UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

SABRINA EVELIN MARTINIANO

Produção de leveduras enriquecidas com selênio a partir de resíduos vegetais

LORENA – SP

2017

SABRINA EVELIN MARTINIANO

Produção de leveduras enriquecidas com selênio a partir de resíduos vegetais

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Edição reimpressa e corrigida

LORENA – SP

Setembro, 2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Martiniano, Sabrina Evelin

Produção de leveduras enriquecidas com selênio a partir de resíduos vegetais / Sabrina Evelin Martiniano; orientador Silvio Silvério da Silva - ed. reimp., corr. - Lorena, 2017.
118 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. Selênio. 2. Leveduras enriquecidas. 3. Selenoleveduras. 4. Farelo de soja . 5. Biomassa amilácea. I. Título. II. da Silva, Silvio Silvério, orient.

Dedico esse trabalho especialmente à minha mãe, que, mesmo nas dificuldades, sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando a correr atrás dos meus sonhos. Palavras e gestos não seriam suficientes para expressar minha gratidão, mas, meu eterno, muito obrigada. Te amo.

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo apoio, paciência e carinho, sem vocês eu não estaria aqui agora.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa de excelência desde o início de minha carreira acadêmica e pela confiança, incentivo e exemplo de profissionalismo, que me permitiram crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Júlio César dos Santos pela paciência, ajuda e exemplo durante este trabalho.

À Michelle, sempre disposta a me ajudar, não ganhei apenas uma aluna de Iniciação Científica, ganhei uma amiga; este trabalho não seria o mesmo sem sua ajuda.

Às minhas amigas de infância (que conheci quando criança e na faculdade), Karina, Maria Angélica e Tainá, que sempre estiveram presentes nos momentos bons e difíceis da vida.

Aos amigos que fiz na pós-graduação, Paulo e Stephanie, com os quais dividi gargalhadas mesmo nos momentos de “descontrole” mútuo, obrigada por toda a ajuda e carinho dentro e fora do laboratório. São amizades que levarei para a vida toda.

Ao Rafael, amigo, colega de trabalho e companheiro de todos os momentos, obrigada por sempre estar comigo e cuidar de mim, sua presença foi fundamental durante todos esses anos, espero sempre estar ao seu lado.

A todos meus companheiros de laboratório e de departamento, Adriana, Andrés, Anuj, Felipe, Gabriela, Gilda, Guilherme, Henrique, Javier, Juliana, Larissa, Letícia, Lucas, Kelly, Matheus, Ruly, Sara, Swapnil, Wagner e tantos outros, não menos especiais, que conviveram no grupo de pesquisa LBIOS.

A todos os professores e funcionários da EEL-USP, com os quais tive a oportunidade de conviver.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

“Vidas são flocos de neve, formando figuras que já vimos antes, tão parecidos uns com os outros quanto ervilhas numa vagem (...) mas, ainda assim, únicas”.

(Neil Gaiman – Deuses Americanos)

RESUMO

MARTINIANO, S. E. **Produção de leveduras enriquecidas com selênio a partir de resíduos vegetais**. 2017. 118 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

O selênio é um não metal da família 6A e um micronutriente essencial para a saúde animal e humana, com importante ação antioxidante, atuando na prevenção de diversas doenças. O consumo de biomassa de levedura enriquecida com selênio aumenta sua absorção pelo organismo e reduz o risco dos efeitos tóxicos causados pelo consumo de sua forma inorgânica, selenito de sódio. A produção de leveduras enriquecidas com selênio a partir de resíduos amiláceos e lignocelulósicos como fontes de carbono e de nitrogênio é uma alternativa de baixo custo e inovadora. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção de biomassa de levedura enriquecida com selênio para alimentação animal a partir de resíduos da agroindústria. Foram avaliadas sete linhagens, pertencentes às espécies *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula glutinis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Realizaram-se estudos em cultivo submerso com selenito de sódio para avaliar os efeitos no metabolismo microbiano, com ênfase no crescimento celular e incorporação de selênio. Todas as linhagens avaliadas foram capazes de crescer e incorporar selênio, sendo que *S. cerevisiae* SSS41 apresentou elevada tolerância a esse composto e capacidade de crescimento em hidrolisados amiláceos, acrescidos de selênio. Entre os hidrolisados utilizados no processo fermentativo, o hidrolisado de farelo de soja apresentou elevada concentração de proteínas, não sendo necessária sua suplementação com nutrientes para que a linhagem *S. cerevisiae* SSS41 produzisse 7,0 g/L de biomassa celular e incorporasse 2375 ppm de selênio. Com a adição de nutrientes e de concentrações mais elevadas de selênio o crescimento celular se manteve constante, porém a incorporação de selênio foi superior a 11000 ppm. Em cultivos realizados com melaço de cana-de-açúcar o crescimento celular foi de $4,17 \pm 0,24$ g/L, com incorporação de 6528 ± 10 ppm de selênio. Além dos cultivos submersos, também foi realizada fermentação em estado sólido com a levedura *R. glutinis* CCT-2186, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz hidrolisado como substratos sólidos e hidrolisado de farelo de arroz com e sem a adição de selênio na solução umedecedora. Nos ensaios realizados, a levedura foi capaz de crescer e incorporar 6038 ± 1219 ppm de selênio. O consumo de biomassa de levedura enriquecida com selênio apresenta diversos benefícios à saúde e a utilização de resíduos agroindustriais vegetal é um processo inovador e reduz os custos de produção.

Palavras-chave: Selênio. Leveduras enriquecidas. Selenoleveduras. Farelo de soja. Biomassa amilácea.

ABSTRACT

MARTINIANO, S. E. **Se-enriched yeast biomass production from vegetal residues**. 2017. 118 p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

Selenium is an essential micronutrient for animal and human health, with an important antioxidant role, preventing several diseases. Consumption of Se-enriched yeast biomass increases selenium absorption in the digestion process and it is less toxic than its inorganic salt, sodium selenite. The production of Se-enriched yeasts from lignocellulosic and starchy residues as carbon and nitrogen sources is an inexpensive and novel alternative. In this context, the present study aims to produce Se-enriched yeast biomass for animal feed from agroindustrial wastes. Seven yeast strains were evaluated from species *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula glutinis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Studies were carried out in submerged culture containing sodium selenite, to verify the effects on microbial metabolism, with emphasis on cell growth and selenium incorporation. All strains evaluated were able to grow and incorporate selenium and *S. cerevisiae* SSS41 presented high tolerance to this compound and growth capacity in starch hydrolysates containing selenium. Among the hydrolysates used in the fermentation process, soybean bran presented a high protein concentration, and no nutrient supplementation was necessary for the production of 7.0 g/L cellular biomass and incorporation of 2375 ppm of selenium by *S. cerevisiae* SSS41 strain. With the addition of nutrients and higher concentrations of selenium, cell growth remained steady, but the incorporation of selenium was higher than 11000 ppm. In fermentations carried out with sugarcane molasses, the cell growth of *S. cerevisiae* SSS41 was 4.17 ± 0.24 g/L, incorporating 6528 ± 10 ppm of selenium. In parallel, solid-state fermentation was carried out with yeast *R. glutinis* CCT-2186, using sugarcane bagasse and hydrolyzed rice bran as solid substrates and rice bran hydrolyzate with and without the addition of selenium in humidifying solution. In these conditions, the yeast was able to grow and incorporate 6038 ± 1219 ppm of selenium. The consumption of selenium-enriched yeast biomass has several health benefits and the use of agro-industrial wastes is an innovative process and reduces production costs.

Keywords: Selenium. Enriched yeasts. Se-enriched yeasts. Soybean bran. Starchy biomass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo simplificado da via de incorporação de selênio em leveduras. SeO_4^{2-} , selenato; SeO_3^{2-} , selenito; H_2Se , seleneto de hidrogênio.	33
Figura 2 – Representação esquemática de parte da estrutura da celulose.....	37
Figura 3 – Representação esquemática de parte da estrutura da hemicelulose do tipo arabinoglucoronoxilana (arabino-4-O-metilglucuronoxilana).	38
Figura 4 – Precursores básicos e suas respectivas unidades aromáticas na lignina.	39
Figura 5 - Fluxograma simplificado das etapas realizadas durante o trabalho.	66
Figura 6 - Crescimento de leveduras em meio YMA-Se (esquerda) e YMA (direita) a 30 °C durante 48 e 120 horas, respectivamente. (A) <i>Candida utilis</i> SSS32; (B) <i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24; (C) <i>Rhodotorula glutinis</i> CCT-2186; (D, E, F, G) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS25 / SSS40 / SSS41 / LALVIN ICV D47.....	68
Figura 7 – Microscopia óptica de leveduras crescidas em ágar YMA-Se (superior) e YMA (inferior) a 30 °C após 48 horas, com um aumento de 400 X. (A) <i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24; (B) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41.....	68
Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41 cultivada na presença de 15 mg/L de selênio (aumento de 10000X).....	74
Figura 9 - Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis e suas interações na liberação de açúcares redutores, de acordo com delineamento composto central rotacional 2^2 , com três repetições no ponto central. (X_1 = H_2SO_4 % m/v; X_2 = % farelo de soja).	80
Figura 10 – Superfície de resposta para a liberação de açúcares redutores (g/L) em função da concentração de H_2SO_4 (% m/v) e relação sólido:líquido (% de farelo de soja).	81
Figura 11 – Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41 após centrifugação, apresentando biomassa celular branca e avermelhada.	82
Figura 12 – Crescimento celular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41 em hidrolisados de biomassas vegetais. (HFA: farelo de arroz; HFAD: farelo de arroz desengordurado; HFM: farelo de milho; HFS: farelo de soja; HHBC: hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar). ..	82
Figura 13 - Porcentagem de consumo de açúcares pelas leveduras <i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41 em hidrolisados de	

biomassas vegetais após 72 horas de cultivo. (HFA: farelo de arroz; HFAD: farelo de arroz desengordurado; HFM: farelo de milho; HFS: farelo de soja; HHBC: hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar)..... 85

Figura 14 – Biomassa de levedura enriquecida com selênio desidratada e triturada. 87

Figura 15 – Crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 em diferentes condições experimentais de acordo com ensaios do planejamento fatorial completo 2^5 , com três repetições no ponto central. 92

Figura 16 – Porcentagem de consumo de açúcares após 72 horas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 em diferentes condições de acordo com ensaios do planejamento fatorial completo 2^5 , com três repetições no ponto central. 94

Figura 17 – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis e suas interações na produção de biomassa celular (A) e na incorporação de selênio pelas células (B), de acordo com planejamento fatorial completo 2^5 , com três repetições no ponto central. ($X_1 = \text{KH}_2\text{PO}_4$; $X_2 = \text{NH}_4\text{NO}_3$; $X_3 = \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $X_4 = \text{CaCl}_2$; $X_5 = \text{Na}_2\text{SeO}_3$). 95

Figura 18 – Crescimento celular e concentração de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 em melaço de cana-de-açúcar em função do tempo de fermentação..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de selênio em alguns alimentos consumidos no Brasil.	25
Tabela 2 – Alguns exemplos de meios e condições de cultivo utilizados na produção de biomassa de levedura enriquecida com minerais.	30
Tabela 3 – Exemplos de produtos à base de leveduras enriquecidas com selênio de uso animal e humano.	35
Tabela 4 – Composição química parcial (%) de amostras de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .	40
Tabela 5 - Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 para hidrólise do farelo de soja, com níveis reais e codificados.	56
Tabela 6 – Planejamento fatorial completo 2^5 , com três repetições no ponto central, para produção de biomassa celular e incorporação de selênio por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41.	58
Tabela 7 – Composição do meio para fermentação em estado sólido.	60
Tabela 8 – Concentração de selênio, biomassa, proteínas, lipídeos e viabilidade celular em cultivos na presença e ausência de selênio.	70
Tabela 9 – Consumo de glicose, produção de subprodutos e pH ao final do cultivo de leveduras cultivadas na presença e ausência de selênio.	72
Tabela 10 – Composição parcial dos hidrolisados de biomassas vegetais utilizados em processo fermentativo.	75
Tabela 11 – Composição de açúcares e compostos inibidores dos hidrolisados de diferentes biomassas vegetais.	77
Tabela 12 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 para hidrólise do farelo de soja.	78
Tabela 13 – Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado de liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de farelo de soja.	80
Tabela 14 - Cultivo de leveduras enriquecidas com selênio em hidrolisados de biomassa vegetais.	84
Tabela 15 – Planejamento fatorial completo 2^5 , com três repetições no ponto central, para a produção de biomassa celular e incorporação de selênio por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41.	89

Tabela 16 – Viabilidade celular, conteúdo proteico intracelular e pH após 72 horas de cultivo com *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 de acordo com ensaios do planejamento fatorial completo 2⁵, com três repetições no ponto central. 91

Tabela 17 – Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R²) para a produção de biomassa celular de *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 a partir de hidrolisado de farelo de soja. 96

Tabela 18 – Teor de açúcares totais e redutores em melaço de cana-de-açúcar *in natura* e diluído. 98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 O selênio	23
2.1.1 Importância na saúde	24
2.1.2 Patologias associadas à deficiência de selênio	26
2.2 Leveduras na nutrição	27
2.2.1 Leveduras enriquecidas com minerais	29
2.2.2 Leveduras enriquecidas com selênio	31
2.3 Biomassa vegetal	36
2.3.1 Materiais lignocelulósicos	36
2.3.2 Materiais amiláceos	40
2.3.3 Métodos de pré-tratamento da biomassa vegetal	44
2.3.4 Biomassa vegetal como substrato em processos fermentativos	45
2.3.5 Fatores que interferem no crescimento microbiano	47
3 OBJETIVOS	50
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Microrganismos	51
4.2 Preparo do inóculo	51
4.3 Avaliação do crescimento de leveduras na presença de selênio	51
4.4 Determinação da incorporação de selênio e seu efeito no metabolismo das leveduras	52
4.5 Teste de adsorção de selênio na parede celular de leveduras	53
4.6 Análise morfológica das leveduras por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.7 Seleção das leveduras produtoras de exoenzimas	53
4.7.1 Carboximetilcelulase	54
4.7.2 Amilases	54
4.8 Obtenção e tratamento de hidrolisados amiláceos	54
4.8.1 Tratamento e caracterização dos hidrolisados amiláceos	55
4.8.2 Delineamento composto central rotacional 2 ² para hidrólise do farelo de soja para uso em processos fermentativos	55

4.9 Obtenção e tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	56
4.10 Avaliação dos hidrolisados amiláceos e lignocelulósico na produção de leveduras enriquecidas com selênio	57
4.10.1 Planejamento fatorial completo 2 ⁵ para análise de crescimento celular e incorporação de selênio	57
4.11 Crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial em meio sintético simulando os açúcares de hidrolisados de resíduos vegetais	59
4.12 Produção de biomassa de levedura enriquecida com selênio a partir de melaço de cana-de-açúcar	59
4.13 Fermentação em estado sólido para a produção de levedura enriquecida com selênio	60
4.13.1 Teste de máxima capacidade absorviva	61
4.14 Métodos analíticos	61
4.14.1 Determinação do teor de umidade da biomassa vegetal	61
4.14.2 Determinação da concentração celular	61
4.14.3 Determinação da viabilidade celular	62
4.14.4 Método de lise celular	62
4.14.5 Determinação de proteínas totais	62
4.14.6 Determinação de lipídeos totais	63
4.14.7 Determinação de fenóis totais	63
4.14.8 Determinação de açúcares totais	63
4.14.9 Determinação de açúcares redutores	64
4.14.10 Determinação das concentrações de açúcares, compostos inibidores e subprodutos de processos fermentativos	64
4.14.11 Determinação do pH	64
4.14.12 Digestão de biomassa para análise de selênio	65
4.14.13 Determinação de selênio total	65
4.15 Fluxograma de atividades	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 Avaliação do crescimento de leveduras na presença de selênio	67
5.2 Determinação da incorporação de selênio e seu efeito no metabolismo das leveduras	69
5.3 Teste de adsorção de selênio na parede celular de leveduras	73
5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	73

5.5	Seleção das leveduras produtoras de exoenzimas.....	74
5.5.1	Carboximetilcelulase.....	74
5.5.2	Amilases	75
5.6	Obtenção e caracterização dos hidrolisados de biomassas vegetais	75
5.7	Delineamento composto central rotacional 2^2 para hidrólise do farelo de soja para uso em processos fermentativos.....	77
5.8	Avaliação dos hidrolisados amiláceos e lignocelulósico na produção de leveduras enriquecidas com selênio	82
5.9	Planejamento fatorial completo 2^5 para análise de crescimento celular e incorporação de selênio	87
5.10	Crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial em meio sintético simulando os açúcares de hidrolisados de resíduos vegetais.....	97
5.7	Produção de biomassa de levedura enriquecida com selênio a partir de melaço de cana-de-açúcar	97
5.1	Fermentação em estado sólido para a produção de levedura enriquecida com selênio.....	99
6	CONCLUSÕES.....	101
7	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	102
	REFERÊNCIAS.....	103
	APÊNDICES.....	113

1 INTRODUÇÃO

O selênio é um não metal da família 6A e um micronutriente essencial para a saúde animal e humana, com importante ação antioxidante, atuando no combate e prevenção de diversas doenças. Esse micronutriente é consumido por meio da alimentação, uma vez que as plantas absorvem o selênio disponível nos solos e o incorporam em substituição ao enxofre nos aminoácidos, constituindo a selenometionina e a selenocisteína. Entretanto, sua disponibilidade na natureza é muito baixa e sua ausência na alimentação pode acarretar em sérios problemas de saúde.

Em animais, o selênio melhora o desempenho reprodutivo, qualidade da carne, leite e ovos, além de reduzir a taxa de mortalidade. A deficiência desse elemento na alimentação animal pode causar doenças como distrofia muscular, necrose no fígado, problemas de crescimento, infertilidade e, em muitos casos, a morte dos animais.

O selênio pode ser consumido em sua forma inorgânica ou orgânica, sendo que a primeira não é bem absorvida pelo organismo e possui maior risco de toxicidade. Uma das formas de suprir sua escassez na dieta animal é por meio da ingestão de biomassa de levedura enriquecida, pois, além de serem fontes de proteínas e lipídeos, esses microrganismos também são capazes de acumular elevadas concentrações de selênio. Os micronutrientes consumidos a partir de leveduras apresentam uma melhor absorção pelo organismo e um menor risco de toxicidade. Em comparação com as plantas, os microrganismos acumulam elevadas concentrações de minerais em pouco tempo, pois apresentam um processo de cultivo rápido e demandam menor espaço.

Para a produção de biomassa de levedura enriquecida, adiciona-se uma solução contendo selênio inorgânico ao meio, que deve apresentar as condições propícias para o crescimento microbiano, minimizando a formação de subprodutos da fermentação. Além disso, quanto maior a disponibilidade de selênio no meio maior é sua incorporação pelo microrganismo, porém elevadas concentrações causam inibição do crescimento celular devido ao estresse osmótico e às condições de toxicidade inerentes a esse elemento, sendo necessário conciliar a incorporação de selênio com a produção de biomassa celular.

No processo fermentativo, a glicose anidra é a principal fonte de carbono utilizada, embora as leveduras sejam capazes de crescer em outros tipos de substratos, como hidrolisados provenientes de biomassa vegetal. Os resíduos vegetais podem ser divididos em lignocelulósicos e amiláceos, de acordo com suas características. Os materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, são de origem agrícola e florestal, constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A biomassa amilácea é composta principalmente por amido, porém os farelos amiláceos também podem apresentar resíduos lignocelulósicos em suas composições, pois são provenientes do processo de beneficiamento dos grãos para consumo humano.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e está entre os maiores produtores de arroz, milho e soja. Os farelos amiláceos, além de serem ricos em açúcares, também apresentam elevados teores de proteínas e lipídeos. Para a utilização da biomassa vegetal é necessário que ocorra um pré-tratamento para a liberação dos açúcares para serem utilizados pelos microrganismos. A utilização de hidrolisados de resíduos vegetais de origem amilácea e lignocelulósica como fontes de carbono e de nitrogênio em processos fermentativos utiliza como matéria-prima produtos de baixo valor agregado. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo a produção de biomassa de levedura enriquecida com selênio para alimentação animal a partir de resíduos vegetais como fontes de carbono e de nitrogênio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O selênio

O selênio (do grego “selene”, que significa lua) foi descoberto pelo químico sueco Berzelius em 1817 e considerado inicialmente como um elemento tóxico e carcinogênico, sendo posteriormente comprovada sua importância na saúde (SALES, 2007).

Esse elemento é um não metal pertencente à família 6A e distribui-se de forma heterogênea por toda a superfície terrestre, sendo encontrado principalmente nas formas de seleneto (NO_x+2), selenito (NO_x+4), selenato (NO_x+6) e selênio elementar (OLIVEIRA, 2006). A toxicidade e a biodisponibilidade dos compostos de selênio na natureza estão relacionadas à sua forma química. O selenato e o selenito são solúveis em água e tóxicos em concentrações relativamente baixas, o selênio elementar é insolúvel em água e não apresenta toxicidade, enquanto o seleneto é altamente tóxico e reativo (SEIXAS; KEHRIG, 2007).

Os animais obtêm selênio por meio de alimentos e água, sendo a alimentação sua principal fonte (CAMPOS, 2012). Frequentemente entra na cadeia alimentar por meio das plantas, que o assimilam pela mesma via do enxofre, incorporando-o aos aminoácidos metionina e cisteína (OLIVEIRA, 2006). A selenometionina corresponde a mais de 50% do total de selênio contido nas plantas, incorporada às proteínas em substituição à metionina (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003).

A disponibilidade de selênio nos vegetais varia de acordo com sua concentração no solo, que depende de cada região (FERREIRA et al., 2002; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003). Com exceção dos solos muito pobres em selênio e dos seleníferos, os solos apresentam, em média, concentrações de 1,0 a 1,5 $\mu\text{g/g}$ de selênio, sendo que locais com excesso ou deficiência desse elemento podem levar à intoxicação e problemas de saúde em humanos e animais (FERREIRA et al., 2002; OLIVEIRA, 2006). Existem regiões onde a concentração de selênio é tão baixa que as síndromes relacionadas à sua deficiência são endêmicas, como é o caso do nordeste da China, norte da Coreia do Norte, regiões áridas da Austrália, centro-sul da China, Nepal, Tibete e África Central, principalmente a República Democrática do Congo, pois a alimentação é baseada em produtos locais,

com pouca ou nenhuma importação de comida de outras áreas (TAPIERO et al., 2003).

2.1.1 Importância na saúde

O selênio é um micronutriente essencial para a saúde animal e humana, com importante ação antioxidante, atuando como agente antimutagênico e, conseqüentemente, na prevenção e combate de alguns tipos de câncer e também na modulação do sistema imune inato e adquirido (ALMONDES et al., 2010; BERNO; POETA; MARÓSTICA JÚNIOR, 2010). Uma vez que as células tumorais apresentam maior estresse oxidativo devido a distúrbios metabólicos, a elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), associada à baixa atividade antioxidante, tem sido relacionada a diversos tipos de câncer e, neste contexto, o selênio pode atuar na prevenção de transformações malignas de células normais (ALMONDES et al., 2010). Esse micronutriente também está envolvido em outros processos biológicos, como a biossíntese de ubiquinona e ATP, além de participar no crescimento, fertilidade e redução do risco de doenças crônicas como arteriosclerose, câncer, artrite, enfisema pulmonar, cirrose hepática, entre outras (VIARO; VIARO; FLECK, 2001).

A principal atividade biológica do selênio é associada à sua presença nas enzimas glutathiona-peroxidase e tioredoxina-redutase, que protegem o DNA e outros componentes celulares contra os danos causados pelos EROs (ALMONDES et al., 2010; VIARO; VIARO; FLECK, 2001). Entretanto, o selênio pode ser tóxico se consumido em elevadas concentrações, causando intoxicação aguda em humanos a partir de doses acima de 1 g, respectivamente, sendo os principais sintomas: gosto metálico na boca, exalação de odor de alho pelas vias respiratórias, distúrbios neurológicos e gastrointestinais, falência renal, enfarto do miocárdio e síndrome do estresse respiratório (OLIVEIRA, 2006). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é recomendado o consumo de 34 µg diários de selênio para adultos (ANVISA, 2004).

Em animais, a intoxicação por selênio afeta principalmente os sistemas cardiovascular e gastrointestinal, também causando perda de pelo e danos ao sistema imunológico e reprodutivo (NICODEMO, 2002). Entretanto, a concentração de selênio considerada tóxica varia de acordo com a espécie e idade. Doses entre

10 e 15 mg de selênio não ocasionam a morte de ovelhas adultas, mas são letais para os filhotes, com maior susceptibilidade no caso de animais estressados (ROBSON; PLANT, 2007). Em bovinos na fase de gestação/lactação a recomendação para ingestão diária de selênio pode variar de 5 a 7 mg/dia, tendo sido relatado como tóxicas doses entre 5 e 50 mg/kg (LIMA; DOMINGUES, 2007).

Consumido por meio da alimentação, este micronutriente está presente em plantas e carnes em concentrações variadas. A Tabela 1 demonstra o teor de selênio em alguns alimentos consumidos no Brasil.

Tabela 1 – Concentrações de selênio em alguns alimentos consumidos no Brasil.

Alimentos	Selênio (µg/100g)
Frutas	Banana prata
	Goiaba vermelha
	Laranja
	Maçã
	Mamão papaia
	Manga
	Maracujá
Leguminosas	Feijão preto
	Feijão vermelho
	Feijão cariquinho
Cereais	Arroz integral
	Farinha de mandioca
	Farinha de trigo
	Fubá
Hortaliças e tubérculos	Tomate
	Beterraba
	Cenoura
	Inhame
Laticínios	Iogurte
	Queijo minas frescal
	Requeijão cremoso
Carnes	Filé mignon
	Lombo
	Camarão
Castanhas	Castanha-do-pará
	Castanhas de caju

Fonte: Adaptado de (FERREIRA et al., 2002); (RODRIGUES et al., 2012).

A castanha-do-pará, alimento considerado rico em selênio, possui uma enorme variação no teor desse micronutriente, sendo observado que 5,24% das

castanhas podem conter mais de 400 µg de selênio por unidade, limite considerado superior ao tolerável para ingestão máxima, e 25,53% apresentam menos de 55 µg por castanha (FREITAS et al., 2008). Essa variação ocorre, em parte, devido às diferentes concentrações de selênio nos solos, uma vez que sua distribuição é na superfície terrestre é heterogênea.

2.1.2 Patologias associadas à deficiência de selênio

A deficiência de selênio causa um decréscimo na atividade da enzima glutathiona-peroxidase, o que resulta em sérios danos oxidativos ao organismo, principalmente ao coração e sistema muscular esquelético (ISHIHARA et al., 1999). Entre os problemas associados à deficiência de selênio estão disfunção no sistema imunológico, cardiomiopatias, fraqueza, dores musculares e alterações nas unhas (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003). Em um estudo realizado por Ishihara e colaboradores (1999) foi constatado que pacientes que sofrem de anorexia nervosa e recebem nutrição parenteral, que não supre as necessidades diárias de selênio, devem ser monitorados em relação à deficiência desse micronutriente, uma vez que pode ocorrer morte súbita devido à arritmia ou insuficiência cardíaca e a deficiência de selênio contribui para o quadro de cardiomiopatia.

Nos locais onde as concentrações de selênio no solo são muito baixas ocorrem doenças endêmicas na população, como as síndromes de Keshan e Kashin-Beck. A doença de Keshan é uma cardiomiopatia endêmica que afeta crianças e mulheres em idade fértil, causando insuficiência cardíaca congestiva, com morte súbita ou ataque de trombose cardíaca difusa (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003). Outra patologia é a doença de Kashin-Beck, uma osteoartropatia endêmica, caracterizada pela deformação dos ossos e das juntas, que aparece durante a infância e puberdade e continua até o final da fase de crescimento (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003; OLIVEIRA, 2006).

Uma das principais alterações ocasionadas pela deficiência de selênio na dieta animal está relacionada à capacidade reprodutiva, afetando machos e fêmeas, e, no caso das aves, influenciando negativamente na postura e eclosão dos ovos (EMBRAPA, 2014). Animais com deficiência de selênio também podem desenvolver patologias como a doença do músculo branco, que é uma distrofia muscular nutricional que afeta caprinos e bovinos, a hepatose dietética, caracterizada por uma

necrose no fígado de suínos, e a diástese exudativa, que causa um edema no tecido corpóreo de aves, sendo que em todos os casos ocorre morte precoce (OLIVEIRA, 2006). Em ovelhas, também pode ocorrer infertilidade, diarreia e problemas no crescimento e produção de lã (ROBSON; PLANT, 2007).

Na suplementação alimentar, o selênio pode ser ingerido na forma inorgânica, como selenito de sódio (Na_2SeO_3), ou orgânica, uma vez que é incorporado a proteínas pela mesma via do enxofre, por meio de leveduras enriquecidas (selenoleveduras) (FONSECA et al., 2013; MARTINS et al., 2013). Entretanto, a forma inorgânica apresenta maior toxicidade e não é bem absorvida pelo organismo, sendo preferencial a forma orgânica, uma vez que este mineral está presente nos aminoácidos selenometionina e a selenocisteína, que são rapidamente assimilados. Além disso, concentrações elevadas de selenito podem causar danos à molécula de DNA, sendo assim, as selenoleveduras são utilizadas como forma de suprir sua escassez na dieta (CAMPOS, 2012).

2.2 Leveduras na nutrição

As leveduras são utilizadas na indústria de alimentos na fabricação de pães, bebidas e como suplementos nutricionais, que incluem os microrganismos íntegros ou fragmentados. Podem ser cultivadas especificamente para fins alimentícios, sendo vulgarmente conhecidas como “tórula”, no caso da levedura *Candida utilis* (HOSKEN, 2013); ou serem provenientes de processos fermentativos, como a produção de etanol em destilarias, recebendo a denominação de leveduras de recuperação. São uma fonte rica em proteínas, lipídeos e vitaminas do complexo B, além de possuírem propriedades prebióticas, associadas à composição química da parede celular, e probióticas, no caso de microrganismos vivos (GRAHAM; SANTOS; WADT, 2009; HOSKEN, 2013).

Por apresentar elevado teor de aminoácidos, as leveduras são excelentes fontes de lisina, um aminoácido essencial (BNDES; CGEE, 2008). Além de serem uma fonte de proteínas, estes microrganismos são capazes de incorporar microelementos em biomoléculas, acumulando-os em concentrações elevadas, sendo frequentemente utilizados como veículos de suplementos minerais (ROEPCKE; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2011). Em comparação com o histórico de utilização das leveduras pela humanidade, o enriquecimento dessa biomassa

com minerais é uma tendência atual, conciliando as propriedades inerentes a esses microrganismos com os efeitos do mineral acumulado. Desta forma, o uso de biomassa de levedura auxilia na manutenção da saúde, pois fornece os componentes essenciais para o correto funcionamento do metabolismo humano e animal.

Embora exista uma enorme variedade de espécies, apenas aquelas que são classificadas como “GRAS” (*Generally Recognized as Safe*), consideradas inócuas à saúde, podem ser utilizadas na alimentação. Entre elas, destaca-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, presente na maioria dos produtos comerciais derivados de leveduras. Linhagens de *S. cerevisiae* são a base de formulações probióticas de uso animal, pois possuem as características necessárias para manter e restaurar a microbiota intestinal. Além disso, existem também outras espécies que são utilizadas na alimentação e leveduras que são aplicadas na produção de enzimas de interesse alimentício, de lipídeos e no enriquecimento de alimentos com carotenoides, minerais, entre outros.

A espécie *Candida utilis*, também conhecida como tórula, é utilizada como componente na ração animal e na produção de proteína unicelular (*single cell protein*) (ALBUQUERQUE, 2003; ØVERLAND et al., 2013). Linhagens de *S. boulardii* são usadas como probiótico de uso humano, enquanto *Kluyveromyces marxianus* é utilizada na produção de enzimas alimentícias e ração animal (GRACIANO et al., 2008). Também há leveduras produtoras de carotenoides, pigmentos naturais utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica (VALDUGA et al., 2009), e de lipídeos, como é o caso da espécie *Rhodotorula glutinis* (ČERTÍK et al., 2013; HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014).

As leveduras, por serem fontes ricas de vitaminas do complexo B, em especial a vitamina B12 – presente principalmente em carnes e responsável pela manutenção das células vermelhas do sangue – tornam-se uma opção nutricional aos veganos, além de contribuir para a regulação das atividades intestinais e bom funcionamento do organismo.

Dentro do contexto industrial brasileiro, considerando-se especialmente o processo de produção de etanol, cerca de metade da biomassa microbiana resultante é destinada ao mercado interno e o restante é exportado, pois é um suplemento proteico de baixo custo, utilizado principalmente como componente da ração animal, e também pela indústria alimentícia (BNDES; CGEE, 2008).

2.2.1 Leveduras enriquecidas com minerais

Para uma alimentação balanceada é necessário ingerir diariamente proteínas, vitaminas e minerais, que, muitas vezes, não são consumidos nas concentrações mínimas exigidas. Atualmente, o uso de suplementos nutricionais é uma prática comum, seja na forma inorgânica ou orgânica, sendo consumidos para reforçar a dieta tanto de seres humanos quanto de outros animais, de acordo com as necessidades de cada espécie.

Os minerais presentes nos suplementos alimentares podem ser encontrados na forma inorgânica ou ligados a algum substrato orgânico, como vitaminas e aminoácidos (ROEPCKE; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2011). Entretanto, alguns elementos, como o selênio e o cromo, apresentam maior biodisponibilidade e são menos tóxicos quando incorporados a um substrato orgânico (DEMIRCI; POMETTO, 2000).

As leveduras são capazes de assimilar metais e metalóides, que podem ser adsorvidos na parede celular ou incorporados a aminoácidos e vitaminas. Em comparação com as plantas, esses microrganismos acumulam elevadas concentrações de minerais em pouco tempo, pois apresentam um processo de cultivo rápido, sendo necessária uma menor área para a produção de biomassa. Além disso, o elevado custo com cereais e suplementos proteicos, utilizados na alimentação animal, tem despertado o interesse por fontes alternativas, como a biomassa microbiana (ROEPCKE; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2011). Os micronutrientes consumidos a partir de leveduras enriquecidas apresentam como vantagem a melhor absorção pelo organismo e baixo risco de toxicidade, pois apresentam uma maior biodisponibilidade, além de estar associados aos benefícios do consumo de uma fonte naturalmente rica em proteínas.

As leveduras podem ser enriquecidas com cromo, selênio, cobre, ferro, zinco (Tabela 2) entre outros, a partir da adição de seus respectivos sais ao meio de cultivo (DEMIRCI; POMETTO, 2000; DE LEÓN et al., 2002; ARAKAKI, A. H. et al., 2011; GAENSLY et al., 2011; ROEPCKE; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2011).

Para a produção de biomassa enriquecida é necessário que as condições do meio sejam favoráveis ao crescimento microbiano, uma vez que a presença de elevadas concentrações de sais causa estresse osmótico, além dos efeitos tóxicos inerentes a algumas dessas substâncias, ocasionando a morte celular.

Tabela 2 – Alguns exemplos de meios e condições de cultivo utilizados na produção de biomassa de levedura enriquecida com minerais.

Microrganismos	Mineral de enriquecimento	Meio de cultivo	Condições de cultivo	Principais resultados	Referência
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cromo	Melaço de cana, Na ₂ CrO ₄ , ureia, CaCl ₂ .2H ₂ O, NH ₄ H ₂ PO ₄ , MgCl.6H ₂ O, KH ₂ PO ₄	Fermentação contínua e batelada alimentada com 1 vvm de aeração, 30 °C e 500 rpm.	A adição de cromato de sódio favorece a produção de cromo orgânico, obtendo-se elevadas concentrações de biomassa enriquecida na fermentação contínua e em batelada alimentada.	DEMIRCI; POMETTO, 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Selênio	Glicose / glicerol, peptona e extrato de levedura	30 °C, 250 rpm durante 24 h.	Maior acúmulo de selenometionina quando o selênio é adicionado na fase de crescimento, porém maior efeito inibitório e menor produção de biomassa	DE LEÓN et al., 2002
<i>Candida pelliculosa</i>	Cobre	Melaço de cana, CuSO ₄ .5H ₂ O, extrato de levedura, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , (NH ₄) ₂ HPO ₄	30 °C, 120 rpm, durante 120 horas.	Produção de até 57,54 g/L de biomassa e 100% de bioacumulação de cobre no processo de batelada alimentada.	ARAKAKI et al., 2011
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ferro	Dextrose, peptona, extrato de levedura e extrato de malte	30 °C, 100 rpm, 2 vvm durante 12 h.	Obtenção de biomassa de levedura com 8 mg/g de ferro e produção de pão com conteúdo seis vezes maior de ferro que o tradicional.	GAENSLY et al., 2011
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Candida guilliermondii</i>	Zinco	Melaço de cana, ZnSO ₄ , extrato de levedura, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ e Fe ₂ (SO ₄) ₃ .	30 °C, 120 rpm durante 120 h.	<i>P. guilliermondii</i> apresentou maior acúmulo de zinco (6820 mg/Kg e 96.030 mg/Kg, de acordo com as condições de cultivo).	ROEPCKE; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2011

Fonte: Autoria própria

Entre os fatores preponderantes para o cultivo estão a disponibilidade de oxigênio e a composição do meio. O oxigênio é fundamental para o crescimento celular, pois direciona o fluxo metabólico para a produção de biomassa, com menor formação de subprodutos, como etanol e glicerol.

Para a produção de biomassa enriquecida é adicionada ao meio uma solução contendo o mineral para o enriquecimento, porém se a concentração desta solução for muito elevada pode ocorrer estresse, diminuição da taxa de crescimento e declínio da viabilidade celular. A interação de aminoácidos ou ureia com minerais influencia na produção de subprodutos e a adição de suplementos minerais, como magnésio, ferro, manganês, cálcio, zinco, entre outros, pode duplicar o rendimento em etanol (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009).

Uma vez que o objetivo é a produção de biomassa microbiana é desejável que a formação de subprodutos seja minimizada. Por outro lado, altas concentrações do mineral de enriquecimento possibilitam uma maior absorção, porém, com menor formação de biomassa. Por isso, é necessário que o meio de cultivo apresente condições propícias para o microrganismo incorporar o composto de interesse e produzir uma elevada quantidade de biomassa, uma vez que leveduras são empregadas na alimentação devido ao seu alto teor proteico.

2.2.2 Leveduras enriquecidas com selênio

As leveduras são eficientes fontes de selênio orgânico, pois incorporam este elemento a partir da adição de seus sais ao meio (DE LEÓN et al., 2002; OLIVEIRA, 2006; YIN; FAN; GU 2010). Uma solução contendo selênio, geralmente na forma de selenato ou selenito de sódio, pode ser adicionada antes do cultivo ou no início da fase de crescimento (DE LEÓN et al., 2002).

O selênio intracelular é, preferencialmente, incorporado aos aminoácidos, em substituição ao enxofre, mas também pode permanecer no interior das células sem estar diretamente ligado aos aminoácidos. Quando ocorre a biotransformação do selênio no interior celular, o selenato ou selenito são reduzidos a selênio amorfo, de cor vermelha, que acumula nas células e no meio de cultivo, de modo que a cultura adquire uma coloração avermelhada (KONETZKA, 1977).

Para a incorporação de selênio é utilizada a via do enxofre, levando à formação dos aminoácidos selenometionina e selenocisteína, principalmente, e, em

menor proporção, tiamina (KONETZKA, 1977). Entretanto, entre os compostos de selênio presentes nos organismos vivos também podem ser encontrados a selenocistina, se-adenosil-selenometionina, selenocistatationa, e 5-metilaminometil-1,2-selenouridina, trimetilselenônio e selenito e selenato dissociados (PUC-RIO, 2005).

A metionina é um aminoácido essencial, ou seja, não é sintetizada pelos animais, enquanto a cisteína é sintetizada nos animais a partir da metionina, sendo considerada, portanto, não-essencial. Esses aminoácidos possuem como precursor a molécula de oxaloacetato, um dos compostos intermediários do ciclo de Krebs, o qual é convertido em aspartato por meio de uma reação de transaminação, caracterizada pela transferência de um grupo amina do oxaloacetato para o aspartato. A partir do aspartato podem-se originar os aminoácidos metionina, asparagina, lisina e treonina (CAMPBELL, 2000).

Para a incorporação de selênio aos aminoácidos, inicialmente, ocorre a transferência do selênio para o interior da célula, formando o composto seleneto de hidrogênio (H_2Se), que, a partir de uma reação com a O-acetil-homoserina, produz a selenohomocisteína (MAPELLI et al. 2011) (Figura 1). A partir da selenohomocisteína pode-se formar selenocisteína, que necessita da presença de serina na reação, e selenometionina, a qual também atua como precursor da selenohomocisteína, porém sem o requerimento de O-acetil-homoserina e com formação adicional de adenosina (THOMAS; SURDIN-KERJAN, 1997; MAPELLI et al. 2011).

Devido ao seu elevado teor proteico, as leveduras conseguem incorporar mais selênio, em substituição ao enxofre presente nas proteínas, em comparação com as plantas (DE LEÓN et al., 2002). Entretanto, para que ocorra uma eficiente incorporação pelo microrganismo, é necessário que o meio de cultivo apresente condições favoráveis ao crescimento celular.

Figura 1 – Metabolismo simplificado da via de incorporação de selênio em leveduras. SeO_4^{2-} , selenato; SeO_3^{2-} , selenito; H_2Se , seleneto de hidrogênio.

Fonte: Adaptado de (THOMAS; SURDIN-KERJAN, 1997); (MAPELLI et al., 2011).

Os trabalhos presentes na literatura com leveduras enriquecidas com selênio empregam meios quimicamente definidos ou elaborados a partir de biomassa açucarada. Grande parte dos estudos utiliza glicose, suplementada com fontes de nitrogênio complexas, como peptona e extrato de levedura (BRONZETTI et al., 2001; DE LÉON et al., 2002; KAUR; BANSAL, 2006; RAJASHREE; MUTHUKUMAR, 2013), embora fontes inorgânicas de nitrogênio e outros nutrientes, tais como sais e vitaminas, também sejam utilizados (MAPELLI et al., 2011; YANG et al., 2013). A incorporação de selênio é usualmente dada por miligrama de selênio incorporado por quilo de biomassa celular seca produzida (mg/kg ou ppm), sendo que o conteúdo pode ser de selênio intracelular total ou selênio orgânico, ligado diretamente aos aminoácidos.

Os meios de cultivo que apresentam matéria-prima açucarada em sua composição podem utilizar melaço de cana-de-açúcar (ESMAEILI et al., 2012; KITAMURA, 2013), suco de uva (PÉREZ-CORONA et al., 2011), extrato de malte (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2012; YIN et al., 2009) e sucos de arroz integral

germinado e de broto de soja (YIN et al., 2009; YIN; FAN; GU, 2010), sendo estes últimos comuns na cultura oriental.

Entre as biomassas açucaradas empregadas no processo fermentativo, o melaço de cana-de-açúcar está entre as mais utilizadas. Esmaielli e colaboradores (2012) conseguiram incorporação de até 288 ppm de selênio e produção de 53,69 g/L de biomassa de *S. cerevisiae* cultivada em reator com sistema de batelada alimentada. Também em sistema de batelada alimentada, Kitamura (2013) obteve incorporação de 3053 ppm de selênio, com produção de 12,73 g/L de biomassa celular de *S. boulardii*. Com açúcar mascavo, Oliveira (2006) obteve 360 ppm de selênio orgânico com a levedura *S. cerevisiae*, a partir de diferentes condições de cultivo.

Durante o processo fermentativo, o momento da adição de selênio ao meio também pode influenciar na sua incorporação pelas células. Em trabalho realizado por De León e colaboradores (2002) foi estudada a adição de diferentes concentrações de selênio, na forma de selenito de sódio, no enriquecimento de *S. cerevisiae* com quatro métodos distintos: no início do processo fermentativo, onde há adaptação da linhagem ao meio e não ocorre o crescimento celular; no início da fase de crescimento; com inóculo cultivado em meio contendo selênio; e com glicerol em substituição à glicose. Os autores observaram que a adição de selenito de sódio durante a fase de crescimento resultou em um maior teor de selenometionina, porém sua adição nas fases onde não há crescimento celular causa menor efeito inibitório e, conseqüentemente, possibilita uma maior produção de biomassa celular. Tanto o glicerol quanto o inóculo acrescido de selênio inibiram o crescimento da linhagem estudada.

Atualmente, existem produtos no mercado destinados à alimentação animal e humana, elaborados com leveduras enriquecidas, nos quais os microrganismos podem estar presentes nas formulações de rações ou serem vendidos como suplemento nutricional em cápsulas ou comprimidos (Tabela 3). Contudo, não há trabalhos que utilizem resíduos agroindustriais como fontes de carbono e de nitrogênio na produção de leveduras com alto conteúdo de selênio.

Tabela 3 – Exemplos de produtos à base de leveduras enriquecidas com selênio de uso animal e humano.

Produto	País	Tipo	Uso	Concentração
Yaxibao2000	China	Ração	Animal	2000 mg/Kg
Selyeast 3000	França	Ração	Animal	3000 mg/Kg
Sel-Plex	Brasil	Ração	Animal	2000 mg/Kg
ZORIEN® SeY	Estados Unidos	Ração	Animal	2000 mg/Kg
High Selenium Yeast	Estados Unidos	Suplemento	Humano	100 µg/g
Levedura de cerveza Selenio	Espanha	Suplemento	Humano	20 µg/g
Levure de Bière et Sélénium	França	Suplemento	Humano	40 µg/g
SelenoExcell	Canada	Suplemento	Humano	200 µg/g
Yeast Bound Selenium	Estados Unidos	Suplemento	Humano	200 µg/g
Food State Selenium	Reino Unido	Suplemento	Humano	200 µg/g

Fonte: Autoria própria.

Na alimentação animal, o consumo de leveduras enriquecidas com selênio apresenta melhores resultados do que o consumo de uma fonte inorgânica de selênio. Martins et al. (2013) compararam a suplementação de selênio a partir de levedura enriquecida e de selenito de sódio na dieta de cachacos e concluíram que o selênio orgânico melhorou o desempenho reprodutivo dos animais, reduzindo o custo médio da dieta e sendo viável também do ponto de vista econômico. Em estudo com tilápias, foi verificado que a incorporação de produto à base de selenoleveduras aumenta o ganho de peso, acúmulo de vitamina E na carne e nível de glutathione peroxidase no sangue, quando comparado com uma fonte inorgânica (FONSECA et al., 2013). Experimentos com codornas indicaram que a suplementação com selênio orgânico auxilia na manutenção da qualidade dos ovos durante o processo de armazenamento, possivelmente devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes, sendo que a adição de 0,2 mg/kg (ppm) de selênio orgânico apresentou resultado equivalente a 0,4 mg/kg (ppm) de selênio inorgânico (GRAVENA et al., 2011).

Devido ao caráter inovador do processo de produção de leveduras enriquecidas com selênio desenvolvido pela aluna na presente tese de doutorado, os resultados desse estudo possibilitaram o depósito do pedido de patente pela Universidade de São Paulo, intitulado “Processo de Produção de Leveduras Enriquecidas com Selênio a partir de Resíduos Vegetais”, nº BR 10 2016 024902 3, junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) em 25 de outubro de 2016.

2.3 Biomassa vegetal

2.3.1 Materiais lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica compreende os resíduos agrícolas e florestais, tais como bagaços, palhas, cascas e cavacos de madeiras, e sua composição varia de acordo com cada espécie. Representa a mais abundante fonte de materiais renováveis do solo, porém apenas uma pequena fração é utilizada como subproduto pelos setores agrícola e florestal, sendo o restante considerado resíduo (SÁNCHEZ, 2009). São compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, embora também estejam presentes, em proporções menores, extrativos e minerais (GÍRIO et al., 2010). Estes componentes estão firmemente associados uns aos outros, constituindo a parede celular vegetal, responsável pelo suporte estrutural, impermeabilidade e resistência a ataques microbianos e estresse oxidativo (SÁNCHEZ, 2009).

Correspondendo à fração polissacarídica, a celulose e a hemicelulose abrangem cerca de dois terços da composição química dos materiais lignocelulósicos. Estes compostos são utilizados como substratos para a produção biotecnológica de diversos produtos por meio da fermentação dos açúcares presentes em sua estrutura por microrganismos específicos. O etanol de segunda geração, produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar, é um dos produtos mais estudados (GÍRIO et al., 2010), mas diversos outros compostos também podem ser obtidos, tais como enzimas, poliois, ácidos orgânicos, *single cell protein*, carotenoides, entre outros (PANDEY et al., 2000; ALBUQUERQUE, 2003; MARTÍNEZ et al., 2006; SARROUH; VALDUGA et al., 2009).

A celulose (Figura 2) é um homopolissacarídeo linear composto por moléculas de glicose unidas em ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) (CAMPBELL, 2000). Corresponde de 30 a 60% da composição da biomassa lignocelulósica (BALAT, 2011) e é o principal constituinte da parede celular vegetal. As ligações glicosídicas formam o dissacarídeo celobiose e o grau de polimerização das cadeias de celulose pode variar de 100 a até mais de 15000 unidades de glicose (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2 – Representação esquemática de parte da estrutura da celulose.

Fonte: Adaptado de (FENGEL; WEGENER, 1989).

As moléculas de celulose formam cadeias lineares, o que possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e acarreta na agregação das cadeias celulósicas em fibrilas elementares, as quais possuem alto grau de cristalinidade (CANILHA et al., 2009; CARVALHO et al., 2009; SÁNCHEZ, 2009). A associação destas fibrilas elementares acarreta na formação de microfibrilas (RAMOS, 2003). A celulose é constituída por regiões cristalinas e amorfas, de acordo com o número de ligações de hidrogênio (BALAT, 2011). A região cristalina possui elevado número de ligações de hidrogênio, tornando-a ordenada, enquanto a região amorfa é menos ordenada, devido à menor quantidade deste tipo de ligação (FENGEL; WEGENER, 1989).

A hemicelulose (Figura 3) é um heteropolissacarídeo complexo, composto por açúcares do tipo pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e/ou ácidos urônicos (FENGEL; WEGENER, 1989; GÍRIO et al., 2010). Outros açúcares também podem estar presentes, assim como seus grupos hidroxilas podem estar parcialmente substituídos por grupos acetilas (GÍRIO et al., 2010). É o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza e representa de 15 a 35% da biomassa lignocelulósica (FENGEL; WEGENER, 1989; SAHA, 2003; GÍRIO et al., 2010).

A composição varia de acordo com o tecido e a espécie vegetal (RAMOS, 2003) e difere largamente entre angiospermas e gimnospermas. Os tipos de hemicelulose mais relevantes são as xilanas e as glucomananas, sendo o primeiro grupo mais abundante e constituindo de 20 a 30% da parede celular das angiospermas (SAHA, 2003; GÍRIO et al., 2010). As xilanas estão presentes em grandes quantidades como subprodutos florestais e agroindustriais, como no caso das indústrias de papel (GÍRIO et al., 2010). O grau de polimerização da xilana em angiospermas está entre 150 e 200 unidades, enquanto que em gimnospermas varia entre 70 e 130 unidades (SAHA, 2003). As arabinoglucuronoxilanas (arabino-4-O-metilglucuronoxilanas) são os principais componentes dos resíduos agroindustriais e consistem de uma cadeia principal de β -(1,4)-Dxilopirranose (GÍRIO et al., 2010).

Figura 3 – Representação esquemática de parte da estrutura da hemicelulose do tipo arabinoglucuronoxilana (arabino-4-O-metilglucuronoxilana).

Fonte: Adaptado de (FENGEL; WEGENER, 1989).

De natureza aromática e complexa, a lignina é um dos principais componentes da biomassa vegetal, presente entre 15 e 36%, de acordo com a espécie vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989; SAHA, 2003). Esta macromolécula envolve as microfibrilas de celulose, conferindo rigidez e proteção contra a degradação química e biológica (CANILHA et al., 2009). As unidades básicas que compõem a lignina são classificadas de acordo com o grau de metoxilação do anel aromático, sendo elas: *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila (Figura 4). A *p*-hidroxifenila não é metoxilada e deriva do álcool *p*-cumarílico, a guaiacila apresenta uma metoxila e é derivada do álcool coniferílico, enquanto que a siringila possui

duas metoxilas e é proveniente do álcool sinapílico (FENGEL; WEGENER, 1989). O elevado número de combinações possíveis entre as unidades de fenilpropanoides garante a complexidade da molécula de lignina.

Figura 4 – Precursores básicos e suas respectivas unidades aromáticas na lignina.

Fonte: Adaptado de (BUDZIAK; MAIA; MANGRICH, 2004).

2.3.1.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é composta principalmente por água e sacarose, seguida por fibras, cinzas e outros compostos, que constituem o bagaço e a palha, mas a quantidade destes componentes pode variar de acordo com a espécie e condições de cultivo.

Espera-se uma produção de cerca de 647,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar para a safra 2017/2018, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, (CONAB, 2017a). Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada gera-se aproximadamente 135 kg de bagaço (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009), sendo parte utilizada na queima para a geração de energia para a própria indústria e o restante considerado resíduo. No ano de 2014 foram implantadas usinas de etanol de segunda geração no Brasil, localizadas em São Miguel dos Campos (AL) e Piracicaba (SP), que utilizam a palha e o bagaço de cana-de-açúcar para a

produção de etanol, visando um aumento de até 50% na produção sem ampliar a área de cultivo (GRANBIO, 2017; RAÍZEN, 2017).

O bagaço de cana-de-açúcar, como qualquer material lignocelulósico, é composto basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, embora também estejam presentes, em concentrações menores, cinzas e extrativos. Na Tabela 4 pode-se observar a composição química do bagaço de diferentes variedades de cana-de-açúcar.

Tabela 4 – Composição química parcial (%) de amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Componente	%
Celulose	37,8 – 39,8
Hemicelulose	26,2 – 29,3
Lignina	23,9 – 27,6
Cinzas	0,4 – 0,5
Extrativos	9,0 – 11,0

Fonte: Adaptado de (PHILIPPINI, 2012).

De modo geral, a celulose, a hemicelulose e a lignina, principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar, apresentam valores medianos, mesmo em diferentes variedades de cana-de-açúcar. Há uma leve variação no teor de cinzas, possivelmente relacionado a fatores como a técnica de colheita, transporte e armazenamento da biomassa (PHILIPPINI, 2012). O bagaço de cana-de-açúcar ainda apresenta em sua composição a sacarose, resultante do processo de moagem na indústria, além de outros componentes que podem ser extraídos por meio de solventes, como ceras e graxas (FENGEL; WEGENER, 1989; PHILIPPINI, 2012). Na alimentação animal, apresenta baixo valor nutritivo e é utilizado após a remoção da lignina, pois esse composto interfere na absorção das fibras (SOUZA; SANTOS, 2002).

2.3.2 Materiais amiláceos

A crescente demanda por uma melhor utilização dos recursos alimentares no mundo tem levado ao aumento da procura por fontes energéticas não competitivas com os alimentos de uso humano (ZAMBOM et al., 2001). Os resíduos amiláceos

apresentam, além do amido, proteínas, minerais e são ricos em fibras, que não são utilizadas na alimentação humana (ZAMBOM et al., 2001; ROSTAGNO, 2011).

Durante o processamento industrial da matéria-prima amilácea são encontrados resíduos de cascas (JIAMYANGYUEN; SRIJESDARUK; HARPER, 2005; BELLAVER; SNIZEK, 2012), que são compostas, como qualquer material lignocelulósico, basicamente por celulose, hemicelulose e lignina.

O amido é o segundo composto mais abundante nas plantas, após a celulose, e a principal reserva energética dos vegetais, presente principalmente em sementes, rizomas, bulbos e raízes do tipo tubérculo (COSTA, 2010). Constitui-se de uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, frequentemente na proporção de 20:80, embora algumas plantas possam apresentar aproximadamente 2% de amilose, no caso de amidos cerosos, ou teores de até 80% desse polissacarídeo (CAVALLINI, 2009; TROMBINI, 2010).

A amilose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de glicose, unidas em ligações glicosídicas do tipo α (1 $\rightarrow$ 4), com grau de polimerização que varia de 200 a 10000 unidades (COSTA, 2010). As ligações glicosídicas conferem à amilose uma estrutura helicoidal, a qual pode se complexar com moléculas de iodo, conferindo uma cor azul intensa, e também com alguns compostos orgânicos, como álcoois alifáticos de cadeia não ramificada (COSTA, 2010; URBANO, 2012). A amilopectina é uma molécula ramificada, formada por cadeias de α (1 $\rightarrow$ 4) glicose conectadas por ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 6) a cada 20-25 unidades de glicose, aproximadamente (URBANO, 2012).

O amido é armazenado nas plantas na forma de grânulos, que são estruturas cristalinas formadas pelo arranjo espacial das macromoléculas de amilose e amilopectina (CAVALLINI, 2009). O tamanho e o formato dos grânulos variam de acordo com a espécie vegetal. São insolúveis em água fria, porém quando aquecidos ocorre o inchamento irreversível e ruptura dos grânulos, produzindo uma pasta viscosa, em um processo denominado gelatinização (MORIKAWA; NISHIHARI, 2000). As proporções entre amilose e amilopectina influenciam no poder de gelatinização e na viscosidade do amido (COSTA, 2010).

Algumas variedades de amido de milho, cevada e arroz, denominados “waxy”, com alto teor de amilopectina, recebem a denominação de amidos cerosos, enquanto algumas variedades de milho podem atingir até 80% de amilose (CAVALLINI, 2009). Por apresentarem diferentes teores de amilose e amilopectina,

estes amidos apresentam propriedades funcionais distintas; o amido de milho normal se caracteriza pela formação de gel, que é bastante utilizado no preparo de alimentos que requerem viscosidade, mas, quando há necessidade de congelamento o amido de milho ceroso apresenta maior estabilidade, por possuir teores muito baixos de amilose (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

2.3.2.1 Farelo de arroz

O arroz (*Oriza sativa*) é classificado de acordo com sua forma de processamento após a colheita, como branco, integral ou parboilizado (SILVA; CALIARI; SOARES JÚNIOR, 2011). A previsão para a safra 2017/2018 de arroz é 11,95 milhões de toneladas, sendo a maior parte da produção concentrada na região sul do país, devido às condições climáticas favoráveis (CONAB, 2017b). No estado de São Paulo, o Vale do Paraíba é a região com a maior produção de arroz, (PLANETA ARROZ, 2016).

Antes de seguir para o consumo humano, o arroz passa por um processo de beneficiamento, que consiste em retirar a casca do grão para torna-lo apto ao consumo. Nessa etapa, obtém-se o farelo de arroz, um subproduto do processo do polimento dos grãos, composto por proteínas, fibras, vitaminas e minerais, muito utilizado na alimentação animal (JIAMYANGYUEN; SRIJESDARUK; HARPER, 2005). Esse produto não apresenta valor comercial significativo, sendo geralmente utilizado para a extração de óleo, como ingrediente na ração animal e como fertilizante orgânico (SILVA; CALIARI; SOARES JÚNIOR, 2011). Também pode ser aplicado no preparo de farinhas múltiplas ou multimisturas, utilizadas no combate à desnutrição, elaboradas com diversos tipos de farelos, sementes, cascas de ovos, entre outros compostos.

A composição química do farelo de arroz depende da variedade, das condições de cultivo e do processo de beneficiamento aplicado (SILVA; CALIARI; SOARES JÚNIOR, 2011). Em média, apresenta de 15 a 20% de lipídeos, 30 a 52% de carboidratos, 7 a 11% de fibras, 10 a 15% de proteínas e 6 a 10% de cinzas (TSIGIE et al., 2012). O óleo extraído pode ser utilizado em processos como a produção de biodiesel, além de ter importância na saúde, pois atua na prevenção de doenças cardíacas e redução dos níveis de colesterol (ZULLAIKAH et al., 2005). O extrato do farelo de arroz, obtido após um processo de pré-tratamento, pode ser

utilizado como uma fonte de nitrogênio de baixo custo em processos fermentativos (MARTINIANO et al. 2014).

2.3.2.2 Farelo de milho

O milho (*Zea sp.*) é um dos principais ingredientes utilizados na alimentação animal, principalmente de aves e suínos (ZAMBOM et al., 2001). De modo geral, cerca de 70% da produção do milho é destinada ao uso animal e apenas 15% ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES, 2006).

As previsões para a primeira e segunda safra de milho de 2017 são de, respectivamente, 29,86 e 61,6 milhões de toneladas, cultivadas em mais de 11 milhões de hectares, sendo a primeira safra (CONAB, 2017b). Durante o beneficiamento do grão são retirados o amido e o óleo, posteriormente utilizados na indústria alimentícia (PAES, 2006). O farelo resultante do processo é aplicado na alimentação de animais devido ao seu baixo custo e composição nutricional.

O grão de milho é composto, em média, por 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibras e 4% de óleo, além de outros compostos, como vitaminas e minerais (PAES, 2006). O farelo de milho possui de, modo geral, de 15 a 22% de amido e 7% de fibras, além de proteínas e minerais (ROSTAGNO, 2011).

2.3.2.3 Farelo de soja

A soja (*Glycine max*) possui grande capacidade de adaptação a diversos locais e climas, facilidade de cultivo e alta produção (BELLAYER; SNIZEK, 2012). Tem sido muito empregada na alimentação animal, principalmente de suínos e aves, embora não seja utilizada *in natura* na formulação de dietas comerciais devido à presença de substâncias tóxicas aos animais (ZAMBOM et al., 2001; BELLAYER; SNIZEK, 2012).

A estimativa para a safra atual é de uma produção de 110,16 milhões de toneladas, com uma projeção de crescimento de 15,4% (CONAB, 2017b). Durante o processamento, os grãos são quebrados com casca, a qual é separada posteriormente, e seguem para a expansão e extração do óleo (BELLAYER; SNIZEK, 2012). Para cada tonelada de soja processada até 3% são transformados em resíduo de casca que, após ser moída e tostada, é incorporada ao farelo

resultante do processo de beneficiamento, dependendo do subproduto a ser comercializado (ZAMBOM et al., 2001; BELLAVER; SNIZEK, 2012).

Em média, o farelo de soja é composto por 3 a 12% de amido, 45 a 48% de proteínas e 5% de fibras, além de lipídeos e minerais, embora essa composição varie de acordo com as características de cada subproduto (ROSTAGNO, 2011).

2.3.3 Métodos de pré-tratamento da biomassa vegetal

Os materiais lignocelulósicos e amiláceos são compostos principalmente por açúcares, mas para que possam ser utilizados em processos fermentativos é necessário que passem por uma etapa de pré-tratamento, que visa romper a estrutura vegetal. Uma vez que cada material lignocelulósico possui propriedades físico-químicas características, torna-se necessário utilizar métodos de pré-tratamento específicos para cada tipo de biomassa lignocelulósica (ALVIRA et al., 2010).

Existem vários tipos de pré-tratamento, que podem ser utilizados individualmente ou combinados, sendo de origem biológica, física ou química. Entre os métodos mais utilizados para lignocelulósicos, destacam-se: hidrólise ácida, hidrólise alcalina, água quente (*hot-water*), moagem, fungos filamentosos, explosão a vapor, expansão da fibra com amônia (*ammonia fiber expansion* – AFEX); extração alcalina, entre outros (BALAT; BALAT; OZ, 2008; CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; SÁNCHEZ, 2009; ALVIRA et al., 2010; GÍRIO et al., 2010; SHUPE; LIU, 2012).

No caso de materiais amiláceos, geralmente são utilizados os processos ácido, enzimático ou a combinação de ambos, sendo o enzimático realizado com amilases, enzimas que degradam o amido, liberando os açúcares presentes em sua estrutura (COSTA, 2010; URBANO, 2012). A hidrólise enzimática fornece conversões de amido em glicose com até 90% de eficiência, embora apresente um custo muito elevado (COSTA, 2010). Além dos ácidos e enzimas, também pode ser utilizada apenas água, dependendo do objetivo, como a liberação de proteínas (MARTINIANO et al., 2014).

O principal objetivo do pré-tratamento ácido é solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas celulolíticas (ALVIRA et al., 2010). Frequentemente a hidrólise ácida ocorre de dois

modos: com ácido concentrado em baixas temperaturas ou com ácido diluído em altas temperaturas (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). A utilização de ácido concentrado é considerada menos atrativa, pois acarreta na formação de compostos inibidores para um posterior processo fermentativo, além do risco de corrosão dos equipamentos empregados durante o processo (ALVIRA et al., 2010).

A hidrólise com ácido diluído tem sido eficaz principalmente por solubilizar a hemicelulose e facilitar o acesso de enzimas degradantes à celulose (GÍRIO et al., 2010). Durante essa etapa também são geradas menores quantidades de produtos de degradação, como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos, que normalmente atuam como inibidores do processo fermentativo. A principal vantagem do pré-tratamento com ácido diluído é a solubilização e recuperação dos açúcares hemicelulósicos, porém não é tão eficaz para a celulose, pois as altas temperaturas requeridas para a hidrólise desse polissacarídeo podem levar a uma maior formação de produtos de degradação (GÍRIO et al., 2010).

2.3.4 Biomassa vegetal como substrato em processos fermentativos

A biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar, é rica em açúcares de cinco e seis carbonos, derivados da hemicelulose e celulose, respectivamente. Dentre os açúcares presentes na hemicelulose, a xilose é o mais abundante em monocotiledôneas (GÍRIO et al., 2010). Por outro lado, os materiais amiláceos são ricos em amido, embora o valor das enzimas utilizadas na sua hidrólise eleve os custos do processo (COSTA, 2010).

A partir de uma hidrólise ácida, libera-se parte dos açúcares contidos na estrutura vegetal na forma de hidrolisado hemicelulósico, porém também são liberados compostos de degradação, considerados inibidores do processo fermentativo. Alguns compostos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos podem apresentar efeito inibitório dependente do pH, como no caso do ácido acético, que quando está em sua forma não-dissociada penetra pela membrana citoplasmática e se dissocia dentro da célula, onde o pH é mais elevado, e, desta forma, ocorre o decréscimo do pH intracelular (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). O ácido acético é normalmente encontrado em hidrolisados, sendo proveniente dos grupos acetil presentes nas xilanas (DU PREEZ, 1994). Além disso, para um eficiente consumo dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico é necessário, além da escolha

de uma linhagem microbiana adequada, que as condições de cultivo contribuam para um melhor desempenho fermentativo.

Devido à complexa estrutura vegetal, os hidrolisados lignocelulósicos e amiláceos não possuem apenas monômeros em sua composição, por isso para que os demais açúcares sejam consumidos eficientemente é necessário que os microrganismos apresentem enzimas capazes de degradá-los em frações menores. A conversão da celulose e da hemicelulose a açúcares fermentescíveis pela ação das enzimas celulasas e hemicelulasas, respectivamente, é de fundamental importância para a utilização eficaz dos materiais lignocelulósicos (CADETE, 2009). Além disso, outro grupo de enzimas, denominadas oxidases, também são empregadas na hidrólise da celulose para aumentar a eficiência do processo enzimático (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012). De mesmo modo, as amilases, enzimas que degradam o amido, são essenciais no uso dos resíduos amiláceos.

Para uma hidrólise enzimática eficiente é necessário que ocorra uma desconstrução da parede celular para facilitar o acesso das celulasas. Entre essas enzimas, destacam-se as monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO) e as expansinas, que permitem um afrouxamento das microfibrilas e atuam em sinergia com as celulasas (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012; TEIXEIRA; SIQUEIRA; BATISTA, 2016).

As celulasas são classificadas em três grupos: endoglucanases (também conhecidas como endo- β -1,4-glucanases), exoglucanases (ou celobiohidrolases) e β -glicosidases, que atuam em sinergismo na degradação da biomassa vegetal (VILLAS-BÔAS, 2001; PHILIPPINI, 2012). As endoglucanases hidrolisam aleatoriamente as ligações β (1 $\rightarrow$ 4) da celulose, o que resulta na redução de seu grau de polimerização e produção de oligossacarídeos de diversos tamanhos, enquanto as celobiohidrolases degradam a estrutura cristalina da celulose, removendo unidades de celobiose e glicose a partir dos finais redutores e não redutores. Ao mesmo tempo, as β -glicosidases, também chamadas de celobiasas, hidrolisam a celobiose e outros oligossacarídeos de cadeia curta a monômeros de glicose (CADETE, 2009; PHILIPPINI, 2012). As endoglucanases também são capazes de hidrolisar substitutos solúveis da celulose, como a carboximetilcelulose (CMC), ao clivar aleatoriamente a cadeia interna de carboidratos, o que permite sua

utilização como fonte de carbono na seleção de microrganismos produtores de celulasas (CADETE, 2009).

Algumas leveduras são produtoras de celulasas, como é o caso de *C. utilis* (VILLAS-BÔAS, 2001) e *R. glutinis*, produtora de endoglucanases (OIKAWA; TSUKAGAWA; SODA, 1998) e α -L-arabinofuranosidase (MARTÍNEZ et al., 2006), enzima pertencente ao grupo das β -glicosidasas. Também há estudos sobre a produção de amilases pelo gênero *Rhodotorulla*, embora varie de acordo com a linhagem (SCHNEIDER et al., 2013; SINGH et al., 2014).

2.3.5 Fatores que interferem no crescimento microbiano

Os microrganismos podem utilizar a fonte de carbono disponível no meio para a produção de biomassa celular ou, quando as condições de cultivo não são favoráveis a seu crescimento, para a produção de metabólitos que possibilitem a sobrevivência da célula. Essa produção pode ocorrer em condições aeróbias ou anaeróbias, de acordo com cada espécie e condições de cultivo.

A disponibilidade de oxigênio está entre os fatores ambientais mais importantes para as leveduras, pois são microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, podem utilizar o oxigênio quando este está disponível no meio, mas na sua ausência são capazes de fermentar os açúcares (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). A disponibilidade de oxigênio no meio e sua taxa de absorção pelas células são os parâmetros que determinam se o fluxo de carbono será direcionado para a formação de biomassa, de etanol ou de outros compostos, tais como xilitol, arabitól, ribitol e glicerol (DU PREEZ, 1994).

Durante a utilização de açúcares pelos microrganismos, o piruvato proveniente da via glicolítica pode ser direcionado para o metabolismo fermentativo ou respiratório, de acordo com a disponibilidade de oxigênio no meio. No metabolismo respiratório, as duas moléculas de piruvato são convertidas em duas moléculas de acetil-CoA, as quais seguem para o Ciclo de Krebs, onde ocorre uma série de reações de oxidação e redução, transferindo a energia potencial, na forma de elétrons, para coenzimas transportadoras, que os transferem para uma cadeia de transporte de elétrons, ocorrendo a liberação de energia para conduzir a síntese de ATP, necessário para a produção de biomassa celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

No consumo de xilose, um açúcar de cinco carbonos, em condições limitantes de oxigênio, leveduras com atividade da enzima xilose-redutase dependente de ambos NADH e NADPH podem regenerar o NAD^+ consumido, produzindo etanol como principal produto (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998). A fermentação não requer oxigênio em suas reações bioquímicas, independentemente do açúcar utilizado como fonte de carbono, e também é capaz de produzir ATP em quantidades reduzidas, pois grande parte da energia original do composto metabolizado permanece nas ligações químicas dos produtos finais orgânicos, como o etanol (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Entretanto, durante um cultivo microbiano a fermentação pode ocorrer na presença de oxigênio, pois os microrganismos são capazes de realizar o processo fermentativo em concomitância com outros processos, como crescimento celular. Com isso, uma intensiva aeração do meio pode ocasionar a competição pelo NADH glicolítico entre a respiração mitocondrial e a fermentação alcoólica, levando a uma maior produção de biomassa e redução do rendimento em etanol (KUYPER et al., 2004).

A maioria dos microrganismos utilizados em processos fermentativos é mesófila, ou seja, apresentam faixa ótima de temperatura em valores medianos, em torno de 30° C. A temperatura afeta a estrutura dos componentes celulares, como proteínas e lipídeos, influenciando no crescimento, requerimentos nutricionais, composição e permeabilidade da membrana celular (OLIVEIRA, 2006). O pH ótimo, no caso de leveduras e fungos filamentosos, está situado em níveis mais baixos, frequentemente entre 5,0 e 6,0.

A composição do meio é outro fator preponderante para a obtenção do produto de interesse. Os componentes básicos necessários ao crescimento dos microrganismos são carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, porém metais, fatores de crescimento e vitaminas também podem ser requeridos (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). O carbono é essencial para a síntese de todos os compostos orgânicos celulares, o nitrogênio e o enxofre são requeridos, principalmente, para a síntese de proteínas e o fósforo, juntamente com o nitrogênio, para a síntese de DNA, RNA e ATP (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). O nitrogênio é essencial para a fermentação, sua adição ao meio permite uma fermentação mais rápida, enquanto que a sua deficiência pode levar à lentidão ou até mesmo impedir que o processo fermentativo ocorra (BACH et al., 2011).

Frequentemente são adicionados aos meios nutrientes complexos, como peptona e extrato de levedura no meio de fermentação, uma vez que estes são ricos em vitaminas e nitrogênio (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Entretanto, existem outras fontes orgânicas ricas em nitrogênio e de baixo custo, como aquelas provenientes de resíduos amiláceos.

A relação C:N é um dos fatores que direciona o fluxo metabólico, meios contendo uma proporção muito alta favorecem o acúmulo de compostos como o etanol, lipídeos, polissacarídeos extracelulares, entre outros (OLIVEIRA, 2006). Em estudo realizado por Manikandan e Viruthagiri (2010), a fermentação de amido de mandioca por *S. cerevisiae*, utilizando relação C:N igual a 35,2, possibilitou formação de até 8,9 g/L de etanol após 48 horas.

Os resíduos vegetais podem ser utilizados tanto como fonte de carbono quanto de nitrogênio em processos fermentativos, possibilitando a redução dos custos e agregando valor à biomassa.

3 OBJETIVOS

- **Geral**

- ✓ Produzir biomassa de levedura enriquecida com selênio com possibilidade de uso na alimentação animal a partir de resíduos agroindustriais.

- **Específicos**

- ✓ Selecionar linhagens de leveduras capazes de crescer na presença de elevadas concentrações de selênio;

- ✓ Estudar o efeito do selênio no metabolismo de diferentes linhagens de leveduras;

- ✓ Verificar quais linhagens de leveduras apresentam maior absorção de selênio, com maior produção de biomassa;

- ✓ Estudar a utilização de biomassa amilácea como fonte de carbono e nitrogênio em processos fermentativos para a produção de biomassa de levedura enriquecida com selênio;

- ✓ Estudar a utilização de hidrolisados provenientes do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono no cultivo submerso na produção de leveduras enriquecidas com selênio;

- ✓ Analisar o efeito da adição de diferentes concentrações de nutrientes e de selênio na produção de biomassa de levedura enriquecida com elevados teores de selênio.

- ✓ Avaliar o potencial de enzimas celulolíticas e amilolíticas de diferentes linhagens de leveduras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

As linhagens de microrganismos utilizadas foram gentilmente doadas pelos Prof. Dr. Carlos A. Rosa (UFMG), Prof. Dr. Fernando Pagnocca (UNESP – Campus Rio Claro) e pela Fundação André Tosello e armazenadas junto à coleção do Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBIOS), da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL-USP). Utilizou-se inicialmente sete linhagens de leveduras de espécies GRAS: *Candida utilis* SSS32, *Kluyveromyces marxianus* SSS24, *Rhodotorulla glutinis* CCT-2186, *Saccharomyces cerevisiae* SSS25, *S. cerevisiae* SSS40, *S. cerevisiae* SSS41, *S. cerevisiae* LALVIN ICV D47, sendo essa última uma levedura comercial, utilizada na produção de vinhos.

As culturas foram crescidas em ágar YMA (3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de malte, 10 g/L de glicose, 20 g/L de ágar) a 30 °C e, após o aparecimento das colônias, mantidas sob refrigeração a 4 °C.

4.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido a partir de culturas estoque recém-repicadas em ágar YMA. Uma alçada das colônias foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio de cultura YPG (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 30 g/L de glicose) e o cultivo foi realizado em incubadora de bancada com agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C durante 24 horas.

Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, lavadas com água destilada estéril, centrifugadas novamente e suspensas em água destilada. A partir desta suspensão celular, calculou-se o volume necessário para inocular o meio de fermentação a partir da contagem do número de células por mL em câmara Agasse Lafont-R.

4.3 Avaliação do crescimento de leveduras na presença de selênio

Inicialmente, foi realizado um estudo para verificar se as leveduras apresentavam tolerância à presença de selênio em concentrações superiores às

encontradas na natureza. Para isso, realizou-se cultivo em placas de Petri, contendo meio YMA com e sem a presença de 15 mg/L de selênio (ágar YMA-Se), na forma de Na_2SeO_3 , cuja concentração foi baseada de acordo com Oliveira (2006), com pH $6,48 \pm 0,03$, sem ajustes. Os cultivos foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas a 30 °C por um período de 48 a 120 horas, de acordo com o aparecimento das colônias.

4.4 Determinação da incorporação de selênio e seu efeito no metabolismo das leveduras

Após a observação do crescimento das leveduras em placas de Petri contendo selênio, realizou-se cultivo submerso para verificar sua incorporação pelas linhagens estudadas. Também foram estudados possíveis efeitos causados no crescimento e metabolismo microbiano, em relação ao conteúdo proteico e lipídico intracelulares e produção de subprodutos, como o etanol.

Inicialmente foi utilizado um meio quimicamente definido (4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L de KH_2PO_4 , 4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 30 g/L de glicose) para o cultivo das leveduras, contendo 15 mg/L de selênio, na forma de Na_2SeO_3 (OLIVEIRA, 2006). Posteriormente, utilizou-se o meio YPG com e sem a adição de 15 mg/L de selênio (YPG-Se e YPG, respectivamente), contendo uma suspensão celular de aproximadamente 1×10^6 cel/mL.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer preenchidos com 40% de seu volume, mantidos em agitador orbital de bancada a 200 rpm, 30 °C, 48 horas. Após esse período, alíquotas do meio foram armazenadas e as leveduras foram recuperadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, lavadas duas vezes com água destilada e armazenadas sob refrigeração para análises posteriores. Com exceção da quantificação de selênio, empregada apenas nos cultivos com o meio YPG-Se, as demais análises, referentes à concentração de biomassa celular, consumo de açúcares, produção de subprodutos e concentração de proteínas e lipídeos intracelulares, foram realizadas em todos os ensaios.

4.5 Teste de adsorção de selênio na parede celular de leveduras

Para verificar se o selênio é apenas adsorvido à parede celular das leveduras foi realizada uma fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 inativa em meio YPG-Se. Optou-se pela utilização dessa linhagem devido ao seu crescimento celular eficiente e por pertencer a uma das espécies mais utilizadas na alimentação animal. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer, contendo 40% de seu volume de meio, mantidos sob agitação de 200 rpm, 30 °C por 48 horas. O inóculo, equivalente a 1×10^6 cél/mL, foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos antes de ser adicionado aos meios de cultivo, para inativar as leveduras. Após esse processo, as leveduras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, lavadas com água destilada e armazenadas sob refrigeração para posterior análise de selênio.

4.6 Análise morfológica das leveduras por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise das amostras por MEV foi realizada no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAR) da EEL-USP. Para isso, optou-se pela linhagem *Saccharomyces cerevisiae* SSS41, obtida após cultivo submerso em meio YPG-Se. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70% e 90%) por 20 minutos, cada, e secas à temperatura ambiente, conforme metodologia adaptada de Accorsini (2010). Posteriormente, foram submetidas à metalização em banho de ouro, realizada em equipamento Coating System BAL-TEC MED 020, e mantidas em dessecador, modelo Edwards PD3, até o momento da análise, quando foram fotomicrografadas em aparelho LEO (modelo 440), sob potência de 20 kV.

4.7 Seleção das leveduras produtoras de exoenzimas

Realizou-se avaliação de uma possível produção de exoenzimas devido a capacidade que algumas leveduras possuem de produzir celulasas e amilases, que podem ser utilizadas na degradação da estrutura da biomassa vegetal de origem lignocelulósica e amilácea, com possibilidade de uso em fermentações sólidas com bagaço de cana-de-açúcar e farelos amiláceos como suporte e fontes de carbono.

Para isso, utilizou-se as leveduras *Candida utilis* SSS32, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula glutinis* CCT-2186, conhecidas pela capacidade de produção de exoenzimas, e *Saccharomyces cerevisiae* SSS41, sendo esta última como controle negativo, crescidas em ágar YMA por 24 horas (TSUKAGAWA; SODA, 1998; VILLAS-BÔAS, 2001; OIKAWA; MARTÍNEZ et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2013; SINGH et al., 2014). Após esse período, uma alçada das colônias foi transferida para um tubo e diluída em água estéril. Duas alíquotas de 20 µL de cada solução celular foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura para a detecção das enzimas e incubadas a 25 °C durante sete dias, conforme metodologia adaptada de Cadete (2009). Os testes foram realizados com duas placas de Petri para cada linhagem, contendo duas alíquotas de solução cada.

4.7.1 Carboximetilcelulase

A análise da produção da enzima carboximetilcelulase foi realizada em meio sólido composto por 1% de carboximetilcelulose, 0,05% de Celobiose, 0,67% de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) e 2% de ágar (CADETE, 2009). Decorrido o período de incubação, as placas foram reveladas pela adição de 5 mL de solução do corante vermelho congo 0,03% e, após 15 minutos, lavadas com solução salina 0,9%. A hidrólise da carboximetilcelulose é evidenciada pela presença de um halo de coloração clara ao redor da colônia.

4.7.2 Amilases

A determinação da produção de amilases foi realizada em meio sólido composto por 1% de amido de milho P. A., 0,67% de YNB e 2% de ágar. As placas foram reveladas pela adição de 5 mL de lugol 0,5% e, após 15 minutos, lavadas com solução salina 0,9%, conforme metodologia adaptada de Oliveira et al. (2014). O amido reage com o iodo e adquire uma coloração azul escuro, o que possibilita a observação de possíveis halos transparentes, no caso de crescimento microbiano.

4.8 Obtenção e tratamento de hidrolisados amiláceos

Os farelos de arroz, milho e soja, após terem seu teor de umidade determinado, foram submetidos à hidrólise ácida com 1% H_2SO_4 (m/v) e relação sólido:líquido com 20% de teor de sólidos, com base em massa seca. A hidrólise foi realizada em frascos Erlenmeyer a 121 °C por 15 minutos.

No caso do farelo de arroz, também teve seu teor de lipídeos reduzido pela extração com etanol 96%, na proporção de 1:5 (s/l), sendo a mistura agitada e mantida em repouso por 15 minutos. Após esse processo, o material foi filtrado e o farelo foi seco a 60 °C, sendo posteriormente hidrolisado, conforme as condições citadas.

4.8.1 Tratamento e caracterização dos hidrolisados amiláceos

Após a hidrólise ácida, cada hidrolisado foi filtrado para separação das partículas sólidas e teve seu pH ajustado para 5,5 com uma solução de NaOH 6,5 N, sendo, em seguida, centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Alíquotas foram armazenadas antes e após o ajuste de pH dos hidrolisados para análises posteriores dos açúcares, pH, proteínas e compostos fenólicos (itens 4.14.5 a 4.14.11) .

4.8.2 Delineamento composto central rotacional 2^2 para hidrólise do farelo de soja para uso em processos fermentativos

Após ensaios preliminares, optou-se pela utilização do hidrolisado de farelo de soja como fonte de carbono e nitrogênio em processos fermentativos devido, principalmente, ao elevado teor de proteínas observado e ao fato de a cultura de soja estar em crescente expansão no país. Para isso, realizou-se um estudo das condições de hidrólise dessa biomassa, com o objetivo de se obter uma maior liberação de açúcares redutores. Para isso, foi feito um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , com três repetições no ponto central, com as variáveis concentração de H_2SO_4 e porcentagem de farelo (Tabela 5).

Tabela 5 - Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 para hidrólise do farelo de soja, com níveis reais e codificados.

Ensaio	Níveis codificados		Níveis reais	
	(X ₁)	(X ₂)	Ácido (%)	Farelo de soja (%)
1	(-1)	(-1)	0,15	7,20
2	(+1)	(-1)	0,85	7,20
3	(-1)	(+1)	0,15	17,80
4	(+1)	(+1)	0,85	17,80
5	(-α)	(0)	0,00	12,50
6	(+α)	(0)	1,00	12,50
7	(0)	(-α)	0,50	5,00
8	(0)	(+α)	0,50	20,00
9	(0)	(0)	0,50	12,50
10	(0)	(0)	0,50	12,50
11	(0)	(0)	0,50	12,50

Fonte: Autoria própria.

4.9 Obtenção e tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em reator de aço inox (AISI 316), com volume operacional de 350 litros, aquecido por resistência elétrica em meio de camisa de óleo. Para isso, utilizou-se 100 mg de H₂SO₄ por grama de bagaço, temperatura de 121 °C e tempo de reação de 10 minutos. Após a hidrólise, o hidrolisado foi concentrado em concentrador a vácuo (SPENCER SCIENTIFIC) de 28 L, a 70 °C, com redução de 20% de seu volume inicial, e armazenado sob refrigeração a 4 °C. Para a utilização em processos fermentativos, o hidrolisado teve seu teor de açúcares determinado, sendo posteriormente diluído até a concentração desejada, teve seu pH ajustado para 5,5 com NaOH 6,5 N e foi centrifugado para remoção de partículas sólidas e precipitados.

4.10 Avaliação dos hidrolisados amiláceos e lignocelulósico na produção de leveduras enriquecidas com selênio

Para avaliar a utilização dos hidrolisados de resíduos vegetais no cultivo de leveduras enriquecidas com selênio foram empregadas as leveduras *Kluyveromyces marxianus* SSS24 e *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 em processos fermentativos individuais. Os hidrolisados avaliados foram de farelo de arroz *in natura* e desengordurado (HFA e HFAD, respectivamente), farelo de milho (HFM), farelo de soja (HFS) e o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBC). Todos os hidrolisados, com pH inicial igual a 5,5, foram suplementados com 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g/L de CaCl_2 e 15,0 mg/L de selênio na forma de Na_2SeO_3 e inoculados com cerca de 1×10^8 cél/mL.

A avaliação dos hidrolisados consistiu de duas etapas: a primeira, na qual foram utilizados apenas o farelo de arroz *in natura* e o bagaço de cana-de-açúcar; e a segunda, onde as outras biomassas foram empregadas. Na primeira etapa, o processo fermentativo foi conduzido com ambas as leveduras e, na fase seguinte, apenas *S. cerevisiae* SSS41, por essa espécie ser amplamente utilizada na alimentação animal e ter apresentado desempenho satisfatório.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, em agitador orbital de bancada a 30 °C, 200 rpm por 72 horas, com retirada periódica de amostras. Ao final do processo, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, lavadas com água destilada e congeladas para análises posteriores da incorporação de selênio e teor de proteínas e lipídeos intracelulares.

4.10.1 Planejamento fatorial completo 2^5 para análise de crescimento celular e incorporação de selênio

Avaliou-se o efeito da suplementação do hidrolisado de farelo de soja (HFS) com os nutrientes KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 e Na_2SeO_3 no crescimento celular e incorporação de selênio pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 (Tabela 6).

Tabela 6 – Planejamento fatorial completo 2⁵, com três repetições no ponto central, para produção de biomassa celular e incorporação de selênio por *Saccharomyces cerevisiae* SSS41.

Ensaio	(X ₁)	(X ₂)	(X ₃)	(X ₄)	(X ₅)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	NH ₄ NO ₃ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ (g/L)	Na ₂ SeO ₃ (mg/L)
1	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	0	0	0	0	10
2	(+1)	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	10	0	0	0	10
3	(-1)	(+1)	(-1)	(-1)	(-1)	0	4	0	0	10
4	(+1)	(+1)	(-1)	(-1)	(-1)	10	4	0	0	10
5	(-1)	(-1)	(+1)	(-1)	(-1)	0	0	0,4	0	10
6	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)	(-1)	10	0	0,4	0	10
7	(-1)	(+1)	(+1)	(-1)	(-1)	0	4	0,4	0	10
8	(+1)	(+1)	(+1)	(-1)	(-1)	10	4	0,4	0	10
9	(-1)	(-1)	(-1)	(+1)	(-1)	0	0	0	0,2	10
10	(+1)	(-1)	(-1)	(+1)	(-1)	10	0	0	0,2	10
11	(-1)	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)	0	4	0	0,2	10
12	(+1)	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)	10	4	0	0,2	10
13	(-1)	(-1)	(+1)	(+1)	(-1)	0	0	0,4	0,2	10
14	(+1)	(-1)	(+1)	(+1)	(-1)	10	0	0,4	0,2	10
15	(-1)	(+1)	(+1)	(+1)	(-1)	0	4	0,4	0,2	10
16	(+1)	(+1)	(+1)	(+1)	(-1)	10	4	0,4	0,2	10
17	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	(+1)	0	0	0	0	20
18	(+1)	(-1)	(-1)	(-1)	(+1)	10	0	0	0	20
19	(-1)	(+1)	(-1)	(-1)	(+1)	0	4	0	0	20
20	(+1)	(+1)	(-1)	(-1)	(+1)	10	4	0	0	20
21	(-1)	(-1)	(+1)	(-1)	(+1)	0	0	0,4	0	20
22	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)	(+1)	10	0	0,4	0	20
23	(-1)	(+1)	(+1)	(-1)	(+1)	0	4	0,4	0	20
24	(+1)	(+1)	(+1)	(-1)	(+1)	10	4	0,4	0	20
25	(-1)	(-1)	(-1)	(+1)	(+1)	0	0	0	0,2	20
26	(+1)	(-1)	(-1)	(+1)	(+1)	10	0	0	0,2	20
27	(-1)	(+1)	(-1)	(+1)	(+1)	0	4	0	0,2	20
28	(+1)	(+1)	(-1)	(+1)	(+1)	10	4	0	0,2	20
29	(-1)	(-1)	(+1)	(+1)	(+1)	0	0	0,4	0,2	20
30	(+1)	(-1)	(+1)	(+1)	(+1)	10	0	0,4	0,2	20
31	(-1)	(+1)	(+1)	(+1)	(+1)	0	4	0,4	0,2	20
32	(+1)	(+1)	(+1)	(+1)	(+1)	10	4	0,4	0,2	20
33	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	5	2	0,2	0,1	15
34	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	5	2	0,2	0,1	15
35	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	5	2	0,2	0,1	15

Fonte: Autoria própria.

O planejamento fatorial completo 2^5 , com três repetições no ponto central, foi realizado com frascos Erlenmeyer de 250 mL, preenchidos com 100 mL de meio e inoculados com 1×10^8 cél/mL, acondicionados em agitador orbital de bancada a 30 °C, 200 rpm durante 72 horas, com retirada periódica de amostras. Ao final do processo, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, lavadas com água destilada e congeladas para análises posteriores.

4.11 Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* comercial em meio sintético simulando os açúcares de hidrolisados de resíduos vegetais

Os hidrolisados amiláceos são meios complexos e de composições variáveis, podendo apresentar açúcares de cinco carbonos em sua fração polissacarídica, além de hexoses e oligossacarídeos. Com isso, foi formulado um meio sintético com base nos açúcares identificados nos hidrolisados amiláceos, sendo suplementado com fontes orgânicas de nitrogênio. O meio foi composto por 3,0 g/L de celobiose, 5,5 g/L de glicose, 5,5 g/L de xilose, 3,0 g/L de arabinose, 7,0 g/L de peptona e 3,0 g/L de extrato de levedura. Além disso, também foi realizado, separadamente, cultivo em meio YPX (50 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura), valores de açúcares mais próximos ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* LALVIN ICV D47, uma linhagem comercial, inoculada na concentração de 1×10^8 cél/mL, em Erlenmeyers preenchidos com 40% de volume de meio, mantidos em agitador orbital de bancada a 30 °C, 200 rpm por 72 horas.

4.12 Produção de biomassa de levedura enriquecida com selênio a partir de melaço de cana-de-açúcar

O melaço de cana-de-açúcar comercial (Marca Caseiro & Natural) foi analisado em relação ao teor de açúcares totais e redutores e, em seguida, diluído para aproximadamente 40 g/L, para uso no processo fermentativo. Para o cultivo foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* SSS41, inoculada com 1×10^8 cél/mL no melaço de cana-de-açúcar suplementado com 5,0 g/L de KH_2PO_4 , 2,0 g/L de NH_4NO_3 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L de CaCl_2 e 15 mg/L de Na_2SeO_3 . O pH inicial foi ajustado para 5,5 com NaOH 6,5 N.

Os ensaios foram realizados em agitador orbital de bancada a 30 °C, 200 rpm por 72 horas, com retirada periódica de amostras. Ao final do cultivo, as células foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, lavadas com água destilada e congeladas para posterior análise de selênio.

4.13 Fermentação em estado sólido para a produção de levedura enriquecida com selênio

A fermentação em estado sólido foi realizada com a levedura *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 2 g de substrato sólido seco, cada, atuando como suporte e também como possível fonte de carbono.

Foram utilizados dois tipos de substratos, um deles acrescido de 10 mg/L de Na_2SeO_3 e o segundo sem a adição de selênio. A composição do meio sólido consistiu de uma mistura entre polpa celulósica e farelo de arroz hidrolisado na proporção de 50% (m/m) (Tabela 7). Em ambos os meios, a cada 2 g de substrato foi adicionado 7 mL de uma solução umedecedora composta por hidrolisado de farelo de arroz, inoculada com 1×10^8 cél/mL. Os substratos e os frascos utilizados foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos. O conteúdo foi homogeneizado assepticamente e mantido em estufa bacteriológica, com umidade de 80%, a 30 °C durante sete dias.

Tabela 7 – Composição do meio para fermentação em estado sólido.

Meio	Substrato / Suporte	Solução umedecedora
1	50% Polpa celulósica + 50% de farelo de arroz hidrolisado	Hidrolisado de farelo de arroz + 10 mg/L de Na_2SeO_3
2		Hidrolisado de farelo de arroz

Fonte: Autoria própria.

A polpa celulósica foi obtida a partir de uma hidrólise alcalina do bagaço de cana-de-açúcar, com base em massa seca, nas condições de 1% de NaOH, relação sólido:líquido igual a 1:10 a 121 °C por 10 minutos (PHILIPPINI, 2012). O farelo de arroz foi submetido à hidrólise ácida com 1% de H_2SO_4 (m/v) e relação sólido:líquido igual a 1:5, com base em massa seca. Após a hidrólise do farelo, o conteúdo foi filtrado e a parte sólida, contendo a biomassa hidrolisada, foi lavada com água

destilada até pH neutro e seca em estufa à 60 °C; o hidrolisado obtido teve seu pH ajustado para 5,5 com NaOH 6,5 N e foi centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos.

Decorrido o tempo de cultivo, as células foram recuperadas pela adição de 30 mL de água destilada em cada frasco, mantidos sob agitação de 200 rpm a 30 °C durante 1 hora. Após esse processo, a mistura foi filtrada em gaze e o sobrenadante, contendo as células, recuperado. As células foram contadas em câmara Agasse Lafont-R e o restante armazenado para análise de selênio.

4.13.1 Teste de máxima capacidade absorviva

Para a realização da fermentação sólida, foi inicialmente estudada a máxima capacidade absorviva dos substratos utilizados. Para isso, foram adicionadas diferentes quantidades de líquido (5, 7 e 10 mL) e a mistura foi deixada em repouso por aproximadamente 30 minutos. Após esse período, foi verificado se havia água no sistema e a porcentagem de umidade foi determinada.

4.14 Métodos analíticos

4.14.1 Determinação do teor de umidade da biomassa vegetal

A determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar e dos farelos de arroz, milho e soja foi realizada em balança analítica *Bel Engineering*, modelo MB 200, por exposição do material à radiação infravermelha sob temperatura de 105 °C por 30 minutos (PHILIPPINI, 2012).

4.14.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular das leveduras foi determinada por dois métodos, o primeiro, utilizado no inóculo e ao longo do processo fermentativo foi a contagem das células em câmara Agasse Lafont-R, com aumento de 400 X em microscópio óptico. Para isso, as células foram diluídas em água destilada, conforme a necessidade, e utilizou-se a Equação:

$$cél/mL = \left(\frac{N^o \text{ de células contadas}}{6,25 \times 10^8} \right) \times \text{diluição}$$

O segundo método utilizado foi o peso seco, sendo aplicado apenas após o término dos processos fermentativos. Nessa metodologia, retirou-se alíquotas de 3 mL de cada frasco de cultivo e as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, lavadas com água destilada, centrifugadas novamente e suspensas no mesmo volume inicial de água destilada. As células foram colocadas em cadinhos previamente tarados e mantidas em estufa a 60 °C até peso constante.

4.14.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular das leveduras foi determinada pela coloração das células com o corante azul de metileno. Para isso, foram adicionados volumes iguais de suspensão celular, previamente diluída, e de solução do corante 0,01% (OLIVEIRA, 2006). A mistura foi homogeneizada e uma alíquota foi pipetada em câmara de contagem Agasse Lafont-R, e as células foram contadas em microscópio óptico com um aumento de 400X, conforme a equação descrita no item 4.15.2. As células viáveis, que estão ativas metabolicamente, permanecem incolores, enquanto as células mortas se coram em azul.

4.14.4 Método de lise celular

As células foram rompidas mecanicamente com pérolas de vidro de 0,05 mm de diâmetro. O método consistiu de uma mistura de proporções iguais de suspensão celular e pérolas de vidro. A mistura foi agitada em vórtice por 1 minuto e mantida em banho de gelo pelo mesmo período, esse procedimento foi repetido cinco vezes (CHÁVEZ, 2008). O extrato obtido foi analisado em relação às concentrações de proteínas e lipídeos.

4.14.5 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada com base no método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Foram utilizados três reativos específicos (Apêndice A), a partir dos quais foi preparada uma mistura reativa no momento do uso, e, depois, adicionado o reativo de Folin-Ciocalteu. Para cada 1 mL de amostra foram adicionados 5 mL da mistura reativa, permanecendo em repouso por 10 minutos.

Posteriormente, adicionou-se 0,5 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído 1:3. Decorridos 10 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 660 nm.

As proteínas totais foram determinadas de acordo com uma curva de calibração elaborada a partir de uma solução estoque 1000 µg/mL de soroalbumina bovina, sendo o branco realizado com água destilada em substituição à amostra, com leitura de absorbância a 660 nm em espectrofotômetro.

4.14.6 Determinação de lipídeos totais

A determinação dos lipídeos totais das amostras foi realizada pelo método da fosfovanilina, que não requer a extração prévia dos lipídeos com solventes (IZARD; LIMBERGER, 2003). Nesse método, adicionou-se 2 mL de H₂SO₄ a 100 µL de amostra e a mistura foi mantida em banho de água fervente por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 5 mL do reagente de fosfovanilina e os tubos foram incubados a 37 °C por 15 minutos. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 530 nm, com 100 µL de água destilada em substituição à amostra. Os resultados foram correlacionados com uma curva de calibração com óleo de soja refinado como padrão.

4.14.7 Determinação de fenóis totais

Os fenóis totais foram determinados a partir da correlação com uma curva de calibração com ácido tânico (1000 mg/mL) como padrão. Adicionou-se 520 µL do reativo de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 e 1,25 mL de uma solução de carbonato de cálcio 20%. Após serem agitados, os tubos foram deixados em repouso, sob a proteção da luz, por 40 minutos, sendo posteriormente realizada leitura em espectrofotômetro a 725 nm, com água destilada como branco (SIMÕES et al., 2003).

4.14.8 Determinação de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método do Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A cada 0,5 mL de amostra foram adicionados 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. A solução foi mantida em

repouso por 20 minutos e, em seguida, foi lida a absorbância a 490 nm, utilizando água como branco no lugar da amostra. A curva de calibração foi elaborada a partir de uma solução estoque de glicose de 1000 µg/mL.

4.14.9 Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do DNS (ácido-2,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Para isso, foi adicionado 0,5 mL de reativo de DNS a cada 1 mL de amostra e a solução foi mantida em banho de água fervente por 10 minutos. Após esse período, o volume foi completado para 5 mL com água destilada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm, com água destilada como branco. A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução estoque de glicose 1000 µg/mL.

4.14.10 Determinação das concentrações de açúcares, compostos inibidores e subprodutos de processos fermentativos

Para a determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, xilitol e etanol as amostras, previamente diluídas, foram filtradas em filtro *Sep-Pak C18* (WATERS C18 CLASSIC). As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo *Agilent Technology*, equipado com coluna aminex HPX-87H (BIORAD) (300 x 7,8 mm), a 45 °C, utilizando uma solução de H₂SO₄ 0,01N como eluente, com fluxo de 0,6 mL/min, detecção por índice de refração (RID6A) e injeção de 20 µL de amostras.

Na determinação furfural e hidroximetilfurfural (HMF), as amostras foram diluídas, conforme necessário, e filtradas em membrana de 0,22 µm (MILLIPORE). As análises foram realizadas por CLAE, em equipamento equipado com coluna *zorbax eclipse plus C18* (4,6 x 100 mm) (AGILENT), à temperatura ambiente e com uma mistura de 11% de acetonitrila, 88% de água e 0,1% de ácido acético como eluente, com fluxo de 0,8 mL/min e detecção por módulo de análise em comprimento de onda de 276 nm e injeção de 20 µL de amostra.

4.14.11 Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado em aparelho pH-metro Hanna HI221.

4.14.12 Digestão de biomassa para análise de selênio

As amostras foram digeridas com 5 mL de HNO_3 , em banho de água fervente até que os vapores despregados deixassem de apresentar coloração amarelada e forte. Após esse processo, foram adicionados 2,5 mL de HCl 37% e a mistura foi mantida sob aquecimento durante 20 minutos para converter o selênio 6 a selênio 4 (NARAYANA et al., 2003; OLIVEIRA, 2006).

4.14.13 Determinação de selênio total

A solução obtida na digestão ácida foi neutralizada até pH 7,0 com NaOH 6,5N e diluída até um volume conhecido, ao qual foi adicionada uma solução de EDTA 5% na proporção de 1:10. Uma alíquota de 3 mL foi utilizada na análise de selênio por espectrofotometria, conforme curva de calibração previamente elaborada. Foram adicionados à amostra 1 mL de uma solução de iodeto de potássio 2% e, em seguida, 1 mL de HCl 2M. O conteúdo foi homogeneizado até que apresentasse uma coloração amarelada, após a qual foram adicionados 0,2 mL de uma solução de amido 1%. O volume final foi ajustado para 10 mL com água destilada.

A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 570 nm, utilizando uma solução sem selênio como branco. A curva de calibração foi elaborada seguindo este mesmo procedimento a partir de uma solução estoque de Na_2SeO_3 em água destilada, de modo a se obter uma concentração final de 1000 mg/mL de selênio.

Esse método é baseado na reação do selênio com iodeto de potássio em meio ácido, com a liberação de iodo, o qual reage com o amido para formar uma solução azul (ERICZON; PETTERSSON; OLIN, 1990; NARAYANA et al., 2003).

4.15 Fluxograma de atividades

A seguir, pode ser observado o fluxograma com as principais atividades desenvolvidas (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma simplificado das etapas realizadas durante o trabalho.

Fonte: Autoria própria.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do crescimento de leveduras na presença de selênio

O tempo de incubação para o surgimento das colônias nas placas de Petri em todas as linhagens avaliadas foi de 48 horas para o meio YMA e de 120 horas para YMA-Se. Em meio YMA as colônias das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* apresentaram o mesmo aspecto relatado na literatura quando crescidas em ágar Sabouraud, com cores variando do branco ao creme, aspecto liso e com bordas suaves (ELLIS et al., 2007). De mesmo modo, *Rhodotorula glutinis* CCT-2186 cultivada em meio YMA apresentou características semelhantes quando cultivada em ágar Sabouraud a 30 °C, com colônias rosadas, de bordas suaves e textura mucosa (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014).

As leveduras avaliadas foram capazes de crescer em meio YMA contendo 15 mg/L de selênio, porém a presença desse elemento retardou o crescimento de todas as linhagens, que apresentaram mudanças nos aspectos das colônias, como tamanho reduzido e coloração rosada (Figura 6). Essa mudança na coloração das células está relacionada à biotransformação do selênio no interior das células, pois quando o selenito, utilizado no meio YMA-Se, é reduzido a selênio amorfo, as células adquirem uma coloração avermelhada devido à cor natural dessa substância (KONETZKA, 1977).

Quando visualizadas sob microscopia óptica, as células também apresentaram mudanças morfológicas, principalmente em *K. marxianus* SSS24 e a linhagem de *S. cerevisiae* SSS41, com o surgimento de pseudohifas e aglomerados celulares, respectivamente (Figura 7). O dimorfismo em fungos é influenciado por diversos fatores ambientais e consiste em um padrão alternante e reversível de crescimento, que oscila entre formas elípticas e filamentosas de células (CECCATO-ANTONINI; SUDBERY, 2004).

Figura 6- Crescimento de leveduras em meio YMA-Se (esquerda) e YMA (direita) a 30 °C durante 48 e 120 horas, respectivamente. (A) *Candida utilis* SSS32; (B) *Kluyveromyces marxianus* SSS24; (C) *Rhodotorula glutinis* CCT-2186; (D, E, F, G) *Saccharomyces cerevisiae* SSS25 / SSS40 / SSS41 / LALVIN ICV D47.

Fonte: Autoria própria.

Figura 7 – Microscopia óptica de leveduras crescidas em ágar YMA-Se (superior) e YMA (inferior) a 30 °C após 48 horas, com um aumento de 400 X. (A) *Kluyveromyces marxianus* SSS24; (B) *Saccharomyces cerevisiae* SSS41.

Fonte: Autoria própria.

5.2 Determinação da incorporação de selênio e seu efeito no metabolismo das leveduras

Inicialmente foi utilizado um meio quimicamente definido (4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L de KH_2PO_4 , 4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 30 g/L de glicose) para o cultivo das leveduras, contendo 15 mg/L de selênio, na forma de Na_2SeO_3 (OLIVEIRA, 2006). Observou-se ausência de crescimento celular nas 48 horas de cultivo para a maioria das linhagens estudadas, exceto *Kluyveromyces marxianus* SSS24, que, embora tenha apresentado crescimento reduzido, produziu 7 g/L de etanol em meio com selênio e 4,7 g/L de etanol nos cultivos controle. O meio quimicamente definido utilizado não apresentou os componentes necessários para um crescimento eficaz das linhagens estudadas.

Quando cultivadas em meio YPG todas as leveduras apresentaram crescimento celular, porém a presença de selênio diminuiu a viabilidade da maioria das linhagens, em comparação com os cultivos controle (Tabela 8). Quanto maior a concentração de selênio adicionado ao meio, maior foi a inibição do crescimento e, ao mesmo tempo, maior a quantidade incorporada pela levedura (DE LEÓN et al., 2002). Entretanto, elementos como selênio, arsênio, prata ou chumbo interferem no crescimento de leveduras em concentrações superiores a 100 $\mu\text{mol/L}$, sendo, no caso do selênio, inibitório acima de 7,9 mg/L, possivelmente devido à perda da eficiência de divisão celular (DE LEÓN et al., 2002; OLIVEIRA, 2006).

De acordo com os resultados, a incorporação de selênio variou entre as linhagens, com valores de 659 a 4064 ppm (mg de selênio/kg de biomassa celular), sendo o menor valor obtido com *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN ICV D47. Em estudo realizado por Oliveira (2006) com uma linhagem comercial de *S. cerevisiae* foi obtida uma produção de biomassa de até 9 g/L enriquecida com 496, 816 e 1102 ppm de selênio, adicionado ao meio de cultivo nas concentrações de 10, 25 e 40 mg/L, respectivamente. De León e colaboradores (2002) produziram biomassa de *S. cerevisiae* contendo de 1500 a 2354 mg/kg de selênio, sendo que quando ocorreu adição de selênio apenas no início do cultivo os valores variaram de 516 a 2583 ppm.

Tabela 8 – Concentração de selênio, biomassa, proteínas, lipídeos e viabilidade celular em cultivos na presença e ausência de selênio.

Levedura	Selênio	Selênio total (mg/kg)	Biomassa (g/L)	Células/mL	Viabilidade celular (%)	Proteínas totais (mg/kg)	Lipídeos totais (mg/kg)
<i>Candida utilis</i> SSS32	+	1946 ± 492	2,61 ± 0,18	6,8 x 10 ⁶	47 ± 0,78	73,79 ± 16,27	18,44 ± 6,23
<i>Candida utilis</i> SSS32	-	—	25,06 ±	1,4 x 10 ⁸	100 ± 0	109,42 ± 26,44	5,24 ± 0,55
<i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24	+	2359 ± 1504	2,31 ± 1,8	2,56 x 10 ⁶	100 ± 0	140,07 ± 58,44	23,41 ± 6,32
<i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24	-	—	10,14	1,57 x 10 ⁸	99,0 ± 1,41	157,39	5,61
<i>Rhodotorula glutinis</i> CCT-2186	+	4065 ± 727	1,33 ± 0,24	2,24 x 10 ⁶	46 ± 5,0	376,61 ± 67,43	99,41 ± 10,51
<i>Rhodotorula glutinis</i> CCT-2186	-	—	9,81 ± 1,79	1,2 x 10 ⁷	72 ± 21,0	183,23 ± 28,69	34,88 ± 1,77
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS25	+	1095 ± 182	4,11 ± 0,88	1,9 x 10 ⁷	69 ± 1,8	559,30 ± 301,91	36,12 ± 19,98
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS25	-	—	9,81 ± 0,93	5,0 x 10 ⁷	100 ± 0	283,36 ± 22,22	12,66 ± 5,15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS40	+	1193 ± 336	4,32 ± 0,72	2,73 x 10 ⁷	63 ± 6,2	740,68 ± 33,92	62,63 ± 1,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS40	-	—	24,80 ± 0,88	6,16 x 10 ⁷	98 ± 2,6	127,59 ± 40,04	3,36 ± 1,19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41	+	833 ± 78	7,33 ± 0,47	3,37 x 10 ⁷	99 ± 0,2	1165,9 ± 150,71	78,14 ± 6,04
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41	-	—	8,33 ± 1,41	7,68 x 10 ⁷	100 ± 0	343,02 ± 88,72	20,13 ± 4,53
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LALVIN ICV D47	+	659 ± 56	7,97 ± 0,24	3,82 x 10 ⁷	93 ± 0,9	1543,17 ± 390,88	69,09 ± 19,90
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LALVIN ICV D47	-	—	11,14 ± 1,41	3,36 x 10 ⁷	100,0	376,21 ± 66,43	21,31 ± 1,87

Fonte: Autoria própria

Na produção de selenoleveduras é preciso conciliar a incorporação de selênio com a produção de biomassa. Para isso, é necessário que a levedura apresente resistência à toxicidade desse elemento. Ao analisar a viabilidade e crescimento celular das leveduras estudadas, observou-se uma produção de 7,33 g/L de biomassa e 99% de viabilidade celular com *S. cerevisiae* SSS41, valores muito próximos ao cultivo controle. Isso indica que a linhagem é capaz de crescer eficientemente na presença 15 mg/L de selênio. Considerando-se o crescimento celular observado, torna-se possível obter uma maior quantidade de biomassa enriquecida com elevados níveis de selênio. Além disso, essa mesma levedura também apresentou conteúdo proteico (1165,88 mg/kg) e lipídico (78,14 mg/kg) elevados.

Em relação às espécies conhecidas como consumidoras de pentoses, *Candida utilis* SSS32, *K. marxianus* SSS24 e *R. glutinis* CCT-2186, a maior incorporação de selênio foi por *R. glutinis* CCT-2186, porém o crescimento e a viabilidade celular foram baixos, apresentando 1,33 g/L de biomassa e 46% de células viáveis. Em contrapartida, *K. marxianus* SSS24 demonstrou resistência ao selênio presente no meio, com 100% de viabilidade ao final do cultivo. A linhagem *C. utilis* SSS32 produziu apenas 2,61 g/L de biomassa celular, com assimilação de 1946 ppm de selênio. Em estudo com *C. utilis*, Yang e colaboradores (2013) obtiveram um conteúdo de selênio 905 e 985 ppm em sistema de batelada simples e alimentada, respectivamente.

Observou-se aumento no conteúdo lipídico das linhagens cultivadas com selênio. De acordo com Čertík et al. (2013), o selênio causa um aumento no acúmulo de lipídeos, principalmente dos ácidos linoleico e linolênico, em leveduras produtoras de carotenoides do gênero *Rhodotorula*.

A presença de selênio diminuiu a porcentagem de consumo de glicose por *C. utilis* SSS32, *K. marxianus* SSS24 e *R. glutinis* CCT-2186, porém não afetou as linhagens de *S. cerevisiae* (Tabela 9). O selênio no meio de cultivo prolonga a fase lag das células (ČERTÍK et al., 2013), ou seja, a fase em que estão sintetizando os compostos necessários para se adaptar ao novo ambiente. Com isso, é necessário um maior tempo de cultivo, embora tenha ocorrido o decréscimo da viabilidade celular das leveduras *C. utilis* SSS32 e *R. glutinis* CCT-2186.

Em relação à formação de subprodutos, avaliou-se a produção de etanol e glicerol durante a fermentação, conforme pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9 – Consumo de glicose, produção de subprodutos e pH ao final do cultivo de leveduras cultivadas na presença e ausência de selênio.

Levedura	Selênio	Consumo de glicose (%)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	pH
<i>Candida utilis</i> SSS32	+	30	1,14 ± 0,04	nd	6,24 ± 0,12
<i>Candida utilis</i>	-	99	3,0 ± 0,64	nd	5,64 ± 0,05
<i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24	+	9	0,58 ± 0,33	nd	5,66 ± 0,23
<i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24	-	99	6,46 ± 0,25	nd	5,26 ± 0,08
<i>Rhodotorula glutinis</i> CCT-2186	+	3	nd	1,28 ± 0	6,34 ± 0,01
<i>Rhodotorula glutinis</i> CCT-2186	-	59	nd	nd	5,14 ± 0,04
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS25	+	98	11,02 ± 2,13	7,36 ± 0,7	5,1 ± 0,05
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS25	-	99	4,61 ± 0,22	nd	6,35 ± 0,01
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS40	+	99	7,16 ± 0,04	3,13 ± 0,5	5,24 ± 0,09
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS40	-	98	5,83 ± 0,16	1,14 ± 0,2	6,58 ± 0,19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41	+	99	6,21 ± 0,6	1,27 ± 0	6,28 ± 0,32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41	-	99	5,93 ± 0,86	nd	6,25 ± 0,35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LALVIN ICV D47	+	99	8,16 ± 0,49	1,79 ± 0,3	5,03 ± 0,24
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LALVIN ICV D47	-	99	6,65 ± 0,77	0,94 ± 0,2	5,99 ± 0,05

+: presença -: ausência nd: não detectado

Fonte: Autoria própria.

A presença de 15 mg/L de selênio aumentou a produção de etanol pela maioria das leveduras, alcançando 11 g/L com *S. cerevisiae* SSS25. A interação de minerais com aminoácidos ou ureia influencia na produção de etanol e a adição de suplementos minerais pode duplicar o rendimento em etanol (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009). O glicerol foi produzido em

concentrações inferiores, com produção máxima de 7,36 g/L por *S. cerevisiae* SSS25. A formação de subprodutos como etanol e glicerol está associada à manutenção do equilíbrio redox da célula, como forma de regenerar o excesso de NADH produzido durante o consumo de açúcares e crescimento celular (DIJKEN; SCHEFFERS, 1986).

Após 48 horas de cultivo, os meios apresentaram alterações nos valores de pH, cujo valor inicial era igual a $6,48 \pm 0,03$ (Tabela 8). De acordo com Du Preez, Bosch e Prior (1986), cultivos com valores iniciais de pH igual 6,5 diminuem a produção de etanol; um subproduto indesejável durante a produção de biomassa de levedura. De acordo com os resultados, pode-se inferir que o selênio afetou o crescimento celular e produção de subprodutos, o que, conseqüentemente, causou alterações no pH.

Assim como em meio sólido, algumas leveduras exibiram mudanças morfológicas, sendo esse dimorfismo mais nítido em *K. marxianus* SSS24 e *S. cerevisiae* SSS41, com o aparecimento de pseudohifas e aglomerados celulares, respectivamente. Também foi observada coloração avermelhada da biomassa, o que reforça a presença de selênio incorporado pelas células, uma vez que a cor vermelha está relacionada à presença de selênio amorfo (KONETZKA, 1977).

5.3 Teste de adsorção de selênio na parede celular de leveduras

A biomassa analisada não apresentou conteúdo de selênio adsorvido pela parede celular, de acordo com o método espectrofotométrico utilizado. Embora este seja um método sensível, o selênio é um elemento instável e podem ocorrer perdas durante o processo de digestão e análise da biomassa, porém, a ausência de coloração na amostra indica que o selênio, caso esteja presente, encontra-se em concentrações muito baixas, inferiores a 140 µg/L, limite mínimo da curva de calibração utilizada.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A desidratação utilizada para a visualização das células de *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 possibilitou a integridade da amostra, o que

indica que esse tipo de material biológico pode ser observado em MEV empregando-se a metodologia descrita por Accorsini (2010). Quando observadas sob um aumento de 10000X, pode-se notar a presença de brotamentos nas células, indicando a resistência e capacidade de crescimento da linhagem na presença de selênio no meio (Figura 8).

Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 cultivada na presença de 15 mg/L de selênio (aumento de 10000X).

Fonte: Autoria própria.

5.5 Seleção das leveduras produtoras de exoenzimas

5.5.1 Carboximetilcelulase

Entre as quatro leveduras avaliadas (*Candida utilis* SSS32, *Kluyveromyces marxianus* SSS24, *Rhodotorula glutinis* CCT-2186 e *Sacchchromyces cerevisiae* SSS41 – controle negativo), apenas *R. glutinis* CCT-2186 foi capaz de apresentar halo de degradação visível do substrato, embora existam relatos da produção de celulases por *C. utilis* na literatura (VILLAS-BÔAS, 2001).

5.5.2 Amilases

Não foi detectado halo de degradação visível do substrato por nenhuma das leveduras durante os sete dias de incubação, embora existam estudos sobre a produção de amilases pelo gênero *Rhodotorulla*, que pode variar de acordo com cada linhagem (SCHNEIDER et al., 2013; SINGH et al., 2014).

5.6 Obtenção e caracterização dos hidrolisados de biomassas vegetais

Os farelos de arroz, soja e milho apresentaram porcentagem de umidade inicial de 9,0%, 8,36% e 9,06%, respectivamente. Após a hidrólise ácida e separação das partículas sólidas por filtração e centrifugação, os hidrolisados foram caracterizados parcialmente em relação ao teor de açúcares, proteínas e fenóis, de acordo com as condições utilizadas no processo fermentativo (Tabela 10).

Tabela 10 – Composição parcial dos hidrolisados de biomassas vegetais utilizados em processo fermentativo.

Hidrolisado	Açúcares totais (g/L)	Açúcares redutores (g/L)	Proteínas (g/L)	Fenóis totais (g/L)
Farelo de arroz	28,02 ± 0,87	14,42 ± 3,41	13,42 ± 0,35	0,31 ± 0,07
Farelo de milho	175,72 ± 19,97	47,01 ± 0,85	7,82 ± 2,33	0,39 ± 0,05
Farelo de soja	38,61 ± 4,45	12,48 ± 0,62	13,52 ± 1,06	0,33 ± 0,05
Bagaço de cana-de-açúcar	69,34 ± 2,83	52,96 ± 0,65	0,47 ± 0,09	0,45 ± 0,002

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Tabela 10, o farelo de milho liberou a maior quantidade de açúcares totais e redutores após a hidrólise ácida, 175,72 e 47,01 g/L, respectivamente, porém apresentou uma liberação de proteínas relativamente menor que os farelos de arroz e de milho. A maior liberação de açúcares pode estar relacionada à composição das biomassas, uma vez que o milho contém cerca de 87% de seu peso em matéria seca, dos quais 62,66% são amido, enquanto os farelos de soja e de arroz apresentam 12,38% e 22,7% desse polissacarídeo, respectivamente (ROSTAGNO, 2011).

Entre os hidrolisados amiláceos, o hidrolisado de farelo de milho apresentou o menor teor de proteínas, 7,82 g/L, correspondendo a cerca de 16% do teor de açúcares redutores, sendo menos rico em nitrogênio orgânico do que os demais hidrolisados amiláceos, que apresentaram aproximadamente 50% de açúcares redutores e proteínas. O farelo de soja apresenta o maior percentual de proteína bruta, de 45,22 - 51,41%, enquanto milho possui 7,88 - 8,87% e arroz 13,13% (ZAMBOM et al., 2001; ROSTAGNO, 2011). Em relação ao hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, obteve-se o menor teor de proteínas, 0,39 g/L, uma vez que essa biomassa lignocelulósica é composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (GOUVEIA et al., 2009; PHILIPPINI, 2012).

Após a hidrólise ácida desses materiais, ocorreu a liberação de compostos fenólicos, o que pode estar relacionado à presença de lignina, pois o grão de milho e o farelo de soja podem conter cerca de 3% desse composto (ZAMBOM et al., 2001). Durante o processamento industrial da matéria-prima amilácea também são encontrados resíduos de cascas, como no caso do farelo de arroz, subproduto do beneficiamento dos grãos (JIAMYANGYUEN; SRIJESDARUK; HARPER, 2005). O grão de soja é quebrado e tem a casca separada e moída durante seu processamento, porém pode ser reincorporada dependendo do subproduto a ser comercializado (BELLAYER; SNIZEK, 2012). Além disso, a cada tonelada de soja processada cerca de 2% são transformados em resíduo de casca, porém esta porcentagem pode variar, pois quando o teor de proteína da soja é elevado a casca do grão é mantida, sendo retirada apenas quando a concentração de proteína for baixa, de modo que eleve seu percentual de proteína bruta (ZAMBOM et al., 2001).

Realizou-se análise do conteúdo de açúcares dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Tabela 11), porém, devido à complexidade da biomassa vegetal, não foi possível identificar suas composições exatas. No caso do bagaço de cana-de-açúcar, o teor elevado de xilose é devido ao fato de o hidrolisado estar concentrado, tendo sido previamente diluído para uso nos processos fermentativos.

Tabela 11 – Composição de açúcares e compostos inibidores dos hidrolisados de diferentes biomassas vegetais.

Hidrolisado	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido acético (g/L)	5- HMF (g/L)	Furfural (g/L)
Farelo de arroz	1,56	4,12	4,71	2,36	10,44	0	0,025	0,055
Farelo de milho	5,35	4,83	3,69	3,35	0,67	0,33	0	0
Farelo de soja	2,75	2,20	4,41	0,44	1,35	0,43	0,101	0,010
Bagaço de cana-de- açúcar	–	3,93	76,67	6,64	–	3,62	0,025	0,065

– : não detectado

Fonte: Autoria própria.

A presença de açúcares de cinco carbonos nos hidrolisados de farelos pode estar relacionada à presença da casca dos grãos na composição nos farelos (ZAMBOM et al., 2001; JIAMYANGYUEN; SRIJESDARUK; HARPER, 2005). Em relação aos compostos inibidores, o ácido acético apresentou a maior concentração no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, sendo de 3,62 g/L. Essa maior liberação possivelmente está relacionada ao fato de o ácido acético ser o principal ácido liberado durante a hidrólise de hemiceluloses acetiladas, apresentando efeito inibitório para diversas linhagens de leveduras (WALKER, 2000; RAMOS, 2003).

5.7 Delineamento composto central rotacional 2² para hidrólise do farelo de soja para uso em processos fermentativos

Estudou-se a hidrólise do farelo de soja a partir de diferentes concentrações de H₂SO₄ (% m/v) e de farelo de soja (%). O farelo de soja apresentou umidade inicial igual a 10% e foi submetido à hidrólise a 121 °C por 15 minutos. Após esse processo, os hidrolisados obtidos foram filtrados, centrifugados e caracterizados parcialmente em relação ao teor de açúcares, proteínas e fenóis (Tabela 12).

Tabela 12 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² para hidrólise do farelo de soja.

Ensaio	Ácido (%) (X ₁)	Farelo de soja (%) (X ₂)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares redutores (g/L)	Proteínas (g/L)	Fenóis (g/L)	pH
1	0,15 (-1)	7,20 (-1)	10,77	0,67	7,50	0,05	5,31
2	0,85 (+1)	7,20 (-1)	27,94	12,34	22,13	0,17	1,76
3	0,15 (-1)	17,80 (+1)	44,56	1,32	21,25	0,27	1,42
4	0,85 (+1)	17,80 (+1)	17,81	11,24	29,63	0,15	4,76
5	0,00 (-α)	12,50 (0)	29,56	0,95	24,38	0,31	3,5
6	1,00 (+α)	12,50 (0)	25,47	16,94	28,25	0,28	6,19
7	0,50 (0)	5,00 (-α)	17,86	7,94	14,25	0,07	2,0
8	0,50 (0)	20,00 (+α)	29,81	4,10	20,75	0,13	1,75
9	0,50 (0)	12,50 (0)	22,23	7,39	14,13	0,07	4,5
10	0,50 (0)	12,50 (0)	21,86	5,64	13,13	0,05	3,92
11	0,50 (0)	12,50 (0)	24,45	8,15	15,50	0,05	3,82

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Tabela 12, as concentrações de açúcares totais variaram de 10,77 a 44,56 g/L, enquanto os açúcares redutores de 0,67 a 16,94 g/L. A fração polissacarídica do farelo de soja é formada por amido, fibras e resíduos de casca (ZAMBOM et al., 2001; ROSTAGNO, 2011), portanto, estão presentes componentes como celulose e hemicelulose. Sabe-se que com a hidrólise ácida branda ocorre a solubilização da hemicelulose (GÍRIO et al., 2010) e o rompimento das ligações glicosídicas do amido, catalisado pela presença de H₂SO₄ (URBANO, 2012). Entretanto, não houve uma correlação positiva entre a liberação de açúcares, pois, como pode ser observado na Tabela 12, as condições que levaram à maior liberação de açúcares totais e redutores não foram as mesmas.

A condição referente ao ensaio 3, que permitiu maior liberação de açúcares totais, apresentou uma porcentagem elevada de farelo de soja e baixa concentração de H₂SO₄, indicando que a hidrólise foi suficiente para romper parte da estrutura vegetal, porém não hidrolisou as cadeias polissacarídicas para a liberação dos açúcares redutores.

A partir dos resultados, foi possível observar que a maior concentração de açúcares redutores foi obtida com o aumento da concentração de ácido e redução do teor de sólidos, como pode ser observado no ensaio 6 (Tabela 12).

Possivelmente devido à menor porcentagem de sólidos, a biomassa se tornou mais acessível à solução ácida, o que permitiu a liberação dos açúcares redutores.

As concentrações de proteínas variaram de 7,5 a 29,63 g/L, porém considerando-se os açúcares correspondentes, obteve-se um elevado teor de proteínas em todos os ensaios, sendo, em alguns casos, superior aos açúcares, como nos ensaios 4 e 6 (Tabela 12). Em processos fermentativos, a relação C:N é um dos fatores que influencia no crescimento celular microbiano e na produção de metabólitos, sendo considerada elevada quando há quantidades acima de 10 vezes de carbono em relação ao nitrogênio no meio (OLIVEIRA, 2006).

De modo geral, para a produção de biomassa de levedura é necessário que o meio de cultivo apresente os componentes necessários para priorizar o crescimento celular. O excesso de carbono em relação à fonte de nitrogênio pode ocasionar acúmulo de metabólitos como etanol, lipídeos e polissacarídeos extracelulares (OLIVEIRA, 2006; MANIKANDAN; VIRUTHAGIRI, 2010; AMARETTI; 2012). Diante desse fato, objetivou-se a liberação de açúcares redutores a partir das diferentes condições de hidrólise abordadas pelo DCCR.

Ao analisar os efeitos das variáveis estudadas e de suas interações na liberação de açúcares redutores (Figura 9), com um nível de 95% de confiança, observou-se que a concentração de H_2SO_4 foi o único fator que interferiu no processo de hidrólise, aumentando a liberação de açúcares. Dentro das condições analisadas, independentemente da quantidade de biomassa vegetal presente, a adição de H_2SO_4 aumentou a eficiência de hidrólise.

Figura 9 - Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis e suas interações na liberação de açúcares redutores, de acordo com delineamento composto central rotacional 2^2 , com três repetições no ponto central. (X_1 = H_2SO_4 % m/v; X_2 = % farelo de soja).

Fonte: Autoria própria.

Com base na liberação de açúcares redutores, foi gerado um modelo estatístico com 95% de confiança para determinar as respostas às mudanças na concentração de H_2SO_4 , sendo apresentado pela Equação:

$$\text{Açúcares redutores (g/L)} = 6,97 + 5,53 * X_1$$

A análise de variância para o modelo linear pode ser observada na Tabela 13.

Tabela 13 – Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado de liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de farelo de soja.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Modelo	244.30	1	244.30	97.20	< 0.0001*
X_1	244.30	1	244.30	97.20	< 0.0001*
Residual	22.62	9	2.51		
Falta de Ajuste	19.31	7	2.76	1.66	0.4257
Erro Puro	3.31	2	1.66		
Total	266.93	10			
R^2	0,9058				

* significativa em um nível de 95% de confiança

Fonte: Autoria própria.

O gráfico de superfície de resposta, apresentado na Figura 10, foi utilizado para avaliar o modelo estatístico para liberação de açúcares redutores. De acordo com o gráfico, para que ocorra uma maior liberação de

açúcares redutores é necessário aumentar a concentração de H_2SO_4 em torno de 1%, ponto máximo, e a relação sólido:líquido deve estar, preferencialmente, entre 6 e 16% no processo de hidrólise.

Figura 10 – Superfície de resposta para a liberação de açúcares redutores (g/L) em função da concentração de H_2SO_4 (% m/v) e relação sólido:líquido (% de farelo de soja).

Fonte: Autoria própria.

Entretanto, devido às características do farelo de soja quando aquecido em meio aquoso, é preferencial uma maior relação sólido:líquido para que não ocorra a compactação do farelo, o que dificulta a recuperação do hidrolisado e reduz o volume de líquido recuperado. A partir dos resultados, pode-se inferir que a concentração de H_2SO_4 é o fator preponderante para a liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise do farelo de soja nas condições estudadas, porém também é importante que a relação sólido:líquido permita a recuperação do hidrolisado, mesmo que essa variável não tenha sido estatisticamente relevante, pois interfere diretamente no processo de recuperação e tratamento do hidrolisado amiláceo. Com isso, optou-se pela utilização de 1% de H_2SO_4 (m/v) e relação sólido:líquido com 20% de farelo de soja.

5.8 Avaliação dos hidrolisados amiláceos e lignocelulósico na produção de leveduras enriquecidas com selênio

Inicialmente, as leveduras *Kluyveromyces marxianus* SSS24 e *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 foram cultivadas em hidrolisado de farelo de arroz *in natura* (HFA) e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não destoxificado (HHBC).

Para ambas as leveduras, observou-se que houve mudança na cor das células após 24h, que se apresentaram tanto brancas quanto rosadas, sendo a coloração rosada relacionada à presença de selênio amorfo no meio, conforme observado na Figura 11 (KONETZKA, 1977). A presença de células pigmentadas se manteve até o final do processo fermentativo em concomitância com as células de cor creme, coloração típica das espécies de leveduras utilizadas (ELLIS et al., 2007).

Figura 11 – Células de *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 após centrifugação, apresentando biomassa celular branca e avermelhada.

Fonte: Autoria própria.

Tanto a linhagem *K. marxianus* SSS24 quanto *S. cerevisiae* SSS41 apresentaram capacidade de crescimento (Figura 12) e incorporação de selênio, indicando a possibilidade de uso dos hidrolisados amiláceos na produção de leveduras enriquecidas com selênio. Entretanto, *S. cerevisiae* tem sido mais amplamente utilizada na alimentação animal ao longo dos anos (GRAHAM; SANTOS; WADT, 2009) com isso, os ensaios posteriores, com

outros hidrolisados, foram realizados apenas com a linhagem *S. cerevisiae* SSS41.

Figura 12 – Crescimento celular de *Kluyveromyces marxianus* SSS24 e *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 em hidrolisados de biomassas vegetais. (HFA: farelo de arroz; HFAD: farelo de arroz desengordurado; HFM: farelo de milho; HFS: farelo de soja; HHBC: hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar).

Fonte: Autoria própria.

As concentrações de biomassa celular e de selênio obtidas nos ensaios realizados com HFA foram de 9,17 g/L de células e 2616 ppm de selênio para *K. marxianus* SSS24, enquanto a linhagem *S. cerevisiae* SSS41 demonstrou produção de 6,0 g/L de biomassa e incorporação de 5420 ppm de selênio (Tabela 14), ambas com 100% de viabilidade celular.

Tabela 14 - Cultivo de leveduras enriquecidas com selênio em hidrolisados de biomassa vegetais.

Hidrolisado	Microrganismo	Selênio incorporado (ppm)	Biomassa (g/L)	Viabilidade celular (%)	Proteínas intracelulares (g/L)	Lipídeos intracelulares (g/L)	pH (72h)
HFA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41	5420 ± 15	6,0 ± 0	100,0 ± 0	9,92 ± 1,04	4,51	5,2 ± 0,3
HFA	<i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24	2620 ± 67	9,17 ± 0,24	100 ± 0	9,48 ± 1,88	0,64	5,15 ± 0,64
HFAD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41	6870 ± 360	4,5 ± 0,24	84,41 ± 1,5	8,77 ± 0,64	–	5,25 ± 0,42
HFM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41	10573 ± 1221	4,25 ± 0,49	100 ± 0	5,88	0,32	3,95
HFS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41	2675 ± 480	5,46 ± 0,98	100 ± 0	7,55 ± 2,1	0,23 ± 0,04	4,37
HHBC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SSS41	6715 ± 243	1,95 ± 0,07	99,56 ± 0,6	–	–	6,02 ± 0,04
HHBC	<i>Kluyveromyces marxianus</i> SSS24	8298 ± 12	1,4 ± 0	87,44 ± 9	–	–	4,99 ± 0,05

– : não detectado

HFA: hidrolisado de farelo de arroz; HFAD: hidrolisado de farelo de arroz desengordurado; HFM: hidrolisado de farelo de milho; HFS: hidrolisado de farelo soja; HHBC: hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Fonte: Autoria própria.

Em relação ao pH do meio extracelular, observou-se ligeira redução nos valores de pH no decorrer do processo fermentativo, o que pode estar relacionado à produção de ácidos orgânicos. Tradicionalmente, os processos fermentativos são realizados em valores de pH igual a 5, pois são raros os microrganismos capazes de crescer em valores ácidos ou básicos extremos (ALTERTHUMM, 2008).

Conforme Tabela 14, *S. cerevisiae* SSS41 cultivada em hidrolisado de farelo de arroz desengordurado (HFAD) apresentou produção de 4,50 g/L de biomassa e incorporação de 6870 ppm de selênio. O consumo de açúcares por essa levedura no HFAD foi de 45%, como pode ser observado na Figura 13, e a viabilidade celular foi reduzida, sendo 84,41%, possivelmente devido à redução do conteúdo lipídico, fonte de carbono para a manutenção e crescimento das células.

Figura 13 - Porcentagem de consumo de açúcares pelas leveduras *Kluyveromyces marxianus* SSS24 e *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 em hidrolisados de biomassas vegetais após 72 horas de cultivo. (HFA: farelo de arroz; HFAD: farelo de arroz desengordurado; HFM: farelo de milho; HFS: farelo de soja; HHBC: hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar).

Fonte: Autoria própria.

Em relação aos ensaios com os hidrolisados de farelo de soja (HFS) e de farelo de milho (HFM), obteve-se 100% de viabilidade celular e produção de 5,46 g/L e 4,25 g/L de biomassa, respectivamente, embora não tenha sido observado consumo de açúcares, o que indica que a levedura utilizou outra

fonte de carbono para seu crescimento. Dependendo das condições ambientais em que se encontra, a espécie *S. cerevisiae* é capaz de produzir lipases associadas ao crescimento celular (LOCK; CORBELLINI; VALENTE, 2007; ARROYO-LÓPEZ et al., 2012). Os hidrolisados de biomassas vegetais, por serem meios complexos, podem conter outras fontes de carbono, além de apresentar variação no teor de nutrientes e minerais, de acordo com cada espécie vegetal e condições de armazenamento da biomassa.

O HFM também apresentou a menor relação entre a concentração de proteínas e açúcares nos hidrolisados amiláceos, apresentando 7,82 g/L de proteínas para 47 g/L de açúcares redutores, como pôde ser observado na Tabela 10, no item 5.6. Uma vez que a deficiência de nitrogênio pode interferir negativamente no processo fermentativo (BACH et al., 2011), a menor disponibilidade de proteínas, aliada à complexidade do meio de cultivo, também pode ter interferido no processo fermentativo.

O HFS apresentou uma alta concentração de proteínas, estando na mesma proporção dos açúcares, de cerca de 12 g/L cada. Deste modo, não é necessário sua suplementação com fontes complexas de nitrogênio, uma vez que o farelo de soja é composto por aproximadamente 50% de proteínas (ZAMBOM et al., 2001), o que permite reduzir os custos com suplementação.

Simultaneamente, foram realizados ensaios com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não destoxificado, no qual foram utilizadas as leveduras *S. cerevisiae* SSS41 e *K. marxianus* SSS24, sendo esta última conhecida por sua capacidade de crescer em xilose (GOSHIMA et al., 2013). Entretanto, embora tenha ocorrido absorção de selênio, as linhagens apresentaram crescimento celular reduzido, possivelmente devido à presença de compostos tóxicos provenientes da hidrólise ácida da biomassa vegetal, como compostos fenólicos e ácidos orgânicos. No caso do ácido acético, pode ocorrer efeito inibitório quando, em sua forma não-dissociada, penetra através da membrana plasmática e se dissocia no interior da célula, causando uma acidificação do meio intracelular (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Ao final do processo fermentativo, separou-se uma alíquota das amostras que foi seca a 60 °C e triturada com gral e pistilo, obtendo-se um composto com grânulos de tamanhos variados e coloração creme (Figura 14).

Figura 14 – Biomassa de levedura enriquecida com selênio desidratada e triturada.

Fonte: Autoria própria.

Os estudos realizados com biomassas vegetais utilizam substratos açucarados, como melaço de cana (ESMAEILI et al., 2012), suco de uva (PÉREZ-CORONA et al., 2011), extrato de malte (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2012; YIN et al., 2009) e sucos de arroz integral germinado e de broto de soja (YIN et al., 2009), em alguns casos, com enfoque no processo de biotransformação e produção de bebidas, diferenciando-se da produção a partir de resíduos vegetais. Com isso, destaca-se o caráter inovador da utilização de hidrolisados de biomassas amiláceas e lignocelulósicas na produção de leveduras enriquecidas com maiores teores de selênio para a alimentação animal.

5.9 Planejamento fatorial completo 2⁵ para análise de crescimento celular e incorporação de selênio

Realizou-se o estudo do efeito dos nutrientes KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 e Na_2SeO_3 e suas interações no crescimento celular e incorporação de selênio pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* SSS41, cultivada em hidrolisado de farelo de soja. Com exceção do selênio, os sais utilizados no processo fermentativo são fundamentais para o metabolismo de fungos, sendo frequentemente utilizados em meios para o crescimento celular e produção de metabólitos (LIMA; BASSO, AMORIM, 2001; OLIVEIRA, 2006). Optou-se pelo NH_4NO_3 em substituição ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pois, em alguns casos,

pode ocorrer inibição pelo sulfato e reduções significativas do pH do meio (LIMA; BASSO, AMORIM, 2001).

A levedura *S. cerevisiae* SSS41 foi capaz de crescer na presença de concentrações variadas de selênio, com e sem adição de nutrientes, com produção de até 11,0 g/L de biomassa celular, indicando que a composição do hidrolisado foi favorável para o crescimento celular (Tabela 15).

Sabe-se que muitos compostos atuam como co-fatores de enzimas e como moduladores da resposta ao estresse ambiental, sendo capazes de inibir ou promover o crescimento microbiano e produção de metabólitos durante o processo fermentativo, o que pode ocorrer de modo antagônico ou diretamente, como no caso de efeitos tóxicos (VENKATESHWAR et al., 2009). Os elementos traço são essenciais para a atividade de algumas enzimas microbianas, geralmente atuando como co-fatores (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Tabela 15 – Planejamento fatorial completo 2⁵, com três repetições no ponto central, para a produção de biomassa celular e incorporação de selênio por *Saccharomyces cerevisiae* SSS41.

Ensaio	KH ₂ PO ₄ (X ₁) g/L	NH ₄ NO ₃ (X ₂) g/L	MgSO ₄ ·7H ₂ O (X ₃) g/L	CaCl ₂ (X ₄) g/L	Na ₂ SeO ₃ (X ₅) mg/L	Selênio (ppm)	Biomassa celular (g/L)
1	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	10 (-1)	2375	7,0
2	10 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	10 (-1)	2895	11,0
3	0 (-1)	4 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	10 (-1)	4097	9,0
4	10 (+1)	4 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	10 (-1)	364	7,0
5	0 (-1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0 (-1)	10 (-1)	12478*	6,67
6	10 (+1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0 (-1)	10 (-1)	2690	7,0
7	0 (-1)	4 (+1)	0,4 (+1)	0 (-1)	10 (-1)	1340	7,0
8	10 (+1)	4 (+1)	0,4 (+1)	0 (-1)	10 (-1)	3957	11,0
9	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,2 (+1)	10 (-1)	5925	7,0
10	10 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0,2 (+1)	10 (-1)	1366	7,33
11	0 (-1)	4 (+1)	0 (-1)	0,2 (+1)	10 (-1)	4330	7,0
12	10 (+1)	4 (+1)	0 (-1)	0,2 (+1)	10 (-1)	4447	5,0
13	0 (-1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0,2 (+1)	10 (-1)	2498	6,67
14	10 (+1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0,2 (+1)	10 (-1)	4137	10,17
15	0 (-1)	4 (+1)	0,4 (+1)	0,2 (+1)	10 (-1)	9544	7,50
16	10 (+1)	4 (+1)	0,4 (+1)	0,2 (+1)	10 (-1)	1035	7,0
17	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	20 (+1)	7969	5,33
18	10 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	20 (+1)	2299	7,10
19	0 (-1)	4 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	20 (+1)	5277	5,86
20	10 (+1)	4 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	20 (+1)	8766	5,17
21	0 (-1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0 (-1)	20 (+1)	3457	6,43
22	10 (+1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0 (-1)	20 (+1)	2980	3,67
23	0 (-1)	4 (+1)	0,4 (+1)	0 (-1)	20 (+1)	6298	7,83
24	10 (+1)	4 (+1)	0,4 (+1)	0 (-1)	20 (+1)	2047	8,35
25	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,2 (+1)	20 (+1)	4053	5,09
26	10 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0,2 (+1)	20 (+1)	2607	11,33
27	0 (-1)	4 (+1)	0 (-1)	0,2 (+1)	20 (+1)	2514	7,50
28	10 (+1)	4 (+1)	0 (-1)	0,2 (+1)	20 (+1)	843	4,13
29	0 (-1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0,2 (+1)	20 (+1)	5239	8,0
30	10 (+1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0,2 (+1)	20 (+1)	1890	5,38
31	0 (-1)	4 (+1)	0,4 (+1)	0,2 (+1)	20 (+1)	1633	7,39
32	10 (+1)	4 (+1)	0,4 (+1)	0,2 (+1)	20 (+1)	4730	5,17
33	5 (0)	2 (0)	0,2 (0)	0,1 (0)	15 (0)	11106*	6,83
34	5 (0)	2 (0)	0,2 (0)	0,1 (0)	15 (0)	11296*	7,0
35	5 (0)	2 (0)	0,2 (0)	0,1 (0)	15 (0)	11107*	7,0

*maiores incorporações de selênio

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 15 pode ser observada incorporação de selênio de 2375 ppm e produção de 7,0 g/L de biomassa no ensaio 1, sem adição de nenhum nutriente, com exceção de Na_2SeO_3 . Nesse mesmo ensaio, a levedura apresentou 100% de viabilidade celular (Tabela 16). Obteve-se incorporações acima de 11000 ppm de selênio nos ensaios 33, 34 e 35, referentes aos pontos centrais e no ensaio 5, com adição de nutrientes ao meio. Entretanto, a biomassa celular nessas condições variou de 6,67 a 7,0 g/L, indicando que não houve prevalência de crescimento celular.

O farelo de soja é uma fonte rica em proteínas, além de também possuir nutrientes como potássio, sódio, cloro, cálcio, fósforo e ser fonte de aminoácidos (ROSTAGNO, 2011). Além disso, a composição da biomassa vegetal varia de acordo com as condições ambientais durante o plantio e da armazenagem, constituindo uma fonte complexa de nutrientes.

A levedura *S. cerevisiae* SSS41 apresentou grande viabilidade celular ao final de 72 horas, com 100% de viabilidade na maioria dos ensaios estudados, sendo o mínimo de 86% de sobrevivência. O conteúdo de proteínas intracelulares foi avaliado após a lise das células, variando de 1,88 a 15,06 g/L (Tabela 16). Sabe-se que aproximadamente 40% da composição das leveduras é proteína bruta (ROSTAGNO, 2011) e devido ao seu alto teor proteico e baixo custo, esses microrganismos tem sido amplamente utilizados pela indústria, principalmente como componentes da ração animal (BNDES; CGEE, 2008).

Nos ensaios realizados no presente trabalho, observou-se o crescimento celular após 72 horas em todos os ensaios, comparando-se com a concentração celular no início do cultivo (Figura 15). Observa-se que tanto na ausência quanto na presença da suplementação com os nutrientes minerais a levedura foi capaz de crescer e se manter viável ao longo do processo fermentativo.

Tabela 16 – Viabilidade celular, conteúdo proteico intracelular e pH após 72 horas de cultivo com *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 de acordo com ensaios do planejamento fatorial completo 2⁵, com três repetições no ponto central.

Ensaio	Viabilidade celular (%)	Proteínas intracelulares (g/L)	pH
1	100	6,19	5,23
2	100	9,47	4,89
3	100	4,28	4,96
4	100	11,5	4,93
5	98	1,88	5,35
6	100	6,53	5,16
7	100	7,34	4,92
8	100	8,84	4,75
9	100	6,09	5,19
10	86	7,75	5,15
11	100	7,94	4,97
12	97	2,94	4,8
13	100	6,22	5,19
14	100	6,78	5,14
15	86	6,78	4,96
16	100	5,81	4,94
17	100	6,78	5,15
18	99	15,06	5,18
19	100	12,56	4,86
20	100	6,75	4,84
21	100	10,69	5,05
22	100	4,25	5,0
23	100	8,47	4,89
24	100	10,25	4,78
25	100	12,44	5,07
26	100	7,53	4,85
27	100	7,66	4,91
28	100	6,41	4,89
29	100	7,94	5,08
30	96	10,81	5,0
31	100	13,56	4,82
32	100	6,88	4,83
33	100	8,34	5,04
34	100	7,41	5,06
35	98	6,81	5,06

Fonte: Autoria própria.

Figura 15 – Crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 em diferentes condições experimentais de acordo com ensaios do planejamento fatorial completo 2^5 , com três repetições no ponto central.

Fonte: Autoria própria.

Sabe-se que o selênio é um elemento capaz de substituir o enxofre nos aminoácidos, porém não completamente, devido à sua alta reatividade (MAPELLI et al., 2011). Com isso, o enxofre, utilizado principalmente na síntese de aminoácidos sulfurados e de algumas vitaminas, continua presente meio e atuando no metabolismo microbiano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Além de ser necessário para os microrganismos, o enxofre também é requerido para o crescimento das plantas e faz parte de sua composição estrutural. No caso do farelo soja, podem estar presentes teores mais elevados, pois os cultivos de soja requerem melhores condições de fertilidade do solo, sendo o enxofre um dos nutrientes mais importantes para o crescimento vegetal (SFREDO; LANTMANN, 2007).

O consumo de açúcares dos hidrolisados durante o processo fermentativo variou de 0,42% a 56,46% (Figura 16), indicando que a levedura utilizou outras fontes de carbono para o crescimento. Além das proteínas, o farelo de soja também possui amido, fibras, lipídeos, entre outros compostos (ROSTAGNO, 2011). E, considerando a presença de casca (ZAMBOM et al., 2001; BELLAVER; SNIZEK, 2012), cuja composição é de origem lignocelulósica, a presença de açúcares de cinco carbono e de oligossacarídeos pode ter interferido negativamente no consumo de açúcares.

Além disso, quando o meio de cultivo contém fontes de carbono não fermentescíveis, as células têm maior requerimento de oxigênio e os radicais livres gerados durante a respiração podem causar estresse oxidativo às células (De LÉON et al., 2002).

Figura 16 – Porcentagem de consumo de açúcares após 72 horas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 em diferentes condições de acordo com ensaios do planejamento fatorial completo 2^5 , com três repetições no ponto central.

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar os efeitos das variáveis estudadas e de suas interações na produção de biomassa celular em um nível de 90% de confiança (Figura 17), observou-se que o Na_2SeO_3 foi o único suplemento adicionado aos meios de cultivo que apresentou efeito significativo, interferindo negativamente no crescimento. Dependendo de sua concentração no meio de cultivo, o selênio pode reduzir o crescimento celular.

Na Figura 17, observa-se que a interação positiva entre NH_4NO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ favoreceu a produção de biomassa, mesmo que isoladamente esses sais não tenham afetado o processo fermentativo, indicando que devem ser usados, preferencialmente, nos mesmos níveis. Por outro lado, o NH_4NO_3 também interagiu, mas de modo antagônico, com CaCl_2 e KH_2PO_4 . O amônio é uma das fontes de nitrogênio preferenciais pela levedura *S. cerevisiae*, sendo assimilado para produzir glutamato e glutamina, a partir dos quais são produzidos outros aminoácidos (CUETO-ROJAS et al., 2016). Em alguns casos, a interação entre minerais e outras substâncias, como aminoácidos, pode afetar o processo fermentativo (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009).

Figura 17 – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis e suas interações na produção de biomassa celular (A) e na incorporação de selênio pelas células (B), de acordo com planejamento fatorial completo 2^5 , com três repetições no ponto central. (X_1 = KH_2PO_4 ; X_2 = NH_4NO_3 ; X_3 = $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; X_4 = CaCl_2 ; X_5 = Na_2SeO_3).

Fonte: Autoria própria

A incorporação de selênio pelas células foi avaliada em um nível de 90% de confiança, mas não foi influenciada pela adição dos nutrientes, tanto isolados quanto de suas interações, conforme mostrado na Figura 17. As características complexas

do meio de cultivo utilizado estão sujeitas a mudanças composicionais e o emprego de microrganismos, passíveis de mutações, contribuem para a instabilidade do processo fermentativo.

A composição do meio de cultivo, assim como diversos fatores ambientais, pode influenciar o comportamento dos microrganismos. No caso da levedura *S. cerevisiae*, quando as células são cultivadas em meios com deficiência de nitrogênio ou presença de etanol podem formar pseudohifas como resposta às condições do meio (CECCATO-ANTONINI; SUDBERY, 2004). Além disso, concentrações elevadas de selênio podem causar danos no DNA das células (CAMPOS, 2012).

De acordo com a análise de variância (ANOVA) da biomassa celular (Tabela 17), com 90% de confiança, não foi possível gerar um modelo estatístico, apresentando um coeficiente de determinação de 0,47669.

Tabela 17 – Análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) para a produção de biomassa celular de *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 a partir de hidrolisado de farelo de soja.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
X_1	0,6400	1	0,63996	0,211426	0,650870
X_2	0,3346	1	0,33456	0,110531	0,743181
X_3	0,3562	1	0,35617	0,117669	0,735343
X_4	0,4418	1	0,44180	0,145959	0,706667
X_5	12,0115	1	12,01153	3,968302	0,060934
X_1X_2	9,0965	1	9,09653	3,005261	0,099193
X_1X_3	0,5127	1	0,51275	0,169398	0,685253
X_1X_4	1,0551	1	1,05512	0,348585	0,561873
X_1X_5	3,6504	1	3,65040	1,205999	0,285848
X_2X_3	9,9131	1	9,91312	3,275040	0,086190
X_2X_4	9,3341	1	9,33408	3,083740	0,095186
X_2X_5	0,0608	1	0,06078	0,020082	0,888801
X_3X_4	0,1792	1	0,17920	0,059203	0,810367
X_3X_5	0,1197	1	0,11972	0,039554	0,844469
X_4X_5	4,6818	1	4,68180	1,546746	0,228743
Erro Puro	57,5105	19	3,02687		
Total	109,8981	34			
R^2	0,47669				

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados e, considerando que o hidrolisado de farelo de soja é uma fonte complexa de nutrientes, infere-se que este possua os componentes mínimos para o crescimento da levedura *S. cerevisiae* SSS41, com a possibilidade de seu uso sem adição de suplementos minerais, com exceção de Na_2SeO_3 , que atua como fonte de selênio para o enriquecimento da biomassa microbiana. Entre as

vantagens da utilização do hidrolisado de farelo de soja como meio de cultivo, destaca-se seu baixo custo, uma vez que utiliza um resíduo vegetal proveniente do processo de beneficiamento do grão de soja (ZAMBOM et al., 2001; BELLAVER; SNIZEK, 2012) e não requer adição de suplementos, e atende às necessidades do microrganismo desejado, características consideradas importantes para meios de cultivo industriais (LIMA; BASSO, AMORIM, 2001).

5.10 Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* comercial em meio sintético simulando os açúcares de hidrolisados de resíduos vegetais

No meio formulado de acordo com os açúcares dos hidrolisados amiláceos de farelo de arroz e de soja a levedura *S. cerevisiae* LALVIN ICV D47 apresentou capacidade de crescimento, embora reduzida, com um aumento de duas vezes em relação à sua concentração inicial e crescimento igual a $6,5 \times 10^8$ cél/mL, com produção de $3,56 \text{ g/L} \pm 0,19$ de biomassa celular. Entretanto, o consumo de açúcares foi reduzido, de apenas 16% e o pH final igual $6,15 \pm 0,12$.

A glicose foi completamente consumida e houve discreta redução nos níveis de xilose, sem produção de etanol. Nos hidrolisados, além dos açúcares monoméricos, existem outros compostos que os microrganismos podem utilizar para seu crescimento, como oligossacarídeos, proteínas e lipídeos (ROSTAGNO, 2011).

Em relação ao meio YPX, observou-se consumo de 5% dos açúcares e crescimento de $5,89 \text{ g/L} \pm 0,38$, com $1,44 \times 10^9$ cél/mL, sem produção de etanol e pH final igual a $6,52 \pm 0,06$.

5.7 Produção de biomassa de levedura enriquecida com selênio a partir de melaço de cana-de-açúcar

Inicialmente, o melaço de cana-de-açúcar comercial foi analisado em relação ao teor de açúcares totais e redutores (Tabela 18) e, em seguida, diluído para aproximadamente 40 g/L, para uso no processo fermentativo. Essa concentração inicial de açúcares é a mais próxima dos valores utilizados para um enriquecimento inicial de levedura com selênio a partir de açúcar mascavo (OLIVEIRA, 2006) e também do conteúdo dos hidrolisados estudados, sendo o de milho o mais rico em açúcares.

Tabela 18 – Teor de açúcares totais e redutores em melaço de cana-de-açúcar *in natura* e diluído.

Açúcares (g/L)	<i>In natura</i>	Diluído
Totais	1072,5 ± 13,26	40,97 ± 4,73
Redutores	760,66 ± 1,89	38,55 ± 0,89

Fonte: Autoria própria.

Após 72 horas de cultivo houve produção de $4,17 \pm 0,24$ g/L de biomassa e incorporação de 6528 ± 10 ppm de selênio, com consumo de 92,9% dos açúcares (Figura 18) e $59 \pm 1\%$ de viabilidade celular. Em estudo realizado com 400 g/L de melaço de cana-de-açúcar, Esmielli e colaboradores (2012) conseguiram incorporação de até 287 ppm de selênio e produção de 53,69 g/L de biomassa de *S. cerevisiae*. Oliveira (2006), ao utilizar 50 g/L de sacarose, com 10 e 25 mg/L de selênio com *Saccharomyces cerevisiae*, obteve aproximadamente 4,5 g/L de biomassa celular, sendo a relação C:N um dos fatores mais importantes para a produção da biomassa microbiana.

Figura 18 – Crescimento celular e concentração de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 em melaço de cana-de-açúcar em função do tempo de fermentação.

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar o teor inicial de proteínas do meio de cultivo formulado à base de melaço de cana-de-açúcar, observou-se composição inicial de $4,17 \pm 0,78$ g/L de proteínas totais, com redução para $2,15 \pm 0,28$ ao final de 72 horas, indicando um consumo de 50,65% das proteínas. Entretanto, o conteúdo proteico intracelular foi de apenas $0,8 \pm 0,25$ g/L, o que pode estar relacionado à resistência da parede

celular ao processo de lise. Além disso, o melaço de cana-de-açúcar possui composição complexa e variável, sendo constituído por uma fração mineral, que pode conter mais de 20 tipos de metais e metaloides em diferentes proporções (KITAMURA, 2013), que podem interferir positiva ou negativamente no processo fermentativo.

Aproximadamente 35% do nitrogênio presente no melaço está na forma de proteínas, embora também apresente outros componentes nitrogenados, como ácidos nucleicos e aminoácidos livres (KITAMURA, 2013) e, observando o consumo de proteínas, pode-se inferir que a composição proteica natural é suficiente para o crescimento da linhagem *S. cerevisiae* SSS41. Entretanto, ocorreu uma acentuada queda no pH do meio de cultivo, o que pode ter levado as células a entrar na fase estacionária e morte, contribuindo para o crescimento celular reduzido. Em trabalho realizado por Oliveira (2006) foi observada redução no pH para 2,3, atribuído à liberação de CO₂ e de prótons H⁺ devido à produção de subprodutos e ao consumo do sal de amônio, presente no meio.

Com isso, sugere-se que fermentações, como a alcoólica, das quais parte da biomassa microbiana já é utilizada para alimentação animal, podem ser realizadas com leveduras enriquecidas com selênio, agregando valor ao produto e contribuindo para a saúde animal.

5.1 Fermentação em estado sólido para a produção de levedura enriquecida com selênio

A partir dos resultados da máxima capacidade absorviva, adicionou-se 7 mL de solução umedecedora aos substratos de fermentação sólida, volume que permitiu a umidificação sem que houvesse água livre no sistema de fermentação sólida, sendo a umidade obtida igual 80%. Esse mesmo valor foi mantido dentro da estufa com os frascos para evitar a perda de água no processo fermentativo.

Optou-se pelo uso da polpa celulósica como suporte para aeração porque o bagaço de cana-de-açúcar é rotineiramente utilizado na alimentação animal e, para que ocorra uma melhor absorção das fibras, há a remoção da lignina (SOUZA; SANTOS, 2002). Deste modo, torna-se possível utilizar a polpa celulósica na alimentação animal, obtida após fermentação em estado sólido, contendo biomassa celular e selênio, aumentando-se seu teor nutricional.

A espécie *Rhodotorula glutinis* é capaz de produzir celulasas (OIKAWA; TSUKAGAWA; SODA, 1998; MARTÍNEZ et al., 2006), tendo sido observado sua produção também em experimentos realizados em placas de Petri, motivo pelo qual foi escolhida para a fermentação em estado sólido. O meio formulado com polpa celulósica, farelo de arroz hidrolisado e selênio possibilitou que a levedura *R. glutinis* CCT-2186 aumentasse sua biomassa celular até $2,13 \times 10^9$ cél/mL após sete dias de fermentação, sendo esse valor, no momento do início do cultivo, de $1,22 \times 10^8$ cél/mL, adicionados na solução umedecedora em 2 g de substrato; e incorporação de 6038 ± 1219 ppm de selênio. Quando cultivada em meio sem selênio, essa linhagem apresentou crescimento similar, com produção de $2,0 \times 10^9$ cél/mL. Também foi observada produção de pigmentos devido à mudança de cor do substrato, que adquiriu aspecto levemente rosado, coloração característica da espécie *R. glutinis*, que é naturalmente produtora de carotenoides.

Devido ao crescimento celular observado é possível que a levedura tenha utilizado apenas a solução umedecedora para crescer ou que o tempo de cultivo tenha sido insuficiente. Entretanto, foi possível observar que o farelo de arroz resultante da hidrólise ácida pode ser utilizado na fermentação em estado sólido, aliado a um suporte que possibilite a aeração do meio, como é o caso da polpa celulósica. De mesmo modo, o hidrolisado de farelo de arroz pode ser aplicado como solução umedecedora e, também, como fonte de carbono e proteínas para o início do crescimento celular.

Com isso, o material obtido ao término do processo fermentativo é uma alternativa à alimentação animal por ser composto por substâncias que já são atualmente utilizadas como alimentos para ruminantes e suínos (SOUZA; SANTOS, 2002; ROSTAGNO, 2011).

6 CONCLUSÕES

Todas as leveduras avaliadas foram capazes de crescer na presença de 15 mg/L de selênio, mas o estresse causado reduziu o crescimento de algumas linhagens. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 apresentou excelente tolerância ao selênio em meios sintéticos e também quando cultivada em hidrolisados amiláceos suplementados com 10 a 20 mg/L de selênio.

Os hidrolisados de resíduos amiláceos são alternativas de baixo custo para a produção de biomassa enriquecida com selênio, pois são ricos em açúcares e proteínas. Em cultivos com a linhagem de *S. cerevisiae* SSS41 não é necessário sua suplementação com compostos inorgânicos, uma vez que a levedura foi capaz de produzir 7 g/L de biomassa celular e incorporar 2375 ppm de selênio. Com a adição de suplementos minerais foi possível aumentar essa produção até cerca de 11000 ppm de selênio, porém isso varia de acordo com a composição da biomassa vegetal e características do microrganismo, sendo que concentrações elevadas de selênio são tóxicas aos animais.

A fermentação em estado sólido demonstrou a capacidade de *Rhodotorula glutinis* CCT-2186 crescer em farelo de arroz hidrolisado e polpa celulósica na presença e ausência de selênio no meio.

A biomassa amilácea pode ser utilizada em cultivos submersos e também em fermentações em estado sólido, na quais, além do hidrolisado atuar como solução umedecedora, o farelo resultante pode ser incorporado a um suporte que permita a aeração do meio, constituindo uma fonte de carbono e, possivelmente, também proteica. A utilização de hidrolisados de resíduos vegetais como fontes de carbono e de nitrogênio na produção de leveduras enriquecidas com selênio é um método inovador e de baixo custo, sendo que, após a hidrólise, o material sólido resultante ainda pode ser utilizado para outras finalidades, como a fermentação em estado sólido.

O consumo de biomassa de levedura enriquecida com selênio apresenta benefícios à saúde, com redução do risco de diversas doenças. Além disso, a utilização de biomassa vegetal como substrato no processo fermentativo reduz os custos de produção.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, sugere-se que as seguintes etapas sejam realizadas:

- Determinação do teor de selenometionina por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) das biomassas de leveduras produzidas a partir de fermentação submersa e fermentação em estado sólido, uma vez que a maior parte do selênio incorporado é convertida a esse aminoácido;
- Estudo do processo fermentativo, utilizando hidrolisados vegetais, em biorreatores e análise da viabilidade econômica do processo;
- Quantificação e identificação dos oligossacarídeos e demais compostos presentes nos hidrolisados de farelos amiláceos;
- Ensaio de digestibilidade e biodisponibilidade em animais da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SSS41 enriquecida com selênio;
- Estudo da aplicação de outros farelos amiláceos e caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar e dos farelos antes e após a fermentação em estado sólido;
- Caracterização em relação ao teor de fibras, amido, proteínas, lipídeos totais, carotenóides e demais nutrientes das amostras de fermentação em estado sólido contendo as células de *Rhodotorula glutinis* CCT-2186.

REFERÊNCIAS

ACCORSINI, F. R. **Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono**. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

ALBUQUERQUE, P. M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã**. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ALMANZA, A. et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. **Food Bioscience**, v. 5, p. 64-72, 2014.

ALMONDES, K. G. S. et al. O papel das selenoproteínas no câncer. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 4, p. 484-488, 2010.

ALTERTHUMM, F. Elementos de microbiologia. In: BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANVISA. Consulta pública nº 80, de 13 de dezembro de 2004. Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 dez. 2004.

ARAKAKI, A. et al. Optimization of Biomass Production with Copper Bioaccumulation by Yeasts in Submerged Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1027-1034, 2011.

ARROYO-LÓPEZ, F. N. et al. Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 42-49, 2012.

PLANETA ARROZ. **Safra brasileira de arroz avançará 8,5% na temporada 2013/17**. 2016. Disponível em: <
http://www.planetaarroz.com.br/noticias/15147/Safra_brasileira_de_arroz_avancara_85_na_temporada_2016_17>. Acesso em: 28 ago. 2017.

BACH, B. et al. Effect of nitrogen addition during alcoholic fermentation on the final content of biogenic amines in wines. **Annals of Microbiology**, v. 61, p.185-190, 2011.

BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551–573, 2008.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.

BELLAVER, C.; SNIZEK, P. N. **Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves**. Concórdia: EMBRAPA, 2012, 20 p. Material técnico.

BERNO, L. I.; POETA, P. T.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Efeitos do selênio oriundo da torta de castanha-do-Brasil sobre a concentração de glutathione reduzida (GSH) em ratos Wistar. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 2, p. 231-239, 2010.

BNDES (BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO); CGEE (CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS) (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.

BRONZETTI, G. et al. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. **Mutation Research**, v. 496, p. 105-115, 2001.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 399-403, 2004.

CADETE, R. M. **Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose, L-arabinose ou D-celobiose e produtoras de celulases e xilanases associadas à madeira em decomposição**. 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. Porto Alegre: ARTMED Ed., 2000.

CAMPOS, D. C. **Avaliação da função do selênio no estresse oxidativo induzido pelo arsenato em células de *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 139 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2012.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Estratégias de preparação do inóculo para bioprodução de xilitol utilizando hidrolisado de palha de trigo. In: BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY, 5º SIPAL, p. 117-120, 2005.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-54, 2009.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.

CAVALLINI, C. M. **Estudo da modificação ácido-etanólica do amido de mandioca seguida de moagem**. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2009.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; SUDBERY, P. E. Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 173-181, 2004.

ČERTÍK, M. et al. Effect of Selenium on Lipid Alternations in Pigment-forming Yeasts. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, p. 45-51, 2013.

CHÁVEZ, J. D. R. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos**. 2008. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar**, primeiro levantamento, abril/2017. Brasília: CONAB, 2017a.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, sétimo levantamento, abril/2017. Brasília: CONAB, 2017b.

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias primas amiláceas visando a obtenção de etanol**. 2010. 109 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

DE LEÓN, C. A. P. et al. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 602-610, 2002.

DEMIRCI, A.; POMETTO, A. L. Enhanced Organically Bound Chromium Yeast Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 531-536, 2000.

DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 199-224, 1986.

DIMAROGONA, M; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1-8, 2012;

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 360-364, 1986.

DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factor affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 944-956, 1994.

ELLIS, D. et al. **Descriptions of medical fungi**. 2nd ed. Adelaide: Nexus Print Solutions, 2007.

EMBRAPA. **Deficiência de microelementos e reprodução**. 2014. Disponível em: <<http://old.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/ct/ct23/04deficienciasmicroelementos.html>> Acesso em: maio 2017.

ERICZON, C.; PETTERSSON, J.; OLIN, A. Interference from iodide in the determination of trace level selenium. **Talnta**, v. 37, n. 7, p. 725-730, 1990.

ESMAEILI, S. et al. An Experimental Design for Production of Selenium-Enriched Yeast. **World Applied Sciences Journal**, v. 19, n. 1, p. 31-37, 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n. 3, 2002.

FONSECA, S. B. et al. Influence of levels and forms of selenium associated with levels of vitamins C and E on the performance, yield and composition of tilapia fillet. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 109-115, 2013.

FREITAS, S. C. et al. Meta-análise do teor de selênio em castanha-do-brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 1, p. 54-62, 2008.

GAENSLY, F. et al. Iron enriched *Saccharomyces cerevisiae* maintains its fermenting power and bakery properties. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 980-983, 2011.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775–4800, 2010.

GOSHIMA, T. et al. Ethanol fermentation from xylose by metabolically engineered strains of *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 5, p. 551-554, 2013.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n.6, p. 1500-1503, 2009.

GRACIANO, G. G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 339-354, 2008.

GRAHAM, H.; SANTOS, T. T.; WADT, G. **Modo de ação de produtos à base de leveduras na nutrição animal**. 2009. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/cet/img/20091105_leveduras.pdf> Acesso em 27 abr. 2017.

GRANBIO. **Bioflex I**. Disponível em <<http://www.granbio.com.br/conteudos/biocombustiveis/>>. Acesso em 27 abr. 2017.

GRAVENA, R. A. et al. Egg quality during storage and deposition of minerals in eggs from quails fed diets supplemented with organic selenium, zinc and manganese. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2767-2775, 2011.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 937-953, 2007.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. **Food Bioscience**, v. 5, p. 64-72, 2014.

HOSKEN, F. M. **Avaliação nutricional da levedura torula (*Candida utilis*) de vinhaça em dietas para coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e cutias (*Dasyprocta spp.*)**. 2013. 92 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

ISHIHARA, H. et al. White muscle disease in humans: myopathy caused by selenium deficiency in anorexia nervosa under long term total parenteral nutrition. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 67, p. 829-830, 1999.

IZARD, J.; LIMBERGER, R. J. Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 411-418, 2003.

JIAMYANGYUEN, S.; SRIJESDARUK, V.; HARPER, W. J. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 55-64, 2005.

KAUR, T.; BANSAL, M. P. Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* at different sodium selenite concentrations. **Nutrición Hospitalaria**, v. 21, p. 704-708, 2006.

KITAMURA, D. H. **Produção de biomassa probiótica e enriquecida com selênio de *Saccharomyces boulardii* utilizando melaço de cana-de-açúcar**. 2013. 137 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

KONETZKA, W. A. Microbiology of metal transformations. In: WEINBERG, E. D. (Ed). **Microorganisms and Minerals**. New York: Marcel Dekker, 1977. p. 317-337.

KUYPER, M. et al. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 655-664, 2004.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Ed). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LIMA, L. G.; DOMINGUES, J. L. Uso do selênio na produção de bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 4, n. 4, p. 462-474, 2007.

LOCK, L.; L.; CORBELLINI, V. A.; VALENTE, P. Lipases produced by yeasts: powerful biocatalysts for industrial purposes. **Tecno-Lógica**, v. 11, n. 1, p. 18-25, 2007

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANIKANDAN, K; VIRUTHAGIRI, T. Optimization of C:N ratio of the medium and fermentation conditions of ethanol production from tapioca starch using co-culture of *Aspergillus niger* and *Sacharomyces cerevisiae*. **International Journal of Chemical Techonology Research**, v. 2, n. 2, p. 947-955, 2010.

MAPELLI, V. et al. Metabolic and bioprocess engineering for production of selenized yeast with increased content of seleno-methylselenocysteine. **MetabolicEngineering**, v. 13, p. 282-293, 2011.

MARTINIANO, S. E. et al. Evaluation of Rice Bran Extract as a Nitrogen Source for Improved Hemicellulosic Ethanol Production from Sugarcane Bagasse by New Xylose-Fermenting Yeast Strains Isolated from Brazilian Forests. **Sugar Tech**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2014.

MARTÍNEZ, C. et al. Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 407-413, 2006.

MARTINS, S. M. M. K. et al. Viabilidade econômica da suplementação de selênio orgânico na dieta de cachacos. In: SIMPÓSIO DE SUSTENTABILIDADE & CIÊNCIA ANIMAL, 3., 2013, Pirassununga. **Resumos...** Pirassununga: USP, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORIKAWA, K.; NISHIHARI, K. Effects of concentration dependence of retrogradation behaviour of dispersions for native and chemically modified potato starch. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 395-401, 2000.

NARAYANA, B. et al. Spectrophotometric Determination of Selenium Using Potassium Iodide and Starch as Reagents. **Microchimica Acta**, v. 141, p. 175-178, 2003.

NICODEMO, M. L. F. **Reflexões sobre o uso de selênio em misturas minerais**. Campo Grande: EMBRAPA gado de corte, 2002. 3 p. Comunicado, ISSN 1516-9308.

OIKAWA, T.; TSUKAGAWA, Y.; SODA, K. Endo- β -glucanase secreted by psychrotrophic yeast: purification and characterization. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 9, p. 1751-1756, 1996.

OLIVEIRA, C. G. R. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rica em organoselênio**. 2006. 77 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

OLIVEIRA, T. R. et al. Enzimas, inibidores de proteases e atividade antibacteriana de extratos aquosos de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 3250-3261, 2014.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.

ØVERLAND, M. et al. Evaluation of *Candida utilis*, s and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 402-403, p. 1-7, 2013.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol, part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. . **Bioresource Technology**, v. 65, p. 191-201, 1998.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006, 6 p. Material técnico.

PÉREZ-CORONA, M. T. et al. Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1050-1055, 2011.

PHILIPPINI, R. R. **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas**. 2012. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

PUC-RIO (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO DE JANEIRO). Certificado Digital. 2005. Disponível em: <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/5854/5854_3.PDF>. Acesso em: 25 abril 2017.

RAÍZEN. **Etanol de segunda geração.** Disponível em: <http://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao>>. Acesso em: 27 abr. 2017.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

ROSTAGNO, H. S. (Ed.). **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.** 3ª ed. Viçosa: UFV/DZO, 2011.

RAJASHREE, K.; MUTHUKUMAR, T. Preparation of selenium tolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, p. 46-53.

ROBSON, S.; PLANT, J. W. Selenium deficiency in sheep. **Primefact 471**, v. 471 2007.

RODRIGUES, A. C. et al. Quantificação de selênio e zinco em frutos oleaginosos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 52., 2012, Recife. **Anais...** Recife: CBQ, 2012.

ROEPCKE, C. B. S.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Optimized production of *Pichia guilliermondii* biomass with zinc accumulation by fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, V. 163, p. 33-42, 2011.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SALES, N. S. **Biodisponibilidade de selênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) e seu potencial anticarcinogênico na mucosa do cólon de ratos.** 2007. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M. et al. Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC–ICP-MS. **Talanta**, v. 88, p. 272-276, 2012.

SARROUH, B.; SILVA, S. S. Repeated batch cell-immobilized system for the biotechnological production of xylitol as a renewable green sweetener. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 2101-2110, 2013.

SCHNEIDER, T. et al. Utilization of soluble starch by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 3, p. 57-63, 2013.

SEIXAS, T. G.; KEHRIG, H. A. O selênio no meio ambiente. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 264-276, 2007.

SHUPE, A. M.; LIU, S. Ethanol fermentation from hydrolysed hot-water wood extracts by pentose fermenting yeasts. **Biomass & Bioenergy**, v. 39, p. 31-38, 2012.

SILVA, C. C. F.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M. S. **Caracterização química de farelo de arroz in natura e extrusado**. 2011. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/63ra/conpeex/mestrado/trabalhos-mestrado/mestrado-celia-caroline.pdf>>. Acesso em: maio 2017.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Florianópolis: Editora UFSC, 2003.

SINGH, P. et al. *Rhodotorula svalbardensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from cryoconite holes of Ny-Ålesund Arctic. **Cryobiology**, v. 68, p. 122-128, 2014.

SLININGER, P. J.; GORSICH, S. W.; LIU, Z. L. Culture nutrition and physiology impact the inhibitor tolerance of the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 778-790, 2009.

SOUZA, O.; SANTOS, I. M. **Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pelos ruminantes**. Aracaju: EMBRAPA, 2002, 3 p. Material técnico.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 134-144, 2003.

TEIXEIRA, T. S.; SIQUEIRA, F. G.; BATISTA, R. D. Enzimas microbianas de desconstrução da parede celular: novas abordagens. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 6, p. 27-37, 2016.

THOMAS, D.; SURDIN-KERJAN, Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 4, p. 503-532, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TROMBINI, F. R. M. **Caracterização de produtos extrusados de misturas de farinha de soja, fécula e farelo de mandioca**. 2010. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

TSIGIE, Y. A. et al. Oil production from *Yarrowia lipolytica* polg using rice bran hydrolysate. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012. doi:10.1155/2012/378384.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Silvio Silvério da Silva; Sabrina Evelin Martiniano; Rafael Rodrigues Philippini. **Processo de produção de leveduras enriquecidas com selênio a partir de resíduos vegetais**. BR 10 2016 024902 3, 25 out. 2016.

URBANO, L. H. **Fermentação etanólica em mostos de hidrolisados de amido de mandioca**. 2012. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VIARO, R. S.; VIARO, M. S.; FLECK, J. Importância bioquímica do selênio para o organismo humano. **Disciplinarum Scientia**, v. 2, n. 1, p. 17-21, 2001.

VILLAS-BÔAS, S. G. **Conversão do bagaço de maçã por *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus* visando a produção de suplemento para ração animal**. 2001. 137 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

WALKER, G. M. **Yeast: physiology and biotechnology**. Scotland: John Wiley & Sons, 2000.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 748-753, 2009.

YANG, B.; WANG, D.; WEI, G.; LIU, Z.; GE, X. Selenium-enriched *Candida utilis*: Efficient preparation with l-methionine and antioxidant capacity in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 27, p. 7-11, 2013.

YIN, H. et al. Optimization of natural fermentative medium for selenium-enriched yeast by D-optimal mixture design. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, 327-331, 2009.

YIN, H.; FAN, G.; GU, Z. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM). **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, 666-669, 2010.

ZAMBOM, M. A. et al. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Maringá**, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001.

ZULLAIKAH, S. et al. A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1889-1896, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva de calibração para análise de proteínas totais e reativos utilizados pelo método de Lowry (1951).

Reativo A: 20 g de Na_2CO_3 ;
4 g de NaOH ;
 H_2O q.s.p 1000 mL.

Reativo B: 2 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
 H_2O q.s.p 100 mL.

Reativo C: 4 g de tartarato de sódio
 H_2O q.s.p 100 mL.

APÊNDICE B – Curva de calibração para análise de lipídeos totais pelo método da fosfovanilina (IZARD; LIMBERGER, 2003).

APÊNDICE C – Curva de calibração para análise de fenóis totais (SIMÕES et al., 2003).

APÊNDICE D – Curva de calibração para análise de açúcares totais pelo método do Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

APÊNDICE E – Curva de calibração para análise de açúcares redutores pelo método do DNS (ácido-2,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

APÊNDICE F – Curva de calibração para análise de selênio (NARAYANA et al., 2003).