

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA FÚNGICA EM RAIZ E FOLHA
DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

MARIA ANGELA AMAZONAS ALMEIDA DA SILVA

Pesquisador da EMBRAPA - CNPMF

Orientador: Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Maio, 1978

A meus pais e irmãos
A Gildo e Adriana

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

Sinceros agradecimentos deverão ser dirigidos:

- Ao Professor Dr. Rodolpho de Camargo, pela segura orientação e estímulo na execução deste trabalho e contribuição para a minha formação de pesquisadora.
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pelo apoio financeiro concedido.
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de modo particular ao Departamento de Tecnologia Rural, pelas facilidades oferecidas para execução do presente trabalho.
- À Chefia e colegas do Centro Nacional de Pesquisas de Mandioca e Fruticultura da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNPMPF).
- Ao Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ, nas pessoas dos Professores Dr.^s Otávio Valsechi, então Chefe do Departamento, e Dr. Homero Fonseca, pela autorização da liofilização e determinação de aflatoxina em materiais inerentes a este trabalho.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, nas pessoas dos Professores Dr.^s Otto J. Crocomo, Henrique Bergamin Filho e Francisco José Krug, pela autorização das análises de aminoácidos e nitrogênio total.
- Aos Professores Dr.^s Roland Vencovsky e Humberto de Campos e ao colega da EMBRAPA/CNPMPF Ranulfo Correia Caldas, pelas sugestões durante as análises estatísticas dos dados.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ.

Aos amigos Gustav e Daisy Westhoff, Dr. Jonas Vaz de Arruda e Maria de Lourdes Ortolani Arruda, Dr. Aloísio e Augusta Viana, Dr. Eurico e Olga Bueno de Souza, pelo apoio dispensado.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ, em especial dos Setores de Microbiologia de Alimentos e de Processamento e Bioquímica de Alimentos, bem como do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, em particular das Secções de Química Analítica e de Bioquímica de Plantas, pela colaboração e execução da liofilização e das análises de aflatoxina, nitrogênio total e aminoácidos.

Aos funcionários das Biblioteca Central e do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ e da EMBRAPA/CNPMPF.

À funcionária da EMBRAPA/CNPMPF, Elane Borges Nascimento, pela execução dos serviços datilográficos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

Í N D I C E

	Página
1 - RESUMO	1
2 - INTRODUÇÃO	3
3 - REVISÃO DE LITERATURA	6
4 - METODOLOGIA	30
4.1 - Preparo do Material	30
4.2 - Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo .	31
4.3 - Ensaio de Métodos de Desidratação da Folha, Níveis Ótimos de Folha e Raiz de Mandioca para o Cresci - mento dos Microrganismos	33
4.4 - Curva de Crescimento	34
4.5 - Determinação de Aflatoxina	35
4.6 - Análise Estatística	35
5 - RESULTADOS	36
5.1 - Análises Químicas em Raiz e Folha de Mandioca	36
5.2 - Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo .	38
5.3 - Ensaio de Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha de Mandioca para o Crescimen- to de <u>Fusarium</u> sp.	48

5.4 - Ensaio de Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz (Fornecendo 1,5 - 2,5 - 3,5 e 4,5 gramas de Carboidrato por Cento) e Cinco de Folha (Fornecendo 0,04 - 0,08 - 0,12 - 0,16 e 0,20 gramas de Nitrogênio por Cento) para o Crescimento de <u>Aspergillus niger</u> IZ-9	61
5.5 - Curva de Crescimento do <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 em Meio de Raiz (1,5 gramas de Carboidrato por Cento) e Folha (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento) de Mandioca Desidratada em Estufa	88
5.6 - Determinação de Aflatoxina em <u>Aspergillus niger</u> IZ-9	95
6 - DISCUSSÃO	96
6.1 - Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo .	96
6.2 - Ensaio de Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha de Mandioca para o Crescimento de <u>Fusarium</u> sp.	104
6.3 - Ensaio de Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha de Mandioca para o Crescimento de <u>Aspergillus niger</u> IZ-9	107
6.4 - Curva de Crescimento do <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 em Meio de Raiz (1,5 gramas de Carboidrato por Cento) e Folha (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento) de Mandioca Desidratada em Estufa a 45°C	113

	Página
7 - CONCLUSÕES	114
8 - SUMMARY	116
9 - LITERATURA CITADA	118

1. RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo investigar a utilização de folhas de mandioca, como fonte de nitrogênio, por microrganismos; estabelecer algumas condições ótimas para tal fim; e determinar o efeito do processo sobre o perfil de aminoácidos.

Os resultados mostraram que folhas de mandioca podem ser utilizadas como fonte de nitrogênio para microrganismos. Dos três testados (Aspergillus niger IZ-9, Aspergillus wentii IZ-1625 e Fusarium sp.) o Fusarium sp. foi o que mais biomassa produziu em um dos ensaios, porém mostrou-se ser instável, não tendo apresentado nenhum crescimento num ensaio posterior, sendo, por este motivo, descartado. Entre o Aspergillus niger IZ-9 e o Aspergillus wentii IZ-1625 o primeiro se comportou melhor em todos os ensaios tendo sido, então, o microrganismo escolhido. Para este fungo, dois métodos de desidratação da folha (em estufa a 45°C e por liofi-

lização) foram testados, tendo o processo de desidratação em estufa apresentado resultados superiores. Utilizando este processo foi determinado que um bom desenvolvimento do microrganismo é alcançado em pH 3 em meio de folha e raiz de mandioca, nas concentrações suficientes para fornecerem 0,12 gramas de nitrogênio por cento e 1,5 gramas de carboidrato por cento, tendo a produção de biomassa alcançado o máximo a partir de 84 horas e de proteína bruta a partir de 60 horas, quando inóculos de 5 mm de diâmetro de culturas de 4 dias de idade foram usados para 50 ml de meio. Em relação ao perfil de aminoácidos essenciais a desidratação da folha de mandioca em estufa a 45°C reduziu sensivelmente o teor de treonina quando comparada com a liofilização. Apesar disto, ofereceu melhores condições de crescimento ao Aspergillus niger IZ-9 tendo resultado num aumento de quase 100% no teor de alguns aminoácidos essenciais como a própria treonina que atingiu níveis equivalentes ao da folha liofilizada e a metionina que alcançou nível superior ao desta folha.

2. INTRODUÇÃO

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

Os microrganismos, apesar de usados desde a antiguidade, só nos últimos anos é que vêm assumindo uma posição de destaque como uma nova fonte potencial de alimento. Em relação aos processos convencionais, a produção de proteína a partir de microrganismos apresenta uma série de vantagens, tais como:

. Os microrganismos possuem um tempo de geração muito mais curto que as plantas e animais e, portanto, podem fornecer um rápido aumento de massa.

. Podem ser modificados geneticamente com muita facilidade e as mutações induzidas, seguidas de programas extensos de seleção, podem resultar em linhagens com qualidades adequadas, como taxa de crescimento mais rápida ou capacidade de crescer em temperaturas mais altas e valores de pH

mais baixos ou, ainda, uma parede celular mais frágil. Até mesmo a composição da proteína pode ser modificada por indução de mutação que afete o sistema enzimico.

. O teor proteico dos microrganismos é, geralmente, superior ao da maioria dos produtos alimentícios convencionais.

. A produção de proteína microbiana pode ser executada em sistemas contínuos, sem a interferência de fatores climáticos, em equipamentos que permitem um controle rigoroso e exigem apenas uma pequena área de terra e pouca quantidade de água.

. O substrato usado para tal fim pode ser baseado no aproveitamento de resíduos agro-industriais que sejam disponíveis em grandes quantidades na localidade. Com isto, o processo, além de fornecer proteínas de boa qualidade, poderá contribuir para o controle de poluição ambiental, principalmente nos grandes centros industriais.

As folhas de mandioca são ricas em proteína e estão disponíveis em grandes áreas de todo o território nacional, principalmente nas regiões norte e nordeste, onde a carência proteica entre a população é mais acentuada. Por outro lado, a cultura da mandioca no Brasil enfrenta muitos problemas de caráter econômico por falta de alternativas que elevem seu potencial de aplicação, de modo que a exploração de sua parte aérea na alimentação pode mudar o quadro de desprestígio da cultura. As folhas de mandioca, no entanto, apesar de possuírem um elevado teor proteico e um bom perfil de aminoácidos, apresentam uma baixa digestibilidade e uma deficiência em aminoácidos sulfurados, o que compromete a sua utilização na alimentação humana e de alguns animais. Com base nestes fatos, levantou-se a hipótese de que este substrato pudesse ser utilizado como fonte de nitro -

gênio para o crescimento de microrganismos. Para evitar uma redução no teor de aminoácidos, foi incorporada uma fonte de carbono mais facilmente assimilável, obtida da própria mandioca: o amido de suas raízes. Sem dúvida, as folhas, devido à sua rica composição, servirão também como fonte de outros elementos, além do nitrogênio, tais como fatores de crescimento e, até mesmo, carbono. Entretanto, sendo o amido da raiz hidrolisado à glicose, acredita-se que esta fonte represente a maior contribuição para o suprimento do último elemento. Sendo o meio de cultura constituído, fundamentalmente, de proteínas e amido, o microrganismo capaz de se desenvolver em tal meio deverá exibir atividades proteolítica e amilolítica. Considerando que a transformação da proteína vegetal em microbiana pode melhorar a qualidade do alimento, o presente trabalho objetiva investigar a utilização de folhas de mandioca por microrganismos, como fonte de nitrogênio, bem como estabelecer algumas condições ótimas para tal fim e determinar o efeito do processo sobre o perfil de aminoácidos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A mandioca, tomada na sua totalidade, pode ser considerada uma planta de alto valor nutritivo. Suas folhas são ricas em proteínas, vitaminas e sais minerais, enquanto que as raízes apresentam um elevado teor de carboidratos.

BANGHAM (1950) chama a atenção para a importância das folhas de mandioca salientando que seu valor nutritivo em relação ao conteúdo de caroteno e proteína é superior ao das folhas da alfafa.

MURILLO (1952) encontrou um valor de 16,94% de proteína em farinha de folhas e talos desidratados de mandioca com 5 meses de idade e ao redor de 20% tomando plantas de 3 meses. Averiguando o aproveitamento dos nutrientes do produto pelo gado, concluiu que o mesmo não causa nenhum transtorno no organismo dos bovinos e que seu uso em rações de vacas leiteiras no lugar de farinha de alfafa desidratada é recomendável economicamente na Costa Rica, onde ração à base de folha de alfafa é importada a um preço elevado.

NORMANHA (1957) relata que folhas de mandioca podem conter até 20% de proteína bruta, 2% de cálcio e 0,5% de ácido fosfórico na matéria seca. Encontrou no feno de farelo de hastes e folhas de uma variedade de mandioca colhida aos 4 meses de idade um teor de 13,83% e 14,88% de proteína bruta nos anos de 1956 e 1957, respectivamente.

ROGERS (1959) determinou o teor proteico das folhas de 107 cultivares de mandioca da Jamaica e obteve uma variação entre 20,6 e 36,4% de proteína bruta na matéria seca. As amostras foram tomadas de plantas maduras ou quase maduras (11 a 12 meses), porém o autor chama a atenção para a importância de se determinar o teor proteico de folhas jovens (2 a 4 meses), quando a quantidade total de folhagem é proporcionalmente muito maior. Afirma que seria valioso se fazer análises comparativas do teor de proteína bruta e aminoácidos em plantas que são maduras para produção de raiz e plantas jovens que têm a mais alta proporção de superfície foliar por planta.

Analisando o perfil de aminoácidos da proteína foliar de 20 cultivares de mandioca, sendo 10 provenientes da Jamaica e 10 do Brasil, ROGERS e MILNER (1963) verificaram que o perfil de aminoácidos essenciais das folhas frescas apresenta um nível criticamente baixo apenas de metionina. Os demais estão presentes em quantidades adequadas, sendo o nível de lisina alto, o que levou os autores a sugerirem que esta proteína pode fornecer um excelente suplemento, em dietas humanas, para proteínas de cereais, tais como as de trigo, milho e arroz. As amostras foram colhidas de plantas com 10 meses de idade na esperança de que, se uma quantidade de proteína satisfatória pudesse ser obtida da folhagem neste estágio, haveria vantagem de uma cultura fornecer, ao mesmo tempo, raiz e folhagem. Entretanto, os autores salientam que se as folhas como fonte de proteína se tor-

narem de maior importância é preferível que plantas num estágio mais jovem (2 a 4 meses) sejam colhidas, considerando que há relativamente mais folha por planta nestes estágios que em estágios mais maduros.

JOHNSON e RAYMOND (1965), estudando a composição química da mandioca, encontraram na literatura que suas folhas frescas contêm em média 77% de umidade, 8,2% de proteína bruta, 3,3% de carboidratos solúveis, 1,2% de gordura, 7,8% de fibra bruta, os constituintes minerais óxido de cálcio, ácido fosfórico e óxido fêrrico, e as vitaminas ácido ascórbico, caroteno, B₁, B₂ e niacina. Concluíram, então, que as folhas de mandioca apresentam um bom valor alimentar.

BARRIOS e BRESSANI (1967), analisando a composição química das folhas de 8 variedades de mandioca cultivadas na República da Guatemala, encontraram um teor proteico de 7,3% com base em matéria fresca e 28,8% em matéria seca. Além de serem ricas em proteína, os autores acharam também que são relativamente ricas em cinzas, cálcio e extrato etéreo. Chamam a atenção para o fato de que a indústria do amido de mandioca pode ser sumamente proveitosa se todos os seus subprodutos forem utilizados eficientemente.

ADRIAN et alii (1968), num estudo nutricional da folha de mandioca, acharam um teor proteico de 32,3% e um teor de substâncias glicídicas indigestíveis de 22,2% na matéria seca. Afirmam que a folha de mandioca segue a regra geral de que as proteínas das folhas tropicais são sempre caracterizadas por um forte déficit em metionina, o que faz deste aminoácido o fator limitante primário das folhas. As proteínas das folhas de mandioca apresentam um déficit em metionina de 67% em relação ao ovo, enquanto que os demais aminoácidos essenciais não ultrapassam a 30%, o que faz com que

essas proteínas sejam consideradas bem equilibradas, destacando-se o alto teor de lisina. Esses dados estão de acordo com os apresentados por ROGERS e MILNER (1963), anteriormente citados.

VITTI et alii (1971/72), pesquisando a viabilidade de utilizar folhas de mandioca desidratadas na alimentação humana, concluíram que há uma grande possibilidade em vista dos teores proteico e de vitamina A do produto. Recomendaram que fossem feitos estudos para se determinar a relação existente entre a idade da planta e os teores de proteína e vitamina A, assim como sobre o aproveitamento do produto no preparo de sopas ou de misturas com outras farinhas. O teor proteico obtido pelos autores girou em torno de 25% na matéria seca entre 6 variedades estudadas com 8 meses de idade. Os teores de vitamina A foram bem altos, tendo sido superiores aos do milho, do farelo de milho, da aveia e de alguns produtos vegetais usualmente consumidos pela população.

FIGUEIREDO e REGO (1973), comparando o teor proteico e mineral de raízes e folhas de 7 variedades de mandioca, encontraram um teor proteico nas ramas de 14 a 15% na matéria seca, aproximadamente oito vezes maior que nas raízes, enquanto que o teor mineral (ferro, cobre, zinco e manganês) das raízes foi bem maior que o das folhas. Os autores não citam a época de colheita podendo, portanto, o baixo teor proteico encontrado, em relação a citações de outros autores, ter sido devido a uma colheita tardia do material analisado.

HELLENDORRN et alii (1975) detectaram um teor de 39,5% de proteína bruta altamente digestível (85,3% de digestibilidade) e uma elevada percentagem de resíduo indigestível (34,6%) em folhas de mandioca desidratadas.

KLING et alii (1976), visando o aproveitamento industrial das folhas de mandioca, fizeram inicialmente um estudo sobre seu teor e qualidade proteica, tendo encontrado um teor proteico médio de 28,92%, sendo a proteína, em relação aos aminoácidos essenciais, rica em lisina e deficiente apenas em metionina, similamente ao encontrado por outros autores, anteriormente citados.

O uso de proteínas e aminoácidos como substrato para o desenvolvimento de microrganismos tem sido relatado com certa frequência na literatura. Quando usados tanto como fontes de nitrogênio como de carbono, ou simplesmente como fontes de carbono, há uma grande liberação de amônia no meio, o que eleva bastante o pH tornando as condições desfavoráveis para aqueles microrganismos que não suportam alcalinidade, como os fungos. Empregados na presença de uma outra fonte de carbono, mais prontamente utilizável não ocorre a amonificação, pois, segundo NICHOLAS (1965), os aminoácidos são utilizados diretamente pela maioria dos fungos e há evidências de que são incorporados diretamente em proteínas, sem sofrerem desanimação.

ZALESKI e PJUKOW (1914), citados por GOTTLIEB (1946), salientaram que Aspergillus metaboliza mais aminoácido na presença de uma fonte de carbono menos utilizável que quando um açúcar mais prontamente assimilável está presente.

WAKSMAN e LOMANITZ (1925), estudando a química da decomposição de proteínas e aminoácidos por microrganismos na presença e ausência de dextrose, testaram o efeito da glicina, alanina, fenilalanina, ácido glutâmico, asparagina e caseína sobre o crescimento de dois fungos (Trichoderma koningi e Zygorhynchus molleri), um actinomiceto (Actinomyces viridochromogenus) e duas bactérias (Bacillus cereus e Bacterium fluorescens),

todos isolados do solo. Verificaram que os microrganismos não atacam proteínas e aminoácidos da mesma maneira. Os dois fungos utilizaram os vários aminoácidos e a proteína tanto como fontes de carbono como de nitrogênio. A intensidade de crescimento e o acúmulo de amônia dependeram, entretanto, na ausência de dextrose, do carbono utilizável na molécula de aminoácido. Foi encontrada uma relação definida entre a quantidade de carbono utilizável da molécula de aminoácido e o acúmulo de amônia. Quando os aminoácidos foram usados apenas como fontes de nitrogênio, ou seja, na presença de dextrose, de uma maneira geral, uma maior quantidade de protoplasma foi sintetizada, uma maior quantidade de nitrogênio foi reassimilada e uma maior quantidade de amônia foi acumulada no meio. A produção de micélio foi muito maior com o ácido glutâmico que com glicina, alanina e fenilalanina. Isto é atribuído, por um lado, ao fato da relação carbono/nitrogênio ser muito maior no ácido glutâmico que nestes outros aminoácidos e, por outro lado, ao fato de que o ácido glutâmico é muito favorável à respiração resultando na formação de muito pouco ácido volátil. Com a asparagina a produção de micélio foi muito pequena em comparação com a quantidade de amônia formada, sendo mais comparável ao decréscimo no teor de aminoácido. Isto indica que o grupo amida se desprende mais facilmente que o grupo amino e que a rápida alteração no pH para alcalinidade, devido ao acúmulo de amônia, reprime o desenvolvimento posterior dos fungos, sendo as intensidades de crescimento e de aminoácidos decompostos limitadas. A quantidade de carbono utilizável na asparagina é tão pequena, em comparação com o nitrogênio utilizável, que apenas uma ínfima quantidade de crescimento pode ser observada. A caseína foi prontamente atacada pelos fungos, mas não completamente decomposta a dióxido de carbono, água e amônia. Uma grande parte do nitrogênio foi deixada sob a forma de polipeptídeos e outros derivados pro-

teicos, os quais o organismo não podia usar mais pronta e rapidamente como uma fonte de carbono. Na presença de dextrose, uma grande parte do nitrogênio foi reassimilada e depois de toda a dextrose ter sido usada, amônia começou a se acumular no meio. Neste caso, apenas uma pequena parte de nitrogênio estava presente na forma de polipeptídeos. As duas bactérias testadas se comportaram diferentemente. Bacillus cereus foi incapaz de atacar glicina, alanina e fenilalanina, enquanto que o ácido glutâmico e asparagina foram ativos até certo ponto e a caseína foi decomposta muito rapidamente. Bacterium fluorescens foi incapaz de decompor caseína, mas agiu muito prontamente sobre os vários aminoácidos usados. O actinomiceto foi capaz de utilizar os aminoácidos e a proteína como fontes de energia, com acúmulo de amônia, mesmo na presença de dextrose. A utilização de determinados compostos como fonte de energia é um simples problema de metabolismo, o que é verdade não apenas para microrganismos, mas para todos os seres vivos que dependem de substâncias complexas para retirar sua energia. Um ser vivo deriva sua energia a partir de uma substância que lhe é mais utilizável e que pode ser específica para um organismo particular. Um grande número de microrganismos prefere certos carboidratos simples a proteínas como fontes de energia e na presença destes, as proteínas serão usadas apenas como fontes de nitrogênio. Portanto, a amônia, que é, principalmente, um produto da utilização de proteínas como fontes de energia, não será acumulada.

Entre os microrganismos, os fungos parecem se destacar como bons utilizadores de proteínas e aminoácidos. WASKMAN e STARKEY (1932) acharam que, em geral, os fungos parecem apresentar uma razão proteína degradada por substância celular microbiana sintetizada mais baixa que as bactérias e actinomicetos, ou seja, os fungos parecem produzir mais biomas-

sa com menos proteína degradada. Mostraram também que havia muito maior crescimento por unidade de proteína decomposta quando glicose estava presente.

ANDERSON e EMMART (1934) determinaram a utilização de alguns aminoácidos (glicina, l-leucina, l-tirosina e ácido l-aspártico) por Fusarium oxysporum como fontes de carbono, através de medidas de respiração. Todos os aminoácidos estudados foram utilizados pelo fungo e, com exceção da leucina, eles foram mais eficientes na produção de micélio que a glicose. As culturas contendo glicose produziram muito mais dióxido de carbono que qualquer outra cultura contendo aminoácido. Ácido aspártico e glicina produziram o maior peso micelial e a maior quantidade de dióxido de carbono, enquanto que leucina e tirosina retardaram a produção de dióxido de carbono. Como é de se esperar, houve uma grande variação de pH para alcalinidade, sendo a maior nas culturas contendo ácido aspártico que variaram de pH 3,1 a 8,0.

STEINBERG (1942) estudou a capacidade do Aspergillus niger Van Tiegh de assimilar nitrogênio de aminoácidos na presença de sacarose e glicerol como fonte de carbono. Observou que quando a sacarose foi usada, os nitrogênios de alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, hidroxiprolina, ornitina e prolina foram tão eficientes quanto nitrogênio de nitrato de amônia em quantidades equivalentes. Utilização moderada de nitrogênio ocorreu com serina, treonina e triptofano. O crescimento foi ainda mais pobre com isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina e valina e muito pobre com os outros aminoácidos naturais restantes. Exceto para hidroxiprolina, que contém o anel pirrolideno facilmente aberto, nenhum dos aminoácidos contendo um grupocíclico ou cadeia de carbono rami-

ficada substituiu plenamente o nitrogênio inorgânico. Foi chamada atenção para a produção aumentada de amido pela cisteína mesmo quando praticamente não houve crescimento. Nenhum dos aminoácidos sulfurados foi capaz de fornecer nitrogênio assimilável apreciável, com exceção da metionina. A superioridade da metionina como fonte de nitrogênio, comparada com cisteína, foi atribuída ao grupo - CH₂ - adicional que separa o enxofre do nitrogênio. Entretanto, a homometionina que contém dois grupos - CH₂ - adicionais foi praticamente insignificante tanto como fonte de nitrogênio como de enxofre. Quando o glicerol foi usado como fonte de carbono os resultados diferiram. O crescimento máximo foi obtido quando o nitrogênio foi suprido com prolina, seguindo-se, em ordem decrescente, ácido glutâmico, alanina, leucina e ácido aspártico. Arginina, glicina e hidroxiprolina deram resultados muito mais pobres que com sacarose, enquanto que com leucina e histidina as produções foram as mesmas. Portanto, melhores resultados são obtidos quando a adição dos aminoácidos é combinada com uma boa fonte de carbono (no caso, sacarose) que com uma fonte pobre (no caso, glicerol).

ROBBINS e MA (1945), estudando o comportamento de proteínas e aminoácidos em relação ao crescimento de Trichophyton mentagrophytes verificaram que a forma normal deste fungo foi incapaz de utilizar nitrato de amônio e cresceu muito mais rapidamente com peptona, hidrolisado de caseína, hidrolisado de gelatina e outros produtos naturais, como fontes de nitrogênio, que com asparagina. Como fonte de carbono foi usada a dextrose. Pensou-se que a ação benéfica desses compostos fosse causada pelos seus aminoácidos. Entretanto, embora misturas de aminoácidos tenham sido benéficas, nenhuma foi tão eficiente quanto hidrolisado de caseína. O fungo usou asparagina e 14 aminoácidos (arginina, glicina, α - alanina, leucina,

tirosina, lisina, prolina, valina, isoleucina, ácido glutâmico, ácido aspártico, histidina, serina e fenilalanina) testados isoladamente e em várias combinações. Nenhum composto isolado foi tão eficiente quanto misturas desses aminoácidos. Triptofano, treonina, hidroxiprolina, cisteína e metionina, bem como a combinação destes aminoácidos, apresentaram efeitos inibitórios, sendo a hidroxiprolina a mais prejudicial. Também a adição destes aminoácidos aos quatorze, previamente citados, formando um único grupo, reduziu o crescimento. A mistura dos quatorze aminoácidos foi a que se aproximou mais do hidrolisado de caseína, tanto em caráter como em quantidade de crescimento. Assim mesmo, o efeito de 10mg desta mistura foi equivalente ao de 2mg de hidrolisado de caseína. Vê-se claramente que este último continua sendo mais eficiente. Nenhuma evidência para aminoácidos essenciais foi obtida. Sugeriu-se que a superioridade de uma mistura de aminoácidos está relacionada com a incapacidade do fungo de transformar nitrogênio inorgânico, ou um composto nitrogenado orgânico simples, nos vários aminoácidos necessários para a formação de proteínas protoplasmáticas tão rapidamente quanto eles podem ser usados se fornecidos pré-formados no meio de cultura. Um preparado sintético de hidrolisado de caseína a partir de aminoácidos não foi tão eficiente quanto o hidrolisado de caseína natural. Quando um mutante ou forma pleomórfica de T. mentagrophytes foi estudado, observou-se que esta forma utilizava amônia e asparagina mais prontamente que a forma normal. Extratos da forma pleomórfica favoreceram seu próprio crescimento e o de linhagens menos vigorosas. Sugeriu-se que o pleomorfismo de T. mentagrophytes envolve o desenvolvimento de um mecanismo melhor para transformar amônia, ou uma fonte de nitrogênio orgânico simples, em substância celular.

Maats tarde, ROBBINS e MacVEIGH (1946) estudaram o efeito da hidroxiprolina sobre o crescimento de T. mentagrophytes e outros fungos em meio sólido contendo asparagina, dextrose e sais, ao qual foram adicionadas diferentes concentrações de hidroxiprolina. Como no estudo anterior, verificaram que este aminoácido possuía uma ação inibitória sobre a linhagem normal de T. mentagrophytes e sobre outros dermatófitos, tais como, Trichophyton gypseum, Trichophyton purpureum, Microsporium canis e Epidermophyton flocculosum, sendo a concentração encontrada inibitória diferente para cada um deles. Entretanto, uma linhagem pleomórfica de T. mentagrophytes foi encontrada ser resistente a hidroxiprolina, mesmo em elevadas concentrações. Outros fungos, Agaricus campestris, Aspergillus niger, Ceratostomella ulmi, Neurospora sitophila, Penicillium notatum, Phycomyces blakesleeanus, Rhodotorula aurantiaca e Stereum murrayi, crescidos a 20°C em meio sólido contendo asparagina, uma mistura de vitaminas e três diferentes concentrações de hidroxiprolina, não apresentaram qualquer resposta a este aminoácido. Polyporous alboluteus, P. berkeleyi, P. circinatus, P. croceus, P. obtusus, P. schweinitzii, P. squamosus, Fomes pini e F. pomaceus crescidos a 25°C em meio sólido basal suplementado com a mistura de vitamina e hidrolisado de caseína, contendo três diferentes doses de hidroxiprolina, também não apresentaram nenhuma resposta ao aminoácido em teste, exceto o Polyporous squamosus que não foi afetado a doses de 0,1 ou 1,0mg de hidroxiprolina, mas foi visivelmente favorecido a 5,0mg. Em presença de peptona ou hidrolisado de caseína, a hidroxiprolina apresentou efeito prejudicial menos pronunciado que em presença de asparagina. Enquanto 0,4mg de hidroxiprolina foi suficiente para inibir completamente o crescimento da linhagem normal de T. mentagrophytes no meio contendo asparagina, com doses de

50mg deste aminoácido evidente crescimento subsuperficial do microrganismo foi obtido em meio contendo 1mg de caseína e consideráveis crescimentos subsuperficial e superficial foram obtidos em meio suplementado com 5mg de hidrolisado de caseína. Resultados similares foram obtidos com quatro outros dermatófitos: T. gypseum, T. purpureum, Microsporum canis e Epidermophyton flocculosum. Para determinar os efeitos individuais dos aminoácidos sobre a ação inibitória da hidroxiprolina foi testada a ação de cada um dos quatorze aminoácidos previamente encontrados como produtores de crescimento da forma normal de T. mentagrophytes. Os resultados com 13 dos aminoácidos foram similares aos obtidos com o meio basal contendo asparagina. Entretanto, a prolina superou, pelo menos em parte, o efeito inibitório da hidroxiprolina. Testes para averiguar a relação existente entre prolina e hidroxiprolina sugeriram que a prolina atua tornando a asparagina utilizável na presença de hidroxiprolina, pois mais crescimento foi obtido no meio contendo asparagina, prolina e hidroxiprolina que nos que continham apenas prolina. Os efeitos da metionina, triptofano e treonina foram testados em meio sólido basal com asparagina e hidrolisado de caseína. O triptofano não apresentou nenhum efeito visível. A ação inibitória da metionina foi tão acentuada no meio contendo hidrolisado de caseína quanto no que continha asparagina. Resultados similares foram encontrados com a treonina. Embora, nas condições do experimento, a treonina e a metionina tenham sido prejudiciais ao crescimento da linhagem normal de T. mentagrophytes, suas ações diferiram do efeito da hidroxiprolina. Suas eficiências aumentaram pouco quando suas concentrações aumentaram de 50 vezes. Além disso, o hidrolisado de caseína, na quantidade usada, não reduziu as ações inibitórias da metionina e treonina como no caso da hidroxiprolina.

GOTTLIEB (1946) investigou o uso de aminoácidos apenas como

fontes de carbono e como fontes de carbono e nitrogênio ao mesmo tempo. Achou que Fusarium oxysporum var. lycopersici e Penicillium roquefortii utilizam a maioria dos aminoácidos como única fonte de carbono. Um estudo quantitativo da eficiência dos vários aminoácidos no fornecimento de carbono ao Fusarium revelou acentuadas diferenças nas capacidades de promover o crescimento. O fungo produziu a maior quantidade de micélio a partir de d, l-β-fenilalanina, l-prolina, valina e l-hidroxiprolina, cujas capacidades de produzir crescimento foram, para os dois primeiros aminoácidos, maiores que a da dextrose e, para os dois últimos, aproximadamente tão eficientes quanto a da dextrose. Três aminoácidos contendo enxofre (metionina, cisteína e cistina) foram testados como fonte de carbono para os dois fungos e nenhum crescimento foi observado. Seis outros fungos foram, então, usados em experimentos similares apenas com metionina, sendo eles: Alternaria solani, Helminthosporium sativum, Rhizoctonia solani, Fusarium moniliforme, Chaetomium globosum e Aspergillus niger. Nenhum desses fungos produziu micélio em meio com metionina. Segundo o autor, a falta de qualquer crescimento em meio contendo aminoácidos sulfurados não parece ser devida a qualquer ação tóxica dos aminoácidos sobre o fungo, mas pode ser devido à incapacidade do fungo de quebrar a ligação carbono-enxofre, pois compostos muito similares a esses aminoácidos são prontamente utilizáveis pelos fungos. Alanina, na qual os organismos crescem rapidamente, se assemelha a cisteína. Ambas são cadeias retas de três carbonos e diferem apenas pela presença do grupo sulfidrílico no carbono β da cisteína. Da mesma maneira, a leucina se assemelha à metionina, pois ambas têm uma cadeia reta de cinco carbonos, diferindo pela presença de uma cadeia lateral metílica na leucina e do enxofre na metionina. Quando testados tanto como fontes de carbono como de nitrogênio, foram usados quatro aminoácidos: glicina, valina, ácido

aspártico e arginina. Fusarium oxysporum var. lycopersici cresceu rapidamente em todos os quatro aminoácidos, enquanto que o Penicillium roquefortii cresceu pobremente em valina, produziu apenas traços de micélio em glicina e micélio abundante em ácido aspártico e arginina.

KLING et alii (1976), anteriormente citados, utilizaram o líquido residual, resultante da coagulação das proteínas extraídas de folhas de mandioca, contendo 0,41% de proteína e 1,10% de açúcares redutores, para o crescimento de Candida utilis. Obtiveram, após 23 horas de crescimento e sem adição de nutrientes, uma massa de células cerca de 10 vezes superior à inoculada, tendo havido um consumo quase total dos açúcares redutores e de cerca de 50% de nitrogênio.

A raiz de mandioca, devido ao seu alto teor de carboidratos, se constitui um excelente substrato para a produção de proteína microbiana.

Em certas regiões do mundo, a mandioca tem sido tradicionalmente enriquecida pela fermentação microbiana. Na Nigéria, um produto fermentado da mandioca, conhecido como "gari", é um alimento básico; resulta de uma fermentação de duplo-estágio produzida por Corynebacterium manihot e Geotrichum candidum (COLLARD e LEVI, 1959). Estudando as reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação para produção deste alimento, AKINRELE (1964) confirmou que o processo ocorre em dois estágios, durante os quais a massa é gradativamente esterilizada contra crescimento microbiano contaminante, através do abaixamento do pH, no primeiro estágio, e produção de gases, que levam à anaerobiose no segundo estágio. Apesar de ser um alimento fermentado, o nível proteico do gari ainda é muito baixo (MORSE e URAIH, 1974). LIMA (1975) relata que a base para a elaboração deste alimento foi transferida do Brasil para a região costeira da África Ocidental através

do método da "mandioca puba". A ocorrência de Geotrichum candidum foi constatada pelo autor na fermentação da mandioca puba dos mercados do Recife. No sudeste da Ásia, a mandioca é comumente misturada com bolo de amendoim e fermentada com Rhizopus e Neurospora sp. para produzir várias formas de alimento para o consumo humano (VARGUESE et alii 1977).

Nos últimos anos, diversos pesquisadores, em diferentes partes do mundo, vêm utilizando esta cultura na produção de proteína microbiana com sucesso.

GRAY e ABOU-EL-SEOUD (1966) afirmam que a mandioca tem um enorme potencial como fonte de carboidrato no processo que envolve a síntese de proteína por fungos. Em seus experimentos, conseguiram um aumento no teor proteico de aproximadamente seis vezes cultivando uma linhagem de Cladosporium cladosporioides em raiz de mandioca fresca adicionada de cloreto de amônio e licor de milho. Salientaram que este aumento não representa as melhores produções alcançáveis e que investigações sobre as condições de cultura podem resultar em produções ainda maiores.

STANTON e WALLBRIDGE (1969) relataram que a fermentação de tubérculos amiláceos por fungos pode resultar num produto alimentício com aumentos significantes no teor proteico.

STRASSER et alii (1970), usando três linhagens de leveduras crescidas em mandioca hidrolisada obtiveram, com base em peso seco, os seguintes teores proteicos (tomados como proteína bruta determinada pelo método de Kjeldahl): mandioca + Candida utilis - 35%, mandioca + Rhodotorula gracilis - 26,7% e mandioca + Hansenula saturnus - 15,5%. Enfatizaram que o enriquecimento da mandioca com proteína monocelular tem uma série de vantagens, tais como:

. O produto enriquecido pode ser preparado da mesma maneira que os alimentos tradicionais de mandioca, não sendo necessário mudar os hábitos alimentares do povo.

. Se a mandioca enriquecida com proteína for adicionada à farinha de mandioca não tratada, haverá pouca alteração no sabor.

. Nenhuma técnica de lavagem e separação dispendiosa será necessária.

. Nos países tropicais, a produção industrial da mandioca processada está apenas começando. Isto significa que muitas novas plantas industriais terão que ser construídas no futuro. E há boas razões para enfatizar que novas plantas incluam o processo para enriquecimento proteico. Isto teria uma vantagem econômica definida. Será mais dispendioso para a maioria dos países em desenvolvimento importar ou produzir proteína para enriquecimento em outras formas como, por exemplo, concentrado proteico de peixe ou proteína de semente oleaginosa.

. O processo de enriquecimento da mandioca pode ser adaptado a condições locais em áreas em desenvolvimento. Como um primeiro passo, plantas piloto para estudo do processo deveriam ser construídas em centros de tecnologia de alimento ou instituições de pesquisa no próprio país em desenvolvimento. Este trabalho serviria ao duplo propósito de treinar pessoal e, posteriormente, desenvolver o processo.

. No estágio experimental do desenvolvimento, a mandioca enriquecida com proteína pode ser usada muito bem para alimentar animais, particularmente aves domésticas e porcos.

Os autores fizeram uma estimativa do custo de processamento

e concluíram que se compara favoravelmente com os custos estimados para outras proteínas alimentares, tais como farinhas de soja, algodão, amendoim e trigo, concentrado proteico de peixe e leite seco desnatado.

MENEZES et alii (1971/72), comparando o desenvolvimento de três leveduras amilolíticas (Endomycopsis fibuligera, Endomycopsis capsularis e Schwanniomyces alluvius) em amido de mandioca não hidrolisado com uma não amilolítica (Rhodotorula gracilis) cultivada em amido de mandioca hidrolisado, obtiveram os seguintes teores proteicos, em relação à matéria seca, determinados pelo método de Kjeldahl: para E. fibuligera - 13,93%; E. capsularis - 10,80%; S. alluvius - 31,36% e R. gracilis - 31,15%

CONCEIÇÃO e GRAMACHO (1972) obtiveram 12,68% de proteína bruta em meio contendo mandioca inoculada com Rhizopus nigricans e 13,56% quando o mesmo substrato foi inoculado com Penicillium digitatum.

TREVELYAN (1974) cultivou Rhizopus oryzae em raiz de mandioca, usando o processo de fermentação semi-sólida e obteve 9,38% de proteína.

No Canadá, um grupo de pesquisadores da Universidade de Guelph vem trabalhando na produção de proteína fúngica utilizando raízes de mandioca, uréia e fosfato de potássio.

Deste grupo, READE et alii (1974) chamam a atenção para três problemas comumente encontrados na produção de proteína microbiana, em geral, e, em particular, na utilização de amido como substrato. O primeiro problema a ser enfrentado é a dissipação do calor produzido pelo metabolismo microbiano, pois os custos de resfriamento são altos nas zonas temperadas e podem ser proibitivos nos trópicos, onde a refrigeração mecânica é normalmente necessária. O segundo problema diz respeito ao elevado custo referente ao equipamento necessário para manter o processo livre de micror-

ganismos contaminantes. E, finalmente, o terceiro se relaciona com o estágio de conversão do amido em glicose incluído na maioria das fermentações industriais que usam amido como substrato. Esses três problemas foram superados pela seleção de um fungo que cresce bem a temperaturas entre 45 e 50°C, pH 3,5 e é produtor de amilases extracelulares. Este fungo pertence ao gênero Aspergillus e foi designado Aspergillus I-21. Em 1975 os autores o identificaram como Aspergillus fumigatus e obtiveram um mutante não esporogênico designado A. fumigatus I-21 A, que vem sendo utilizado em trabalhos posteriores.

AZI et alii (1975) idealizaram um fermentador para ser utilizado neste processo, cuja principal característica é a sua capacidade de fornecer aeração e agitação através de uma única peça, evitando, assim, a necessidade de um compressor de ar, o que representa uma redução nos custos de produção.

GREGORY et alii (1976) relatam que o fermentador foi, inicialmente, testado em escala laboratorial, através de modelos cujas capacidades foram aumentando sucessivamente de 1 a 120 litros. Finalmente, um modelo de 3.000 litros foi construído e enviado ao Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), em Cali, Colômbia, para testes em escala de planta piloto. Quanto ao rendimento do processo em relação à mandioca total utilizada como substrato foram obtidos, em escala laboratorial, 24g/l do produto, contendo 37% de proteína bruta, tomada em relação ao produto seco, 27% de proteína verdadeira, 49% de aminoácidos totais e 1,8% de metionina em relação à proteína verdadeira. O valor nutricional da biomassa foi avaliado, tendo o teor de aminoácidos essenciais sido satisfatório para o porco, com exceção do nível de metionina, que foi considerado sub-ótimo. Em testes

com ratos, a dieta fúngica, quando não suplementada com metionina ou em comparações baseadas em proteína bruta, foi sempre inferior a de referência contendo caseína e suplementada com metionina e triptofano. Quando a dieta fúngica foi suplementada com metionina e todas as rações continham 10% de proteína verdadeira, entretanto, a relação de eficiência proteica (peso ganho por peso de proteína consumida) e os valores da taxa de proteína líquida para A. fumigatus I-21 A foram apenas ligeiramente inferiores aos valores obtidos com caseína, não tendo havido diferença significativa a nível de 5% de probabilidade entre as duas dietas. Os ratos aceitaram o micélio prontamente. Quanto à avaliação toxicológica, extensos exames clínicos e hematológicos feitos em ratos não revelaram qualquer anormalidade atribuível à dieta. Foram feitos testes laboratoriais para seis micotoxinas e todos os resultados foram negativos.

No processo de produção de proteína microbiana que está sendo realizado no CIAT, as raízes são lavadas, para remoção da terra aderida, e raladas mecanicamente inclusive com a casca. Em seguida, são colocadas no fermentador que contém água até a metade de sua capacidade. O meio aquoso é submetido a uma temperatura de 65-70°C para gelatinizar o amido e facilitar sua utilização pelo microrganismo. Adiciona-se mais água ao meio até chegar quase completamente a capacidade total do fermentador. A adição de água reduz a temperatura do meio para 46 a 47°C e dilui a concentração de carboidratos totais a aproximadamente 4%. O pH do meio é reduzido para 3,5 pela adição de uma solução de ácido sulfúrico, a qual fornece também parte do enxofre requerido para o processo. Em seguida, adicionam-se uréia como fonte de nitrogênio e fosfato de potássio como fonte de fósforo. Os demais elementos minerais necessários ao processo são fornecidos pelas raízes de

mandioca. O inóculo, previamente preparado num fermentador de 200 litros, é adicionado ao fermentador de 3.000 litros e o processo se desenvolve por cerca de 20 horas. No fim do processo, parte da biomassa pode ser usada como cultura iniciadora para uma nova remessa e o restante é recuperado por um sistema de prensagem e filtração, onde grande parte da porção líquida é eliminada. A biomassa é colhida e deixada ao sol e ar para acabar de secar, após o que é misturada a mais mandioca ou qualquer outro ingrediente apropriado para baixar o teor proteico a um nível desejável e servir como ração para porcos em crescimento.

Um total de 10 fermentações executadas no fermentador de 200 litros da planta piloto do CIAT forneceu os seguintes dados preliminares (Informe Anual do CIAT, 1976): Para 25,3 kg de mandioca fresca conseguiu-se uma quantidade de biomassa final secada ao sol de 4,3 kg, um rendimento em peso da biomassa seca de 16,9% em relação à mandioca fresca, 48,5% em relação à matéria seca e 28,6% em relação à proteína bruta, enquanto que a nível de laboratório conseguiu-se uma biomassa com 37% de proteína bruta (GREGORY et alii, 1976). A avaliação do valor nutritivo da biomassa seca em ratos, sem adição de metionina, mostrou uma relação de eficiência proteica de 1,8 comparada com 2,5 para a caseína, porém, em escala laboratorial (GREGORY et alii, 1976), a suplementação com metionina elevou o valor nutritivo da biomassa tornando-o comparável ao da caseína. Os resultados preliminares obtidos na planta piloto estão sendo checados sob condições mais padronizadas do processo.

Em 1977, GREGORY et alii noticiaram o estabelecimento da planta piloto no CIAT. A planta é composta de dispositivos para lavar e raspar as raízes de mandioca, dois fermentadores do tipo idealizado por AZI et alii

(1975), sendo um de menor capacidade destinado ao preparo do inóculo, uma prensa de rolo para coleta da biomassa e uma unidade com cobertura corrediça para secagem do produto ao sol e ar. Como o processo resulta num grande volume de líquido efluente residual, experimentos foram desenvolvidos para determinar a viabilidade de reciclar parte do efluente em fermentações subsequentes. A reciclagem de 50% de efluente em fermentações sequenciais revelou um efeito acentuadamente tóxico para o microrganismo. O efeito da reciclagem de 25% do efluente não foi determinado e é questionável se valeria a pena a reciclagem desta baixa percentagem.

No Instituto de Tecnologia de Alimentos (S. Paulo), SALES e MENEZES (1976) estudaram a consorciação entre leveduras amilolíticas (Endomycopsis fibuligera, Endomycopsis capsularis e Schwanniomyces alluvius) e não amilolíticas (Candida utilis e Rhodotorula gracilis) visando obter uma boa relação entre o açúcar consumido e a biomassa produzida em substrato de mandioca. Observaram que a consorciação entre E. fibuligera e C. utilis foi a que apresentou melhor rendimento em biomassa, sendo da ordem de 14,9 g/l, com um teor proteico de 56% na matéria seca, quando se empregou uréia como fonte de nitrogênio e 30 g/l de açúcares totais.

Na Malásia, VARGHESE et alii (1977) relatam que tentativas para produzir mandioca enriquecida com proteína, para alimentação animal, por fermentação sólida com linhagens locais de Rhizopus, Aspergillus e Neurospora mostraram que os níveis proteicos dos produtos fermentados não excederam a 3%. Como este valor é baixo, os autores testaram a capacidade de suplementos nitrogenados naturais de aumentar a atividade microbiana. A suplementação com 35% de esterco de galinha aumentou os níveis proteicos para 8-10,5% e com soja, amendoim e farelo de abacaxi a 25% os níveis proteicos

foram 40,10 e 7% respectivamente. Em combinação com esterco de galinha (12,5 + 12,5%) os valores proteicos variaram entre 8 e 18% para soja, 8 e 10% para amendoim e 5 e 7% para farelo de abacaxi. Esses resultados indicam que a suplementação aumentou a eficiência da fermentação e contribuiu para aumentar os valores proteicos. O processo foi desenvolvido como um estágio inicial visando o projeto de uma planta piloto para produção contínua do material.

MENSE et alii (1947) encontraram que uma grande variedade de carboidratos, em conjunção com substâncias proteínicas de origem animal ou vegetal, pode ser empregada para a produção de amilase por Aspergillus niger NRRL 337. Portanto, é possível que a combinação de folhas de mandioca com suas raízes estimule a produção de enzimas amilolíticas favorecendo, conseqüentemente, o desenvolvimento de microrganismos.

PARK (1969/70), estudando a influência do nitrogênio orgânico sobre a produção de alfa-amilase fúngica, achou que caseína hidrolisada e vinhaça seca de destilaria de cereais foram mais eficientes que caseína não hidrolisada e peptona, mostrando que as duas primeiras fontes de nitrogênio orgânico se encontravam sob uma forma mais degradada e, portanto, mais facilmente assimilável pelo microrganismo.

Foi visto que bactérias, leveduras e fungos filamentosos degradam, isoladamente ou em associação substrato de mandioca como fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento. Entretanto, para a produção industrial de proteína, os fungos filamentosos parecem apresentar certas vantagens. SPICER (1971) mostra uma série de vantagens dos fungos sobre os organismos unicelulares, tais como:

. Os fungos possuem um melhor perfil proteico. Aminoácidos

essenciais, tais como, metionina e cistina podem estar presentes em concentrações maiores, acima de 4% da proteína total, cerca de duas vezes a quantidade nas leveduras ou bactérias.

. A recuperação do micélio é muito mais fácil e menos dispendiosa.

. Os fungos, em culturas contínuas, têm uma estrutura filamentosa que permite seu manufaturamento como produtos alimentícios texturados sem necessidade de extração como no caso de outras formas de proteína.

. Os fungos são aceitos em muitas partes do mundo, como Japão, Indonésia e outros países da Ásia como um ingrediente básico da dieta diária.

. O alto teor de ácidos nucleicos presente nas leveduras exige um tratamento especial para reduzi-lo a níveis aceitáveis. Por outro lado, a baixa percentagem de aminoácidos sulfurados nesses organismos exige suplementação para obter valores biológicos satisfatórios. Nenhuma dessas duas limitações se aplica à proteína fúngica.

Entre os fungos filamentosos, o gênero Aspergillus tem sido usado por diversos pesquisadores para a fermentação da mandioca com bons resultados. READE et alii (1974) usaram um mutante não esporogênico de Aspergillus fumigatus por ser um organismo tolerante a altas temperaturas e capaz de crescer sobre amido. Por outro lado, alguns relatos mostram que o gênero Fusarium se presta muito bem para a produção de proteína microbiana. Os próprios autores acima referidos afirmam que a linhagem de Fusarium graminearum IMI 154209 é muito mais rica em proteína que o A. fumigatus, não tendo sido usada, porém, por não crescer sobre amido. CHRISTIAS et alii

(1975) acharam que F. oxysporum e F. moniliforme continham aproximadamente 30% mais proteína e aminoácidos totais que Aspergillus niger e a composição em aminoácidos da proteína micelial foi superior a da "British Petroleum" que é proteína de levedura "Tropina", produzida comercialmente sobre substratos de hidrocarbonetos. Segundo os autores, ao contrário de outros relatos publicados, o Fusarium parece ser um organismo muito melhor que o Aspergillus para a produção de proteína microbiana.

4. METODOLOGIA

4.1. Preparo do Material

Raízes e folhas de mandioca foram fornecidas pela Estação Experimental de Piracicaba, São Paulo, sendo as raízes da variedade IAC - Yara (1416-67) e as folhas da variedade IAC - Jaçanã (X - 352-7) devido à disponibilidade na época. As raízes foram lavadas, descascadas e passadas em ralador de modo a se obter finas tiras semelhantes a talharins para facilitar a secagem. Foram pesadas, colocadas em bandejas e deixadas em estufa, com circulação de ar forçada a 45º C até estabilização do peso sendo, desta maneira, determinado o teor de umidade. As folhas foram lavadas em água corrente, moídas e pesadas, separando-se metade para ser desidratada por liofilização, através do liofilizador Virtis modelo 10145 MRBA, de laboratório, e a outra metade em estufa, a qual foi espalhada em bandejas e mantida em estufa a 45º C, com circulação de ar forçada, até estabilização do peso para determinação do teor de umidade. O tempo decorrido entre a co-

lheita do material e seu preparo para desidratação foi cerca de três horas. As tiras de raiz bem secas, folha liofilizada e folha desidratada em estufa foram moídas e, em seguida, passadas em peneira de 150 mesh para que se transformassem em pó e tivessem suas fibras eliminadas. O material foi guardado em frascos âmbar hermeticamente fechados. Amostras de raiz foram tomadas para determinação de nitrogênio total pelo método Kjeldahl, a qual foi efetuada na Secção de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, através do Analisador Automático II da Technicon ; e amido pelo método proposto por DUBOIS et alii (1956). Amostras de folhas, além de terem sido analisadas em relação ao teor de nitrogênio total, tiveram o perfil de aminoácidos determinado na Secção de Bioquímica de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, através do Analisador Automático de Aminoácidos Beckman, Modelo 120 C .

4.2. Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo

Foram ensaiados três fungos (Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625, cedidos pela Micoteca do Instituto Zimotécnico do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", e Fusarium sp., isolado de raiz de mandioca com cerca de 7 dias após ter sido colhida e deixada, acidentalmente, ao ar livre) e nove valores de pH (de 1 a 9) seguindo-se o esquema fatorial.

O meio foi preparado com raiz e folha de mandioca desidratada em estufa nas quantidades suficientes para fornecerem três gramas de carboidrato por cento e 0,08 gramas de nitrogênio por cento, respectivamente. Foi gelatinizado entre 60-70°C durante 15 minutos, resfriado em água corrente e distribuído em 9 frascos de Erlenmeyer de 500 ml para ajustagem do pH nos valores de 1 a 9, a qual foi feita com ácido sulfúrico 2N e hidróxido de sódio 2N. Em seguida, foi distribuído em 81 frascos de 250 ml, cada um contendo 50 ml de meio, sendo 9 repetições para cada valor de pH e 3 para cada fungo. A esterilização foi feita a 121°C por 15 minutos.

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

Tendo sido feita a inoculação, os frascos foram colocados num agitador regulado para 120 batidas por minuto. A temperatura foi mantida entre 28-30°C.

Após quatro dias de incubação mediu-se o pH dos meios e, em seguida, o material foi filtrado para a determinação do peso seco, em estufa até peso constante, na temperatura de 60°C de modo a garantir que não houvesse alteração no perfil de aminoácidos (SPICER, 1971).

4.3. Ensaio de Métodos de Desidratação da Folha, Níveis Ótimos de Folha e Raiz de Mandioca para o Crescimento dos Microrganismos

Foram testados cinco níveis de folha de modo a fornecerem 0,04 - 0,08 - 0,12 - 0,16 e 0,20 gramas de nitrogênio por cento e quatro níveis de raiz correspondentes a 1,5 - 2,5 - 3,5 e 4,5 gramas de carboidrato por cento, de acordo com o seguinte esquema fatorial.

Raiz	Folha	0 (0,04)	1 (0,08)	2 (0,12)	3 (0,16)	4 (0,20)
(1,5) - 0		00	01	02	03	04
(2,5) - 1		10	11	12	13	14
(3,5) - 2		20	21	22	23	24
(4,5) - 3		30	31	32	33	34

Este esquema foi seguido tanto para a folha desidratada em estufa como para a liofilizada.

Os meios foram preparados em frascos de Erlenmeyer de 250 ml onde foram gelatinizados, como descrito anteriormente. Todos tiveram o pH ajustado para o valor ótimo determinado no ensaio anterior. Em seguida, foram distribuídos em 80 frascos de 250 ml, sendo 50 ml para cada frasco e duas repetições para cada tratamento. A esterilização foi feita a 121°C por 15 minutos.

O inóculo foi obtido de maneira semelhante ao ensaio anterior.

Os frascos foram colocados em agitador regulado para 120 batidas por minuto. A temperatura foi mantida entre 28 e 30°C .

Após quatro dias de incubação mediu-se o pH e, em seguida, o material foi filtrado em tela de nylon permeável aos esporos, se presentes, e partículas residuais de folha, mas impermeável ao micélio, o qual foi deixado desidratar em estufa a 60°C até peso constante para determinação do peso seco. O material desidratado foi encaminhado à Seção de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura para determinação de nitrogênio total pelo método Kjeldahl e conversão de proteína bruta multiplicando-se pelo fator 6,25 (American Association of Cereal Chemists, Inc. 1962). O material referente à melhor produção de proteína bruta foi submetido à análise de aminoácidos, a qual foi realizada na Seção de Bioquímica de Plantas da mesma instituição.)

4.4. Curva de Crescimento

Tendo sido determinados o melhor microrganismo, o pH ótimo, o melhor método de desidratação da folha e os níveis ótimos de folha e raiz , foi feita a curva de crescimento dentro das condições ótimas encontradas.

Como nos ensaios anteriores, o meio foi gelatinizado e o pH ajustado para o valor ótimo determinado. Em seguida foi distribuído em 27 frascos de Erlenmeyer de 250 ml, autoclavado a 121°C por 15 minutos, inoculado e mantido em agitador regulado para 120 batidas por minuto. A temperatura ficou entre 28-30°C .

As determinações do pH final, peso seco e proteína bruta foram feitas tomando-se três amostras em intervalos de 12 horas num período de 12 a 120 horas, tendo a análise estatística seguido o delineamento de experimentos inteiramente casualizados.

4.5. Determinação de Aflatoxina

Foi pesquisada a presença de aflatoxina em micélio de Aspergillus niger IZ-9, cultivado em raiz e folha de mandioca desidratada em estufa, pelo método proposto por PONS et alii (1966) modificado por FONSECA (1977), segundo comunicação pessoal, em que o pigmento verde é extraído com éter de petróleo.

4.6. Análise Estatística

Na análise de variância foi feito o teste F para se verificar a significância da ação dos tratamentos sobre a produção de biomassa e proteína, assim como das interações e suas decomposições. Pela análise de regressão foram encontradas as equações que melhor se adaptam aos dados observados em cada caso (GOMES, 1973). A comparação das médias foi feita pelo teste de Student-Newman-Keuls (STEEL e TORRIE, 1960).

5. RESULTADOS

5.1. Análises Químicas em Raiz e Folha de Mandioca

As análises de nitrogênio nas amostras de folha e raiz de mandioca, variedades IAC-Jaçanã (x - 352-7) e IAC-Yara (1416-67), respectivamente, passadas em peneira de 150 mesh, mostraram que a folha desidratada em estufa possuía 3,90% de nitrogênio, a folha liofilizada 4,06% e a raiz 0,23% , que correspondem a 24,38% , 25,38% e 1,44% de proteína bruta (N x 6,25) , respectivamente. O teor de amido da raiz, após a peneiragem, ficou em torno de 100% . A umidade, tanto das folhas como da raiz, foi cerca de 70% .

A análise de aminoácidos nas folhas (Tabela 1) revelou que o método de desidratação não alterou a qualidade proteica, exceto em relação à treonina que sofreu uma redução de 36,79% no processo de desidratação em estufa quando comparado com a liofilização. As maiores concentrações foram observadas em ácido glutâmico, seguindo-se ácido aspártico e leucina. Em comparação com o padrão de aminoácidos da FAO, a folha de mandioca apresenta-se deficiente apenas em metionina. Triptofano não foi analisado, porém ROGERS e MILNER (1963) e ADRIAN et alii (1969) encontraram que este aminoácido está presente na folha de mandioca em quantidade adequada .

Tabela 1. Teor de Aminoácidos da Folha de Mandioca Variedade IAC - Jaçanã (x - 352-7) Após Passagem em Peneira de 150 mesh

Aminoácido	Folha Desidratada em Estufa (g/100 g proteína)		Folha Liofilizada (g/100 g proteína)		Aminoácidos essenciais (FAO)
	Totais	Essenciais	Totais	Essenciais	
Lisina	4,28	4,28	4,53	4,53	4,2
Histidina	1,63	--	1,69	--	--
Arginina	4,41	--	4,35	--	--
Ácido aspártico	8,07	--	8,38	--	--
Treonina	2,68	2,68	4,24	4,24	2,8
Serina	2,65	--	2,20	--	--
Ácido glutâmico	10,18	--	11,25	--	--
Prolina	3,74	--	3,67	--	--
Glicina	4,81	--	4,62	--	--
Alanina	5,25	--	4,91	--	--
Cistina	--	--	--	--	2,0
Valina	4,70	4,70	5,11	5,11	4,2
Metionina	0,38	0,38	0,47	0,47	2,2
Isoleucina	4,03	4,03	3,99	3,99	4,2
Leucina	7,58	7,58	7,57	7,57	4,8
Tirosina	3,40	3,40	3,07	3,07	2,8
Fenilalanina	4,18	4,18	4,22	4,22	2,8
Triptofano	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	1,4
Soma total	--	--	--	--	31,4
- Triptofano	71,97	31,23	74,27	33,20	30,0

a - Não analisado.

5.2. Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo

Após a autoclavagem dos meios de cultura foram observadas algumas alterações em relação à cor e viscosidade. Assim, em pH 1 a cor passou de verde (dada pela folha) a vinho-tinto, em pH 2 a vermelho claro e em pH 8 e 9 vermelho-amarronzado. Na faixa de pH de 3 a 7 não foi observada nenhuma mudança na coloração. A viscosidade foi aumentando gradativamente à medida que o pH crescia, ficando o meio completamente líquido em pH 1 e 2 e pastoso em pH 8 e 9.

Após quatro dias de incubação novas modificações foram observadas. Todos os meios apresentaram-se igualmente fluidos, porém, diferentes graus de turvação e coloração foram observados. Para o Fusarium sp em pH 1 o meio ficou amarelo avermelhado, em pH 2 e 3 amarelo claro e nos demais a cor foi tendendo gradativamente para vermelho-amarronzado à medida que o pH se tornava alcalino. Quanto à turvação, em pH 1 e 2 os meios apresentaram-se límpidos, em pH 3 mostraram uma forte turvação e nos demais uma ligeira turvação. Para o A. niger IZ-9 em pH 1,5 e 6 o meio ficou amarelo avermelhado e nos demais amarelo claro; foi observada uma forte turvação em todos os valores de pH, exceto no pH 1, onde o meio ficou límpido. Para o A. Wentii IZ-1625 em pH 2, o meio apresentou-se amarelo claro com forte turvação e os demais mostraram pigmentação vermelha, que foi aumentando de intensidade gradativamente à medida que o pH crescia, e uma ligeira turvação.

Em relação à produção de biomassa, A. niger IZ-9 e A. Wentii IZ-1625 começaram a apresentar crescimento a partir do pH 2, enquanto que o Fusarium sp. apenas a partir do pH 3. Por este motivo, os tratamentos com os valores de pH 1 e 2 foram desprezados da análise estatística reduzindo,

assim o fatorial para 7 (valores de pH) x 3 (fungos). Os resultados foram tomados em relação ao peso seco expresso em gramas por litro (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de Biomassa, Expressa em Peso Seco (gramas/litro), por Fusarium sp, Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 em Meio de Raiz e Folha de Mandioca (Desidratada em Estufa) na Faixa de pH de 1 a 9 e Determinação do pH Final do Meio (Médias de três repetições).

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

A análise de variância (Tabela 3) revelou diferença altamente significativa a nível de 1% de probabilidade entre os tratamentos empregados, tendo tanto os fungos, pelo menos um deles, como o pH, pelo menos um dos valores, dado uma contribuição altamente significativa a nível de 1% de probabilidade para a variação na produção de peso seco. Também a interação fungos x pH apresentou diferença altamente significativa a nível de 1%, indicando que a variação ocorrida não foi causada pela ação isolada dos fungos ou pH, mas por uma ação conjunta dos dois fatores, ou seja, pelo menos um dos fungos se comportou de maneira distinta dos demais em relação aos valores de pH testados.

Tabela 3. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Fusarium sp, Aspérgillus niger IZ-9 e Aspérgillus wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 3 a 9

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Fungos	2	362,51	181,25	60,82 **
pH	6	261,26	43,54	14,61 **
Int. Fungos x pH	12	151,39	12,62	4,23 **
(Tratamentos)	(20)	(775,16)	(38,76)	(13,01 **)
Resíduo	42	125,01	2,98	
Total	62	900,17		

** - Significativo $p \leq 0,01$

C.V. = 18%

A decomposição da interação pH/fungos (Tabela 4) mostrou que A. niger IZ-9 e A. wentii IZ-1625 responderam aos valores de pH analisados com uma diferença altamente significativa a nível de 1% de probabilidade, enquanto que o Fusarium sp. não apresentou nenhuma variação significativa.

Tabela 4. Decomposição da Interação Fungos x pH Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Fusarium sp., A. niger IZ-9 e A. wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 3 a 9.

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Int. Fungos x pH	12	151,39	12,62	4,23 **
pH / <u>Fusarium</u>	6	29,32	4,89	1,64 NS
pH / <u>A. niger</u>	6	248,35	41,39	13,89 **
pH / <u>A. wentii</u>	6	134,98	22,50	7,55 **
Resíduo	42	125,01	2,98	

NS - Não Significativo

** - Significativo $p \leq 0,01$

Através da comparação das médias pelo teste de Student - Newman - Keuls (Tabela 5), observou-se que os melhores resultados obtidos foram produzidos pelo A. niger IZ-9, nos valores de pH 3,7,8 e 9; Fusarium sp em todos os valores de pH analisados; e A. wentii IZ-1625 no pH 3, não tendo havido diferença significativa entre esses tratamentos. Todos os demais tratamentos apresentaram diferença altamente significativa a nível de 1% de probabilidade quando comparados com a melhor média obtida. Em relação ao melhor resultado do A. wentii as produções obtidas por este fungo

Tabela 5. Teste de Student - Newman - Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) Dadas por Fusarium sp, Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 3 a 9.

Fungo	pH	Médias de Peso Seco (g/l)	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls Para a Média 15,16	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls Para a Média 12,18
<u>A. wentii</u> IZ1625	4	4,00	11,16 **	8,18 **
<u>A. wentii</u> IZ1625	6	4,48	10,68 **	7,70 **
<u>A. wentii</u> IZ1625	7	5,32	9,48 **	6,86 **
<u>A. niger</u> IZ9	6	5,47	9,69 **	6,71 **
<u>A. wentii</u> IZ1625	5	5,77	9,39 **	6,41 **
<u>A. wentii</u> IZ1625	8	6,99	8,17 **	5,19 *
<u>A. wentii</u> IZ1625	9	7,01	8,15 **	5,17 *
<u>A. niger</u> IZ9	5	7,35	7,81 **	4,83 *
<u>A. niger</u> IZ9	4	8,62	6,54 **	3,56 NS
<u>Fusarium</u> sp.	5	10,47	4,69 NS	
<u>Fusarium</u> sp.	8	11,19	3,97 NS	
<u>Fusarium</u> sp.	4	11,29	3,87 NS	
<u>Fusarium</u> sp.	9	11,69	3,47 NS	
<u>A. wentii</u> IZ1625	3	12,18	2,98 NS	
<u>Fusarium</u> sp.	6	12,75	2,41 NS	
<u>A. niger</u> IZ9	8	13,24	1,92 NS	
<u>A. niger</u> IZ9	7 e 9	13,34	1,82 NS	
<u>Fusarium</u> sp.	3	13,55	1,61 NS	
<u>Fusarium</u> sp.	7	13,82	1,34 NS	
<u>A. niger</u> IZ9	3	15,16	0,00 NS	

NS - Não Significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

em pH 8 e 9 e pelo A. niger em pH 5 diferiram significativamente a nível de 5% de probabilidade. As produções resultantes do A. wentii em todos os outros valores de pH diferiram a nível de 1% de probabilidade e quanto aos demais tratamentos não houve diferença.

Como o Fusarium sp. revelou ser ótimo produtor de biomassa numa ampla faixa de pH (de 3 a 9) foi escolhido para este trabalho, sendo utilizado, nos testes subsequentes, o pH 3, uma vez que neste valor de pH os problemas de contaminação são minimizados.

No entanto, o A. niger IZ-9 também apresentou uma ótima produção de biomassa e antes de decidir descartá-lo ou não uma análise mais detalhada se fêz necessária. Tendo este fungo se desenvolvido em pH 2, o que também ocorreu com o A. wentii IZ-1625, nova análise foi feita incluindo-se o pH 2 e tomando-se os resultados apenas destes dois fungos (Fatorial 8 x 2).

Esta nova análise (Tabela 6) mostrou diferença altamente significativa, a nível de 1% de probabilidade, entre os tratamentos, sendo tanto o pH como os fungos responsáveis por esta variação. A interação pH x fungos também foi altamente significativa a nível de 1% de probabilidade indicando que os dois fatores não agiram isoladamente na variação de produção de biomassa.

Tabela 6. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 2 a 9.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Fungos	1	225,90	225,90	89,29 **
pH	7	359,70	51,39	20,31 **
Int. Fungos x pH	7	62,86	8,98	3,55 **
(Tratamentos)	(15)	(648,46)	(43,23)	(17,09 **)
Resíduo	32	80,96	2,53	
Total	47	729,42		

** - Significativo $p \leq 0,01$

C.V. = 19%

A decomposição da interação Fungos x pH (Tabela 7), revelou que tanto o A. niger IZ-9, como o A. wentii IZ-1625 reagiram aos valores de pH analisados com uma diferença altamente significativa, a nível de 1% de probabilidade, em ambos os casos.

Comparando-se as médias pelo teste de Student - Newman - Keuls (Tabela 8), verificou-se que no pH 2 tanto o A. niger IZ-9, como o A. wentii IZ-1625 tiveram baixa produção com uma diferença altamente significativa em relação à maior média obtida. Os melhores resultados foram produzidos pelo A. niger IZ-9 em pH 3, 7, 8 e 9 e pelo A. wentii em pH 3, não tendo havido diferença significativa entre esses tratamentos.

Tabela 7. Decomposição da Interação Fungos x pH Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por A. niger IZ-9 e A. wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 2 a 9.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Int. Fungos x pH	7	62,86	8,98	3,55 **
pH/ <u>A. niger</u>	7	271,26	38,75	15,32 **
pH/ <u>A. wentii</u>	7	151,31	21,62	8,54 **
Resíduo	32	80,96	2,53	

** - Significativo $p \leq 0,01$

O pH final foi determinado (Tabela 2) e verificou-se que em pH de 3 a 6, o Fusarium sp. apresentou uma elevação no pH final e em 8 e 9 um decréscimo. O A. niger IZ-9 em pH de 3 a 6 mostrou um ligeiro aumento e em 7, 8 e 9 uma brusca queda no valor de pH. Finalmente, o A. wentii IZ-1625 aumentou em 3, 4 e 5 e baixou em 6, 7, 8 e 9, sendo, porém, esta queda menos acentuada que a produzida pelo A. niger IZ-9. Isto pode ser também indicado pela decomposição da interação (Tabela 7), onde observa-se que a interação do pH inicial com o A. niger IZ-9 foi maior do que com o A. wentii IZ-1625.

Assim, em relação ao pH inicial, ficou definido para o A. niger IZ-9, nas condições utilizadas, um pico de produção de biomassa em pH ácido (pH 3) e outro em pH neutro a alcalino (pH 7, 8 e 9). Entretanto, tomando-se em consideração o pH final (Tabela 2), observa-se que ambos os picos ocorreram quando este se situava em torno de 3,7. Para o A. wentii IZ-1625 a melhor produção foi atingida em pH 3.

Tabela 8. Teste de Student - Newman - Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) Dadas por Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 2 a 9.

Fungos	pH	Médias de Peso Seco (g/l)	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls Para a Média 15,16	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls Para a Média 12,18
<u>A. wentii</u> IZ-1625	4	4,00	12,13 **	8,89 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	2	4,04	12,09 **	8,85 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	6	4,48	11,61 **	8,37 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	7	5,32	10,70 **	7,46 **
<u>A. niger</u> IZ-9	6	5,47	10,53 **	7,29 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	5	5,75	10,23 **	6,99 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	8	6,99	8,88 **	5,64 *
<u>A. wentii</u> IZ-1625	9	7,01	8,86 **	5,62 *
<u>A. niger</u> IZ-9	5	7,35	8,49 **	5,25 *
<u>A. niger</u> IZ-9	2	7,98	7,80 **	4,57 *
<u>A. niger</u> IZ-9	4	8,62	7,11 **	3,87 *
<u>A. wentii</u> IZ-1625	3	12,18	3,24 NS	-
<u>A. niger</u> IZ-9	8	13,24	2,09 NS	
<u>A. niger</u> IZ-9	7 e 9	13,34	1,98 NS	
<u>A. niger</u> IZ-9	3	15,16	-	

NS - Não Significativo

** - Significativo $p \leq 0,05$

* - Significativo $p \leq 0,01$

Embora no pH 3 o A. wentii IZ-1625 não tenha diferido significativamente da maior produção dada pelo A. niger IZ-9, comparando-se em termos gerais observa-se que o último foi muito melhor produtor de biomassa que o primeiro. Desta maneira, o A. niger IZ-9 foi também selecionado para este trabalho, tendo sido escolhido o pH 3 para os testes subsequentes pela mesma razão que para o Fusarium sp.

5.3. Ensaio de Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e Por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha de Mandioca para o Crescimento de Fusarium sp.

Os resultados deste ensaio, tomados em relação à produção de biomassa, expressa em gramas de peso seco por litro de meio, estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Fusarium sp. em Meio de Mandioca, Sendo Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folhas Desidratada em Estufa e Liofilizada. (Médias de Duas Repetições).

		F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
E	R ₀	4,36	4,57	6,39	7,74	3,78
	R ₁	4,48	6,11	7,02	1,93	0,90
	R ₂	3,16	1,78	1,22	7,33	4,51
	R ₃	9,83	10,86	4,85	16,61	0,03
L	R ₀	2,83	6,84	7,60	14,22	23,55
	R ₁	4,20	1,63	9,36	9,26	0,86
	R ₂	5,16	2,30	0,05	0,14	0,12
	R ₃	4,50	7,40	0,03	0,12	0,29

E - Método de Desidratação da Folha em Estufa

L - Método de Desidratação da Folha por Liofilização

R₀----R₃ - Níveis de Raiz (1,5 - 2,5 - 3,5 e 4,5 gramas de carboidrato por cento)

F₀----F₄ - Níveis de Folha (0,04 - 0,08 - 0,12 - 0,16 e 0,20 gramas de nitrogênio por cento).

A análise de variância (Tabela 10) revelou que o fungo respondeu aos diferentes níveis tanto de folha como de raiz e que não houve diferença estatística entre os métodos de desidratação da folha empregados, porém em combinação destes tanto com níveis de raiz como de folha houve um efeito interativo, indicando que o fungo se comporta de maneira distinta em relação aos métodos de desidratação dentro dos diferentes níveis de folha e raiz. A análise mostrou também que, pelo menos, uma combinação de nível de folha com nível de raiz difere das demais e, ainda, pelo menos, uma combinação dos três fatores, níveis de folha, níveis de raiz e métodos de desidratação, difere das demais.

Tabela 10. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Fusarium sp em Raiz e Folha de Mandioca Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha (MD), Quatro Níveis de Raiz (R) e Cinco de Folha (F).

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
MD	1	2,45	2,45	0,76 NS
F	4	85,19	21,30	6,61 **
R	3	325,37	108,46	33,68 **
MD x F	4	97,41	24,35	7,56 **
MD x R	3	360,51	120,17	37,32 **
F x R	12	573,84	47,82	13,30 **
MD x F x R	12	472,96	39,41	12,24 **
(Tratamentos)	(39)	(1917,73)	(49,17)	(15,27 **)
Resíduo	40	128,98	3,22	
Total	79	2046,71	25,91	

NS - Não significativo

C.V. = 34,51%

** - Significativo $p \leq 0,01$

A decomposição das interações duplas e tripla está apresentada na tabela 11. Para métodos de desidratação x níveis de folha observou-se que o fungo respondeu aos diferentes níveis de folha apenas em relação ao método de desidratação em estufa, enquanto que para métodos de desidratação x níveis de raiz o fungo respondeu aos níveis de raiz em relação aos dois métodos. A decomposição da interação tripla mostrou que apenas os componentes níveis de folha dentro do método de desidratação em estufa em relação ao nível zero de raiz e níveis de raiz dentro de método de desidratação por liofilização em relação ao nível zero de folha, não mostraram diferenças significativas.

Para os componentes da interação tripla que apresentaram diferença significativa foram feitas as análises de regressão, estando as equações de regressão que melhor estimam a produção de biomassa pelo fungo contidas na tabela 12 e as respectivas curvas nas figuras 1,2,3 e 4.

A comparação das médias pelo teste de Student-Newman - Keuls (Tabela 13) mostrou que houve diferença altamente significativa a nível de 1% de probabilidade entre as duas maiores médias obtidas, indicando a produção com o método de desidratação da folha por liofilização nos níveis zero de raiz, fornecendo 1,5 gramas de carboidrato por cento, e quatro de folha, fornecendo, 0,20 gramas de nitrogênio por cento, como sendo a melhor. Tomando-se a maior média produzida com o método de desidratação em estufa com a sua imediatamente inferior, verificou-se que diferem entre si a nível de 1% de probabilidade, indicando que para este método a melhor produção foi obtida nos níveis três de raiz, correspondente a 4,5 gramas de carboidrato por cento, e três de folha, correspondente a 0,16 gramas de nitrogênio por cento.

Tabela 11. Decomposição das interações MD x F, MD x R e MD x F x R Relativas à Análise de Variância Apresentada na Tabela 10.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
MD x F	4	97,41	24,35	7,56 **
F/MD-E	4	152,49	38,12	11,84 **
F/MD-L	4	30,11	7,53	2,34 NS
MD x R	3	360,51	120,17	37,32 **
R/MD-E	3	141,85	47,28	14,68 **
R/MD-L	3	544,03	181,34	56,32 **
MD x F x R	12	472,96	39,41	12,24 **
F/MD-E. R ₀	4	21,73	5,43	1,69 NS
F/MD-E. R ₁	4	55,26	13,82	4,29 **
F/MD-E. R ₂	4	47,85	11,96	3,72 *
F/MD-E. R ₃	4	316,38	79,09	24,56 **
F/MD-E. R ₀	4	526,72	131,68	40,89 **
F/MD-E. R ₁	4	132,46	33,12	10,28 **
F/MD-E. R ₂	4	39,74	9,94	3,09 *
F/MD-E. R ₃	4	89,26	22,31	6,93 **
F/MD-E. F ₀	3	53,14	17,71	5,50 **
F/MD-E. F ₁	3	86,76	28,92	8,98 **
F/MD-E. F ₂	3	40,54	13,51	4,20 *
F/MD-E. F ₃	3	221,82	73,94	22,96 **
F/MD-E. F ₄	3	28,33	9,44	2,93 *
F/MD-E. F ₀	3	5,75	1,92	0,60 NS
F/MD-E. F ₁	3	53,85	17,95	5,57 **
F/MD-E. F ₂	3	145,55	48,52	15,07 **
F/MD-E. F ₃	3	294,30	98,10	30,47 **
F/MD-E. F ₄	3	802,64	267,55	83,09 **
Resíduo	40	128,98	3,22	.

NS - Não significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

Tabela 12. Equações de Regressão que Melhor Estimam a Produção de Biomassa por Fusarium sp. Relativas às Decomposições da Interação Tripla que Apresentaram Diferenças Significativas (Tabela 11).

Decomposições	Equações de Regressão
F/MD-E. R ₁	$\hat{y} = 4,73872 + 2,09456x - 0,80714x^2$
F/MD-E. R ₂	$\hat{y} = 3,16001 + 5,53875x - 12,37231x^2 + 6,34876x^3 - 0,89521x^4$
F/MD-E. R ₃	$\hat{y} = 9,83006 + 30,56494x - 48,45375x^2 + 21,87500x^3 - 2,95625x^4$
F/MD-L. R ₀	$\hat{y} = 3,60072 + 0,16956x + 1,17786x^2$
F/DM-L. R ₁	$\hat{y} = 3,94814 - 7,66928x + 7,90857x^2 - 1,55000x^3$
F/MD-L. R ₂	$\hat{y} = 3,99900 - 1,22400x$
F/MD-L. R ₃	$\hat{y} = 4,50002 + 20,19578x - 25,47535x^2 + 9,21914x^3 - 1,04458x^4$
R/MD-E. F ₀	$\hat{y} = 4,82675 - 3,39825x + 1,63125x^2$
R/MD-E. F ₁	$\hat{y} = 4,56500 + 10,89585x - 12,56752x^2 + 3,21167x^3$
R/MD-E. F ₂	$\hat{y} = 6,39000 + 9,12250x - 11,14000x^2 + 2,64250x^3$
R/MD-E. F ₃	$\hat{y} = 7,37275 - 8,11975x + 3,77375x^2$
R/MD-E. F ₄	$\hat{y} = 3,78000 - 10,97750x + 10,52500x^2 - 2,42750x^3$
R/MD-L. F ₁	$\hat{y} = 6,76725 - 7,49525x + 2,57625x^2$
R/MD-L. F ₂	$\hat{y} = 7,60000 + 14,07415x - 15,71249x^2 + 3,39333x^3$
R/MD-L. F ₃	$\hat{y} = 14,22000 + 1,53835x - 8,70752x^2 + 2,20917x^3$
R/MD-L. F ₄	$\hat{y} = 23,54500 - 40,66165x + 21,47999x^2 - 3,50333x^3$

F₀ ---- F₄ - Níveis de Folha

R₀ ---- R₃ - Níveis de Raiz

MD-E - Método de desidratação da folha em estufa

MD-L - Método de desidratação da folha por liofilização

Figura 1. Produção de Biomassa por Fusarium sp. nos níveis 1(....), 2(-.-.-) e 3(---) de Raiz, Respectivamente, 2,5-3,5 e 4,5% de Carboidrato, em Função dos Níveis 0-1-2-3 e 4 de Folha Desidratada em Estufa, Respectivamente, 0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,20% de Nitrogênio

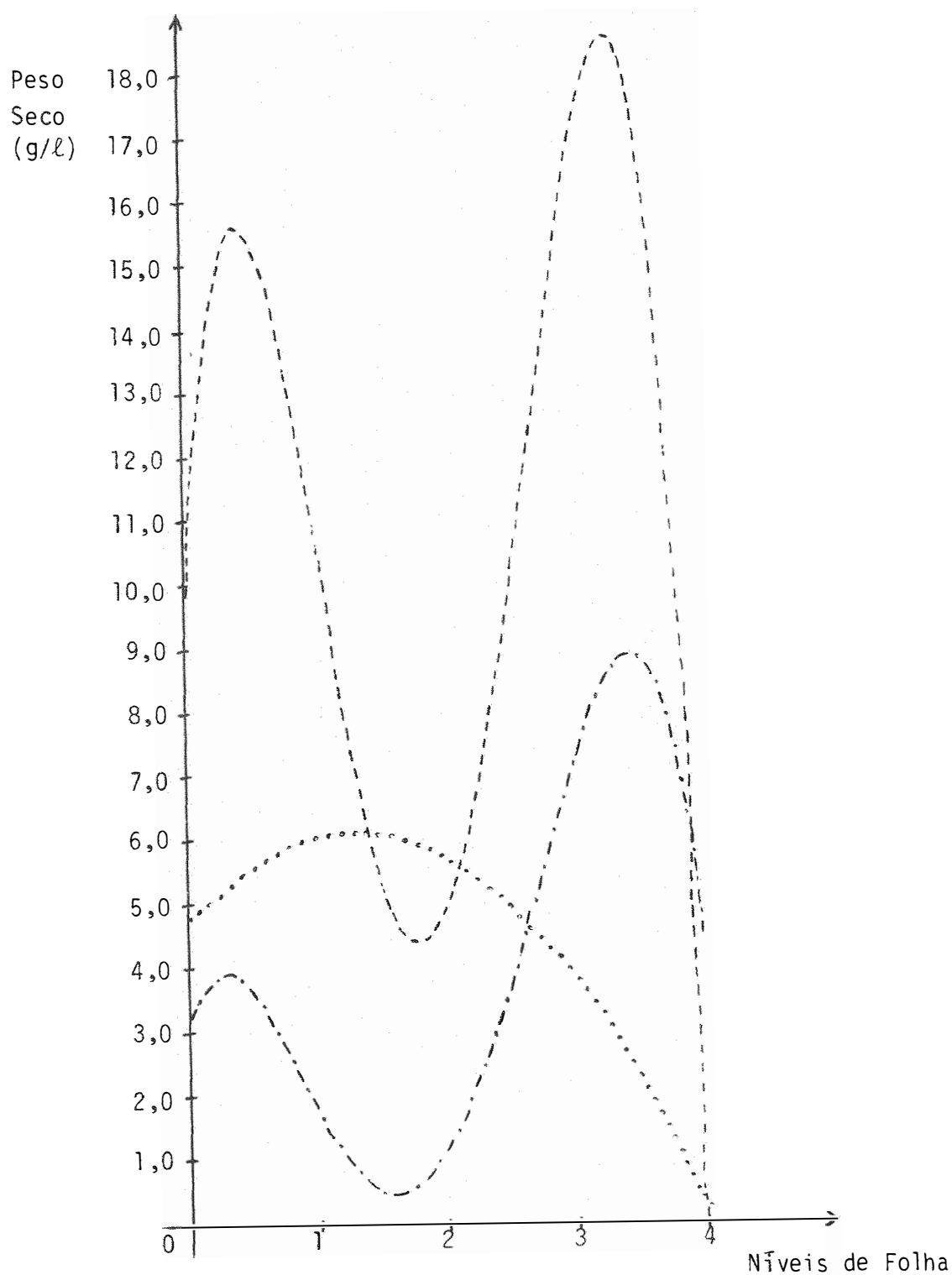


Figura 2. Produção de Biomassa por *Fusarium* sp. nos Níveis 0(—), 1(....), 2(-.-.-) e 3(----) de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5-3,5-4,5 g% de Carboidrato, em Função dos Níveis 0-1-2-3 e 4 de Folha Liofilizada, Respectivamente, 0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,20g% de Nitro - gênio.

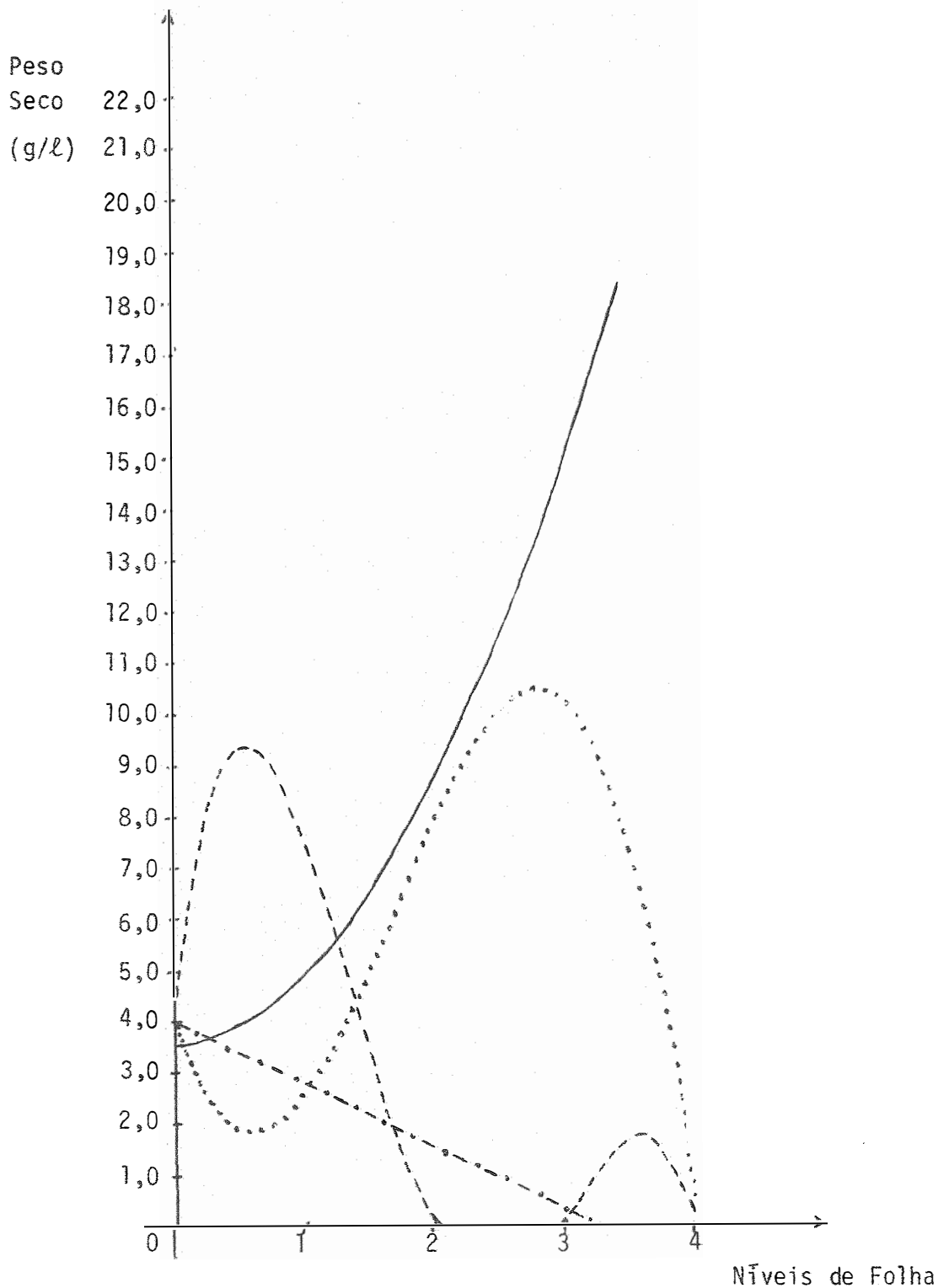


Figura 3. Produção de Biomassa por *Fusarium* sp. nos Níveis 0(—), 1(...), 2(-.-.-), 3(----) e 4(-x-x-) de Folha Desidratada em Estufa, Respe-
tivamente, 0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,20g% de Nitrogênio, em Fun-
ção dos Níveis 0-1-2 e 3 de Raiz, Respetivamente, 1,5-2,5-3,5 e
4,5g% de Carboidrato.

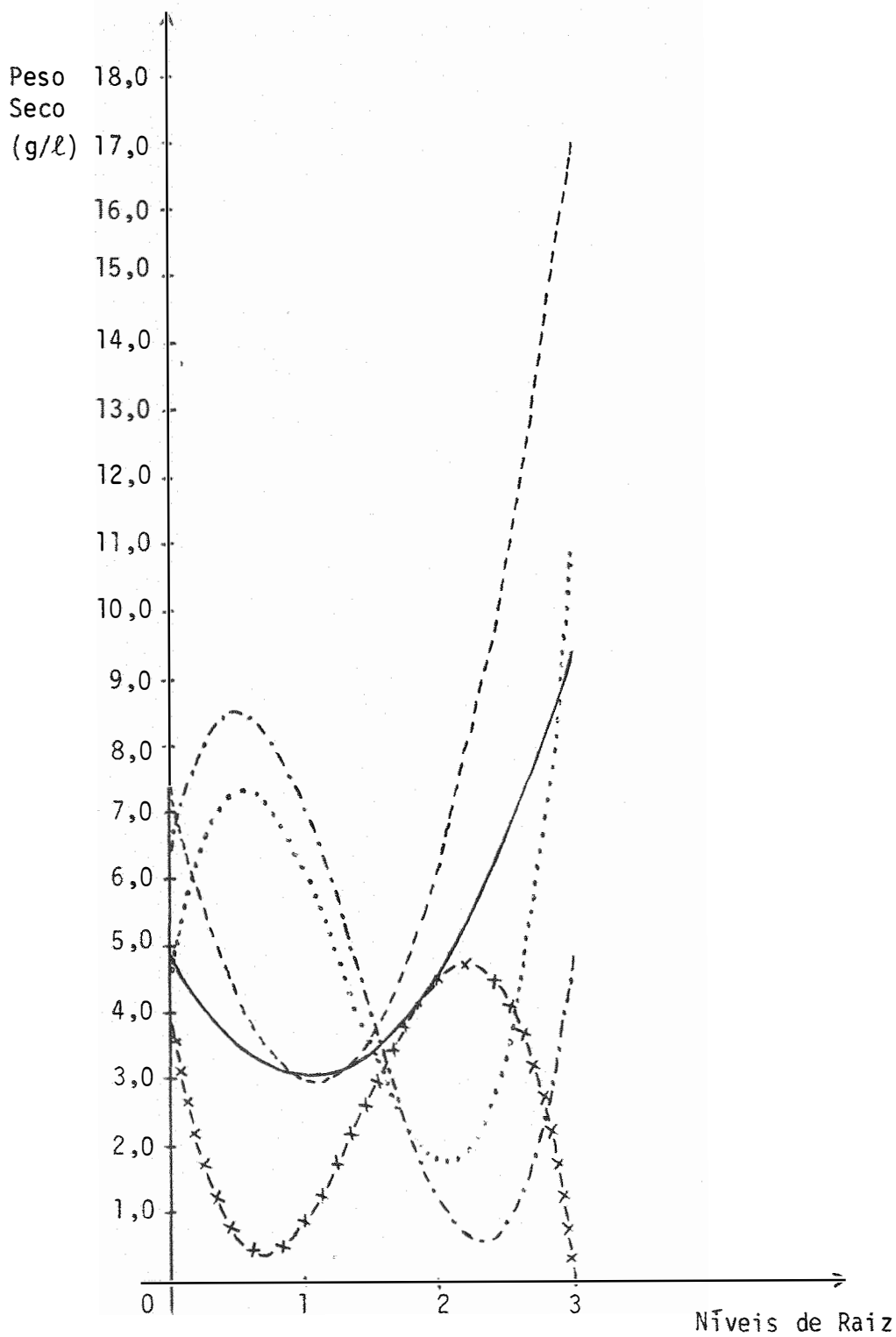


Figura 4. Produção de Biomassa por *Fusarium* sp. nos Níveis 1(...), 2(-.-.-), 3(- - -) e 4(-x-x-) de Folha Liofilizada, Respectivamente, 0,08-0,12-0,16 e 0,20g% de Nitrogênio, em Função dos Níveis 0-1-2 e 3 de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5-3,5 e 4,5g% de Carboidrato.

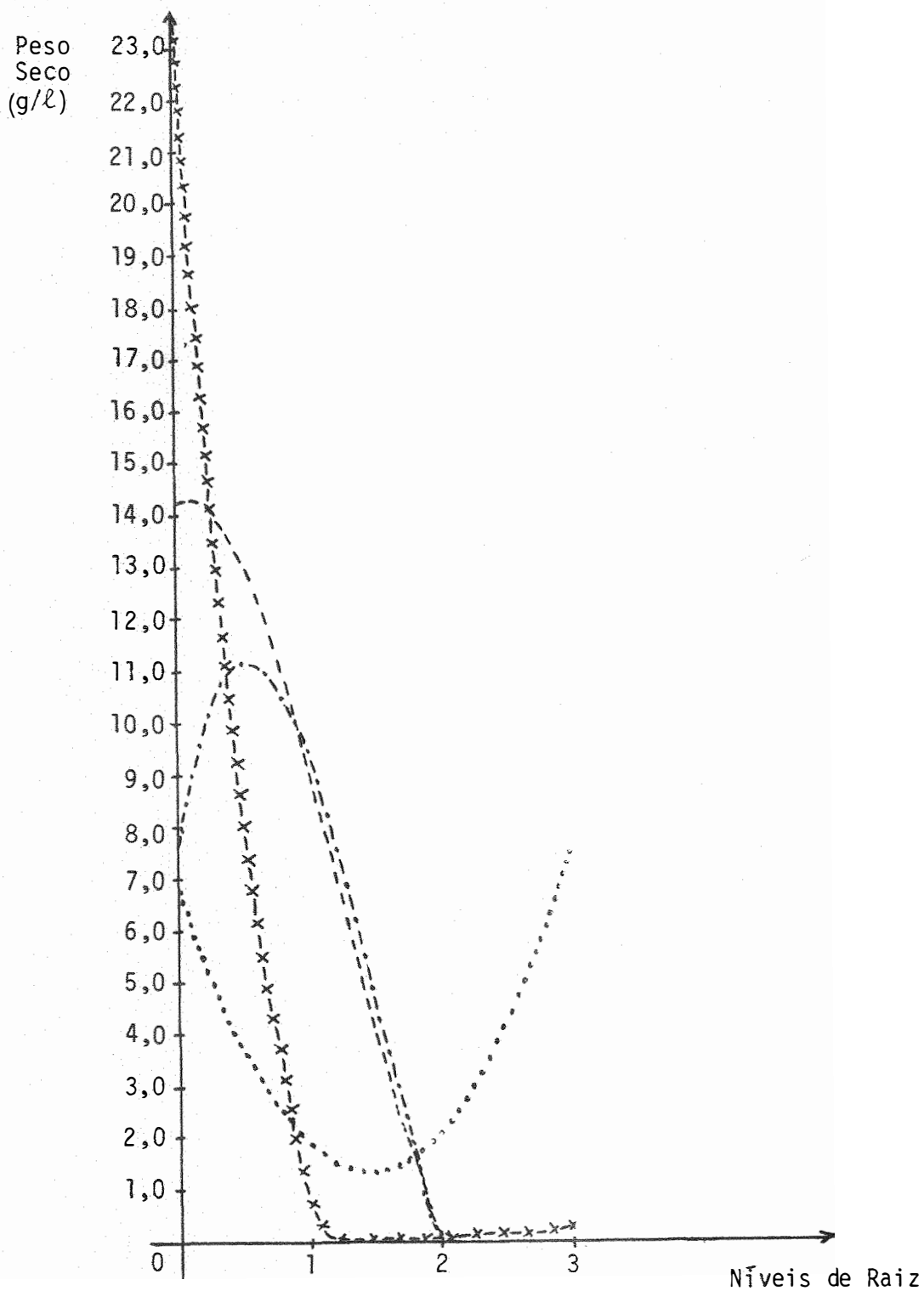


Tabela 13. Teste de Student - Newman - Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Fusarium sp. em Raiz e Folha de Mandioca Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha, Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha.

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 23,55	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 16,61
E-R ₃ F ₄ = L-R ₃ F ₂	0,03	18,52 **	13,06 **
L-R ₂ F ₂	0,05	18,50 **	13,04 **
L-R ₃ F ₃ = L-R ₂ F ₄	0,12	18,45 **	12,98 **
L-R ₃ F ₃	0,14	18,43 **	12,97 **
L-R ₃ F ₄	0,29	18,31 **	12,85 **
L-R ₁ F ₄	0,86	17,87 **	12,40 **
E-R ₁ F ₄	0,90	17,83 **	12,37 **
E-R ₂ F ₂	1,22	17,58 **	12,12 **
L-R ₁ F ₁	1,63	17,26 **	11,80 **
E-R ₂ F ₁	1,78	17,14 **	11,68 **
E-R ₁ F ₃	1,93	17,02 **	11,56 **
L-R ₂ F ₁	2,30	16,73 **	11,27 **
L-R ₀ F ₀	2,83	16,31 **	10,85 **
E-R ₂ F ₀	3,16	16,06 **	10,59 **
E-R ₀ F ₄	3,78	15,57 **	10,10 **

- Continua -

- Continuação -

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 23,55	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 16,61
L-R ₁ F ₀	4,20	15,24 **	9,77 **
E-R ₀ F ₀	4,36	15,11 **	9,65 **
E-R ₁ F ₀	4,48	15,02 **	9,55 **
L-R ₃ F ₀	4,50	15,00 **	9,54 **
E-R ₂ F ₄	4,51	14,99 **	9,53 **
E-R ₀ F ₁	4,57	14,94 **	9,48 **
E-R ₃ F ₂	4,85	14,72 **	9,26 **
L-R ₂ F ₀	5,16	14,48 **	9,02 **
E-R ₁ F ₁	6,11	13,73 **	8,27 **
E-R ₀ F ₂	6,39	13,51 **	8,05 **
L-R ₀ F ₁	6,84	13,16 **	7,69 **
E-R ₁ F ₂	7,02	13,02 **	7,55 **
E-R ₂ F ₃	7,33	12,77 **	7,31 **
L-R ₃ F ₁	7,40	12,72 **	7,25 **
L-R ₀ F ₂	7,60	12,56 **	7,09 **
E-R ₀ F ₃	7,74	12,45 **	6,98 **
L-R ₁ F ₃	9,26	11,25 **	5,79 **
L-R ₁ F ₂	9,36	11,17 **	5,71 **
E-R ₃ F ₀	9,83	10,80 **	5,34 **
E-R ₃ F ₁	10,86	9,99 **	4,53 **
L-R ₀ F ₃	14,22	7,35 **	1,88 NS

- Continua -

- Continuação -

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 23,55	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 16,61
E-R ₃ F ₃	16,61	5,46 **	-
L-R ₀ F ₄	23,55	-	-

E - Método de Desidratação da Folha em Estufa

L - Método de Desidratação da Folha por Liofilização

R₀ ---- R₃ - Níveis de Raiz (1,5 - 2,5 - 3,5 e 4,5 gramas de Carboidrato por Cento).

F₀ ---- F₄ - Níveis de Folha (0,04 - 0,08 - 0,12 - 0,16 e 0,20 gramas de Nitrogênio por Cento).

NS - Não Significativo

** - Significativo $p \leq 0,01$

As variações no pH final dos meios, após quatro dias de incubação, estão apresentadas na tabela 14. A estimativa da média quando foi usado o método de desidratação da folha em estufa foi 3,37 e, no caso da desidratação por liofilização, 3,35, sendo os desvios padrão 0,056 e 0,058, respectivamente.

Tabela 14. Valores do pH Final do Meio de Raiz e Folha de Mandioca Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha, Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha para a Produção de Biomassa por Fusarium sp. (Médias de duas repetições).

		F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
E	R ₀	3,5	3,4	3,4	3,5	3,3
	R ₁	3,4	3,3	3,3	3,1	3,1
	R ₂	3,1	3,0	3,2	3,4	3,2
	R ₃	4,6	3,8	3,4	3,6	3,1
L	R ₀	3,6	3,8	3,6	3,7	4,3
	R ₁	3,8	3,0	3,5	3,4	3,1
	R ₂	3,5	3,1	2,9	3,1	3,1
	R ₃	3,3	3,5	2,9	3,0	3,1

E - Método de Desidratação da folha em Estufa

L - Método de Desidratação da folha por Liofilização

R₀ - ---- R₃ - Níveis de Raiz (0,5-2,5-3,5 e 4,5 g% de Carboidrato)

F₀ - ---- F₄ - Níveis de Folha (0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,20 g% de Nitrogênio)

Com a melhor produção de biomassa obtida com a folha liofilizada ocorreu nos limites inferior de concentração de raiz e superior de folha foi feito um outro ensaio abrangendo concentrações de raiz de modo a fornecerem 0,5 - 1,0 - 1,5 e 2,0 gramas de carboidrato por cento e de folha para fornecerem 0,16 - 0,20 - 0,24 - 0,28 e 0,32 gramas de nitrogênio por cento. Para a folha desidratada em estufa, a melhor produção foi obtida no maior nível de raiz e num nível intermediário de folha. Assim, foi fixado o nível de folha e variou-se a concentração de raiz abrangendo uma faixa que forneceu 3,5 - 4,0 - 5,0 - 5,5 gramas de carboidrato por cento.

Após cinco dias e meio de incubação não foi observado crescimento em nenhum dos tratamentos, nem da folha liofilizada, nem da desidratada em estufa.

5.4. Ensaio de Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e Por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz (Fornecendo 1,5 - 2,5 - 3,5 e 4,5 gramas de Carboidrato por cento) e Cinco de Folha (Fornecendo 0,04 - 0,08 - 0,12 - 0,16 e 0,20 gramas de Nitrogênio por Cento). Para o Crescimento de *Aspergillus niger* IZ-9.

Nas tabelas 15 e 16 estão apresentados os resultados deste ensaio tomados em relação à produção de biomassa, medida em gramas de peso seco por litro de meio, e à produção de proteína bruta, também expressa em gramas/litro, respectivamente.

A análise de variância (Tabela 17) revelou diferença altamente significativa a nível de 1% de probabilidade entre os métodos de desidratação da folha testados, tendo a desidratação em estufa a 45°C apresentado melhor resultado. O fungo respondeu aos níveis de folha, porém não mostrou

variação em relação aos níveis de raiz. Os fatores métodos de desidratação e níveis de folha contribuíram isoladamente para as variações ocorridas. As produções de biomassa nos dois métodos de desidratação não dependeram dos níveis de raiz, assim como das combinações de níveis de folha com níveis de raiz, embora tenha havido um efeito interativo entre os dois últimos fatores.

Tabela 15. Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Mandioca, Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e Por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz (Fornecendo 1,5 - 2,5 - 3,5 e 4,5 gramas de Carboidrato por Cento) e Cinco de Folha (Fornecendo 0,04 - 0,08-0,12-0,16 e 0,20 gramas de Nitrogênio por Cento) (Médias de Duas Repetições).

		F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
E	R ₀	9,77	17,02	23,32	17,15	13,39
	R ₁	12,40	18,08	22,74	13,29	12,97
	R ₂	14,04	21,89	20,58	16,46	13,43
	R ₃	17,74	20,14	14,34	11,83	12,90
L	R ₀	9,94	18,59	20,18	19,74	14,47
	R ₁	11,74	19,83	19,35	13,84	14,61
	R ₂	14,61	18,84	13,56	15,13	11,63
	R ₃	17,09	15,87	16,16	11,63	11,56

E - Método de Desidratação da Folha Em Estufa

L - Método de Desidratação da Folha Por Liofilização.

R₀ ---- R₃ - Níveis de Raiz

F₀ ---- F₄ - Níveis de Folha

Tabela 16. Produção de Proteína Bruta (gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Mandioca, Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e Por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz (Fornecendo 1,5 - 2,5 - 3,5 e 4,5 gramas de Carboidrato por Cento) e Cinco de Folha (Fornecendo 0,04 - 0,08 - 0,12 - 0,16 e 0,20 gramas de Nitrogênio por Cento) (Médias de Duas Repetições).

		F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
E	R ₀	2,01	3,82	5,84	4,45	3,48
	R ₁	2,20	3,82	5,36	3,34	3,32
	R ₂	2,20	4,17	4,35	3,90	3,32
	R ₃	2,44	3,75	3,31	2,65	2,22
L	R ₀	1,88	4,28	5,47	5,35	4,22
	R ₁	2,07	4,35	4,54	3,94	4,24
	R ₂	2,27	3,77	3,49	4,28	3,41
	R ₃	2,41	3,24	3,86	3,28	3,24

E - Método de Desidratação da Folha Em Estufa

L - Método de Desidratação da Folha Por Liofilização

R₀----R₃ - Níveis de Raiz

F₀----F₄ - Níveis de Folha

Tabela 17. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 em Raiz e Folha de Mandioca Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha (MD), Quatro Níveis de Raiz (R) e Cinco de Folha (F).

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
MD	1	11,40	11,40	2,12 **
F	4	503,78	125,95	23,41 **
R	3	22,53	7,51	1,40 NS
MD x F	4	27,80	6,95	1,29 NS
MD x R	3	25,76	8,59	1,59 NS
F x R	12	346,26	28,85	5,36 **
MD x F x R	12	60,91	5,08	0,94 NS
(Tratamentos)	(39)	(998,44)	(25,60)	(4,76 **)
Resíduo	40	215,37	5,38	
Total	79	1.213,81	15,36	

NS - Não Significativo

C.V. = 14,67%

** - Significativo $p \leq 0,01$

Pela decomposição das interações (Tabela 18) verificou-se que dentro de cada método de desidratação o fungo respondeu aos diferentes níveis de folha, mas não aos níveis de raiz.

Tabela 18. Decomposição das Interações MD x F, MD x R e MD x F x R Relativas à Análise de Variância Apresentada na Tabela 17.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
MD x F	4	27,80	6,95	1,29 NS
F/MD-E	4	357,66	89,42	16,62 **
F/MD-L	4	173,92	43,48	8,08 **
MD x R	3	25,76	8,59	1,59 NS
R/MD-E	3	19,13	6,38	1,19 NS
R/MD-L	3	29,16	9,72	1,81 NS
MD x F x R	12	60,91	5,08	0,94 NS
F/MD-E. R ₀	4	203,13	50,78	9,44 **
F/MD-E. R ₁	4	158,38	39,60	7,36 **
F/MD-E. R ₂	4	116,36	29,09	5,41 **
F/MD-E. R ₃	4	96,10	24,02	4,47 **
F/MD-L. R ₀	4	151,09	37,77	7,02 **
F/MD-L. R ₁	4	101,22	25,31	4,70 **
F/MD-L. R ₂	4	56,00	14,00	2,60 NS
F/MD-L. R ₃	4	56,45	14,11	2,62 *
R/MD-E. F ₀	3	66,85	22,28	4,14 **
R/MD-E. F ₁	3	28,21	9,40	1,75 NS
R/MD-E. F ₂	3	101,32	33,77	6,28 **
R/MD-E. F ₃	3	38,62	12,87	2,39 NS
R/MD-E. F ₄	3	0,45	0,15	0,03 NS
R/MD-L. F ₀	3	59,69	19,90	3,70 *
R/MD-L. F ₁	3	17,23	5,74	1,07 NS
R/MD-L. F ₂	3	55,53	18,51	3,44 *
R/MD-L. F ₃	3	70,22	23,41	4,35 **
R/MD-L. F ₄	3	17,34	5,78	1,07 NS
Resíduo	40	215,37	5,38	

NS - Não Significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

As equações que melhor estimam a produção de biomassa pelo fungo, relativas às decomposições da interação tripla que apresentaram diferenças significativas, estão apresentadas na tabela 19. A decomposição referente a níveis de folha dentro do método de desidratação por liofilização no nível dois de raiz, embora não significativa, apresentou um valor de F estimado muito próximo do F tabelado. A análise de regressão mostrou significância a nível de 5% de probabilidade para o componente de quarto grau, razão pela qual foi feita a equação. As curvas referentes às equações estão apresentadas nas figuras 5,6,7 e 8.

A comparação das médias pelo teste de Student-Newman - Keuls mostrou que as melhores produções obtidas com folha desidratada em estufa a 45°C não diferem das melhores obtidas com folha liofilizada e, ainda, uma grande quantidade de médias que não diferem significativamente da maior, produzida com o método de desidratação em estufa nos níveis zero de raiz correspondente a 1,5 gramas de carboidrato por cento, e dois de folha, que forneceu 0,12 gramas de nitrogênio por cento (Tabela 20).

Em relação à produção de proteína bruta (Tabela 21), a análise de variância apresentou resultados diferentes dos observados para peso seco. Assim, houve diferença entre os métodos de desidratação, porém a liofilização mostrou melhor resultado que a desidratação em estufa. O fungo respondeu tanto aos níveis de folha como de raiz tendo estes fatores apresentado um efeito interativo, o qual foi independente dos métodos de desidratação. Houve também um efeito interativo dos níveis de folha com métodos de desidratação, enquanto que em relação ao último fator, os níveis de raiz apresentaram uma ação isolada.

Tabela 19. Equações de Regressão que melhor Estimam a Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 Relativas às Decomposições da Interação Tripla que Apresentaram Diferenças Significativas (Tabela 18)

Decomposições	Equações de Regressão
F/MD-E. R ₀	$\hat{y} = 9,72472 + 10,59506x - 2,46464x^2$
F/MD-E. R ₁	$\hat{y} = 12,39996 - 7,27436x + 22,70535x^2 - 11,27030x^3 + 1,51436x^4$
F/MD-E. R ₂	$\hat{y} = 15,09629 + 6,35593x - 1,75536x^2$
F/MD-E. R ₃	$\hat{y} = 17,89942 + 6,46052x - 5,84431x^2 + 0,98167x^3$
F/MD-L. R ₀	$\hat{y} = 10,27114 + 9,55622x - 2,13393x^2$
F/MD-L. R ₁	$\hat{y} = 11,62414 + 16,24322x - 8,83143x^2 + 1,23750x^3$
F/MD-L. R ₂	$\hat{y} = 14,61003 + 21,48819x - 25,87482x^2 + 9,78909x^3 - 1,17749x^4$
F/MD-L. R ₃	$\hat{y} = 17,52200 - 1,53100x$
R/MD-E. F ₀	$\hat{y} = 9,65100 + 2,55600x$
R/MD-E. F ₂	$\hat{y} = 24,60950 - 2,91050x$
R/MD-L. F ₀	$\hat{y} = 9,69150 + 2,43400x$
R/MD-L. F ₂	$\hat{y} = 19,98750 - 1,78500x$
R/MD-L. F ₃	$\hat{y} = 18,53750 - 2,30250x$

MD-E - Método de Desidratação da Folha Em Estufa

MD-L - Método de Desidratação da Folha Por Liofilização

R₀---R₃ - Níveis de Raiz

F₀---F₃ - Níveis de Folha

Figura 5. Produção de Biomassa por *Aspergillus niger* IZ-9 nos Níveis 0(—), 1(...), 2(-.-.-) e 3(----) de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5-3,5 e 4,5g% de Carboidrato, em Função dos Níveis 0-1-2-3- e 4 de Folha Desidratada em Estufa, Respectivamente, 0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,20g% de Nitrogênio.

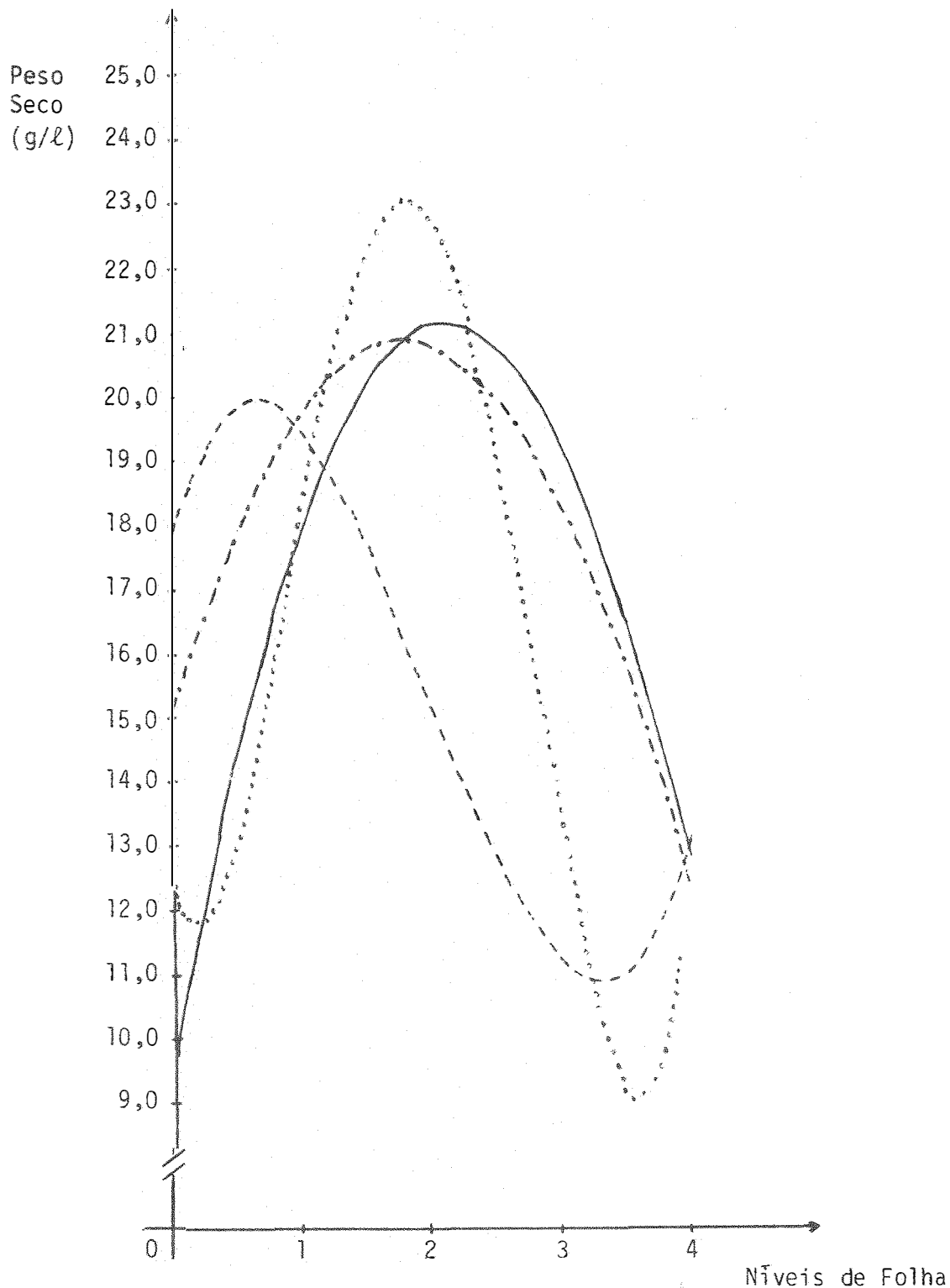


Figura 6. Produção de Biomassa por *Aspergillus niger* IZ-9 nos Níveis 0(—), 1(.....), 2(- - - -) e 3(----) de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5-3,5 e 4,5g% de Carboidrato, em Função dos Níveis 0-1-2-3 e 4 de Folha Liofilizada, Respectivamente, 0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,20g% de Nitrogênio.

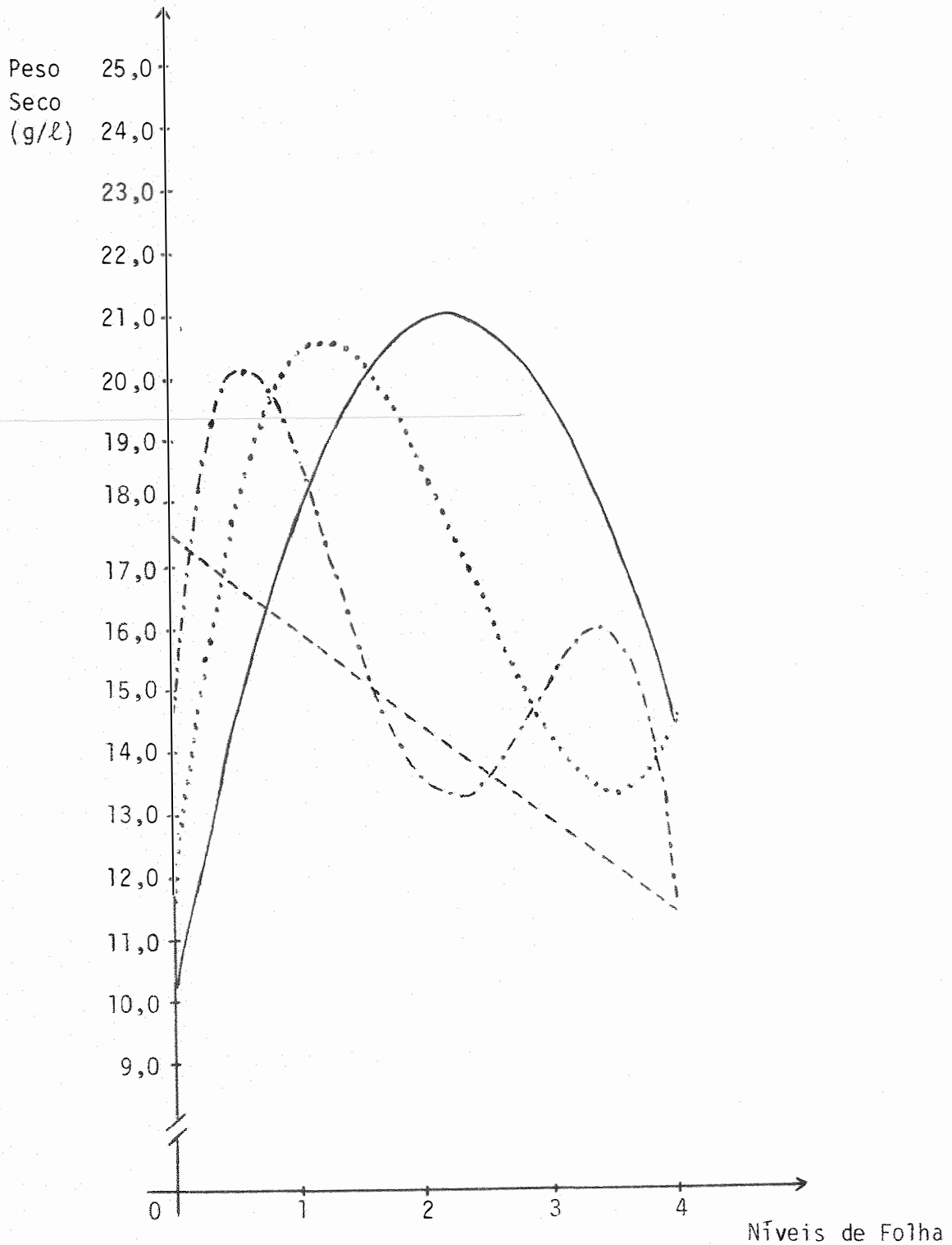


Figura 7. Produção de Biomassa por *Aspergillus niger* IZ-9 nos Níveis 0(—), e 2(-.-.-) de Folha Desidratada em Estufa, Respectivamente, 0,04 e 0,12g% de Nitrogênio, em Função dos Níveis 0-1-2 e 3 de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5-3,5 e 4,5g% de Carboidrato.

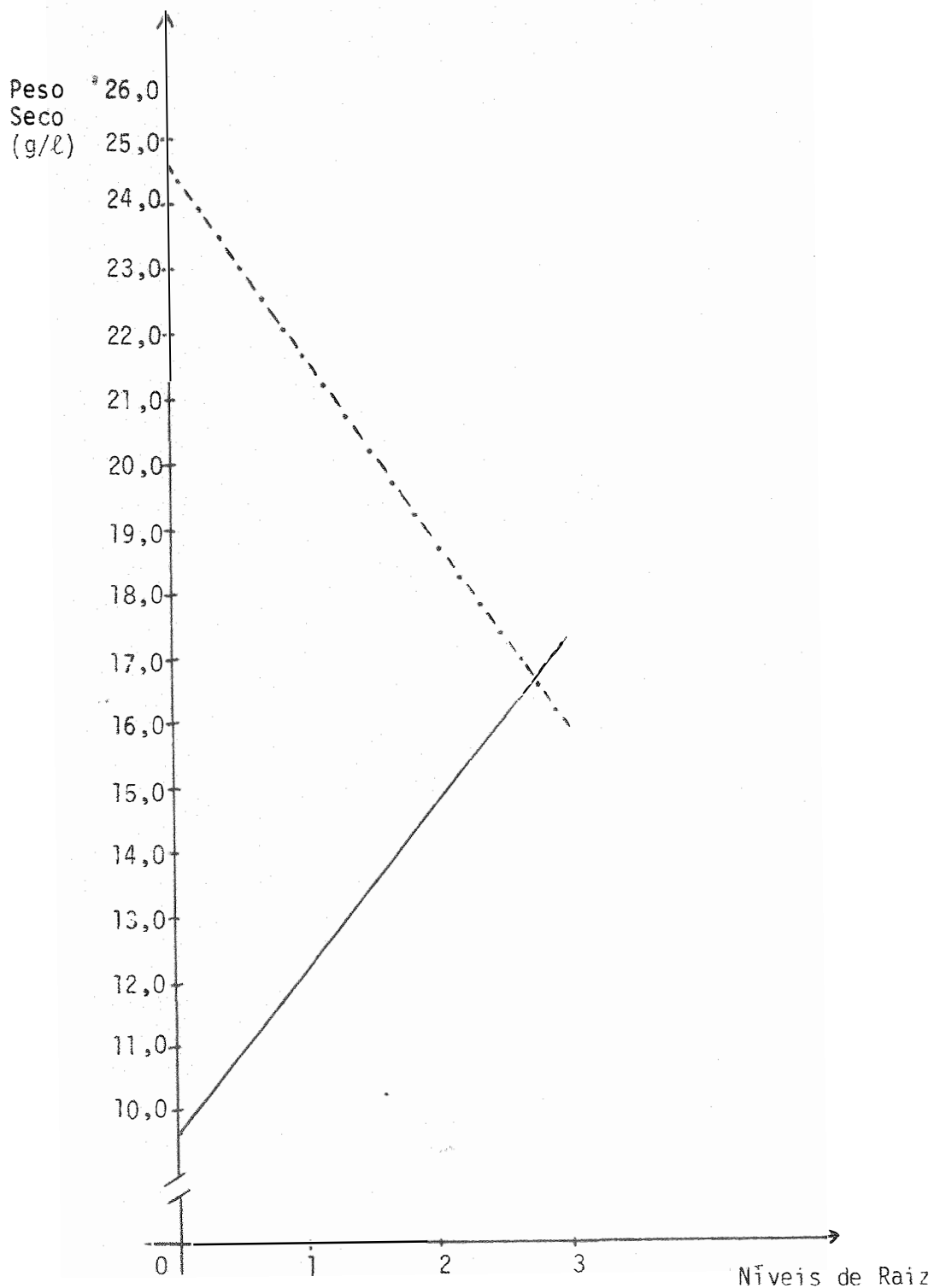


Figura 8. Produção de Biomassa por *Aspergillus niger* IZ-9 nos Níveis 0(—), 2(-·-·-) e 3(----) de Folha Liofilizada, Respectivamente, 0,04-0,12-0,16g% de Nitrogênio em Função dos Níveis 0-1-2 e 3 de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5-3,5 e 4,5g% de Carboidrato.

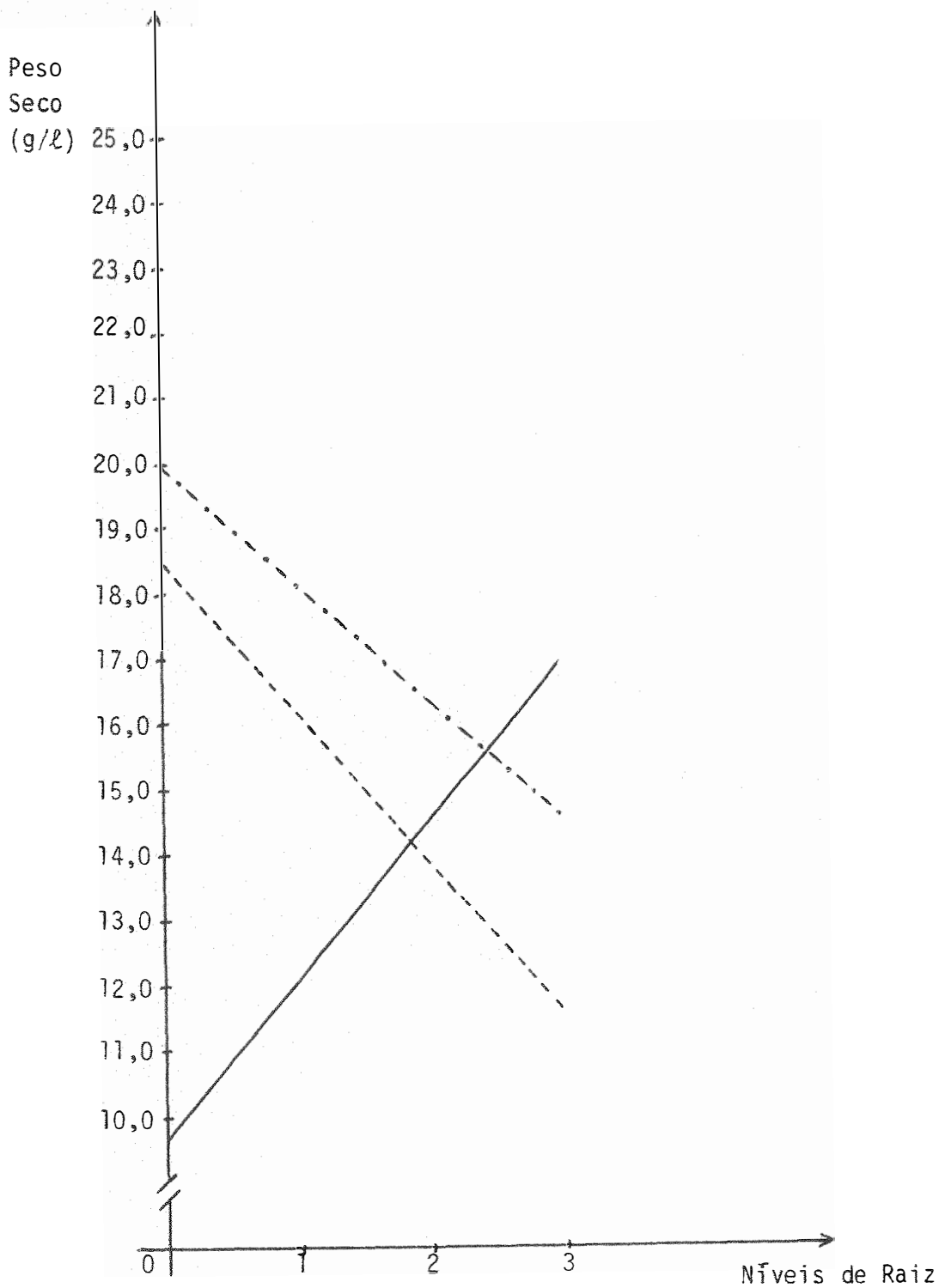


Tabela 20. Teste de Student - Newman - Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Raiz e Folha de Mandioca Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha, Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha.

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 23,32
E-R ₀ F ₀	9,77	8,26 **
L-R ₀ F ₀	9,94	8,16 **
L-R ₃ F ₄	11,56	7,17 **
L-R ₃ F ₃ = L-R ₂ F ₄	11,63	7,13 **
L-R ₁ F ₀	11,74	7,06 **
E-R ₃ F ₃	11,83	7,01 **
E-R ₁ F ₀	12,40	6,66 **
E-R ₃ F ₄	12,90	6,35 *
E-R ₁ F ₄	12,97	6,31 *
E-R ₁ F ₃	13,29	6,12 *
E-R ₀ F ₄	13,39	6,05 *
E-R ₂ F ₄	13,43	6,03 *
L-R ₂ F ₂	13,56	5,95 *
L-R ₁ F ₃	13,84	5,78 *
E-R ₂ F ₀	14,04	5,66 *
E-R ₃ F ₂	14,34	5,48 *

- Continuação -

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 23,32
L-R ₀ F ₄	14,47	5,40 NS
L-R ₂ F ₀ = L-R ₀ F ₄	14,61	5,31 NS
L-R ₂ F ₃	15,13	4,99 NS
L-R ₃ F ₁	15,87	4,54 NS
L-R ₃ F ₂	16,16	4,37 NS
E-R ₂ F ₃	16,46	4,18 NS
E-R ₀ F ₁	17,02	3,84 NS
L-R ₃ F ₀	17,09	3,80 NS
E-R ₀ F ₃	17,15	3,76 NS
E-R ₃ F ₀	17,74	3,40 NS
E-R ₁ F ₁	18,08	3,20 NS
L-R ₀ F ₁	18,59	2,88 NS
L-R ₂ F ₁	18,84	2,73 NS
L-R ₁ F ₂	19,35	2,42 NS
L-R ₀ F ₃	19,74	2,18 NS
L-R ₁ F ₁	19,83	2,13 NS
E-R ₃ F ₁	20,14	1,94 NS
L-R ₀ F ₂	20,18	1,91 NS
E-R ₂ F ₂	20,58	1,67 NS
E-R ₂ F ₁	21,89	0,87 NS

- Continua -

- Continuação -

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 23,32
E-R ₁ F ₂	22,74	0,35 NS
E-R ₀ F ₂	23,32	-

E - Método de Desidratação da Folha Em Estufa

L - Método de Desidratação da Folha por Liofilização

R₀---- R₃ - Níveis de Raiz(1,5-2,5-3,5 e 4,5 g% de Carboidrato)

F₀---- F₄ - Níveis de Folha (0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,30 g% de Nitrogênio)

NS - Não Significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

Tabela 21. Análise de Variância Referente à Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 em Raiz e Folha de Mandioca Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha (MD), Quatro Níveis de Raiz (R) e Cinco de Folha (F).

Causas de Variação	G.L.	S.O.	Q.M.	F.
MD	1	0,66	0,66	2,12 **
F	4	49,14	12,28	39,63 **
R	3	11,25	3,75	12,10 **
MD x F	4	3,99	1,00	3,22 **
MD x R	3	0,73	0,24	0,79 NS
F x R	12	12,04	1,00	3,24 **
MD x F x R	12	1,55	0,13	0,42 NS
(Tratamentos)	(39)	(79,36)	(2,03)	(6,55 **)
Resíduo	40	12,58	0,31	
Total	79	91,94		

NS - Não Significativo

C.V. = 15,51 %

** - Significativo $p \leq 0,01$

A decomposição das interações (Tabela 22) mostrou que o efeito interativo entre métodos de desidratação e níveis de folha abrangeu tanto a desidratação em estufa como por liofilização. Embora a interação entre métodos de desidratação e níveis de raiz não tenha sido significativa, tomando-se o efeito dos níveis de raiz em cada método de desidratação observou-se que o fungo respondeu aos mesmos tanto para a desidratação em estufa como por liofilização. Da mesma maneira, o fungo respondeu aos níveis de folha na desidratação em estufa em relação a todos os níveis de raiz e no processo de liofilização não foi encontrada diferença apenas em relação ao nível três de raiz. Quanto aos níveis de raiz, foram observadas diferenças, tanto para desidratação em estufa como por liofilização, somente em relação aos níveis dois e três de folha.

As equações de regressão que melhor estimam a produção de proteína bruta e suas respectivas curvas estão apresentadas na tabela 23 e figuras 9 , 10 , 11 e 12.

A comparação das médias pelo teste de Student - Newman - Keuls mostrou um número menor de médias que não apresentaram diferenças significativas do que o observado em relação ao peso seco, quando comparadas com a melhor média obtida, a qual coincidiu com a maior produção tomada em peso seco (Tabela 24).

Foi feita a análise de aminoácidos da proteína fúngica produzida nos dois métodos de desidratação da folha com os níveis zero de raiz e dois de folha (Tabela 25). De um modo geral, observou-se que o método de desidratação em estufa apresentou melhores resultados que a liofilização. Comparando-se o perfil de aminoácidos do Aspergillus niger IZ-9 cultivado em folha desidratada em estufa com o da folha correspondente houve um ligei-

Tabela 22. Decomposição das Interações MD x F, MD x R e MD x F x R Relativas à Análise de Variância Apresentada na Tabela 21.

Causa de Variância	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
MD x F	4	3,99	1,00	3,22 **
F/MD-E	4	27,75	6,94	22,38 **
F/MD-L	4	24,78	6,20	19,99 **
MD x R	3	0,73	0,24	0,79 NS
R/MD-E	3	5,86	1,95	6,30 **
R/MD-L	3	6,13	2,04	6,59 **
MD x F x R	12	1,55	0,13	0,42 NS
F/MD-E. R ₀	4	15,63	3,91	12,60 **
F/MD-E. R ₁	4	10,53	2,63	8,49 **
F/MD-E. R ₂	4	6,04	1,51	4,87 **
F/MD-E. R ₃	4	3,26	0,82	2,63 *
F/MD-L. R ₀	4	16,66	4,16	13,43 **
F/MD-L. R ₁	4	8,10	2,03	6,54 **
F/MD-L. R ₂	4	4,36	1,09	3,51 *
F/MD-L. R ₃	4	2,14	0,53	1,72 NS
R/MD-E. F ₀	3	0,19	0,06	0,20 NS
R/MD-E. F ₁	3	0,22	0,07	0,24 NS
R/MD-E. F ₂	3	7,59	2,53	8,16 **
R/MD-E. F ₃	3	3,54	1,18	3,81 *
R/MD-E. F ₄	3	2,04	0,68	2,19 NS
R/MD-L. F ₀	3	0,33	0,11	0,35 NS
R/MD-L. F ₁	3	1,58	0,53	1,70 NS
R/MD-L. F ₂	3	4,54	1,51	4,88 **
R/MD-L. F ₃	3	4,48	1,49	4,82 **
R/MD-L. F ₄	3	1,67	0,56	1,80 NS
Resíduo	40	12,58	0,31	

NS - Não Significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

Tabela 23. Equações de Regressão que Melhor Estimam a Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 Relativas às Decomposições da Interação Tripla que Apresentaram Diferenças Significativas (Tabela 22).

Decomposições	Equações de Regressão
F/MD-E. R ₀	$\hat{y} = 1,92400 + 2,91700x - 0,6400x^2$
F/MD-E. R ₁	$\hat{y} = 2,19501 - 1,77619x + 5,86928x^2 - 2,85121x^3 + 0,37812x^4$
F/MD-E. R ₂	$\hat{y} = 2,37172 + 1,83506x - 0,40964x^2$
F/MD-E. R ₃	$\hat{y} = 2,65300 + 0,90500x - 0,26500x^2$
F/MD-L. R ₀	$\hat{y} = 1,88886 + 2,96928x - 0,59857x^2$
F/MD-L. R ₁	$\hat{y} = 2,35900 + 1,74900x - 0,33900x^2$
F/MD-L. R ₂	$\hat{y} = 2,36200 + 1,32750x - 0,26250x^2$
R/MD-E. F ₂	$\hat{y} = 6,00450 - 0,86050x$
R/MD-E. F ₃	$\hat{y} = 4,30500 - 0,48250x$
R/MD-L. F ₂	$\hat{y} = 5,22000 - 0,58750x$
R/MD-L. F ₃	$\hat{y} = 5,08800 - 0,58700x$

MD-E - Método de Desidratação da Folha Em Estufa

MD-L - Método de Desidratação da Folha Por Liofilização

R₀ ---- R₃ - Níveis de Raiz

F₂ ---- F₃ - Níveis de Folha

Figura 9. Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 nos Níveis 0(—), 1(....), 2(-·-·-·) e 3(- - - -) de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5-3,5 e 4,5g% de Carboidrato, em Função dos Níveis 0-1-2-3 e 4 de Folha Desidratada em Estufa, Respectivamente, 0,04-0,08-0,12 - 0,16 e 0,20g% de Nitrogênio.

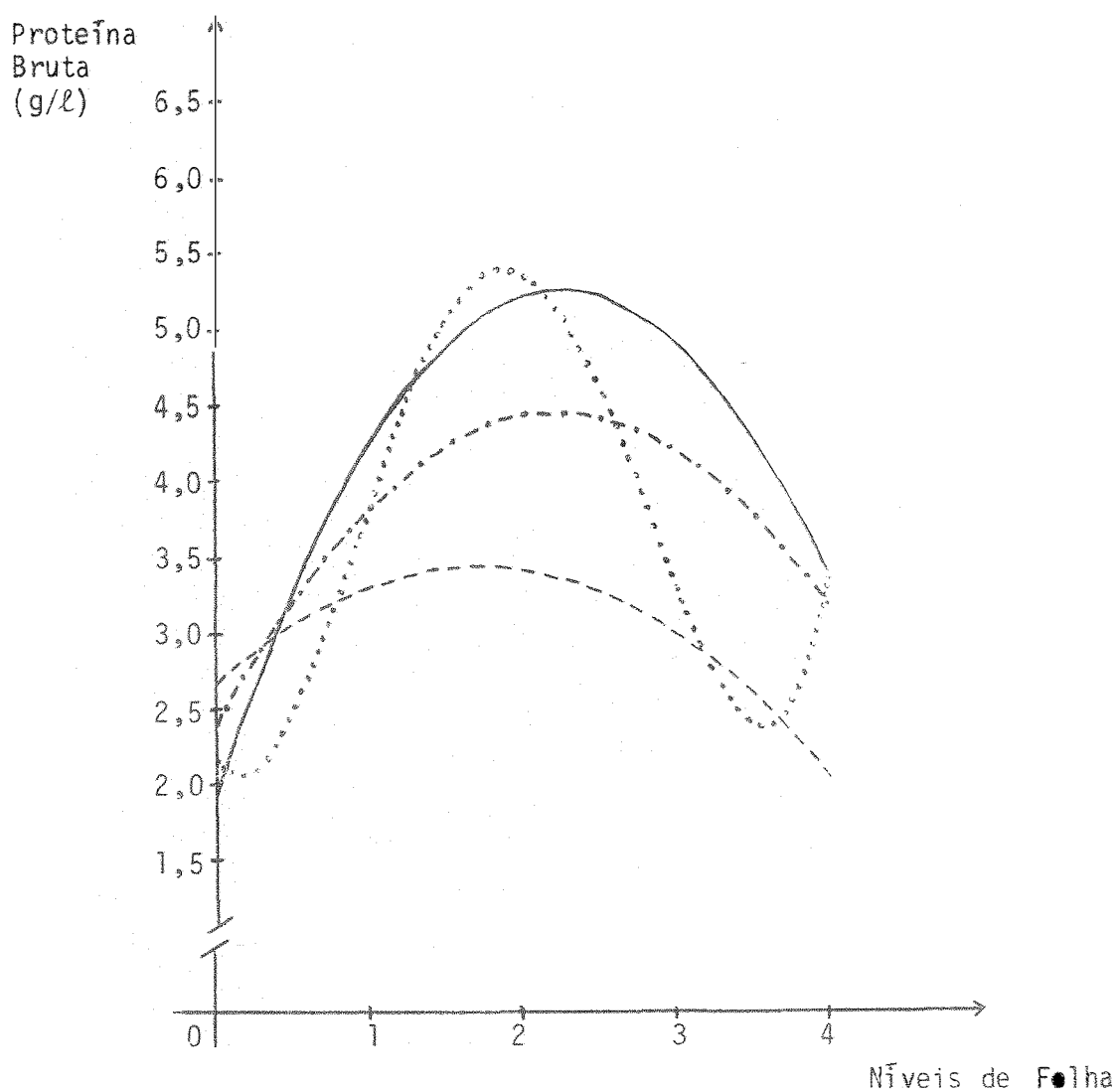


Figura 10. Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 nos Níveis 0(—), 1(....) e 2(-·-·-) de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5 e 3,5g% de Carboidrato, em Função dos Níveis 0-1-2-3 e 4 de Folha Liofilizada, Respectivamente, 0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,20g% de Nitrogênio.

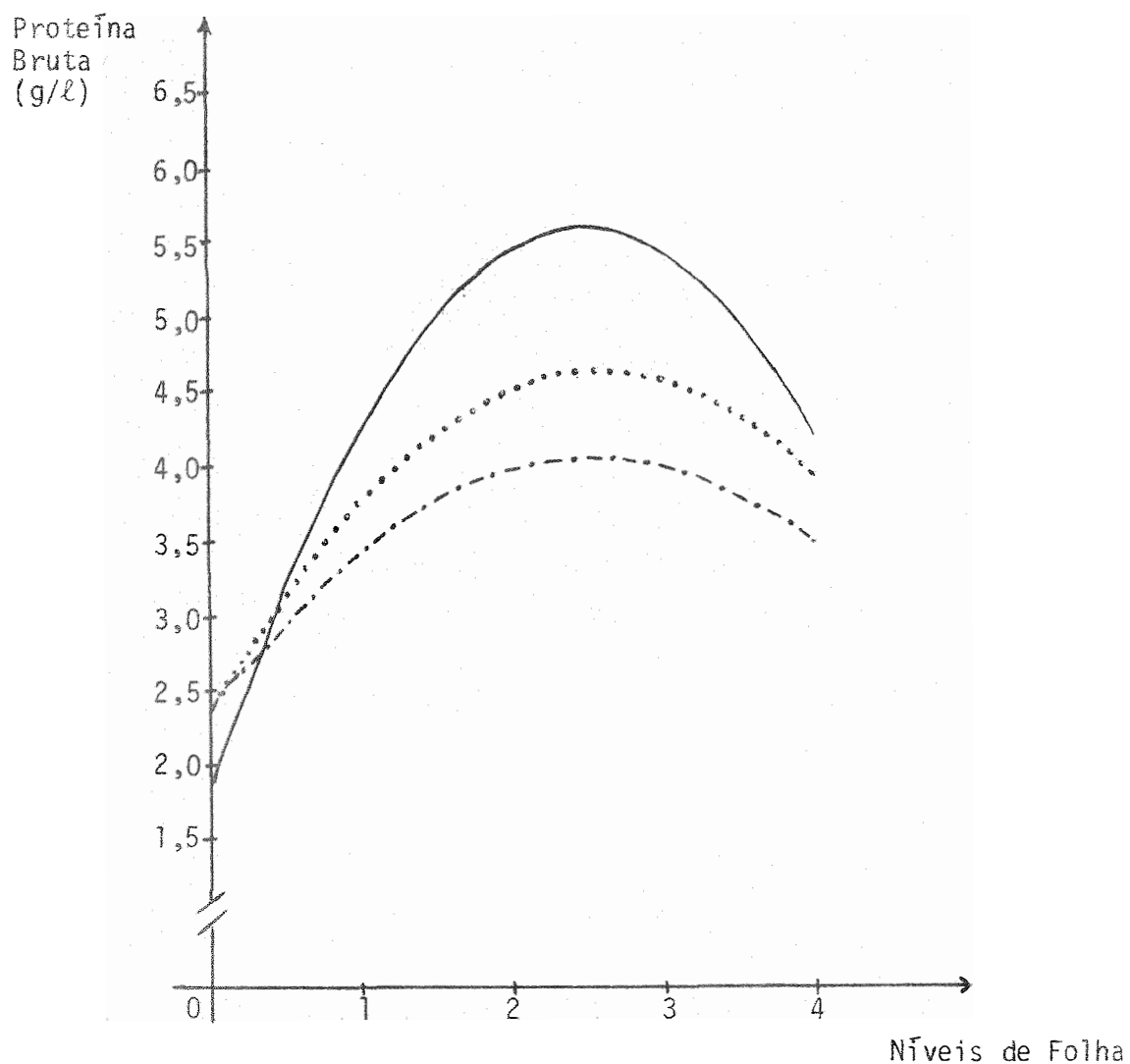


Figura 11. Produção de Proteína Bruta por *Aspergillus niger* IZ-9 nos Níveis 2(-----) e 3(-----) de Folha Desidratada em Estufa, Respectivamente, 0,12 e 0,16g% de Nitrogênio, em Função dos Níveis 0-1-2 e 3 de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5-3,5 e 4,5g% de Carboidrato.

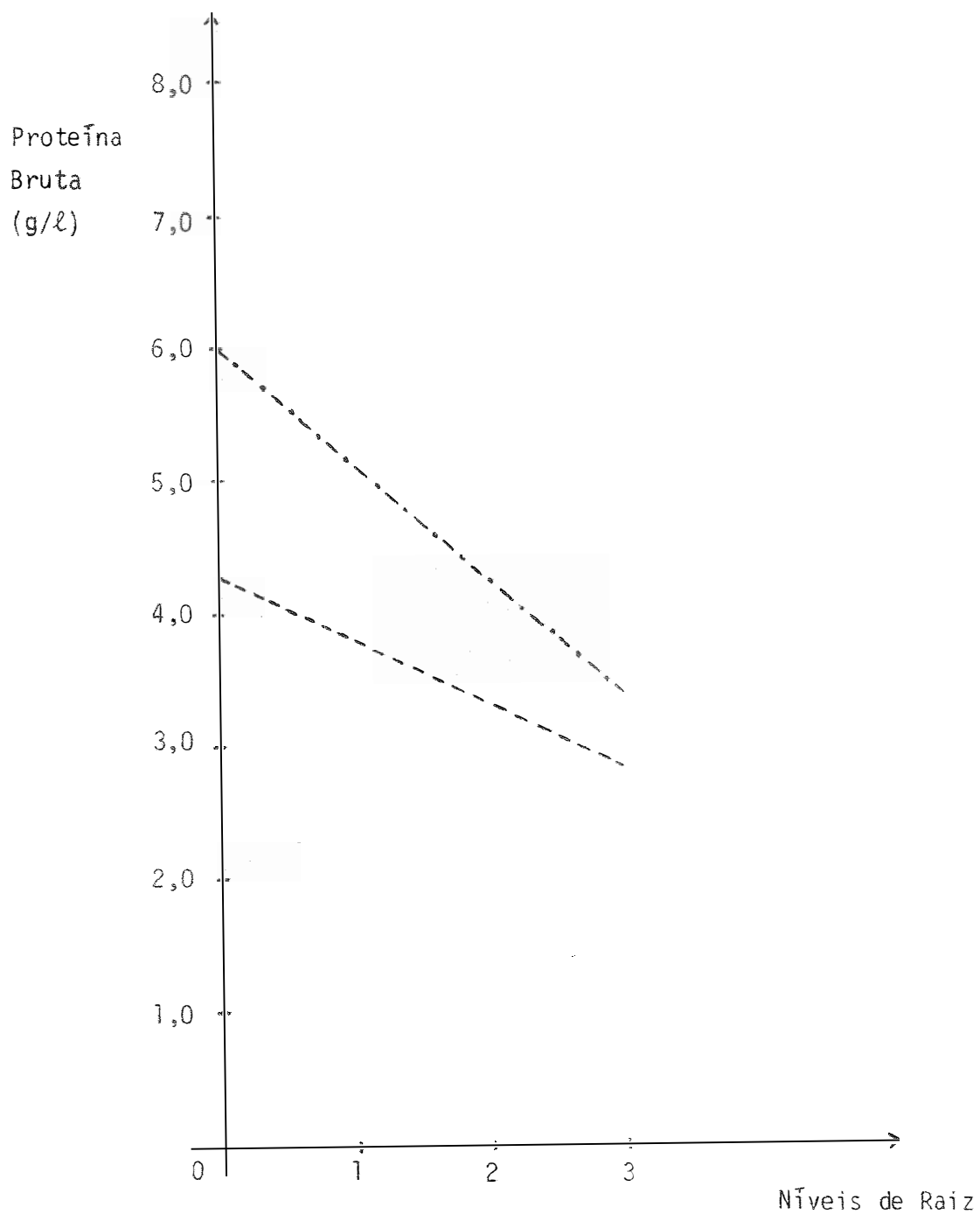


Figura 12. Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 nos Níveis 2(-----) e 3(----) de Folha Liofilizada, Respectivamente, 0,12 e 0,16g% de Nitrogênio, em Função dos Níveis 0-1-2 e 3 de Raiz, Respectivamente, 1,5-2,5-3,5 e 4,5g% de Carboidrato.

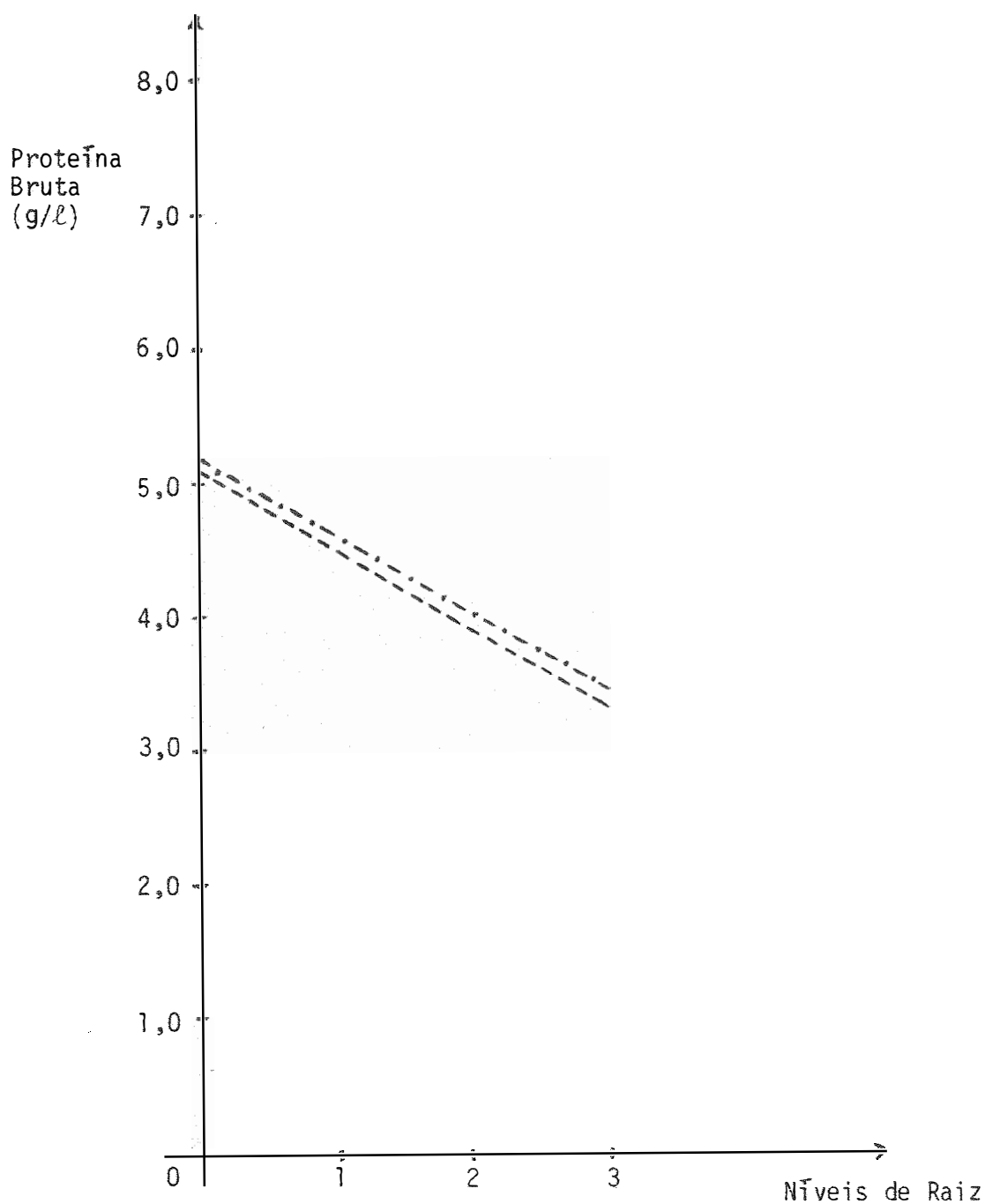


Tabela 24. Teste de Student - Newman - Keuls para Comparação das Médias de Produção de Proteína Bruta (gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Raiz e Folha de Mandioca Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha, Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha.

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 5,84
L-R ₀ F ₀	1,88	10,15 **
E-R ₀ F ₀	2,01	9,82 **
L-R ₁ F ₀	2,07	9,67 **
E-R ₁ F ₀ = E-R ₂ F ₀	2,20	9,33 **
E-R ₃ F ₄	2,22	9,28 **
L-R ₂ F ₀	2,27	9,15 **
L-R ₃ F ₀	2,41	8,79 **
E-R ₃ F ₀	2,44	8,72 **
E-R ₃ F ₃	2,65	8,18 **
L-R ₃ F ₁ = L-R ₃ F ₄	3,24	6,67 **
L-R ₃ F ₃	3,28	6,56 **
E-R ₃ F ₂	3,31	6,49 **
E-R ₁ F ₄ = E-R ₂ F ₄	3,32	6,46 **
E-R ₁ F ₃	3,34	6,41 **
L-R ₂ F ₄	3,41	6,23 **
E-R ₀ F ₄	3,48	6,05 **
L-R ₂ F ₂	3,49	6,03 **

- Continuação

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman-Keuls para a Média 5,84
E-R ₃ F ₁	3,75	5,36 *
L-R ₂ F ₁	3,77	5,31 *
E-R ₀ F ₁ = E-R ₁ F ₁	3,82	5,18 *
L-R ₃ F ₂	3,86	5,08 *
E-R ₂ F ₃	3,90	4,97 NS
L-R ₁ F ₃	3,94	4,87 NS
E-R ₂ F ₁	4,17	4,28 NS
L-R ₀ F ₄	4,22	4,15 NS
L-R ₁ F ₄	4,24	4,10 NS
L-R ₀ F ₁ = L-R ₂ F ₃	4,28	4,00 NS
L-R ₁ F ₁ = E-R ₂ F ₂	4,35	3,82 NS
E-R ₀ F ₃	4,45	3,56 NS
L-R ₁ F ₂	4,54	3,33 NS
L-R ₀ F ₃	5,35	1,26 NS
E-R ₁ F ₂	5,36	1,23 NS
L-R ₀ F ₂	5,47	0,95 NS
E-R ₀ F ₂	5,84	-

E - Método de Desidratação da Folha Em Estufa

L - Método de Desidratação da Folha Por Liofilização

R₀ ---- R₃ - Níveis de Raiz (1,5-2,5-3,5 e 4,5 g% de Carboidrato)

F₀ ---- F₄ - Níveis de Folha (0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,20 g% de Nitrogênio)

NS - Não Significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

Tabela 25. Teor de Aminoácidos em *Aspergillus niger* IZ-9 após Quatro Dias de Incubação em Meio de Raiz e Folha de Mandioca (Desidratada em Estufa e Liofilizada), Fornecendo 1,5 gramas de Carboidrato por Cento e 0,12 gramas de Nitrogênio por Cento, Respectivamente, em Comparação com os Valores Encontrados nas Folhas Desidratada em Estufa e Liofilizada e com o Padrão de Aminoácidos Essenciais Determinado pela FAO

Aminoácidos	Desidratação em Estufa (g/100 g de proteína)			Liofilização (g/100 g de proteína)			Aminoácidos Essenciais (FAO) (g/100 g de proteína)
	Folha		A. niger IZ-9	Folha		A. niger IZ-9	
	Totais	Essenciais		Totais	Essenciais		
Lisina	4,28	4,28	5,00	5,00	4,53	4,13	4,2
Histidina	1,63	--	1,96	--	1,69	1,73	--
Arginina	4,41	--	5,00	--	4,35	4,52	--
Ácido aspártico	8,07	--	7,73	--	8,38	7,18	--
Treonina	2,68	2,68	4,48	4,48	4,24	4,35	2,8
Serina	2,65	--	2,36	--	2,20	2,40	--
Ácido glutâmico	10,18	--	11,16	--	11,25	9,95	--
Prolina	3,74	--	3,97	--	3,67	3,42	--
Glicina	4,81	--	5,09	--	4,62	4,65	--
Alanina	5,25	--	5,71	--	4,91	5,06	--
Cistina	--	--	--	--	--	--	2,0
Valina	4,70	4,70	5,89	5,89	5,11	4,41	4,2
Metionina	0,38	0,38	0,60	0,60	0,47	0,43	2,2
Isoleucina	4,03	4,03	4,86	4,86	3,99	3,97	4,2
Leucina	7,58	7,58	9,00	9,00	7,57	7,37	4,8
Tirosina	3,40	3,40	3,75	3,75	3,07	3,10	2,8
Fenilalanina	4,18	4,18	4,79	4,79	4,22	4,05	2,8
Triptofano	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	1,4
Soma total	--	--	--	--	--	--	31,4
- Triptofano	71,97	31,23	81,35	38,37	74,27	70,72	30,0

a - Não analisado

ro decrêscimo apenas nos níveis de ácido aspártico e serina. Em todos os demais houve um ligeiro acrêscimo, o qual foi mais acentuado para treonina, ácido glutâmico, valina, metionina e leucina. Para o fungo cultivado em folha liofilizada houve um ligeiro decrêscimo em lisina, prolina, valina, metionina, isoleucina, leucina e fenilalanina, uma queda um pouco mais acentuada em relação aos ácidos aspártico e glutâmico, e um pequeno acrêscimo nos demais, em comparação com os valores encontrados na folha liofilizada. Em relação ao padrão de aminoácidos essenciais determinado pela FAO, a proteína microbiana continuou deficiente em metionina, apesar do aumento no valor deste aminoácido produzido na desidratação em estufa, e superior em alguns casos, principalmente treonina e leucina. Comparando-se os teores totais de aminoácidos, o processo de transformação da proteína da folha liofilizada em proteína fúngica levou a uma redução de 4,78%, enquanto que para a folha desidratada em estufa houve um aumento de 13,03%. Considerando que o processo de desidratação em estufa produziu uma redução de 3,10% em relação à liofilização tem-se um ganho líquido em aminoácidos de 9,93% na transformação da proteína da folha desidratada em estufa em proteína fúngica.

Os valores do pH final dos meios foram também determinados e estão apresentados na tabela 26. Para os tratamentos com folha desidratada em estufa a estimativa da média foi 3,32, tendo um desvio padrão de 0,056, enquanto que para aqueles com folha liofilizada a estimativa da média foi 3,03 com um desvio padrão de 0,029.

Considerando que em relação às melhores médias obtidas, tanto para produção de biomassa como de proteína bruta, os métodos de desidratação não diferiram, que em termos de teores de aminoácidos totais a folha

Tabela 26. Valores do pH Final do Meio de Raiz e Folha de Mandioca Onde Foram Testados Dois Métodos de Desidratação da Folha, Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha para o Crescimento de Aspergillus niger IZ-9 (Médias de duas Repetições).

		F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
E	R ₀	3,0	2,9	2,9	3,2	3,4
	R ₁	3,0	3,0	3,2	3,4	3,3
	R ₂	3,4	3,4	3,3	3,5	3,5
	R ₃	3,5	3,5	3,6	3,7	3,7
L	R ₀	3,0	3,0	3,1	2,9	2,9
	R ₁	3,1	3,0	3,1	3,0	3,0
	R ₂	3,1	2,7	3,0	2,9	3,1
	R ₃	3,3	3,1	3,2	3,1	2,9

E - Método de Desidratação da Folha em Estufa

L - Método de Desidratação da Folha Por Liofilização

R₀ ---- R₃ - Níveis de Raiz

F₀ ---- F₄ - Níveis de Folha

desidratada em estufa produziu melhores resultados e que o processo de desidratação em estufa é menos dispendioso, foi escolhido este método para a determinação da curva de crescimento. Foram tomados os níveis zero de raiz (1,5 gramas de carboidrato por cento) e dois de folha (0,12 gramas de nitrogênio por cento) porque as produções alcançadas nestes níveis, em relação às duas medidas de crescimento tomadas, embora não tenham diferido significativamente de muitas outras, foram as melhores.

5.5. Curva de Crescimento do *Aspergillus niger* IZ-9 em Meio de Raiz (1,5 gramas de Carboidrato por Cento) e Folha (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento) de Mandioca Desidratada em Estufa.

O crescimento do microrganismo foi detectado em intervalos de 12 horas num período de 12 a 120 horas, tendo sido avaliado em relação à produção de biomassa, expressa em peso seco. Após 12 horas de incubação nenhum crescimento foi observado, tendo a primeira medida sido efetuada após 24 horas. O teor de proteína bruta do micélio foi determinado paralelamente ao peso seco. Da mesma forma, o pH final dos meios foi medido (Tabela 27).

A análise de variância tanto em relação à produção de biomassa (Tabela 28) como de proteína bruta (Tabela 29) mostrou que apenas os componentes de primeiro e segundo graus foram significativos.

A equação de regressão que melhor se adequou aos valores de peso seco obtidos foi a seguinte: $\hat{y} = -5,86236 + 0,55126x - 0,00253x^2$. Para os teores de proteína bruta foi encontrada a seguinte equação: $\hat{y} = -0,79689 + 0,11678x - 0,00054x^2$. As respectivas curvas estão representadas nas figuras 13 e 14.

Tabela 27. Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) e Proteína Bruta (gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Raiz (1,5 gramas de Carboidrato por Cento) e Folha (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento) de Mandioca Desidratada em Estufa para Determinação da Curva de Crescimento e Valores do pH Final dos Meios (Médias de três repetições).

Horas	Peso Seco (g/l)	Proteína Bruta (g/l)	pH Final
12	-	-	3,0
24	5,88	1,83	3,2
36	9,45	2,39	3,4
48	16,67	3,74	3,2
60	18,64	4,39	3,2
72	19,58	4,67	3,1
84	22,44	5,20	2,9
96	23,94	5,54	3,0
108	23,44	5,50	3,2
120	24,40	5,45	3,1

Tabela 28. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 Apresentada na Tabela 27.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Regressão Linear	1	902,94	902,94	578,81 **
Regressão Quadrática	1	122,83	122,83	78,74 **
Desvios da Regressão	6	22,86	3,81	2,44 NS
(Tratamentos)	(8)	(1048,63)	(131,08)	(48,02 **)
Resíduo	18	28,08	1,56	
Total	26	1076,71		

NS - Não Significativo

** - Significativo $p \leq 0,01$

Tabela 29. Análise de Variância Referente à Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 Apresentada na Tabela 27.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Regressão Linear	1	39,89	39,89	199,47 **
Regressão Quadrática	1	5,56	5,56	27,80 **
Desvios da Regressão	6	0,58	0,10	0,50 NS
(Tratamentos)	(8)	(46,03)	(5,75)	(28,75 **)
Resíduo	18	3,60	0,20	
Total	26	49,63		

NS - Não Significativo

** - Significativo $p \leq 0,01$

Figura 13. Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 no Nível Zero de Raiz (1,5g% de Carboidrato) e Dois de Folha Desidratada em Estufa, (0,12g% de Nitrogênio) Durante o Período de 24 a 120 Horas.

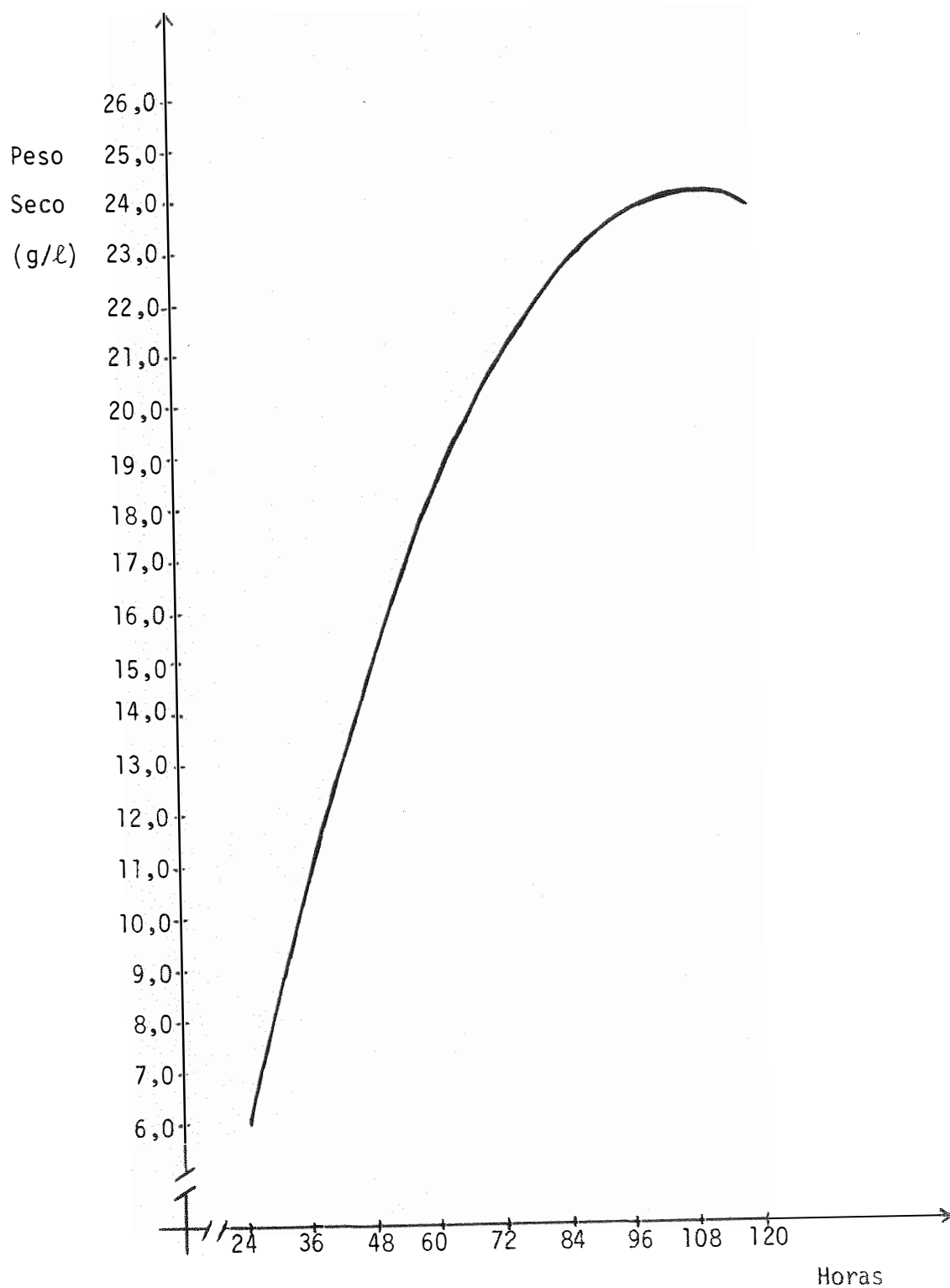
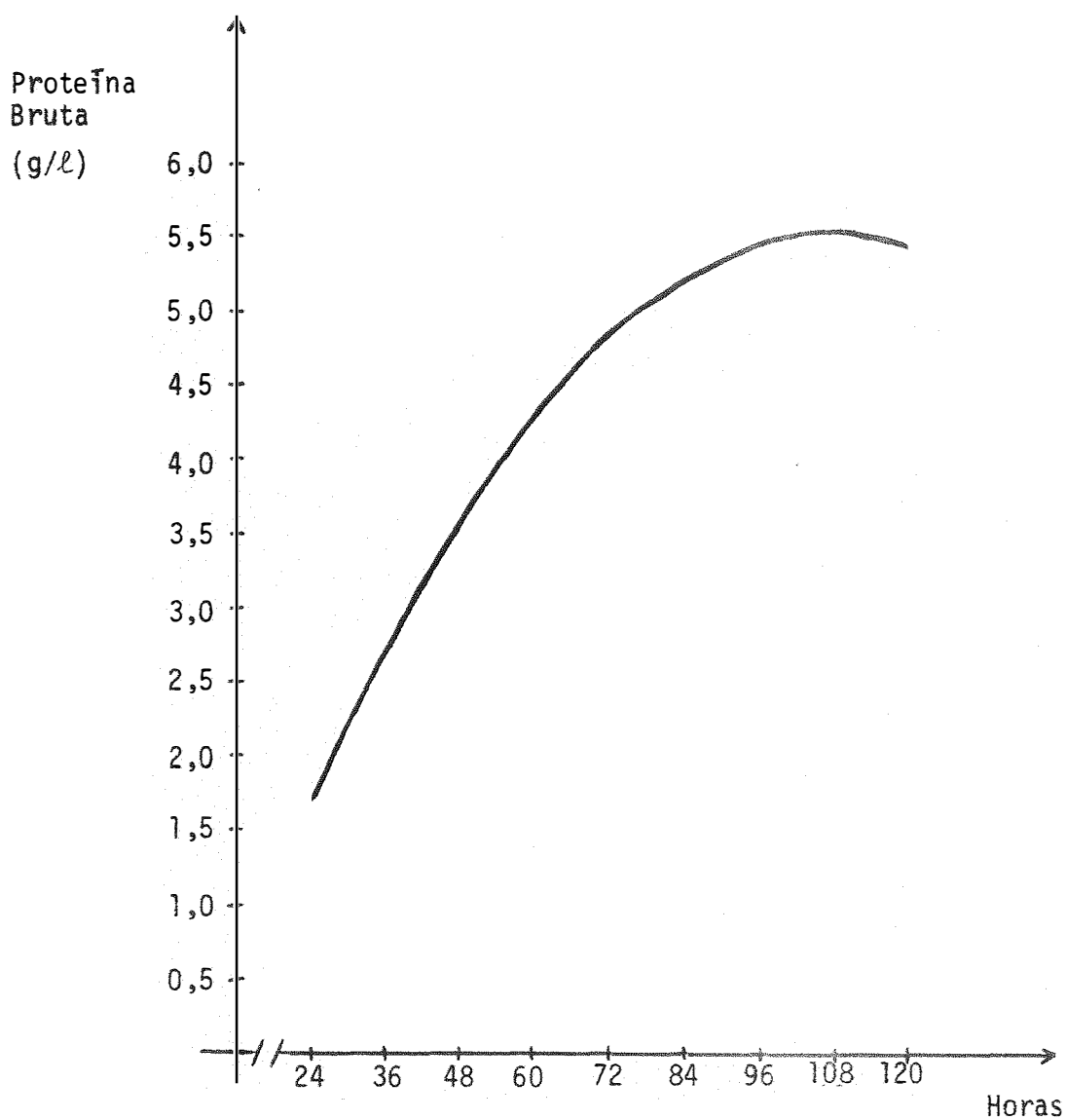


Figura 14. Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 no Nível Zero de Raiz (1,5g% de Carboidrato) e Dois de Folha Desidratada em Estufa (0,12g% de Nitrogênio) Durante o Período de 24 a 120 Horas.



A comparação das médias de produção de biomassa pelo teste de Student-Newman-Keuls (Tabela 30) mostrou que o máximo de produção foi alcançado a partir de 84 horas. Em relação à produção de proteína bruta o teste revelou que já a partir de 60 horas foi atingido a máxima produção (Tabela 31).

Tabela 30. Teste de Student-Newman-Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) da Curva de Crescimento do Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Raiz e Folha de Mandioca Desidratada em Estufa.

Horas	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 24,40
24	5,88	25,72 **
36	9,45	20,76 **
48	16,67	10,74 **
60	18,64	8,00 **
72	19,85	6,69 **
84	22,44	2,72 NS
108	23,44	1,33 NS
96	23,94	0,64 NS
120	24,40	-

NS - Não significativo

** - Significativo $p \leq 0,01$

Tabela 31. Teste de Student-Newman-Keuls para Comparação das Médias de Produção de Proteína Bruta (gramas/litro) da Curva de Crescimento do Aspergillus niger IZ-9 em meio de Raiz e Folha de Mandioca Desidratada em Estufa.

Horas	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 5,54
24	1,83	14,27 **
36	2,39	12,12 **
48	3,74	6,92 **
60	4,39	4,42 NS
72	4,67	3,35 NS
84	5,20	1,31 NS
120	5,45	0,35 NS
108	5,50	0,15 NS
96	5,54	-

NS - Não Significativo

** - Significativo $p \leq 0,01$

A média para os valores do pH final dos meios foi 3,12 e teve um desvio padrão de 0,03.

5.6. Determinação de Aflatoxina em Aspergillus niger IZ-9

Os testes cromatográficos realizados em Aspergillus niger IZ-9 cultivado em folha e raiz de mandioca não detectaram qualquer presença de aflatoxina.

6. DISCUSSÃO

6.1. Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo

A alteração na cor dos meios em pH 1, 2, 8 e 9 após a esterilização pode ser uma indicação de que houve hidrólise ácida e alcalina, em temperatura elevada (121°C por 15 minutos), das proteínas.

O não crescimento de Fusarium sp. em pH 1 e 2 pode ser explicado por uma ação do pH sobre o sistema de transporte de aminoácidos do meio externo para o interior da célula. Sabe-se que a passagem de aminoácidos através da membrana da célula fúngica se dá por transporte ativo. Embora pouco se saiba a respeito das moléculas envolvidas neste processo (WHITAKER, 1976), várias permeases de aminoácidos já foram descritas e caracterizadas em Neurospora crassa e Penicillium chrysogenum (PIOTROWSKA et alii, 1976). Em Neurospora já foram, inclusive, sugeridos quatro sistemas distintos de permeases para aminoácidos (PALL, 1969, citado por RAILEY e KINSEY, 1976), tendo sido mostrado que as atividades de três destes sistemas são alteradas com a germinação e crescimento do microrganismo (RAILEY e KINSEY, 1976). A

ação do pH sobre o transporte de aminoácidos pode ser devida a alterações nos estados iônicos dos substratos ou produtos afetando a interação enzima — substrato ou, até mesmo, a solubilidade do substrato. Outras hipóteses podem também ser aventadas, tais como, alteração na permeabilidade da membrana celular, dificultando o transporte do complexo enzima - aminoácido do meio externo para o interno; bloqueio da dissociação do aminoácido na superfície interna da célula, ou, ainda, redução na eficiência do sistema de produção de energia.

Na faixa de pH de 3 a 7 a observação dos meios após esterilização parece indicar não haver ocorrido hidrólise de proteínas. O bom crescimento do Fusarium sp. leva a se pensar que os sistemas enzimáticos de hidrólise de proteínas e transporte de aminoácidos não foram afetados pela variação de pH. Se não houve hidrólise durante a esterilização pode-se deduzir que o fungo libera enzimas proteolíticas no meio para tornar a fonte de nitrogênio disponível. Sabe-se que a grande maioria dos fungos produz vários tipos de enzimas proteolíticas. NAKAO et alii (1973), relatam a produção de protease extracelular por uma linhagem selvagem de Fusarium sp. e um mutante resistente a kabicidina obtido, a partir desta linhagem, o qual acumula cerca de dez vezes mais protease. SUZUKI et alii (1976), estudando as características deste mutante, sugerem que devem ter ocorrido alterações na estrutura e permeabilidade da membrana a enzimas e que isto seria um fator para o acúmulo extracelular de grandes quantidades de enzimas. A alteração gradativa na cor do meio após o crescimento em pH de 4 a 7 para uma cor semelhante a observada em pH 8 e 9 após a esterilização pode ser devida à hidrólise enzimica das proteínas do substrato,

ou a uma produção de pigmento pelo fungo, porém esta última hipótese parece pouco provável devido à semelhança da coloração antes e após a ação do microrganismo.

Em pH 8 e 9 há indicação de que ocorreu hidrólise durante a autoclavagem. Como os valores do ponto isoelétrico (pI) da maioria das proteínas são geralmente menores que 7 a maior contribuição da fonte de nitrogênio para o crescimento deve ter sido dada por aqueles aminoácidos que possuem seus pontos isoelétricos acima de 8 e 9. No entanto, é possível que o crescimento tenha se dado também às custas de aminoácidos devido a um aumento na constante dielétrica produzido pelos aminoácidos na forma anfótera.

Por outro lado, sendo a síntese de enzimas estimulada pelo substrato, a presença de aminoácidos livres dispensa a produção de proteases e a energia que seria gasta para este fim pode ser empregada para maior eficiência do sistema de transporte.

A discussão até agora foi dirigida para o efeito do pH sobre a disponibilidade da fonte de nitrogênio. Entretanto, a utilização da fonte de carbono também é afetada pela variação na concentração hidrogeniônica.

Em pH 1 e 2 a falta de viscosidade do meio observada após a esterilização parece indicar que houve hidrólise do amido provocada pelo baixo pH e temperatura elevada. Similarmente ao que foi discutido em relação ao transporte de aminoácidos, o não crescimento de Fusarium sp. pode ser explicado pela ação do pH sobre o sistema enzimico responsável pelo transporte de glicose através da membrana celular o qual, em fungos, se dá

por um mecanismo de transporte facilitado.

Em pH de 3 a 9 , onde houve pouca ou nenhuma hidrólise após a esterilização, o fungo deve ter liberado enzimas amilolíticas no meio. NAKAO et alii (1973) e SUZUKI et alii (1976) relatam a produção de amilase pelo Fusarium sp. e seu mutante resistente a kabicidina, anteriormente citados. Tendo havido um bom crescimento do Fusarium sp. nesta faixa de pH as ações das enzimas amilolíticas e as de transporte de glicose parecem não terem sido afetadas.

A turvação pode ser um indício da floculação de enzimas extracelulares, cujos pontos isoelétricos coincidem com o pH do meio. Assim, em pH 1 e 2 a ausência de turvação indicaria que enzimas extracelulares não foram liberadas ou, se foram, seus pontos isoelétricos estão distanciados dos valores de pH em questão. Por outro lado, a forte turvação ocorrida em pH 3 indicaria que um grande número de proteínas presente possui seu ponto isoelétrico em torno de 3 e a fraca turvação nos demais valores de pH revelaria a presença de um número menor de proteínas com pontos isoelétricos em torno do pH testado.

Abaixo do limite inferior de pH o não crescimento do fungo pode ainda ser explicado pela saturação da membrana celular por íons hidrogênio impedindo a penetração de cátions essenciais, em quantidades adequadas, na célula.

Para o Aspergillus niger IZ-9 e o Aspergillus wentii IZ-1625 algumas explicações para os fenômenos observados podem ser similares ao que foi discutido para o Fusarium sp.

Assim, o não crescimento destes fungos em pH 1 parece também ter sido devido à ação do pH sobre os sistemas de transporte de aminoácidos, glicose ou cations. No entanto, o crescimento em pH 2, embora reduzido, revela que as enzimas responsáveis pelo transporte de aminoácidos e glicose não foram suficientemente afetadas pelo pH a ponto de impedir o crescimento. Por outro lado, a passagem de íons essenciais através da membrana celular saturada com íons hidrogênio, embora em pequeno grau, parece ter sido suficiente para promover algum crescimento.

Em pH de 3 a 7, onde presume-se não ter havido hidrólise de proteínas após a esterilização dos meios, o crescimento dos microrganismos parece revelar a presença de enzimas proteolíticas. Em pH 3 e 7 para o A. niger IZ-9 e pH 3 para o A. wentii IZ-1625 o bom crescimento dos fungos pode indicar que as atividades destas enzimas proteolíticas, assim como das transportadoras de aminoácidos, não foram afetadas pelo pH.

Em pH 4,5 e 6 para A. niger IZ-9 e 4, 5, 6, 7, 8 e 9 para o A. wentii IZ-1625 a redução no crescimento poderia ser explicada pela não disponibilidade de zinco, cálcio e/ou outros íons importantes para a atividade enzimica. COCHRANE (1958) explica a depressão entre dois picos de uma curva pH/crescimento como sendo causada pela não disponibilidade dependente de pH de um ou mais elementos inorgânicos, tais como ferro, zinco e cálcio, podendo o suprimento do elemento em forma utilizável eliminar esta depressão. SEKINE (1973) descreve algumas propriedades físico-químicas de duas proteinases neutras produzidas por A. sojae, as quais possuem cálcio e zinco nas suas estruturas. No presente trabalho, não foram adicionados elementos minerais ao meio porque a folha de mandioca é rica em tais elementos,

porém é possível que para o A. niger IZ-9 e A. wentii IZ-1625 algum desses elementos, que seja essencial, esteja sob forma não utilizável na faixa de pH em questão, uma vez que em determinados valores de pH, aminoácidos formam complexos com certos íons.

A presença de algumas proteínas do meio com pontos isoelétricos próximos daqueles das proteinases poderia ser também uma explicação para a redução no crescimento, uma vez que em pH acima dos pontos isoelétricos envolvidos as cargas tanto das proteínas do meio como das proteinases tornariam-se negativas, o que dificultaria a formação do complexo enzima-substrato. SEKINE (1973) encontrou que os pontos isoelétricos das proteinases neutras I e II de A. sojae são 4,7 e 4,2, respectivamente, e o pH ótimo para a atividade de ambas as enzimas é 7. Em um outro trabalho, no mesmo ano, o autor relata que a proteinase neutra II é especificamente ativa em substrato de protamina e histona. Sabe-se que estas proteínas são do grupo das proteínas básicas, possuindo pontos isoelétricos em torno de 12, daí, possivelmente, a grande afinidade da enzima por estas proteínas em pH 7. Por outro lado, o autor relata que a proteinase neutra I foi especificamente ativa em caseína de leite, cujo ponto isoelétrico é idêntico ao encontrado para a enzima e, portanto, em pH 7 tanto a enzima como o substrato estão positivamente carregados. Desta maneira, possivelmente, outros fatores influem na formação do complexo enzima-substrato, além dos pontos isoelétricos de cada elemento. NAKADAI et alii (1973), em 3 trabalhos, relatam a purificação e propriedades de uma proteinase alcalina e duas neutras I e II produzidas por Aspergillus oryzae. Verificaram que a atividade enzimática varia em função do pH e do substrato. Assim, a proteinase alcalina apresentou picos de atividade em vários valores de pH (4,0 - 7, 5 - 8, 0 - 8, 7 - 10,5

e 11,0) dependendo do substrato utilizado. As proteinases neutras I e II, quando testadas com caseína de leite, apresentaram a melhor atividade em pH 7,0 e 5,5 a 6,0, respectivamente.

Em relação à utilização da fonte de carbono, em pH 2, onde se supõe haver ocorrido hidrólise após a esterilização, o crescimento dos fungos, embora relativamente baixo, parece indicar que o pH não influenciou negativamente ou teve pouca influência sobre as enzimas transportadoras de glicose. Em pH de 3 a 9 a presença de enzimas amilolíticas é esperada a fim de transformar o amido em glicose utilizável pelos microrganismos. LINEBACK et alii (1966) relatam a produção de glicoamilase por Aspergillus niger, cuja atividade não é afetada pela concentração hidrogeniônica numa faixa de pH de 2 a 9 em meios de caldo nutriente e extrato de levedura, porém os autores chamam atenção para uma possível ação inibitória de determinados valores de pH sobre a síntese da enzima. Isto poderia ser também uma explicação para a redução no crescimento do Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 nos valores de pH anteriormente mencionados.

Quanto à alteração no pH produzida pelos microrganismos pode-se salientar que, de um modo geral, o abaixamento indica a produção de ácidos orgânicos e a reação do dióxido de carbono com hidróxido de sódio, enquanto que o aumento indica a liberação de amônia no meio.

A queda brusca produzida pelo A. niger IZ-9 em pH 7, 8 e 9 parece indicar haver um maior estímulo de produção de ácidos por este fungo em relação aos demais. Isto, provavelmente, teria favorecido o bom desenvolvimento do fungo nesta faixa de pH e indicaria que, na realidade, o melhor pH

para o crescimento de A. niger IZ-9 estaria em torno de 3. Porém, há evidências de que as substâncias liberadas para ajustar o pH para valores em torno de 3,7 exercem uma influência direta sobre o crescimento ou indireta induzindo a síntese de substâncias estimuladoras de crescimento ou solubilizando compostos de modo a liberar íons necessários ao crescimento. A importância do pH inicial estaria relacionada com a produção dessas substâncias, uma vez que em pH 4, valor que mais se aproxima do pH final em que ocorreu a maior produção, houve redução do crescimento. LILLY e BARNETT(1951) atribuem o não desenvolvimento de Sordaria fimicola em meio de glicose e hidrolisado de caseína em pH de 3,6 a 3,8 a um efeito do pH externo sobre o interno a tal ponto que houve inibição da síntese de tiamina, para a qual o fungo é auto-suficiente em pH igual ou superior a 4,0, pois a adição da vitamina ao meio determinou um crescimento normal e formação de peritécio. Os autores também relatam que a solubilidade de ferro em soluções alcalinas é grandemente aumentada na presença de ácidos orgânicos, tais como ácidos cítrico, tartárico e málico.

Considerando-se os melhores resultados obtidos, os três fungos podem ser igualmente utilizados para a produção de massa micelial. Similamente ao encontrado por CHRISTIAS et alii(1975) o Fusarium sp. revelou ser um ótimo produtor de biomassa e apresentou ainda a vantagem de se desenvolver bem em uma ampla faixa de pH, sendo, desta maneira, escolhido para o presente trabalho. Entre o A. niger IZ-9 e o A.wentii IZ-1625 foi escolhido o primeiro porque o seu comportamento geral como produtor de biomassa mostrou ser melhor que o segundo.

Em vista da evidência de que o melhor pH para o crescimento do A. niger IZ-9 está em torno de 3, este valor de pH foi escolhido para os testes subsequentes do presente trabalho. Uma outra razão é que em pH ácido a disponibilidade de oxigênio é maior que em alcalino e, portanto, os custos com aeração são minimizados, quando se pensa em transferir o processo para uma escala industrial. Uma terceira razão é que os problemas de contaminação são diminuídos quando fungos são cultivados em pH ácido, tendo, por este motivo, o pH 3 sido escolhido também para o Fusarium sp.

6.2. Ensaio de Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e Por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha de Mandioca para o Crescimento de Fusarium sp.

Nas figuras 1 e 2, onde a produção de biomassa (peso seco em gramas/litro) em cada nível de raiz é tomada em relação aos níveis de folha, observa-se a presença de efeitos tóxicos e estimulantes da folha, em determinados níveis, sobre o crescimento do Fusarium sp. No entanto, estes efeitos não parecem ser exclusivamente da folha, mas de uma interação complexa entre folha e raiz. Esta hipótese é reforçada quando o peso seco em cada nível de folha é tomado em função dos níveis de raiz (Figuras 3 e 4). Num mesmo nível de raiz houve queda de produção para um determinado nível de folha e aumento para outros.

Acredita-se na possibilidade da presença de fatores que afetam o crescimento tanto na fonte de carboidrato como na de nitrogênio, os quais não foram destruídos pelos processos de desidratação. Em determina-

dos níveis estes fatores estimulariam a produção e, ao atingirem níveis de incompatibilização surgiria um efeito inibitório.

No ensaio subsequente, em que foram testados níveis de raiz com 0,5 a 2,0 gramas de carboidrato por cento e de folha com 0,16 a 0,32 gramas de nitrogênio por cento para a folha liofilizada e de 3,5 a 5,5 gramas de carboidrato por cento fixando a folha no nível correspondente a 0,16 gramas de nitrogênio por cento para a folha desidratada em estufa, o não crescimento do fungo em todos os tratamentos pode ter resultado de uma alteração na constituição genética do fungo durante as repicagens sucessivas em meio de malte.

É possível que a linhagem selvagem isolada de raiz de mandioca, utilizada anteriormente, fosse heterocariótica e, portanto, mais adaptável a diversos meios de cultura. Dois núcleos diferentes do heterocário podem ter se fundido para formar um diplóide heterozigótico, o qual pode ter se multiplicado simultaneamente com o núcleo haplóide, mantendo a condição heterocariótica. Pode ter havido separação dos núcleos diplóide e haplóides, levando à formação de micélios diplóide homocário, haplóides homocários e/ou heterocários. Possivelmente, o meio de malte ofereceu condições de crescimento para todos os micélios produzidos, havendo seleção em favor daquele que apresentou menor complexidade. Durante a repicagem para manutenção do fungo em meio de malte é possível que se tenham tomado setores haplóides com núcleos deficientes para síntese de certas enzimas ou fatores de crescimento. Utilizando-se inóculos provenientes destas colônias para crescimento em meio de folha e raiz de mandioca é possível que

este meio não tenha suprido a deficiência apresentada pelo microrganismo, o qual se tornou, então, incapaz de se desenvolver.

A presença de um glucosídeo cianogênico em mandioca relativamente estável poderia ter sido também uma das causas para o resultado obtido. VUAFLART (1909), citado por JOHNSON e RAYMOND (1965), descreve a presença de dois glucosídeos cianogênicos em mandioca, um dos quais libera ácido cianídrico quando moída em água e é decomposto por emulsina ou por ácido hidrolórico, enquanto que o outro pode ser hidrolisado por ácido hidrolórico, mas é estável em tratamento com emulsina e quando a mandioca é moída com água. É possível que o processamento a que foram submetidas as folhas e raízes de mandioca, no presente trabalho, tenha eliminado a maior parte, senão totalmente, do glucosídeo cianogênico mais instável. No entanto, o mais estável pode ter permanecido no meio e durante a autoclavagem ter sido hidrolisado, deixando o meio com ácido cianídrico dissolvido e produzindo uma atmosfera saturada com o ácido. Para que um microrganismo sobreviva em tais condições é necessário que ele utilize o cianeto como fonte de carbono e/ou nitrogênio (IWANOFF e ZWETROFF, 1936; YOUATT, 1954; WARE e PAINTER, 1955; RANGASWAMI e BALASUBRAMANIAN, 1963; STROBEL, 1964, 1966 e 1967; DUNNILL e FOWDEN, 1965; FLOSS et alii, 1965; ALLEN e STROBEL, 1966; STAFFORD e CALLELY, 1969; CASTRIC e STROBEL, 1969; BRYSK e RESSLER, 1970; MUNDY et alii, 1973; e KNOWLES, 1976) ou para sínteses de vitamina B₁₂ (TRELAWNY et alii, 1956) ou, ainda, que seja capaz de produzir as enzimas necessárias à respiração cianeto-resistente (MIZUSHIMA et alii, 1959; MIZUSHIMA e ARIMA, 1960; MIZUSHIMA et alii, 1960; ARIMA e OKA, 1965; OKA e ARIMA, 1965; SKOW-

RONSKI e STROBEL, 1969; MCFETERS et alii, 1970; LAMBOWITZ e SLAYMAN, 1971 ; SAUER et alii, 1973; WESTON et alii, 1974; ASHCROFT e HADDOCK, 1975; NIVEN et alii, 1975; e KNOWLES, 1976). Possivelmente o micélio com núcleo haplóide, utilizado como inóculo, perdeu a capacidade de realizar uma ou mais destas atividades, as quais são pré-requisitos para o processo de desintoxicação do cianeto.

6.3. Ensaio de Dois Métodos de Desidratação da Folha (Em Estufa a 45°C e Por Liofilização), Quatro Níveis de Raiz e Cinco de Folha de Mandioca para o Crescimento de Aspergillus niger IZ-9

Analisando-se o comportamento geral do Aspergillus niger IZ-9 nos dois métodos de desidratação da folha testados, verifica-se que a escolha do melhor método depende da maneira como se determina o crescimento. Quando medido em termos de peso seco a desidratação em estufa mostrou-se ser melhor, ao contrário do observado quando o crescimento foi estimado em relação à produção de proteína bruta, onde a liofilização apresentou melhor resultado. A discrepância destes resultados parece revelar haver um efeito dos dois métodos de desidratação da folha sobre a fisiologia do microrganismo. Como a medida do peso seco não leva em consideração o número de células, mas o peso das mesmas, qualquer fator que estimule a produção de determinadas substâncias no interior das células, tais como polissacarídeo, gordura ou outras, leva a um aumento no peso seco. Neste caso, a folha desidratada em estufa parece estimular mais a produção destas substâncias que a liofiliza -

da. Por outro lado, há interferência dos níveis de folha e raiz sobre as produções. Assim, em determinadas combinações desses fatores, as produções obtidas com a folha desidratada em estufa, tomadas tanto em peso seco como em proteína bruta não diferiram das melhores obtidas com a folha liofilizada (Tabelas 20 e 24).

Tomando-se o crescimento do microrganismo em peso seco nos níveis de folha em relação aos níveis de raiz o comportamento nos níveis zero (0,04 gramas de nitrogênio por cento) e dois (0,12 gramas de nitrogênio por cento) de folha, tanto para o método de desidratação em estufa (Figura 7) como para a liofilização (Figura 8), foi similar parecendo indicar que provavelmente os fatores que interferem no crescimento presentes na folha desidratada em estufa são os mesmos da folha liofilizada. No nível zero de folha as produções aumentaram à medida que os níveis de raiz cresceram, enquanto que no nível dois a resposta foi inversa parecendo indicar que os fatores existentes nas folhas interagem com outros presentes na raiz. No nível três de folha (0,16 gramas de nitrogênio por cento) desidratada em estufa o fungo não respondeu aos níveis de raiz, enquanto que para a folha liofilizada o crescimento foi semelhante ao produzido no nível dois, sendo, porém, inferior. As diferenças entre as produções nos níveis dois e três de folha liofilizada foram aumentando à medida que cresciam os níveis de raiz, parecendo mostrar um possível efeito de substâncias inibitórias presentes na folha e sua interação com fatores presentes na raiz ou a presença de fontes de carbono disponíveis nas folhas, desequilibrando a relação carbono/nitrogênio.

Analisando-se o peso seco nos níveis de raiz em função dos níveis de folha observa-se que para a folha desidratada em estufa (Figura 5) houve um estímulo no nível dois de folha em relação aos níveis zero, um e dois de raiz. Poder-se-ia pensar que este estímulo tivesse se dado por um ajustamento da relação ótima raiz/folha para o crescimento do microrganismo, porém esta hipótese é pouco provável uma vez que aumentando-se o nível de raiz para três a concentração ótima de folha para manter uma relação próxima das melhores relações obtidas deveria ser acima do nível dois se apenas a relação raiz/folha estivesse influenciando na produção. Entretanto, para este nível de raiz o pico de produção se deu no nível um de folha. O simples fato de três níveis de raiz apresentarem produções máximas no mesmo nível de folha já indica que a relação raiz/folha não é o único fator responsável pelo aumento ou queda de produção. Para a folha liofilizada (Figura 6) verifica-se também que esta relação não é mantida. É importante observar, neste caso, o deslocamento dos picos de produção máxima nos níveis crescentes de raiz no sentido decrescente dos níveis de folha. Esta mesma tendência foi detectada para a folha desidratada em estufa, porém não tão acentuada. Isto reforça a hipótese da presença de fatores inibidores nas folhas, tais como alguns aminoácidos em determinadas concentrações, o que está de acordo com o encontrado por ROBBINS e McVEIGH (1946), ou outros fatores presentes tanto na raiz como na folha, ou, ainda, alteração na relação carbono/nitrogênio devido à presença de fontes de carbono disponíveis nas folhas.

Comparando-se o crescimento do fungo nos níveis de folha em função dos níveis de raiz medido em peso seco, tanto para folha desidratada

em estufa (Figura 7) como para folha liofilizada (Figura 8), com a produção em proteína bruta para folha desidratada em estufa (Figura 11) e folha liofilizada (Figura 12), respectivamente, observa-se que os fatores que afetam o desenvolvimento do fungo quando medido em peso seco podem também alterar a produção de proteína bruta, embora não necessariamente os níveis de folha que acarretam uma alteração na variação do peso seco levem à mesma variação na produção de proteína bruta. Assim, onde o nível zero para folha desidratada em estufa (Figura 7) e liofilizada (Figura 8) foi mantido, o peso seco foi aumentando à medida que se elevou o nível de raiz. Esta variação não foi observada quando se mediu o teor de proteína bruta (Figuras 11 e 12). No nível três de folha desidratada em estufa não houve variação no peso seco em função dos níveis de raiz (Tabela 18), porém a produção de proteína bruta apresentou uma queda gradativa à medida que aumentaram os níveis de raiz (Figura 11), parecendo indicar que a queda de proteína deve ter sido compensada pela síntese de outras substâncias. No nível dois de folha desidratada em estufa o comportamento do fungo em termos de peso seco é similar ao comportamento em relação à produção de proteína bruta. O mesmo acontece para os níveis dois e três da folha liofilizada. Isto poderia indicar que a redução no crescimento quando se aumentou o nível de raiz foi, possivelmente, devida ao aumento no número de células ou no teor de proteínas, ou, ainda, ambos os fatores.

As produções de proteína bruta nos níveis de raiz em função dos níveis de folha desidratada em estufa (Figura 9) e liofilizada (Figura 10) não apresentam a tendência de deslocamento dos picos de produção máxima detectada em relação ao peso seco. Esta observação pode reforçar a hi

põtese de que em determinados níveis de folha o processo de síntese proteica é estimulado, sendo este estímulo aumentado ou diminuído dependendo do nível de raiz. O aumento deste leva a uma faixa mais ampla de produções máximas, porém mais baixas.

Os aminoácidos resultantes da hidrólise da proteína foliar podem exercer uma ação estimulante sobre o crescimento incorporando-se diretamente em fragmentos de peptídeos durante a síntese de determinadas proteínas, através de transaminaões para a síntese de outros aminoácidos ou, ainda, através de reações de desaminação. As transaminaões se do por reações de aminoácidos que passam mais facilmente através da membrana celular com α -cetoácidos presentes no citoplasma resultantes do metabolismo celular. Entre as transaminases mais ativas estão as glutâmico, alanina e aspartato. Essas transaminases são capazes de reagir com quase todos os aminoácidos proteicos em diferentes velocidades, sendo de se esperar que as reações onde participam seus substratos específicos sejam mais rápidas e, portanto, mais eficientes na síntese de outros aminoácidos.

A folha de mandioca, por possuir grandes quantidades dos ácidos glutâmico e aspártico, certamente desempenha um papel importante na síntese de outros aminoácidos, proporcionando um bom desenvolvimento do microrganismo. Como visto anteriormente, WAKSMAN e LOMANITZ (1925) encontraram que o ácido glutâmico é um bom estimulador da produção de micélio. O aumento nas concentrações de certos aminoácidos da proteína fúngica e redução de outros quando comparados com o perfil de aminoácidos da proteína foliar (Tabela 25) podem ter ocorrido em consequência de reações de transaminação e desaminação. Um determinado aminoácido reagindo com os ácidos α -

cetoglutâmico ou oxaloacético, reações catalisadas pelas glutâmico ou aspartato-transaminases, respectivamente, resultará na formação de ácidos glutâmico ou aspártico. O α -cetoácido formado deve ser degradado para que não ocorra reversibilidade ou síntese de aminoácido transaminado, mantendo, assim, um nível ótimo de aminoácidos exigido pela célula fúngica, o qual não necessariamente é o mesmo exigido pela célula vegetal.

O fato do ácido glutâmico ser especificamente permeável à membrana mitocondrial interna e na matriz sofrer reações de transaminação e desaminação revela a importância deste aminoácido em processos metabólicos essenciais ao desenvolvimento do microrganismo. O ácido α -cetoglutâmico produzido nestas reações pode se incorporar ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos e, através de oxidações sucessivas, fornecer um ganho energético de, pelo menos, nove moles de fosfato de alta energia, se a reação de formação do ácido α -cetoglutâmico for uma transaminação, ou, pelo menos, doze se for uma desaminação. Se o ácido oxaloacético produzido se desviar para a formação de ácido pirúvico e este for completamente oxidado, o ganho energético será, então, de 25 moles de fosfato de alta energia, no caso da transaminação, ou 28, na desaminação.

Tendo sido a melhor produção obtida no menor nível de raiz testado, tanto medida em peso seco como em proteína bruta, quer para folha desidratada em estufa quer liofilizada, é possível que reduzindo-se ainda mais o nível de raiz, ou até mesmo eliminando-a totalmente, uma maior produção seja alcançada.

6.4. Curva de Crescimento do *Aspergillus niger* IZ-9 em Meio de Raiz (1,5 gramas de Carboidrato por Cento) e Folha (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento) de Mandioca Desidratada em Estufa a 45°C

Pelos resultados alcançados observou-se que o teor de proteína do micélio atingiu uma estabilidade a partir de 60 horas (Tabela 31 e Figura 14), mostrando que a produção de proteína em 84 horas, ou seja, no início da fase estacionária (Tabela 30 e Figura 13) equivale à produção na metade da fase exponencial. Isto concorda com os dados de CHRISTIAS et alii (1975) que encontraram resultados similares com uma linhagem selvagem de *Aspergillus niger* IZ-9 e seu mutante 70, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Candida tropicalis*.

Estes resultados podem indicar também que o aumento no peso seco a partir de 60 horas se deve não à síntese de proteínas, mas ao acúmulo de outras substâncias.

Deve-se salientar que o tempo necessário para a máxima produção obtida pode ser reduzido se o inóculo for previamente cultivado em meio de raiz e folha de mandioca, nas condições ótimas estabelecidas no presente trabalho, e utilizado em quantidades ótimas a serem determinadas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir o seguinte:

- 7.1. Folhas de mandioca podem ser utilizadas como fonte de nitrogênio para o crescimento de microrganismos, conforme ficou demonstrado pelo uso da variedade IAC-Jaçanã (x - 352-7).
- 7.2. Dentre as culturas ensaiadas, o Aspergillus niger IZ-9 mostrou desenvolver-se bem em meio de raiz e folha de mandioca, em quantidades suficientes para fornecerem 1,5 g % de carboidrato e 0,12 g % de nitrogênio, respectivamente, em pH 3 . A máxima produção de biomassa foi atingida a partir de 84 horas e a de proteína bruta a partir de 60 horas, sendo utilizado um inóculo de 5 mm de diâmetro, proveniente de culturas com 4 dias de idade, para 50 ml de meio.

7.3. Apesar da desidratação da folha de mandioca em estufa a 45°C ter reduzido o teor de treonina, quando comparada com a liofilização, ofereceu melhores condições de crescimento para o Aspergillus niger IZ-9, chegando a resultar num aumento de quase 100% no teor de alguns aminoácidos essenciais como a própria treonina, que atingiu níveis equivalentes ao da folha liofilizada, e a metionina, que alcançou nível superior ao da mesma.

8. SUMMARY

The objectives of the present study were:

1. to investigate the utilization of cassava leaves as a source of nitrogen by microorganisms;
2. to establish some optimal conditions for this purpose; and
3. to determine the effect of the process on the profile of aminoacids.

The results showed that cassava leaves may be utilized as a source of nitrogen for microorganisms. Three microorganisms were tested: Aspergillus niger IZ-9, Aspergillus wentii IZ-1625 and Fusarium sp. Of these, Fusarium sp. was the one which produced the most biomass in one of the trials. However, it proved to be unstable, since in a subsequent trial it did not present any growth. For this reason, it was discarded. When comparing Aspergillus niger IZ-9 with Aspergillus wentii IZ-1625, the first showed better behavior in all trials, so it was the microorganism selected. Two methods of dehydrating leaves were tested for this fungus

(in an oven at 45°C and by liofilization). Better results were obtained in the oven dehydration process. Utilizing this process, it was determined that good microorganism development is achieved at pH 3, in cassava leaves and root media, at concentrations which were sufficient to provide 0.12 g of nitrogen per cent and 1.5 g of carbohydrate per cent. Maximum production of biomass was attained from 84 hours on, and of crude protein from 60 hours on, when 5 mm diameter inoculums of 4-day old cultures were used for 50 ml of media. With regard to the profile of essential amino-acids, cassava leaf dehydration in an oven at 45°C considerably reduced the content of treonine, as compared to liofilization. In spite of this, it offered better growth conditions for Aspergillus niger IZ-9, resulting in an increase of almost 100% in content of some essential amino-acids, such as treonine itself, that attained levels equivalent to that of the liofilized leaf, and metionine, which reached a higher level than that of liofilized leaf.

9. LITERATURA CITADA

- ADRIAN, J. , F. PEYROT , J. S. OLIVEIRA e M. F. de CARVALHO, 1969. Etude Nutritionnelle de la Feuille de Manioc (Manihot utilissima). Revista de Ciências Agronômicas, Lourenço Marques, 2 (A): 43-60.
- AKINRELE, I. A., 1964. Fermentation of Cassava. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 15: 589-594.
- ALLEN, J. e G. A. STROBEL, 1966. The Assimilation of $H^{14}CN$ by a Variety of Fungi. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 12: 414-416.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, INC., 1962. Cereal Laboratory Methods. 7.^a ed. St. Paul.
- ANDERSON, A. K. e K. EMMART, 1934. Relation of Certain Amino Acids to Carbon Dioxide and Mycelium Production of Fusarium oxysporum. Plant Physiology, Lancaster, 9: 823-829.

- ARIMA, K. e T. OKA, 1965. Cyanide Resistance in Achromobacter I. Induced Formation of Cytochrome a_2 and its Role in Cyanide - Resistant Respiration. Journal of Bacteriology, Baltimore, 90(3): 734-743.
- ASHCROFT, J. R. e B. A. HADDOCK, 1975. Synthesis of Alternative Membrane-Bound Redox Carriers during Aerobic Growth of Escherichia coli in the Presence of Potassium Cyanide. Biochemical Journal, Cambridge, 148: 349-352.
- AZI, F. A. , A. G. MEIERING , C. L. DITSCHAEVER e A. E. READE, 1975. Air Injection by Self-Aspirating Impeller in Aerobic Fermentation. Journal of Milk Food Technology, Shelbyville, 38(2): 94-99.
- BANGHAM , W. N., 1950. A Mandioca Supera a Alfafa. A Fazenda, New York, 45(8): 27-29.
- BARRIOS, E. A. e R. BRESSANI, 1967. Composición Química de la Raíz y de la Hoja de Algunas Variedades de Yuca Manihot. Turrialba, San José, 17 (3): 314-320.
- BRYSK, M. M. e C. RESSLER, 1969. γ -Cyano- α -L-aminobutyric Acid. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 245(5): 1156-1160.
- CASTRIC, P. A. e G. A. STROBEL, 1969. Cyanide Metabolism by Bacillus megaterium. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 244(15): 4089-4094.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, Cali, 1976. Produccion de Proteina Microbiana. Informe Anual, p. 14-18.
- CHRISTIAS, C. , C. COUVARAKI , S. G. GEORGOPOULOS , B. MACRIS e V. VOMVOYANNI, 1975. Protein Content and Amino Acid Composition of Certain Fungi Evaluated for Microbial Protein Production. Applied Microbiology, Washington, 29: 250-254.

- COCHRANE, V. W., 1958. Physiology of Fungi. New York, John Wiley & Sons, Inc. 524 p.
- COLLARD, P. e S. LEVI, 1959. A Two-Stage Fermentation of Cassava. Nature, London, 183: 620-621.
- CONCEIÇÃO, A. J. da e D. D. GRAMACHO, 1972. Teste de Enriquecimento da Fécula da Mandioca com a Utilização de Rhizopus nigricans Ehr. Penicillium digitatum Sac. In: Anais da VI Reunião da Comissão Nacional da Mandioca, Recife, p. 57-59.
- DUBOIS, M. , K. A. GILLES , Y. K. HAMILTON , P. A. REBERS e F. SMITH, 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, St. Paul, 28(3): 350-356.
- DUNNILL, P. M. e L. FOWDEN, 1965. Enzymatic Formation of β -Cyanoalanine from Cyanide by Escherichia coli Extracts. Nature, London, 208(5016): 1206-1207.
- FIGUEIREDO, A. de A. e M. M. do REGO, 1973. Teor Proteico e Mineral em Raízes e Folhas de Mandioca. Boletim Técnico do Centro de Tecnologia Agrícola e Alimentar, Rio de Janeiro, 5: 23-25.
- FLOSS, H. G. , L. HADWIGER e E. E. CONN, 1965. Enzymatic Formation of β -Cyanoalanine from Cyanide. Nature, London, 208(5016): 1207-1208.
- FONSECA, H., 1977. Comunicação Pessoal.
- GOMES, F. P., 1973. Curso de Estatística Experimental. 5^a ed. Piracicaba. Editora da ESALQ/USP. 430 p.
- GOTTLIEB, D., 1946. The Utilization of Amino Acids as a Source of Carbon by Fungi. Archives of Biochemistry, New York, 9: 341-351.

- GRAY, W. D. e M. O. ABOU-EL-SEOUD, 1966. Fungal Protein for Food and Feeds. III. Manioc as a Potential Crude Raw Material for Tropical Areas. Economic Botany, New York, 20: 251-255.
- GREGORY, K. F. , A. E. READE , G. L. KHOR , J. C. ALEXANDER , J. H. LUMSDEN e G. LOSOS, 1976. Conversion of Carbohydrates to Protein by High Temperature Fungi. Food Technology. Champaign, 30: 30-35.
- GREGORY, K. F. , A. G. MEIERING , F. A. AZI , J. A. D. SEDGWICK , J. D. CUNNINGHAM , S. J. MACLEAN , J. SANTOS-NÚÑEZ e G. GÓMEZ, 1977. Establishment of a Pilot Plant for the Production of Fungal Protein from Cassava. In: Proceedings of the Fourth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Ottawa, 267-270.
- HELLENDORRN, E. W. , M. G. NOORDHOFF e J. SLAGMAN, 1975. Enzymatic Determination of the Indigestible Residue (Dietary Fibre) Content of Human Food. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 26: 1461-1468.
- IWANOFF, N. N. e E. S. ZWETROFF, 1936. The Biochemistry of the Fungi. Annual Review of Biochemistry, Palo Alto, 5: 585-612.
- JOHNSON, R. M. e W. D. RAYMOND; 1965. The Chemical Composition of Some Tropical Food Plants. IV. Manioc. Tropical Science, London, 7(03): 109-115.
- KLING, S. H. , E. SOLEWICZ , M. S. P. DAUMAS , G. H. da SILVA , M. R. J. MARTINS , R. M. B. de MOURA e J. C. PERRONE, 1976. Aproveitamento Industrial das Folhas de Mandioca. Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia, Rio de Janeiro, 9 (11): 13-18.
- KNOWLES, C. J., 1976. Microorganisms and Cyanide. Bacteriological Reviews. Washington, 40 (3): 652-680.

- LAMBOWITZ, A. M. e C. W. SLAYMAN, 1971. Cyanide-Resistant Respiration in Neurospora crassa. Journal of Bacteriology, Baltimore, 108(3): 1087-1096.
- LILLY, V. G. e H. L. BARNETT, 1951. Physiology of the Fungi. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc. 464 p.
- LIMA, O. G. de, 1975. Pulque, Balchê e Pajauaru na Etnobiologia das Bebidas e dos Alimentos Fermentados. Recife, Editora da Universidade Federal de Pernambuco, 405 p.
- LINEBACK, D. R. , C. E. GEORGI e R. L. DOTY, 1966. Glucoamylase (α -1,4-Glucan Glucohydrolase) Production by Aspergillus niger as Influenced by Medium Composition. The Journal of General and Applied Microbiology, Tokyo, 12 (1): 27-38.
- McFETERS, G. A. , D. F. WILSON e G. A. STROBEL, 1970. Cytochromes in a Cyanide-Resistant Strain of Bacillus cereus. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 16: 1221-1226.
- MENEZES, T. J. B. de , I. B. FIGUEIREDO e J. STRASSER, 1971/72. Proteína Monocelular de Leveduras Amilolíticas. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 4: 109-116.
- MENSE, E. H. LE , J. CORMAN , J. M. VAN LANEN e A. F. LANGLYKKE, 1947. Production of Mold Amylases in Submerged Culture. Journal of Bacteriology, Washington, 54: 149-159.
- MIZUSHIMA, S. , M. NAKANO e K. I. SAKAGUCHI, 1959. Cyanide Insensitive Terminal Respiratory System in Aerobacter cloacae. The Journal of Biochemistry, Tokyo, 46(3): 373-381.

- MIZUSHIMA, S. e K. ARIMA, 1960. Mechanism of Cyanide Resistance in Achromobacter. I. Adaptive Formation of Cyanide Resistant Respiratory System in Growing Cells. The Journal of Biochemistry, Tokyo, 47(3): 351-360.
- MIZUSHIMA, S. e K. ARIMA, 1960. Mechanism of Cyanide Resistance in Achromobacter. II. Adaptive Formation of Cyanide Resistant Respiratory System in Resting Cells. The Journal of Biochemistry, Tokyo, 47(5): 600-607.
- MIZUSHIMA, S. e K. ARIMA, 1960. Mechanism of Cyanide Resistance in Achromobacter. III. Nature of Terminal Electron Transport System and its Sensitivity to Cyanide. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 47(6): 837-845.
- MIZUSHIMA, S. , T. OKA e K. ARIMA, 1960. Mechanism of Cyanide Resistance in Achromobacter. IV. Cyanide Resistant Respiration on Anaerobically Cultivated Cells. The Journal of Biochemistry, Tokyo, 48(2): 205-213.
- MORSE, R. E. e N. URAIH, 1974. Protein Enriched Gari. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, Ottawa, 7(2): 151-154.
- MUNDY, B. P. e F. H. S. LIU, 1973. α -Aminobutyronitrile as an Intermediate in Cyanide Fixation by Rhizoctonia solani. Canadian Journal of Biochemistry, Ottawa, 51: 1440-1442.
- MURILLO, O. E., 1952. Valor de la Harina de Hojas e Tallos Deshidratados de Yuca en la Producción de Leche. Turrialba, San José, 2(4): 166-169.

- NAKADAI, T. , S. NASUNO e N. IGUCHI, 1973. Purification and Properties of Alkaline Proteinase from Aspergillus oryzae. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 37 (12): 2685-2694.
- NAKADAI, T. , S. NASUNO e N. IGUCHI, 1973. Purification and Properties of Neutral Proteinase I from Aspergillus oryzae. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 37(12): 2695-2701.
- NAKADAI, T. , S. NASUNO e N. IGUCHI, 1973. Purification and Properties of Neutral Proteinase II from Aspergillus oryzae. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 37(12): 2703-2708.
- NAKAO, Y. , M. SUZUKI , M. KUNO e K. MAEJIMA, 1973. Production of Alkaline Protease from n-Paraffins by a Kabicidin Resistant Mutant Strain of Fusarium sp. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 37(5): 1223-1224.
- NICHOLAS, D. J. D., 1965. Utilization of Inorganic Nitrogen Compounds and Amino Acids by Fungi. In: AINSWORTH, G. C. e A. S. SUSSMAN, Coord. The Fungi. An Advanced Treatise. Vol. I. The Fungal Cell. New York, Academic Press. 748 p.
- NIVEN, D. F. , P. A. COLLINS e C. J. KNOWLES, 1975. The Respiratory System of Chromobacterium violaceum Grown under Conditions of High and Low Cyanide Evolution. Journal of General Microbiology, New York, 90: 271-285.
- NORMANHA, E. S., 1957. Farelo de Ramas e Folhas de Mandioca. Lavoura e Criação, São Paulo, 100: 9-10.

- OKA, T. e K. ARIMA, 1965. Cyanide Resistance in Achromobacter. II. Mechanism of Cyanide Resistance. Journal of Bacteriology, Baltimore, 90 (3): 744-747.
- PARK, Y. K. e LIMA, D. C., 1971/1972. Conversão Contínua do Amido em Glicose pelo Complexo Amiloglicosidase-Resina. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 4: 147-154.
- PIOTROWSKA, M. , P. P. STEPIEN , E. BARTNIK e E. ZAKRZEWSKA, 1976. Basic and Neutral Amino Acid Transport in Aspergillus nidulans. Journal of General Microbiology, New York, 92(1): 89-96.
- PONS, W. A. Jr. , A. F. CUCULLU , L. S. LEE , J. A. ROBERTSON , A. O. FRANZ e L. A. GOLDBLATT, 1966. Determination of Aflatoxins in Agricultural Products: Use of Aqueous Acetone for Extraction. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Washington, 49(3): 554-562.
- RAILEY, R. M. e J. A. KINSEY, 1976. Development of Amino Acid Uptake Activity in Neurospora. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 22 (2): 115-120.
- RANGASWAMI, G. e A. BALASUBRAMANIAN, 1963. Release of Hydrocyanic Acid by Sorghum Roots & Its Influence on the Rhizosphere Microflora & Plant Pathogenic Fungi. Indian Journal of Experimental Biology. New Delhi, 1: 215-217.
- READE, A. E. , K. F. GREGORY , G. L. KHOR e J. C. ALEXANDER, 1974. Single-Cell Protein Production. In: Proceedings of the Tenth Annual University of Guelph Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Guelph, p. 6-9.
- ROBBINS, W. J. e R. MA, 1945. Growth Factors for Trichophyton mentagrophytes. American Journal of Botany, New York, 32: 509-523.

- ROBBINS, W. J. e I. McVEIGH, 1946. Effect of Hydroxyproline on Trichophyton mentagrophytes and Other Fungi. American Journal of Botany, New York, 33: 638-647.
- ROGERS, D. J., 1959. Cassava Leaf Protein. Economic Botany, New York, 13: 261-263.
- ROGERS, D. J. e M. MILNER, 1963. Amino Acid Profile of Manioc Leaf Protein in Relation to Nutritive Value. Economic Botany, New York, 17: 211-216.
- SALES, A. M. e T. J. B. de MENEZES, 1976. Produção de Biomassa Proteica de Mandioca. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, 7: 139-146.
- SAUER, B. L., H. J. COLVIN e K. D. MUNKRES, 1973. The Effects of Nitrogen Source Upon Respiration of Neurospora crassa. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 55(2): 389-395.
- SEKINE, H., 1973. Neutral Proteinase II of Aspergillus sojae: An Enzyme Specifically Active on Protamine and Histone. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 37(7): 1765-1767.
- SEKINE, H., 1973. Neutral Proteinases I and II of Aspergillus sojae: Some Physicochemical Properties and Amino Acid Composition. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 37(8): 1945-1952.
- SKOWRONSKI, B. e G. A. STROBEL, 1969. Cyanide Resistance and Cyanide Utilization by a Strain of Bacillus pumilus. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 15: 93-98.
- SPICER, A., 1971. Protein Production by Micro-Fungi. Tropical Science, London, 13(4): 239-250.

- STAFFORD, D. A. e A. G. CALLELY, 1969. The Utilization of Thiocyanate by a Heterotrophic Bacterium. The Journal of General Microbiology, New York, 55(2): 285-289.
- STANTON, W. R. e A. WALLBRIDGE, 1969. Fermented Food Processes. Process Biochemistry, 4: 45-51.
- STEEL, R. G. D. e J. H. TORRIE, 1960. Principles and Procedures of Statistics. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc. 481 p.
- STEINBERG, R. A., 1942. Effect of Trace Elements on Growth of Aspergillus niger with Amino Acids. Journal of Agricultural Research, Washington, 64(8): 455-475.
- STRASSER, J. , J. A. ABBOTT e R. F. BATTEY, 1970. Process Enriches Cassava with Protein. Food Engineering, Rotterdam, 42: 112-116.
- STROBEL, G. A., 1964. Hydrocyanic Acid Assimilation by a Psychrophilic Basidiomycete. Canadian Journal of Biochemistry, Ottawa, 42: 1637-1639.
- STROBEL, G. A., 1966. The Fixation of Hydrocyanic Acid by a Psychrophilic Basidiomycete. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 241(11): 2618-2621.
- STROBEL, G. A., 1967. 4-Amino-4-Cyanobutyric Acid as an Intermediate in Glutamate Biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 242(14): 3265-3269.
- STROBEL, G. A., 1967. Cyanide Utilization in Soil. Soil Science, Baltimore, 103(4): 299-302.

- SUZUKI, M. , M. KUNO e Y. NAKAO, 1976. Characteristics of the Kabicidin Resistant Mutant of Fusarium sp. Having a High Productivity of Alkaline Protease. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 40(2): 365-371.
- TRELAWNY, G. S. , V. SCHATZ , K. BARTH e A. SCHATZ, 1956. Microbiological Metabolism of Organic and Inorganic Cyanides. Proceedings of the Pennsylvania Academy of Science, Easton, 30: 44-53.
- TREVELYAN, W. E., 1974. The Enrichment of Cassava with Protein by Moist-Solids Fermentation. Tropical Science, London, 16(4): 179-194.
- VARGUESE, G. , J. J. THAMBIRAJAH e F. M. WONG, 1977. Protein Enrichment of Cassava by Fermentation with Microfungi and the Role of Natural Nitrogenous Supplements. In: Proceedings of the Fourth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Ottawa, 250-255.
- VITTI, P. , I. B. FIGUEIREDO e E. ANGELUCCI, 1971/72. Folhas de Mandioca Desidratadas para Fins de Alimentação Humana. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 4: 117-125.
- WAKSMAN, S. A. e S. LOMANITZ, 1925. Contribution to the Chemistry of Decomposition of Proteins and Amino Acids by Various Groups of Microorganisms. Journal of Agricultural Research, Washington, 30(3): 263-281.
- WAKSMAN, S. A. e R. L. STARKEY, 1932. The Decomposition of Proteins by Microorganisms with Particular Reference to Purified Vegetable Proteins. Journal of Bacteriology, Baltimore, 23: 405-428.
- WARE, G. C. e H. A. PAINTER, 1955. Bacterial Utilization of Cyanide. Nature, London, 175(4464): 900.

- WESTON, J. A. , P. A. COLLINS e C. J. KNOWLES, 1974. The Respiratory System of the Marine Bacterium Beneckea natriegens. II. Terminal Branching of Respiration to Oxygen and Resistance to Inhibition by Cyanide. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 368: 148-157.
- WHITAKER, A., 1976. Amino Acid Transport into Fungi: An Essay. Transactions of the British Mycological Society, London, 67(3): 365-376.
- YOUATT, J. B., 1954. Studies on the Metabolism of Thiobacillus thiooxidans. The Journal of General Microbiology, New York, 11(2): 139-149.