULTURA. Comportamento das lavouras. Agroanalysis, 12(12): 32, 1988.
3. AIDOO, K.E. et alii. Solid substrate fermentations. Advances in Applied Microbiology, 28:201-37, 1982.
4. AKINRELE, I.A. Fermentation of cassava. Journal of the Science of Food and Agriculture, 15(9):589-94, 1964.
5. ALBUQUERQUE, M. Mandioca. Belém. IPEAN-Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuária do Norte, v.1, n. 2, 1970. 65p.
6. AOAC. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. Ed. by Sidney Willians. 14.ed. Virginia, 1984. 1141p.
7. AU, P.M. & FIELDS, M.L. Nutritive quality of fermented sorghum. Journal of Food Science. 46:652-4, 1981.
8. AYERST, G. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. Journal Stored Prod. Res. 5:127-41, 1969.
9. AYRES, J.C. Manioc: The potencial existe for increased use of this tropical plant and its products. Food Technology, (4):128-33, 1972.
10. AZOULAY, E. et alii. Fermentation methods for protein enrichment of cassava and corn with **Candida tropicalis**. Applied and Environmental Microbiology, 39(1):41-7, 1980.
11. BAYLEY, K.V. Rural nutrition studies in Indonesia. III. Epidemiology of hunger oedema in the cassava areas. Tropical and Geographical Medicine, 13:289-302, 1961.
12. BAJRACHARYA, R. & MUDGETT, R.E. Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. Biotechnology and Bioengineering, 22:2219-35, 1980.
13. BANCO DO NORDESTE DO BRASIL S/A. Botânica agrícola - pragas e moléstias da mandioca. Fortaleza, Departamento de Assuntos Econômicos do Nordeste, 1968. 27p.

14. \_\_\_\_\_. Considerações sobre a análise do ácido cianídrico em mandioca e seus produtos manufaturados. Fortaleza, Departamento de Assuntos Econômicos do Nordeste, 1968. 24 p.
15. BEUCHAT, L.R. Fermented soybean foods. Food Technology, (6):64-70, 1984.
16. BORZANI, W. et alii. Cultivo de microrganismos em meios contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. II. Modelo cinético para o cultivo de **A. niger** NRRL 337 em frascos agitados. Revista Brasileira de Tecnologia, 6:125-32, 1975.
17. BRASIL é o maior produtor de mandioca mas tem problemas de comercialização. O Indicador Rural, Rio de Janeiro, 2 (30):8, março 1983.
18. BRESSANI, R. & ELIAS, L.G. Processed vegetable protein mixtures for human consumption in developing countries. Advances in Food Research, 16:1-103, 1968.
19. BROOK, E.J. et alii. Fermentation methods for protein enrichment of cassava. Biotechnology and Bioengineering, 11:1271-84, 1969.
20. CANNEL, E. & MOO-YOUNG, M. Solid-state fermentation systems. Process Biochemistry, 15(5):2-7, 1980.
21. \_\_\_\_\_. Solid-state fermentation systems. Process Biochemistry, 15(6):24-8, 1980.
22. CARRIZALEZ, V. et alii. Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. Biotechnology and Bioengineering, 23:321-33, 1981.
23. CIAT. Industrialización de la yuca. 1902-1984. Compilado de la base de datos del Centro de Información sobre yuca del CIAT. Cali, Unidade de Comunicaciones e Información, 1986.
24. CONCEIÇÃO, A.J. A Mandioca, 2.ed. São Paulo, Livraria Nobel, 1981. 382p.
25. DABBAH, R. Protein from microorganisms. Food Technology, 24(6):35-42, 1970.
26. DURAND, A. & CHEREAU, D.A. New Pilot Reactor for solid-state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp. Biotechnology and Bioengineering, 31:476-86, 1988.
27. EL-DASH, A.A. Utilização da mandioca na alimentação humana e em outros produtos industrializados. In: SECRETARIA DO ESTADO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, 13(145):74-82, 1987.

28. ENRICHING cassava with microbes. New Scientists, 45(684): 108, 15 jan 1970.
29. FERNANDES, V.M.V. & NICOLI, J.R. Production of protein from the thermotolerant fungus **Phanerochaete chrysosporium**, using the brown juice from a protein extract of cassava leaves as substract. Revista de Microbiologia, 12(4):121-4, 1981.
30. FERREIRA, A.B.H. Novo Dicionário da Língua Portuguesa, 2. ed. Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 1986. 1838p.
31. FREITAS, R.J.S. et alii. Técnicas Analíticas de Alimentos Curitiba, Instituto de Tecnologia do Paraná, 1979. 1114p.
32. GANDHI, A.P. & KJAER GAARD, L. Effect of carbon dioxide on the formation of -amilase by **Bacillus subtilis** growing in continuous and batch cultures. Biotechnology and Bioengineering, 17: 1109-18, 1975.
33. GELLI, D.S. Curso de Atualização em Microbiologia de Alimentos. Curitiba, 1985.
34. GRAJEK, W. Production of protein by thermophilic fungi from sugar-beet pulp in soli-state fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 32:255-60, 1988.
35. GRAMACHO, D. Contribuição ao Estudo Químico das Raízes de mandioca. Salvador, Instituto de Química Agrícola e Tecnologia da Bahia, v.1, jun 1947. 28p.
36. GRAY, W.D. Microbial protein for the space age. Developings Industrial Microbiology, 3:63-71, 1962.
37. \_\_\_\_\_. Fungal protein for food and feeds. I. Introduction. Economic Botany, 20:89-93, 1966.
38. \_\_\_\_\_ & ABOU-EL-SEOUD, M.O. Fungal protein for food and feeds. III. Manioc as a potential crude raw material for tropical areas. Economic Botany, 20:251-5, 1966.
39. GREGORY, K.F. et alii. Conversion of carbohydrates to protein by high temperature fungi. Food Technology, 30(3): 30-5, 1976.
40. HAN, Y.W. & ANDERSON, A.W. Semisolid fermentation of rye-grass straw. Applied Microbiology, 30(6):930-4, 1975.
41. HARRIS, R.V. Effect of **Rhizopus** fermentation on the lipid composition of cassava flour. Journal of the Science of Food and Agriculture, 21(12):626-7, 1970
42. HECHT, V. et alii. Conversion of cellulose into fungal cell mass in solid-state culture. Applied Microbiology and Biotechnology, 21:189-91, 1985.
43. HEDENSKOG, G. & MOGREN, H. Some methods for processing of single-cell protein. Biotechnology and Bioengineering, 15:129-42, 1973

44. HESSELTINE, C.W. A millenium of fungi, food, and fermentation. Mycologia, 57(2):147-97, 1965.
45. \_\_\_\_\_ & WANG, H.L. Traditional fermented foods. Biotechnology and Bioengineering, 9:275-88, 1967.
46. \_\_\_\_\_. Biotechnology report. Biotechnology and Bioengineering, 14:517-32, 1972.
47. \_\_\_\_\_. Solid-state fermentation. Part 1. Process Biochemistry, 12(4):24-7, 1977.
48. \_\_\_\_\_. Solid-state fermentation. Part 2. Process Biochemistry, 12(6):29-31, 1977.
49. \_\_\_\_\_. Future of fermented foods. Process Biochemistry, 16(3):2-13, 1981.
50. \_\_\_\_\_. Future of fermented foods. Nutrition Reviews, 41(10):293-301, 1983.
51. HOHNHOLZ, J.H. Manioc cultivation in South East Asia. Applied Geography and Development, 16: 117-35, 1980.
52. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3.ed. São Paulo, O Instituto, 1985. 533p.
53. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estudo nacional de despesa familiar. Rio de Janeiro, 1977.
54. INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Curso de Microbiologia de Alimentos. Campinas, O ITAL, 1979. 104p.
55. JOHNSON, R.M. & RAYMOND, W.D. The chemical compositions of some tropical food plants. IV. Manioc. Tropical Science, 7(3):109-15, 1965.
56. JUCHEM, P.A. Reflexão sobre a fome. Revista Ipardes, 1(2):57-71, jun 1979.
57. KATO, M.S.A. & SOUZA, S.M.C. Conservação de raízes após a colheita. In: SECRETARIA DO ESTADO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, 13(145):9-16, 1987.
58. KIHLEBERG, R. The microbe as a source of food. Annual Review of Microbiology, 26:427-66, 1972.
59. KING, C.G. Protein malnutrition: a major internacional problem. News Report, 12(3):37-9, 1962.
60. KNAPP, J.S. & HOWEL, J.A. Solid-substrate fermentation. In: WISEMAN, A. Topics in Enzyme and Fermentation technology. Ellis Honwood Ltd, Chichester. v.4, 1980.p 85-143.

61. KONO, T. & ASAI, T. Kinetics of fermentation process. Biotechnology and Bioengineering, 11:293-321, 1969.
62. LANARA. Métodos Microbiológicos. Brasília, Ministério da Agricultura, 1981.
63. LAUKEVICS, J.J. et alii. Solid-substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. Biotechnology and Bioengineering, 24:1465-74, 1984.
64. \_\_\_\_\_. Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid-substrate fermentation of wheat straw. Biotechnology and Bioengineering, 27:1687-91, 1985.
65. LEITÃO, R.F.F. et alii. A mistura do trigo, milho, mandioca e soja em pastas alimentícias. Boletim do ITA, 50:187-204, 1967.
66. LEVANON, Y. Biotecnologia. Lorena, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, v.1 e v.2.
67. LINDENFELSER, L.A. & CIEGLER, A. Solid-substrate Fermentor for Ochratoxin A production. Applied Microbiology, 29(3):323-7, 1975.
68. LONSANE, B.K. et alii. Engineering aspects of solid-state fermentation. Enzyme Microbiology and Technology, 7(6):258-65, 1985.
69. MARTINELLI FILHO, A. & HESSELTINE, C.W. Tempeh fermentation: package and tray fermentations. Food Technology, 18(5):167-71, 1964.
70. Mc LOUGHLIN, A.J. Fermentation of pollulants. Process Biochemistry, 7(1):27-9, 1972.
71. MEIERING, A.G. et alii. Microbial protein from whey and cassava. Transactions of the Asae, 21(3):586-93, 1978.
72. MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E DO COMÉRCIO. Beneficiamento e Industrialização da Mandioca. São Paulo, MIC, v.2. 42p
73. MOHR, W. Análises químicas de 115 variedades de manihot utilíssima cultivada no campo experimental de mandioca, em Capila, município de Cai. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Rio Grande do Sul, 1944. 18p.
74. MUINDI, P.J. & HANSSEN, J.F. Protein enrichment of cassava root meal by *Trichoderma harzianum* for animal feed. Journal of the Science of Food and Agriculture, 32:655-61, 1981.
75. NARAHARA, H. et alii. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. Journal of Fermentation Technology, 60(4):311-9, 1982.

76. NISHIO, N. et alii. Hydrolase production by **Aspergillus niger** in solid-state cultivation. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 8:263-70, 1979.
77. ORIOL, E. et alii. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by **Aspergillus niger**. Applied Microbiology and Biotechnology, 27: 498-503, 1988.
78. PAMMENT, N. et alii. Solid-state cultivation of **Chaetomium cellulolyticum** on alkali-pretreated sawdust. Bio-technology and Bioengineering, 20:1735-44, 1978.
79. PIZZINATTO, A. & VITTI, P. Pães mistos de trigo, soja e mandioca. Coletânea do ITAL, 6(1):189-202, 1975.
80. RAIMBAULT, M. & ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 9:199-209, 1980.
81. \_\_\_\_\_ et alii. Protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation using molds isolated from Traditional foods. Journal of Fermentation Technology, 63(4):395-399, 1985.
82. RANGEL, J.C. A cultura da mandioca e sua industrialização. In: Reunião da Sociedade Rural Brasileira, São Paulo. 17(204):38-43, ago 1937.
83. READE, A.E. & GREGORY, K.F. High-temperature production of protein enriched feed from cassava by fungi. Applied Microbiology, 30(6):897-904, 1975.
84. REIS, A.J. Aspectos Econômicos da Mandioca. In: SECRETARIA DO ESTADO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 13(145):5-8, 1987.
85. REVUZ, B. & VOISIN, D. Le Manioc protéiné, procédé Adour Speichim. Industries Alimentaires et Agricoles, 35:1079-84, 1980.
86. RIBEIRO FILHO, J. Cultura da Mandioca. Viçosa, Escola Superior de Agricultura, 1976. 80p.
87. ROGERS, D. Some botanical and ethnological considerations of **Manihot esculenta**. Economic Botany, 19(10):369-77, 1965.
88. ROSEMBERG, J.A. Pesquisa do conteúdo microbiano da farinha de mandioca. Arquivos de Fermentação, 2:85-93, 1957.
89. SALES, A.M. Enriquecimento da Farinha de Mandioca por Fermentação. Campinas, 1972. 62p. Tese, Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
90. \_\_\_\_\_ & MENEZES, T.J.B. Produção de biomassa protéica de mandioca. Coletânea do ITAL, 7:139-46, 1976.

91. SANTOS, J. & GOMEZ, G. Production of fungal protein from rasped fresh cassava roots using 200 and 3000 litres fermentors. Animal Feed Science and Technology, 8(4):314-24, 1983.
92. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Fungal protein produced on cassava for growing rats and pigs. Journal of Animal Science, 56(2):264-70, 1983.
93. SCRIMSHAW, N.S. & BEHAR, M. Protein malnutrition in young children. Science, 133: 2039-47, 1961.
94. \_\_\_\_\_. Nutrition and infection. Journal American Medical Women's Association, 17(5):422-6, 1962.
95. SEBRELL, W. Jr. World aspects of protein malnutrition Proc. Conf. on soybean products for protein in human foods (USDA), 1961. p3-12.
96. SENEZ, J.C. Solid Fermentation of starchy substrates. Food and Nutrition Bulletin, 1(2):18-20, 1979.
97. SHIBASAKI, K. & HESSELTINE, C.W. Miso fermentation. Economic Botany, 16:180-95, 1962.
98. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Miso. II. Fermentation. In: Developments in Industrial Microbiology. New York, Plenum Press, 1981. p205-16. v.2.
99. SHIEH, Y.S.C. & BEUCHAT, L.R. Microbial changes in fermented peanut and soybean pastes containing kojis prepared using *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*. Journal of Food Science, 47:518-22, 1982.
100. SILMAN, R.W. Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. Biotechnology and Bioengineering, 22:411-20, 1980.
101. SOCCOL, C.R. Aproveitamento do resíduo de soja da fabricação do extrato hidrossolúvel para elaboração de pasta de soja fermentada. Curitiba, 1986. 113p. Tese, Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
102. SPICER, A. Protein production by microfungi. Tropical Science, 13(4):239-50, 1971.
103. STEVENS, C.A. & GREGORY, K.E. Production of microbial biomass protein from potato processing wastes by *Cephalosporium eichorniae*. Applied and Environmental Microbiology, 53(2):284-91, 1987.
104. STRASSER, J. et alii. Process enriches cassava with protein. Food Engineering, (5):112-6, 1970.
105. TANNENBAUM, S.R. Single-cell protein food of the future. Food Technology, 25(9):98-102, 1971.

106. TELES, F.F. Técnicas de liberação do ácido cianídrico e toxidez cianogênica das mandiocas. In: SECRETARIA DO ESTADO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 13(145):18-22, 1987.
107. TOSELLO, A. As farinhas na alimentação brasileira. Boletim do ITAL, 21(3):1-9, 1970.
108. \_\_\_\_\_. A indústria de alimentos no Brasil. Boletim do ITAL, 23:1-12, 1970.
109. TREVELYAN, W.E. The enrichment of cassava with protein by moist-solids fermentations. Tropical Science 16(4):179-94, 1974.
110. TRINCI, A.P.J. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. Journal General Microbiology, 57:11-24, 1969.
111. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH EDUCATION AND WELFARE. Bacteriological Analytical Manual for Foods. 6ed. Food and Drug Administration, 1984.
112. VANNESTE, G. Enrichissement protéinique du manioc par fermentation fongique. Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires, 37(1):19-24, 1982.
113. VAN VEEN, A.G. Fermented protein rich foods. FAO Report. nº FAO 57.
114. \_\_\_\_\_ & STEINKRAUS, K.H. Nutritive value and wholesomeness of fermented foods. Journal Agriculture Food Chemistry, 18(4):576-8, 1970.
115. VENOSA, C.M.S. et alii. Cultivo de microorganismos 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. Revista Brasileira de Tecnologia, 6:117-32, 1975.
116. VILELA, E.R. & JUSTE Jr, E.S.G. Tecnologia da farinha de mandioca. In: SECRETARIA DO ESTADO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 13(145):60-3, 1987.
117. VITTI, P. et alii. Variedades de mandioca para o preparo de "pellets". Boletim do ITAL, 58:47-61, 1978.
118. \_\_\_\_\_ et alii. Obtenção de raspas de mandioca obtidas por dois processos - uso de suas farinhas em panificação. Boletim do ITAL, 59:89-98, 1978.
119. \_\_\_\_\_ et alii. Folhas de mandioca desidratadas para fins de alimentação humana. Coletânea do ITAL, 4:117-25, 1971/1972.

120. YAMAMOTO, K. Studies on koji. Bulletin Agriculture Chemistry Society Japan, 21(5):319-24, 1957.
121. WANG, H.L. & HESSELTINE, C.W. Wheat temp. Cereal Chemistry, 43(5):563-70, 1966.
122. WATERLOW, J.C., et alii. Protein malnutrition in man. Advances in Protein Chemistry, 15:131-238, 1960.
123. WILSON, B.J. et alii. Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the **Aspergillus flavus** group. Applied Microbiology, 16(6):819-21, 1968.
124. WOOD, T. The cyanogenic glucoside content of cassava and cassava products. Journal of the Science of Food and Agriculture, 16(6):300-5, 1965.
125. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO Expert Group. WHO Technical Report Serie n° 301, 1965.