

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

LETICIA SCHMIDT MEDEIROS

**RESÍDUO DO BENEFICIAMENTO DA SOJA: UMA ALTERNATIVA
PARA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE MEIO DE CULTIVO
PARA CRESCIMENTO DE MICRORGANISMO PROBIÓTICO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2019

LETICIA SCHMIDT MEDEIROS

**RESÍDUO DO BENEFICIAMENTO DA SOJA: UMA ALTERNATIVA
PARA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE MEIO DE CULTIVO
PARA CRESCIMENTO DE MICRORGANISMO PROBIÓTICO**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Profa. Dra. Priscila Vaz de Arruda.

TOLEDO
2019

TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso

RESÍDUO DO BENEFICIAMENTO DA SOJA: UMA ALTERNATIVA PARA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE MEIO DE CULTIVO PARA CRESCIMENTO DE MICRORGANISMO PROBIÓTICO

por

LETÍCIA SCHMIDT MEDEIROS

Monografia apresentada às 15:00 horas do dia 26 de junho de 2019 como requisito parcial para obtenção do título de TECNÓLOGO EM PROCESSOS QUÍMICOS, Curso de Tecnologia em Processos Químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo-assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Patrícia Schaker
UTFPR Câmpus Toledo

Prof. Dr. Cleversson Busso
UTFPR Câmpus Toledo

Profa. Dra. Priscila Vaz de Arruda
UTFPR Câmpus Toledo
Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara
Coordenador do TCC

O “Termo de Aprovação” encontram-se assinados e devidamente depositados na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos, UTFPR Câmpus Toledo -PR, conforme Normativa Conjuntiva 01/11 da PROGRAD/PROP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Priscila Vaz de Arruda por todo apoio, paciência e dedicação ao longo da elaboração do meu TCC.

Agradeço aos meus pais, Alaíde Medeiros Gonçalves e Salete Schmidt, que apesar de todas as dificuldades, me ajudaram durante este período tão importante de formação acadêmica.

Aos amigos, por me incentivarem nos momentos mais difíceis.

Agradeço a COAMO por disponibilizar os resíduos para a pesquisa.

E por fim, a Universidade Tecnológica Federal de Toledo por me proporcionar a estrutura e condições necessárias para concluir este curso.

RESUMO

MEDEIROS, Letícia Schmidt. **Resíduo do Beneficiamento da soja: uma alternativa para suplementação nutricional de meio de cultivo para crescimento de microrganismo probiótico.** TCC (Curso de Tecnologia em Processos Químicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2019.

Probióticos são microrganismos que atuam diretamente no equilíbrio da microbiota intestinal beneficiando aqueles que o consomem. Os mesmos podem ser ingeridos por meio de alimentos ou na forma de medicamento liofilizado. A busca por matérias primas renováveis e de baixo custo para a obtenção de diferentes insumos é crescente nos últimos tempos, principalmente devido ao fato de possibilitar a redução de custo na formulação de insumos com alto valor agregado, como os probióticos. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, obtendo grande quantidade de um material lignocelulósico, considerado subproduto de sua colheita e beneficiamento, composto por casca, palha e vagem. Este material vem sendo utilizado para a produção de ração para alimentação animal, porém devido à sua riqueza em nutrientes, principalmente como fonte de vitaminas, minerais e nitrogênio apresenta elevado potencial para ser aproveitado na formulação de meios de cultivo microbiano. Neste sentido, realizou-se a verificação do efeito de diferentes concentrações do extrato deste material de forma a suplementar as fontes tradicionais de nitrogênio empregadas durante o cultivo de biomassa probiótica da levedura *Saccharomyces boulardii*. O extrato foi obtido por tratamento térmico com água sendo autoclavado a 111°C por 15min. A análise de nitrogênio total foi feita pelo método de Kjeldahl e apresentou uma concentração 43,7mg/L de nitrogênio no extrato do resíduo do beneficiamento da soja (200 g/L) utilizado no presente trabalho. Cultivos foram realizados em diferentes proporções de meio comercial e extrato, sendo os cultivos realizados sob agitação mecânica por 48 horas, 30°C e 200rpm. Por meio das análises estatísticas pelos métodos de Dunnett 5% e Turkey 5% concluiu-se que a utilização de uma maior quantidade de extrato do resíduo da soja no meio de cultivo não reduz a formação de células de forma significativa, ou seja, é possível reduzir o custo de produção do probiótico sem variar muito a produtividade. Como este trabalho tem caráter inovador, bem como ainda se trata de resultados iniciais, estes se mostraram promissores, demonstrando o potencial do extrato do resíduo do beneficiamento da soja para otimização do meio de cultivo para produção de probióticos.

Palavras Chaves: resíduo do beneficiamento da soja, suplementação nutricional, *Saccharomyces boulardii*.

RESUMO

MEDEIROS, Letícia Schmidt. **Residue of the Processing the Soybean: an alternative for nutritional supplementation of the medium used on the growth of probiotic microorganism.** TCC (Course of Technology in Chemical Processes), Federal Technological University of Paraná. Toledo, 2019.

Probiotics are microorganisms that act directly on the balance of the intestinal microbiota benefiting those who consume it. They may be ingested by food or in the form of lyophilized medicament. The search for renewable and low-cost raw materials to obtain different inputs is increasing in recent times, mainly due to the fact that it allows the reduction cost in the formulation of inputs with high added value, such as probiotics. Currently, Brazil is the second largest producer of soybeans in the world, obtaining a large quantity of lignocellulosic materials, considered as by-products that came from the harvest and processing, as is the case of the soy industry, which produces a rich material in bark, straw and pod. This material has been used for the production animal food, but due to present a lot of nutrients, mainly as a source of vitamins and minerals presents high potential to be used in the formulation of culture medium for microorganisms. In that sense, it was verified the effect of different concentrations of the extract of these materials in order to supplement the traditional sources of nitrogen used during the cultivation of probiotic biomass of the yeast *Saccharomyces boulardii*. The extract was obtained by heat treatment with water being autoclaved at 111 ° C for 15min. The total nitrogen analysis was done by the Kjeldahl method and presented a concentration of 43.7 mg / L of nitrogen in the soybean extract residue (200 g / L) used in the present work. Cultures were carried out in different proportions of commercial medium and extract, and the cultures were carried out under agitation for 48 hours, 30 ° C and 200rpm. By Dunnett 5% and Turkey 5% statistical analyzes it was concluded that the use of a higher amount of soybean residue extract in the culture medium does not reduce cell formation significantly, so it is possible to reduce the cost of production of the probiotic without varying the productivity. As this work has an innovative character, as well as initial results, these have shown to be promising, demonstrating the potential of the residue extract from the soybean processing to optimize the culture medium for probiotic production..

Key words: Residue of soybeans. Nutritional supplementation. *Saccharomyces boulardii*.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

DNS	Acido 3,5-dinitrosalicílico
[]	Concentração
YFS	Extrato do farelo de soja
YM	Yeast Malt extract
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
g	Gramas
hrs	Horas
MC	Meio Comercial
mL	Mililitros
min	Minuto
L	Litro
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos dos principais microrganismos probióticos	17
Tabela 2- Composição centesimal aproximada (g/100g) e valor energético (Kcal/100g) da soja e resíduo.....	22
Tabela 3- Conteúdo de aminoácidos essenciais (EAE) do grão e do resíduo de soja (mg aminoácidos/g de proteína).....	23
Tabela 4- Experimentos realizados para se verificar a necessidade da suplementação nutricional com extrato de resíduo de soja	29
Tabela 5- Biomassa celular produzida (ΔX) açúcar consumido (ΔS), conversão de substrato em célula (YX/S) e produtividade(P) para o tempo de 16 horas de fermentação	37
Tabela 6- Análise estatística do Crescimento celular por Turkey 5% e Dunnett 5% para 48 horas de cultivo.....	38
Tabela 7- Estimativa de preço médio dos componentes do meio de cultivo sintético	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Evolução área de soja no Brasil.....	20
Figura 2 -Comportamento da produtividade de soja no Brasil.....	21
Figura 3 -Estrutura da planta de soja.....	21
Figura 4 -Estrutura dos materiais lignocelulósico.....	23
Figura 5 -Estrutura da celulose.....	24
Figura 6 -Estrutura da Hemicelulose.....	24
Figura 7 -Estrutura da celulose envolta por microfibrilas.....	25
Figura 8 -Percussores primários da lignina: a) álcool trans-p-cumarílico; b) álcool trans-coniferílico e c) álcool trans-sinapílico.....	25
Figura 9 -Estrutura básica do aminoácido.....	26
Figura 10 -Cinética de crescimento da biomassa celular em todas as condições.....	34
Figura 11 -Consumo de glicose (g/L) durante o cultivo para todas as condições.....	35
Figura 12 -Blockspot de comparação da diferença de concentração celular (g/L) pelas condições de cultivo.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3.1	PROBIÓTICOS	16
3.1.1	<i>Saccharomyces boulardii</i>	17
3.2	MEIO DE CULTURA	18
3.3	SOJA	20
3.3.1	Aspectos econômicos da soja	20
3.3.2	Estrutura da planta da soja.....	21
3.4.3	Resíduos do beneficiamento da Soja	22
3.5	MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	23
3.5.1	Celulose	24
3.5.2	Hemicelulose	24
3.5.3	Lignina	25
3.5.4	Proteína	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	RESÍDUO DO BENEFICIAMENTO DA SOJA	27
4.2	OBTENÇÃO DE EXTRATO DE RESÍDUO DE SOJA	27
4.2.1	Padronização do extrato de resíduo de soja	27
4.3	MICROORGANISMO E MEIOS DE CULTURA	28
4.3.1	Levedura	28
4.3.2	Meio para ativação e manutenção do micro-organismo	28
4.3.3	Meio para preparo do pré-inóculo e inóculo.....	28
4.3.4	Meios e condições de produção de biomassa	28
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	30
4.4.1	Açúcares Redutores	30
4.4.1.1	Preparo da curva padrão de glicose	30
4.4.2	Determinação da concentração celular	30
4.4.3	Determinação do pH	31
4.4.4	Determinação de Nitrogênio	31
4.5	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS	31
4.5.1	Fator de conversão de substrato em célula	31

4.5.2	Produtividade	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
6	CONCLUSÕES.....	40
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento na expectativa de vida da população, aliado ao crescimento exponencial dos custos médico hospitalares, a sociedade necessita vencer novos desafios, através do desenvolvimento de novos conhecimentos científicos e de novas tecnologias que resultem em modificações importantes no estilo de vida das pessoas. A nutrição precisa se adaptar a esses novos desafios, através do desenvolvimento de novos conceitos. Nesse contexto, os alimentos funcionais e especialmente os probióticos e prébióticos são conceitos que vem se tornando cada vez mais comun em nosso dia-a-dia (ROBERFROID, 2002).

Assim que um animal nasce inicia-se a colonização de uma complexa e dinâmica população de microrganismos em seu trato gastrointestinal, sendo a microbiota constituída majoritariamente por bactérias que podem ser classificadas como permanentes, também chamadas de nativas, ou temporárias. A constituição da microbiota depende do contato direto com microrganismos presentes na alimentação e meio ambiente do animal, além de ser influenciada por fatores genéticos. As bactérias presentes no intestino estão ligadas diretamente a nutrição, uma vez que pelo processo de fermentação metabolizam vários substratos formando produtos finais como ácidos graxos de cadeia curta e gases, contribuindo positivamente para as necessidades energéticas diárias do hospedeiro (OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008). Ademais, são relacionadas a síntese de vitaminas e a absorção de minerais, como o magnésio e o cálcio (SILVESTRE, 2016).

Além disso, o equilíbrio da microbiota intestinal está diretamente relacionado a resposta imune do intestino, pois impede que microrganismos potencialmente patogênicos nele presentes exerçam seus efeitos. Pelo contrário, o desequilíbrio desta microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, conseqüentemente, infecção bacteriana. As investigações nessa área têm atraído muito interesse aos probióticos, que são suplementos microbianos viáveis que alteram a microbiota presente no intestino e exercem efeitos benéficos a saúde, atuando como anti-inflamatório, antialérgico, regulador da flora intestinal, além de auxiliar no aumento da imunidade (BADARÓ et al., 2008; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008).

Os probióticos vem sendo associados efeitos benéficos, tais como atividade antimicrobiana, melhoria no metabolismo da lactose, propriedades antimutagênicas, propriedades anticarcinogênicas, propriedades antidiarréicas, estimulação do sistema imune, melhoria da síndrome do intestino irritável e supressão de infecções causadas por *Helicobacter pylori* (PIMENTEL, 2011).

A levedura não patogênica *Saccharomyces boulardii* tem sido prescrita nos últimos 30 anos para profilaxia e tratamento de doenças diarreicas causadas por bactérias (KELESIDIS,

2012). Ela foi isolada do fruto da lichia na Indochina por volta dos anos 50, e caracterizada como probiótica, por atuar em pH ácido entre 4,5 e 6,5, temperatura ótima a 37 °C, além de propriedades que favorecem sua atuação no trato gastrointestinal (CZERUCKA et al., 2007).

Entretanto, poucos são os estudos que avaliam o seu crescimento e produção de biomassa probiótica em meios alternativos (resíduos agroindustriais) sendo este o objetivo do presente trabalho. Levando em consideração que o Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, com uma previsão de safra 2019/2020 de 123 milhões de toneladas segundo a USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) e que o estado do Paraná é o segundo maior produtor deste grão, a quantidade de resíduos gerados é grande e se os processos produtivos não fizerem seu aproveitamento correto, pode ocasionar problemas de poluição ambiental. Durante a colheita e beneficiamento da soja, são gerados materiais lignocelulósicos como a palha (caule, folhas), vagem e casca. A palha não é aproveitada no processamento da colheita, sendo separada e deixada no campo para servir de proteção ao solo (EMBRAPA, 2007). Já a vagem é um resíduo obtido durante a seleção e extração do óleo vegetal da soja e é aproveitada como fonte proteica na fabricação de rações para as criações de frangos e suínos. Quanto às cascas, estas são removidas para produzir um farelo com alto teor de proteína, os quais também são destinados à ração animal (MARTINS, 2015; FRANCHINI et al., 2016).

De acordo com Liu e Li (2017), cada tonelada de soja processada gera cerca de 75 kg de casca, a qual é o maior resíduo da agroindústria dessa cultura. Ainda de acordo com estes autores a composição química da casca de soja depende da eficiência do processo de descascamento, e assim, as cascas podem conter quantidades de celulose (29-51%), hemiceluloses (10–25%), lignina (1-4%), pectinas (4-8%), proteínas (11-15%) e extrativos em concentrações variadas. Sendo que no presente trabalho além da casca da soja também foram utilizados as vagens e entrecasas separadas durante o beneficiamento da soja.

Atualmente, várias pesquisas têm sido desenvolvidas na área de produção de compostos de alto valor agregado utilizando como precursores materiais lignocelulósicos que são considerados resíduos com pouco ou nenhum valor financeiro. Esses materiais englobam basicamente resíduos agroindustriais como cascas, palhas e bagaços. O acúmulo desses materiais na natureza gera problemas de cunho ambiental, devido à decomposição descontrolada do mesmo por falta de destino adequado, e também de cunho econômico, tendo em vista que apenas uma pequena parcela desses resíduos são subaproveitados no beneficiamento de rações para animais e adubos ecológicos, ocorrendo a perda em potencial do uso dos mesmos.

Neste trabalho, desenvolveu-se em escala laboratorial uma tecnologia que permite o cultivo de micro-organismo probiótico, no caso, a levedura *Saccharomyces boulardii*,

utilizando o resíduo do beneficiamento da soja (vagem, casca e entrecasca) como fonte alternativa de suplementação de nitrogênio, visando à obtenção de biomassa partir de meio de cultivo alternativo e de baixo custo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a suplementação de meio de cultivo a partir do uso do resíduo do beneficiamento da soja (vagem e casca) como fonte de nitrogênio alternativa para obtenção de biomassa probiótica (*Saccharomyces boulardii*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o resíduo do beneficiamento da soja (vagem e casca) quanto ao teor de nitrogênio;
- Avaliar as cinéticas de produção de biomassa em escala de bancada a partir da utilização de diferentes proporções de extrato de resíduo do beneficiamento da soja;
- Selecionar o meio que possibilite o maior rendimento de biomassa de *Saccharomyces boulardii*, a partir da suplementação nutricional com extrato de resíduo do beneficiamento da soja.

3.1 PROBIÓTICOS

Segundo a ANVISA, probióticos são os microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Os probióticos podem ser ingeridos de forma natural, por meio de alimentos ou medicamentos (DE MENEZES COPPOLA, 2004).

Ao nascer os mamíferos iniciam o desenvolvimento da microbiota intestinal, a qual é influenciada pela exposição contínua aos micro-organismos da dieta, do ambiente e por fatores genéticos. (KITAMURA, 2013 apud LARSEN E MONIF, 2001; ZOETENDAL et al., 2001). Uma microbiota saudável promove o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal. Contudo, o desequilíbrio da flora intestinal pode ocorrer por diversos motivos, como a ingestão de antibióticos, consumo excessivo de álcool, estresse, fumo, alimentação desequilibrada e idade que acarreta na diminuição da imunidade, no aumento da probabilidade de infecções, inflamações e condições degenerativas. (KITAMURA, 2013 apud BENGMARK, 1998).

Os microrganismos nativos da flora intestinal assim como os probióticos atuam contra microrganismos patogênicos principalmente por meio da competição por espaço e nutrientes. Quando a microbiota normal é alterada cria-se um vácuo biológico que propicia a proliferação de microrganismos transitórios e outros patogênicos sobreviventes. Desta forma, para reestabelecer o equilíbrio da microbiota o uso de uma terapia a base de probióticos vem sendo recomendada, pois os mesmos preenchem esses espaços até que os microrganismos benéficos os ocupem (DOS SANTOS, 2011, KITAMURA, 2013 apud ISOLAURI, NEUHANNIG, 2019; SALMINEN e OUWEHAND, 2004; SANDERS, 2008).

A Tabela 1, contém exemplos dos principais microrganismos descritos com características probióticas.

Tabela 1- Exemplos dos principais microrganismos probióticos

Gênero <i>Lactobacillus</i>	Gênero <i>Bifidobacterium</i>	Outras
<i>spp.</i>	<i>spp.</i>	
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. delbreuckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (LB)	<i>B. adolescentes</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Dextranum</i>
<i>L. fermentum</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>

Fonte: OLIVEIRA (2002) apud COLLINS, et al (1998).

3.1.1 *Saccharomyces boulardii*

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura probiótica que foi primeiramente isolada da casca de frutas nos anos 50 e deste então é usada como probiótico, adicionada a dieta alimentar com os objetivos de equilibrar a flora intestinal (MÜLLER, 2006 apud SURAWICZ et al. 1989; RASIC, 1983).

Grande parte dos probióticos comercializados para consumo humano são bactérias lácticas, no entanto, o uso de leveduras com propriedades bioterapêuticas comprovadas, como a *Saccharomyces boulardii*, apresentam vantagens quando comparadas com as bactérias. Tais como, a resistência natural a antibióticos, maior resistência a mudanças ambientais abruptas (gradientes de pH, alterações osmóticas, etc.) e menores exigências nutricionais do que as bactérias lácticas, o que influencia diretamente no custo de produção (CZERUCKA, 2007; PARDO et al., 2009). Pardo et al (2009), ainda citam, a capacidade de maior tolerância aos ácidos dos fungos em relação às bactérias, uma característica importante uma vez que para chegar ao intestino o probiótico deve resistir ao baixo pH do estômago.

Contudo, esta levedura não pertence a microbiota do trato intestinal, apesar de conseguir sobreviver e atuar neste local sendo eliminada do sistema digestivo em pouco tempo após a interrupção de sua ingestão. (LOPES, 2010 apud MARTINS et al., 2005).

Entretanto, devido ao seu poder probiótico já comprovado, a levedura *Saccharomyces boulardii* tem sido testada em relação a sua eficácia clínica em diversos tipos de doenças

agudas, incluindo diarreia relacionada ao uso de antibióticos, infecção por *Clostridium difficile*, diarreia do viajante e doença de Crohn (MCFARLAND, 2010).

A *Saccharomyces boulardii* é insensível à ação de sucos digestivos e de antibacterianos. Essa última propriedade é favorável, pois, possibilita a atuação da levedura no controle da microbiota intestinal ainda durante a antibioticoterapia (DOS SANTOS, 2011)

Indo além da saúde humana, as pesquisas voltadas a saúde animal também estão focando a introdução de probióticos, como a *Saccharomyces boulardii* a ração dos animais, com o objetivo de reduzir o uso de antibióticos, uma vez que os efeitos do probiótico nos animais se assemelham ao dos humanos (GABOARDI, 2015).

3.2 MEIO DE CULTURA

Os microrganismos são adaptados ao meio ambiente natural onde vivem, e nele existem fatores limitantes ao seu crescimento, como as fontes de carbono e nitrogênio, que atuam como os principais componentes do meio nutriente em um processo de cultivo. (NEVES, 2003).

Os meios podem ser classificados de duas formas: sintéticos e naturais. Os meios sintéticos são preparados com compostos orgânicos e inorgânicos puros com concentração e composição conhecida. Enquanto os meios naturais são constituídos por tecidos ou sumo de plantas ou animais, o que os torna extremamente atrativos uma vez que permitem cultivar microrganismos a partir de fontes naturais de qualquer parte do mundo. Outra vantagem que os meios naturais têm sobre os sintéticos é o custo de aquisição menor, tendo em vista que se pode utilizar resíduos de processos industriais (NEVES, 2003).

Contudo, em geral, fontes naturais oriundas de plantas, como os subprodutos do beneficiamento da soja, requerem um pré-tratamento para viabilizar sua utilização como substrato em processos biotecnológicos, de modo a tornar os carboidratos contidos na celulose e hemicelulose, disponíveis aos micro-organismos (LORENCINI, 2013 apud TEIXEIRA et al., 2008). Entre os pré-tratamentos que podem ser utilizados destacam-se os físicos, biológicos e os químicos, que podem estar associados entre si, sendo que cada método atua diferentemente sobre o material (LORENCINI, 2013).

O pré-tratamento físico objetiva-se a reduzir o tamanho das partículas e a cristalinidade, seu processo consiste basicamente na trituração e moagem da matéria-prima o que aumenta superfície disponível e reduz o grau de polimerização. O pré-tratamento biológico está ligado diretamente ao uso de microrganismos que produzem de forma natural enzimas capazes de degradar a lignina e hemicelulose de matérias lignocelulósicas. Enquanto, o pré-tratamento

químico faz uso de tratamentos com ozônio, ácidos, bases e solventes orgânico para o mesmo objetivo (COSTA, 2019).

O produto obtido do pré-tratamento de um material lignocelulósico, pode atuar como fonte de nitrogênio ou de carbono em meio de cultivo para promoção do crescimento de diferentes microrganismos. Um exemplo são as leveduras, as quais geralmente utilizam preferencialmente a glicose, como fonte de carbono, em relação à outros açúcares presentes no meio. A concentração da glicose no meio não age somente como fonte de carbono, mas também como um regulador global do mecanismo de crescimento celular, o que afeta diretamente na capacidade de fermentação do microrganismo (JUNIOR, 2012).

Além disso, para um bom crescimento e eficiência da fermentação se fez necessária a adição de fontes nitrogenadas ao meio, pois assim como a fonte de carbono, sua presença é vital e a deficiência pode acarretar na inibição do desenvolvimento do microrganismo (JUNIOR, 2012 apud VILANOVA et al., 2007).

O nitrogênio é um dos componentes presente nas vitaminas e no sistema enzimático das plantas, uma vez que está presente nos aminoácidos, os quais formam as proteínas. Segundo Lucero (2001), a velocidade de inativação dos transportadores de açúcares dos microrganismos é menor quando há uma fonte de nitrogênio presente, bem como o tempo de meia-vida aumenta, pois o consumo de nitrogênio dos microrganismos está ligado diretamente ao processo de turnover da proteína tendo em vista que as proteínas e enzimas dos microrganismos também são formados por aminoácidos.

De acordo com a análise dos subprodutos do beneficiamento da soja realizada por Silva (2006), o grão da soja apresenta 40,4% de proteína, enquanto o resíduo da soja 46,7%. Como a proteína possui em sua constituição 16% de nitrogênio (N) a resíduo da soja apresenta aproximadamente 7,47% do mesmo (DE MEDEIROS, 2015). O que juntamente com os minerais de sua composição tornam o resíduo da soja uma alternativa mais barata de fonte de nitrogênio para meios de cultura.

Verifica-se ainda na literatura, que diferentes fontes de nitrogênio podem ser empregadas para o crescimento de microrganismos, por exemplo, Gaboardi (2015), empregou efluente de arroz parboilizado durante o cultivo da levedura *Saccharomyces boulardii* e obteve o favorecimento do crescimento deste micro-organismos, enquanto o mesmo atuava como biorremediador. Thakur (2017), atingiu bons resultados utilizando licor de maceração de milho (CSL) como fonte de nitrogênio para o cultivo de *Lactobacillus casei* e Altaf (2005), utilizou lentilha vermelha no cultivo de *Lactobacillus amylophilus* obtendo também resultados satisfatórios.

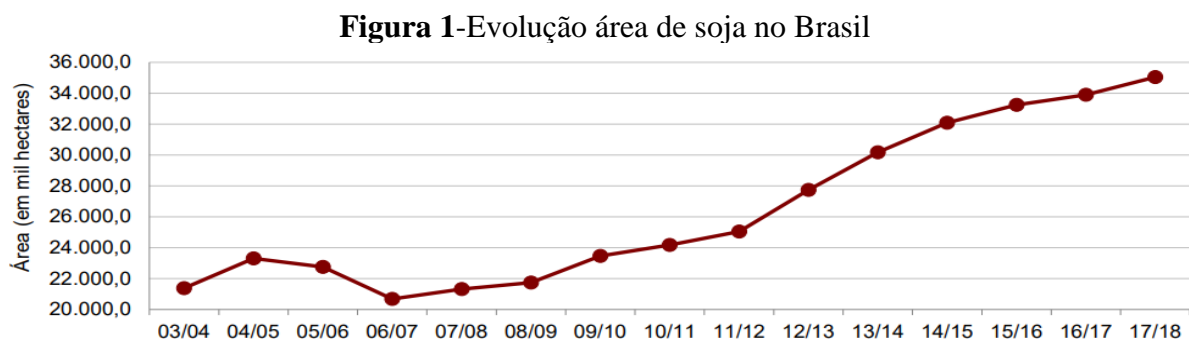
3.3 SOJA

3.3.1 Aspectos econômicos da soja

A soja é utilizada na fabricação de diversos bens de consumo, aparecendo em diferentes setores das indústrias cosmética e farmacêutica, veterinária, adesivos, entre outros. Contudo, apenas 7% da destinação final da soja é para estes setores diferenciados, sendo que cerca de 49%, vão para o processamento de óleo e farelo, usados especificamente na alimentação humana e animal, bem como na produção de biocombustíveis, como o biodiesel. Os 44% restantes, são exportados *in natura*, sendo a maior parte destinados para a China (APROSOJA, 2014).

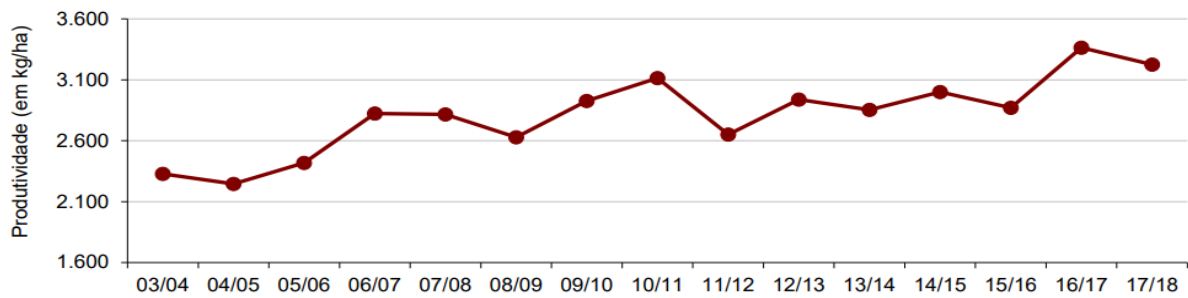
O estado do Paraná é o segundo maior produtor de soja do Brasil, sendo que a safra 2017/2018 resultou em uma produção de 19.070 milhões de toneladas, o que representou cerca de 20% da produção nacional deste grão, perdendo somente para o estado do Mato Grosso, que produziu 31.887 milhões de toneladas na mesma safra (CONAB, 2018).

A respeito da área plantada e produção de grãos no país, a soja tem se destacado com um aumento da lavoura de aproximadamente 16,64% nos últimos cinco anos, atingindo na última safra 34.991,4 mil hectares, conforme representado pela Figura 1 (CONAB, 2018).



Fonte: CONAB (2018).

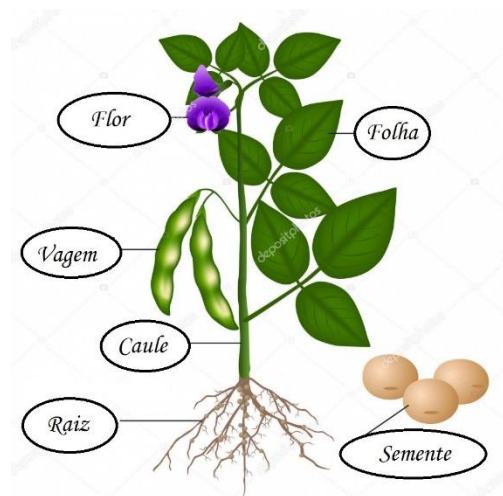
Ao mesmo tempo, a produtividade desta oleaginosa vem aumentando a cada ano, devido as novas tecnologias empregadas no processo, apresentando um valor máximo de 3.364 kg/ha na safra 2016/2017, como ilustrado na Figura 2 (CONAB, 2018).

Figura 2-Comportamento da produtividade de soja no Brasil

Fonte: CONAB (2018).

3.2.2 Estrutura da planta da soja

A planta de soja tem sua estrutura formada, basicamente, pelas folhas, caule, flor, raiz, vagem e semente como ilustrado na Figura 3. Botanicamente, é classificada como uma dicotiledônea cuja o desenvolvimento pode ser dividido em dois períodos, o vegetativo, desde a semente até o florescimento e o reprodutivo, do florescimento à colheita (MUNDSTOCK, 2005).

Figura 3-Estrutura da planta de soja

Fonte: Adaptado de Depositphotos (2018).

Segundo a IPEA (2012) o Brasil produz durante a colheita e processamento da soja, em torno de 41 milhões de toneladas de resíduo vegetal, gerando materiais lignocelulósicos como a palhada (que inclui o caule, folha e raiz), a vagem e a casca. A palhada que não é aproveitada durante o beneficiamento da soja, é separada e deixada na área de plantio para servir de adubo e proteção ao solo (EMBRAPA, 2007). Já a casca e a vagem, obtidas durante a seleção e extração do óleo vegetal da soja são aproveitadas como fonte proteica, principalmente para a fabricação de ração animal (GARSTKA, 2018 apud MARTINS, 2015; FRANCHINI et al., 2016).

3.4.3 Resíduos do beneficiamento da Soja

Devido à importância da cultura da soja no agronegócio nacional e ao volume de material processado diariamente, a casca de soja surge como um resíduo agroindustrial bastante interessante para ser utilizado como suplementação nutricional de animais, por exemplo. A casca de soja é a parte externa do grão, obtida por separação durante o processo de extração do óleo. Também conhecida como casquinha de soja, é comercializada na forma de casca ou peletizada (ZAMBOM et al., 2001).

Do ponto de vista nutricional, dentre as principais características que a tornam um ingrediente alternativo na suplementação nutricional refere-se ao teor de proteínas presentes em sua estrutura, conforme ilustra a Tabela 2.

Tabela 2- Composição centesimal aproximada (g/100g) e valor energético (Kcal/100g) da soja e resíduo

Fonte proteica	Umidade	Energia	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	Fibras	Cinzas
Soja(grão)	5,60	451,6	40,4	24,55	17,26	9,341	2,88
Soja (resíduos)	8,40	334,1	46,7	1,67	33,10	4,97	5,20

Fonte: Adaptado de SILVA (2006).

O conteúdo de 40% de proteína do grão de soja (Tabela 1) se assemelha ao encontrado por Grieshop et al, (2001) em variedades dessa leguminosa no Brasil (41%), China e Estados Unidos (42%), enquanto que teor o proteico do resíduo de soja apresentou-se similar ao da farinha de soja (46%) e da proteína texturizada de soja (47%) (GARCÍA et al., 1998).

Além dos componentes destacados na Tabela 1, o resíduo da soja é rico em aminoácidos conforme ilustra a Tabela 3.

Tabela 3-Conteúdo de aminoácidos essenciais (EAE) do grão e do resíduo de soja (mg aminoácidos/g de proteína)

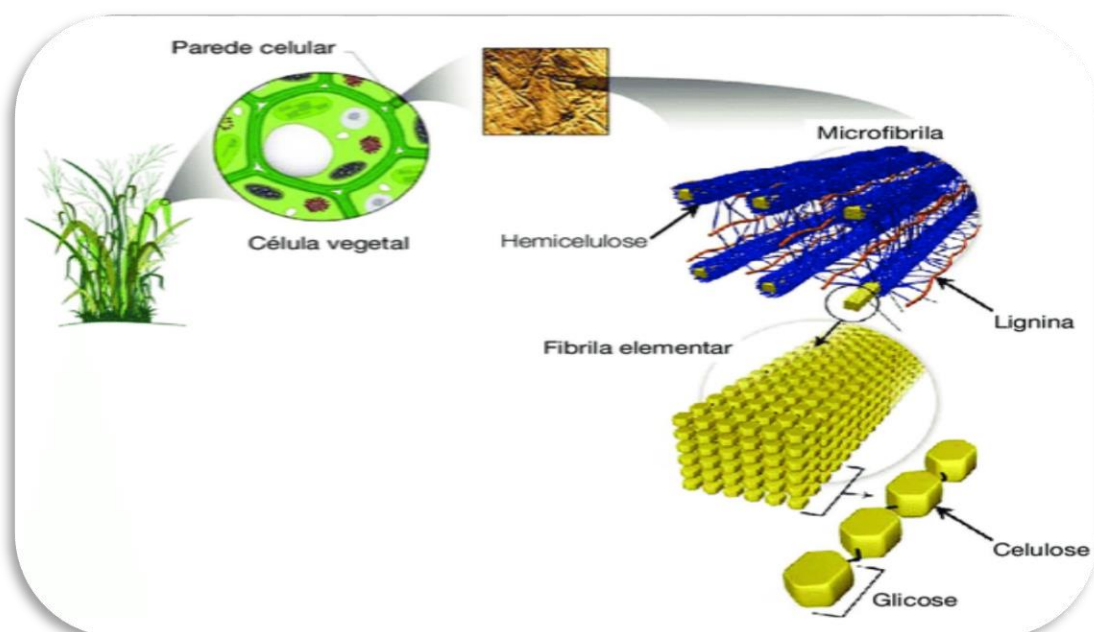
Aminoácidos	Soja	
	Grão	Resíduo
Histidina	29,2	27,1
Isoleucina	53,1	47,0
Leucina	88,5	78,8
Lisina	59,6	59,8
Metionina + cistina	28,7	25,2
Fenilalanina + tirosina	109,3	98,5
Treonina	46,3	43,6
Triptofano	11,2	12,2
Valina	57,2	57,4

Fonte: Adaptado de SILVA (2006).

3.5 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Os materiais lignocelulósicos são biomassas vegetais formadas de polímeros de carboidratos complexos constituídos, majoritariamente, por três componentes: celulose, hemicelulose e lignina. Além de conter também proteínas, extrativos e cinzas (BALAT, 2011). A Figura 4 representa a disposição das estruturas que compõem uma biomassa lignocelulósica.

Figura 4-Estrutura dos materiais lignocelulósico

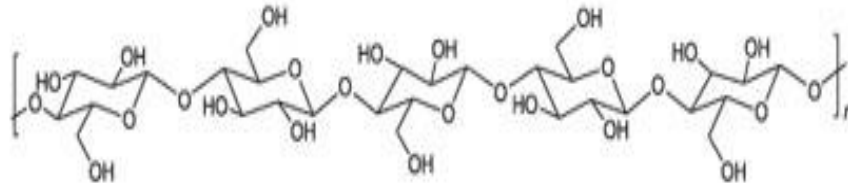


Fonte: Adaptado de SANTOS (2012).

3.5.1 Celulose

Principal componente da parede celular da biomassa vegetal, insolúvel em água, existe na forma de um polímero linear de glicose de alta massa molecular formado de ligações β -1,4 glicosídicas, como mostra na Figura 5. O número de unidades de glicose na molécula de celulose varia entre 15 a 15.000, apresentando um valor médio da ordem de 3.000 unidades (CASTRO, 2009).

Figura 5-Estrutura da celulose

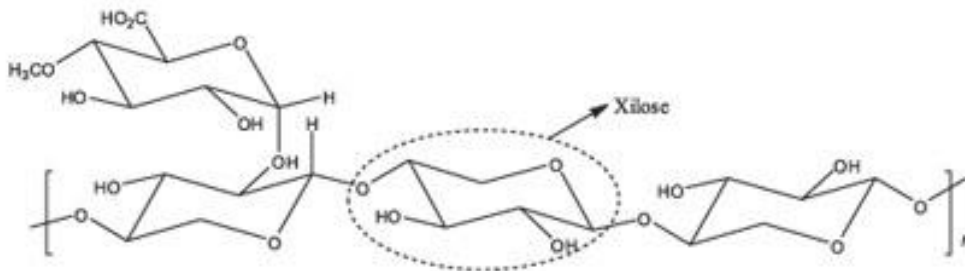


Fonte: SANTOS (2012).

3.5.2 Hemicelulose

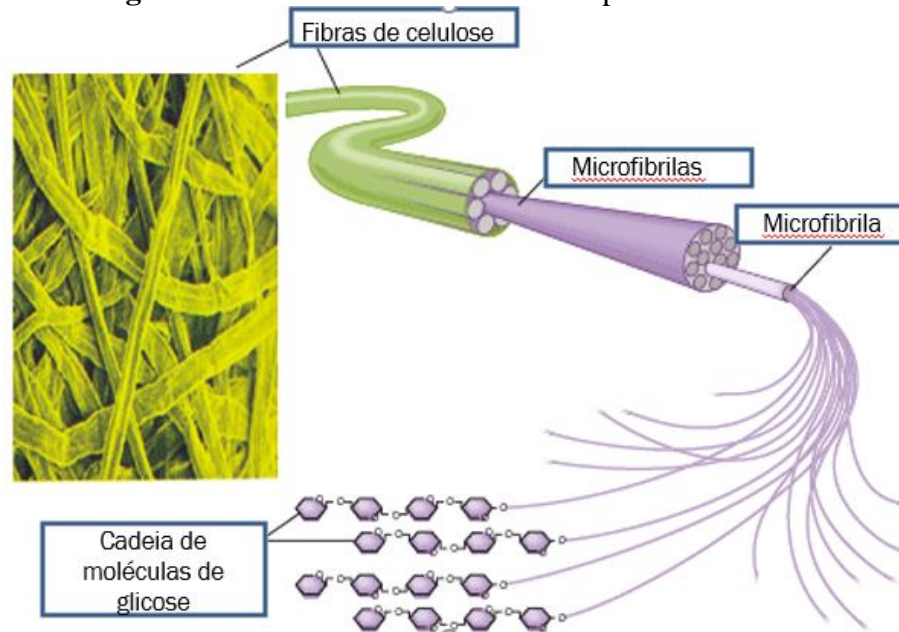
As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metilglucurônico (SANTOS, 2012). Ao contrário da celulose, é um polissacarídeo de baixo peso molecular que atua fazendo ligações entre a lignina e as fibras de celulose conferindo rigidez e promovendo a integração da rede celulose-hemicelulose-lignina (SOBRINHO CHEMMÉS, 2013).

Figura 6-Estrutura da Hemicelulose



Fonte: SANTOS (2012).

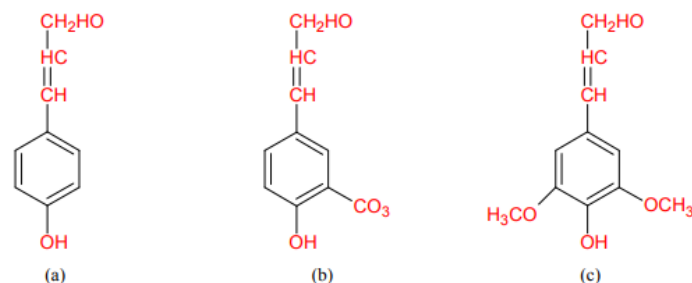
A junção de um grupo de cadeias de celulose envoltas por moléculas de hemicelulose é denominada de microfibrila, Figura 7. A orientação paralela destas cadeias favorece a formação de ligações de pontes de hidrogênio intramolecular, fazendo da celulose insolúvel em água, e originando fibras compactas que compõem a parede celular dos vegetais (BERNABÉ, 2008 apud RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; FIBERWORLD, 2006).

Figura 7-Estrutura da celulose envolta por microfibrilas

Fonte: Adaptado de JONES (2018).

3.5.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula tridimensional, amorfa e altamente ramificada que contém em sua estrutura inúmeros grupos aromáticos e alifáticos, com diversos anéis fenilpropânicos substituídos ligados por meio de diferentes tipos de ligações, como do tipo éter ou carbono-carbono (ALVES, 2011 apud ARANTES, 2009; RAMIRES, 2010). Acredita-se, que a formação da lignina se dá pela polimerização oxidativa de três álcoois precursores (Figura 8): álcool trans-coniferílico, álcool trans-p-cumarílico e álcool trans-sinapílico (SOBRINHO CHEMMÉS, 2013).

Figura 8-Percussores primários da lignina: a) álcool trans-p-cumarílico; b) álcool trans-coniferílico e c) álcool trans-sinapílico

Fonte: ALVES (2011) apud BERNABÉ (2008).

A lignina é um polímero fenólico importante para conferir resistência mecânica, permitir o transporte de água no interior das plantas e propiciar defesa de plantas lenhosas (CASTRO, 2016). Além disso, ela se destaca como a fonte mais abundante de compostos

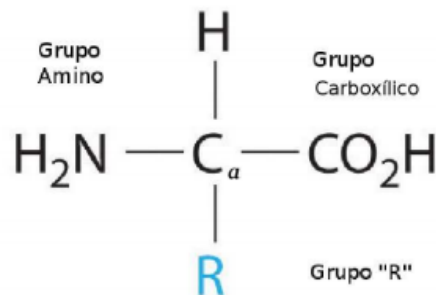
aromáticos na natureza e pode ser utilizada para adesivos ou reagentes químicos para substituir aqueles que são derivados do óleo. O principal resíduo da soja, a casca, contém baixa porcentagem de lignina o que a transforma em uma matéria prima de qualidade para produção de lipídios (LIU, 2017).

3.5.4 Proteína

As proteínas são polímeros constituídos de unidades de aminoácidos (Figura 9), que por sua vez, são moléculas orgânicas que apresentam ligados a um mesmo átomo de carbono (denominado de carbono α) um átomo de hidrogênio, um grupo amina, um grupo carboxílico e uma cadeia lateral "R" que difere os aminoácidos em sua estrutura, tamanho, cargas elétricas e solubilidade em água, além de determinar as propriedade físico-químicas (SILVA, 2009).

De acordo com Mandarino (2006), a maioria das cultivares de soja apresenta um teor médio entre 36% e 40% de proteína, podendo atingir conteúdos superiores a 45%, enquanto seu resíduo atinge em torno de 46%. Esses dados classificam a soja e seu resíduo como uma fonte alternativa para compor um meio de cultura para crescimento de microrganismos, uma vez que na estrutura dos aminoácidos está o nitrogênio, suplemento importante para o desenvolvimento dos mesmos.

Figura 9-Estrutura básica do aminoácido



Fonte: MEDINA (2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), câmpus Toledo/PR.

4.1 RESÍDUO DO BENEFICIAMENTO DA SOJA

O resíduo beneficiamento da soja (casca e vagem), estudado neste trabalho, foi fornecido pela COAMO Agroindustrial Cooperativa - Toledo- PR. Este resíduo, consiste basicamente em cascas, entrecasas e vagens separadas durante o beneficiamento da soja. Inicialmente, o resíduo foi triturado em liquidificador para aumentar a superfície de contato e em seguida armazenado em recipientes plásticos para posterior uso.

4.2 OBTENÇÃO DE EXTRATO DE RESÍDUO DE SOJA

4.2.1. Padronização do extrato de resíduo de soja

Para a obtenção de extrato de resíduo de soja um tratamento térmico com água foi realizado, baseado em metodologia de suplementação nutricional de meio com farelo de arroz (ARRUDA, 2011). Para isso, uma solução de resíduo de soja na concentração de 200 g/L foi autoclavada a 111°C por 15 minutos, seguido de centrifugação asséptica a 4000 rpm, para o aproveitamento do sobrenadante e descarte do precipitado formado. O sobrenadante resultante foi estocado em geladeira e empregado como meio de suplementação, conforme será descrito nos itens abaixo.

O sobrenadante foi armazenado em frascos para posterior análises de açúcares redutores (MILLER,1959), bem como nitrogênio total. Esta última análise foi realizada por empresa terceirizada – Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia (GERPEL). O extrato obtido foi acrescido ao meio de cultura sintético, conforme descrito no item 4.3.4.

4.3 MICRORGANISMO E MEIOS DE CULTURA

4.3.1 Levedura

Foi utilizada a cepa de *Saccharomyces boulardii* previamente isolada do medicamento Floratil®100- *Saccharomyces boulardii*-17 liofilizado 100 mg, da empresa Merck.

4.3.2 Meio para ativação e manutenção do micro-organismo

O meio Yeast Malt extract (YM) líquido, foi utilizado para o preparo da ativação do microrganismo, este é composto por: extrato de levedura, 3 g/L; extrato de malte, 3 g/L; peptona, 5 g/L; glicose, 10 g/L e água, qsp. Após 48h de seu cultivo, em incubadora do tipo Shaker a 30°C e 200 rpm, no meio descrito acima, as culturas de trabalho foram mantidas em placas de Petri contendo meio YM sólido a 4°C e foram repicadas para um novo meio de cultivo YM sólido a cada 2 semanas (KITAMURA,2013).

4.3.3 Meio para preparo do pré-inóculo e inóculo

Tanto o pré-inóculo e inóculo foram cultivados em meio formulado com: glicose anidra (30 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), peptona bacteriológica (2 g/L), fosfato dipotássio (0,6 g/L), uréia (0,36 g/L), sulfato de amônio (0,12 g/L), sulfato de magnésio (0,24 g/L) e água (qsp.) em frascos Erlenmeyer (125 mL), com 100 mL do meio, respectivamente. Os cultivos foram realizados à 30°C, sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório por 24 horas (MÜLLER, 2006). A transferência de células foi realizada por meio da raspagem das placas de Petri, na proporção de uma placa para cada 100 mL do meio descrito no item 4.3.2.

4.3.4 Meios e condições de produção de biomassa

Os ensaios para avaliação da fonte de nitrogênio (obtida conforme item 4.2.1) empregados no cultivo da biomassa de *Saccharomyces boulardii* estão ilustrados na Tabela 4. Semelhante ao inóculo, as células cultivadas em meio formulado com: glicose anidra (30 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), peptona de bacteriológica (2 g/L), fosfato dipotássio (0,6 g/L), uréia (0,36g/L), sulfato de amônio (0,12g/L), sulfato de magnésio (0,24g/L) e água (qsp.) respectivamente, em frascos Erlenmeyer (125 mL), com 12,5 mL do meio acrescidos de diferentes proporções de extrato de resíduo de soja (Tabela 4). Os cultivos foram realizados à 30°C, sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório por 48 horas

(KITAMURA, 2013; MÜLLER, 2006). O volume de células adicionado ao meio de cultivo para a inoculação foi calculado por espectrometria a partir de uma curva de calibração previamente realizada para o micro-organismo em estudo e correlacionada com a absorbância, conforme descrito no item 4.4.2 (ARRUDA, 2011). A concentração inicial de células nos cultivos foi de 2g/L, conforme reportado por Kitamura (2013).

Tabela 4-Experimentos realizados para se verificar a necessidade da suplementação nutricional com extrato de resíduo de soja

Ensaio	Quantidade de extrato de resíduo de soja (%)	Quantidade de meio de cultivo (%)	Relação extrato de resíduo: Meio (%)
1	0	100	0:100
2	10	90	10:90
3	20	80	20:80
4	30	70	30:70
5	40	60	40:60
6	50	50	50:50
7	60	40	60:40
8	70	30	70:30
9	80	20	80:20
10	90	10	90:10
11	100	0	100:0

Fonte: Própria do autor.

Para todas as condições avaliadas o pH inicial de cultivo foi de 4,5 e quando necessário este foi corrigido com solução de NaOH 3N durante o preparo do meio. Os cultivos foram realizados em duplicata por 48 horas. Amostras correspondentes ao volume de cada Erlenmeyer foram retiradas no início de cada cultivo e após 4, 8, 16, 24, 32 e 48 horas de incubação. Em seguida,

foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos, separando o sobrenadante das células para imediata avaliação de concentração celular e posterior determinação de concentração de glicose consumida para cada um dos tempos (FIORESE,2015).

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Açúcares Redutores

A determinação dos açúcares redutores totais foi feita pelo método espectrofotométrico, proposto por Miller (1959), que utiliza solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) que tem como princípio o fato dos açúcares reduzirem o reagente DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) na presença de hidróxido de sódio, para o composto 3-amino-5-nitrosalicílico, um produto de cor laranja-avermelhado, que pode ser mensurado em um espectrofotômetro, a 540 nm, por absorvância (KITAMURA, 2013). Para isso foi necessário o preparo de uma curva padrão de glicose (item 4.4.1.1)

Em um tubo de ensaio com tampa foi adicionado 0,25 mL da amostra, 0,5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente DNS (3,5-dinitrosalicílico), rapidamente o tubo foi transferido para um banho de água fervente por 5 min. Após este tempo, a mistura foi posta em um banho de gelo até atingir temperatura ambiente e completada com 4mL de água destilada. Por fim, foi realizada a leitura no espectrofotômetro. Todas as análises foram realizadas em triplicata, para a calibração do espectrofotômetro foi utilizada água destilada como amostra e os demais reagentes na mesma forma e quantidades descritas acima (SANTOS, 2015).

4.4.1.1Preparo da curva padrão de glicose

A curva padrão de calibração dos açúcares totais foi realizada a partir da diluição de uma solução estoque de glicose de (5 g/L) para obtenção de solução nas soluções concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 g/L. Em seguida as reações de DNS foram realizadas como descrito no item 4.1.1. Com a equação da reta obtida pela curva padrão foi possível calcular a concentração dos açúcares redutores em cada amostra (SANTOS, 2015).

4.4.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por espectrofotometria a 600 nm, onde a concentração de células em g/L foi calculada por uma curva padrão que correlaciona a absorvância a 600 nm e o peso seco das células obtidas do cultivo por 24 horas em meio empregado no preparo do inóculo.

Para obtenção do peso seco das células, 3 mL da suspensão de células previamente cultivadas por 24 horas foram pipetadas em membranas de filtração com taras conhecidas devidamente posicionadas em sistema de filtração Millipore. Após a filtragem as membranas foram alocadas em placas de Petri pequenas (5 cm de diâmetro), tampadas e secas em micro-ondas na potência de 100W durante 15 minutos. Por fim, transferidas para um dessecador até o fim da pesagem em balança analítica, ou seja, até obter peso estável (GONÇALVES,2010).

. O resultado da análise foi expresso em g de peso seco / L. A concentração celular obtida foi calculada através da equação:

$$\text{Peso seco } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = \frac{(\text{membrana após o inoculo(g)} - \text{membrana antes do inoculo (g)}) \times 1000}{\text{volume da suspensão de célula utilizado (mL)}} \quad (1)$$

4.4.3 Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado pelo pHmetro, utilizando correção de temperatura.

4.4.4 Determinação de Nitrogênio

Após a obtenção do extrato de soja conforme descrito no item 4.2.1. A concentração de nitrogênio foi determinada pelo método de Kjeldahl, conforme metodologias estabelecidas no laboratório de Qualidade de Água da Universidade Estadual Do Oeste do Paraná.

4.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS

4.5.1 Fator de conversão de substrato em célula

Determinou-se o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) a partir da concentração de células formadas pela concentração do substrato consumido, baseado na Equação (2) (NADAI, 2015):

$$Y_{X/S} = \frac{(\text{concentração de células formadas})}{(\text{concentração de substrato consumido})} \quad (2)$$

4.5.2 Produtividade

A produtividade (g/L.h) foi determinada pela razão entre a concentração de células formadas e o tempo total de fermentação, consoante a Equação (3) (NADAI, 2015):

$$P \left(\frac{\text{g}}{\text{L.h}}\right) = \frac{(\text{concentração de células formadas})}{(\text{tempo final})} \quad (3)$$

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da determinação da concentração celular (item 4.4.2) de cada condição de cultivo realizada foram submetidos à análise estáticas por Anova 5% fator duplo sem repetição e as médias comparadas pelos testes de Dunnett 5% e Anova 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

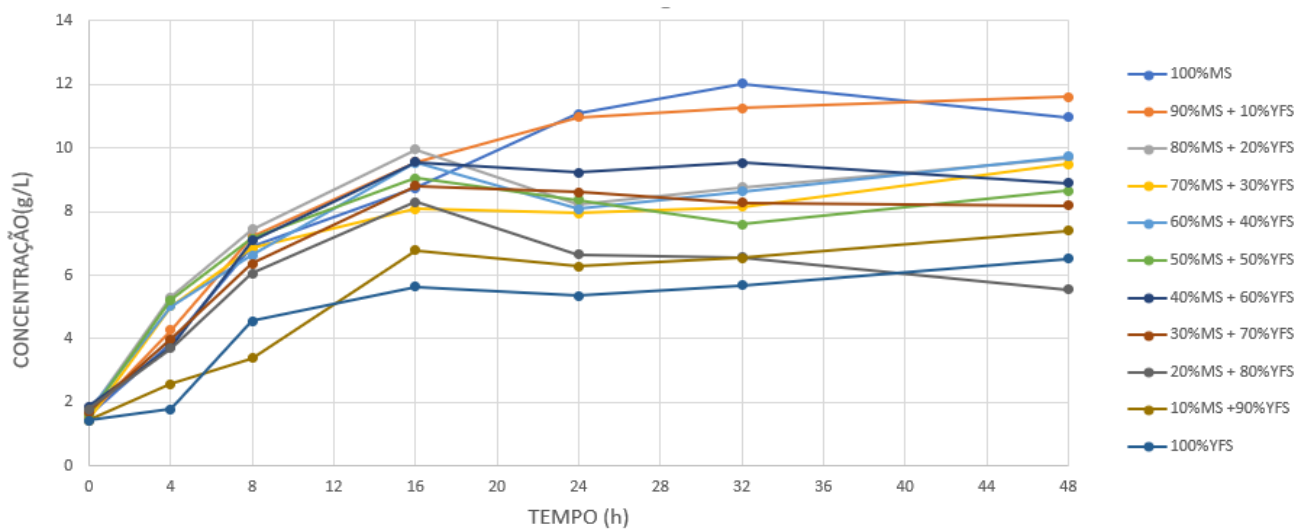
De acordo com Mandarino (2006), os grãos de soja apresentam um teor médio entre 36% e 40% de proteína, podendo atingir conteúdos superiores a 45%, variando de acordo com o solo onde foi cultivado, enquanto o extrato do resíduo do beneficiamento da soja foi analisado e atingiu 46,7%. Devido a porcentagem de proteína estar ligada diretamente a quantidade de nitrogênio presente no material, esperava-se que o resíduo do beneficiamento da soja apresentasse aproximadamente 7,47% de nitrogênio. Contudo, o resultado obtido na análise de nitrogênio por Kjeldahl realizada no extrato de soja de 43,17 mg/L (Anexo 01), apresentou um valor inferior ao potencial do resíduo. Esse resultado indica a necessidade de um pré-tratamento mais agressivo para liberar o nitrogênio presente nas proteínas, tais como hidrólise ácida ou hidrólise enzimática.

A Figura 10 apresenta o crescimento celular da levedura *Saccharomyces boulardii* cultivada nas condições descritas no item 3.3.4 durante 48 horas. Verifica-se nas primeiras 16 horas de cultivo um rápido crescimento do microrganismo independente da condição avaliada, com exceção das condições onde somente se empregou YFS (100%) ou 10%MC + 90%YFS. Tal comportamento deve-se principalmente, à realização do pré-inóculo nas mesmas condições de cultivo, evitando assim a existência de uma fase de adaptação do microrganismo. Esse mesmo comportamento já foi previamente verificado por Kitamura (2016) durante o cultivo de *Saccharomyces boulardii* em meio YM líquido incubado sob agitação em incubador do tipo Shaker a 30°C e 120 rpm por 24 horas com concentração inicial de célula de 2g/L e pH de 5,5, uma vez que este também não observou fase lag.

Ainda com relação a Figura 10, pode-se notar que após 16 horas de cultivo, há diferenças em relação ao crescimento das células em função da formulação dos meios de cultivo. Para as condições 100%MC, 90%MC+10%YFS, 80%MC+20%YFS, 70%MC+30%YFS, 60%MC+40%YFS, 10%MC+90%YFS e 100%YFS observa-se um aumento na concentração de células, enquanto para as condições 50%MC+50%YFS, 40%MC+60%YFS, 30%MC+70%YFS, 20%MC+80%YFS observa-se decréscimo.

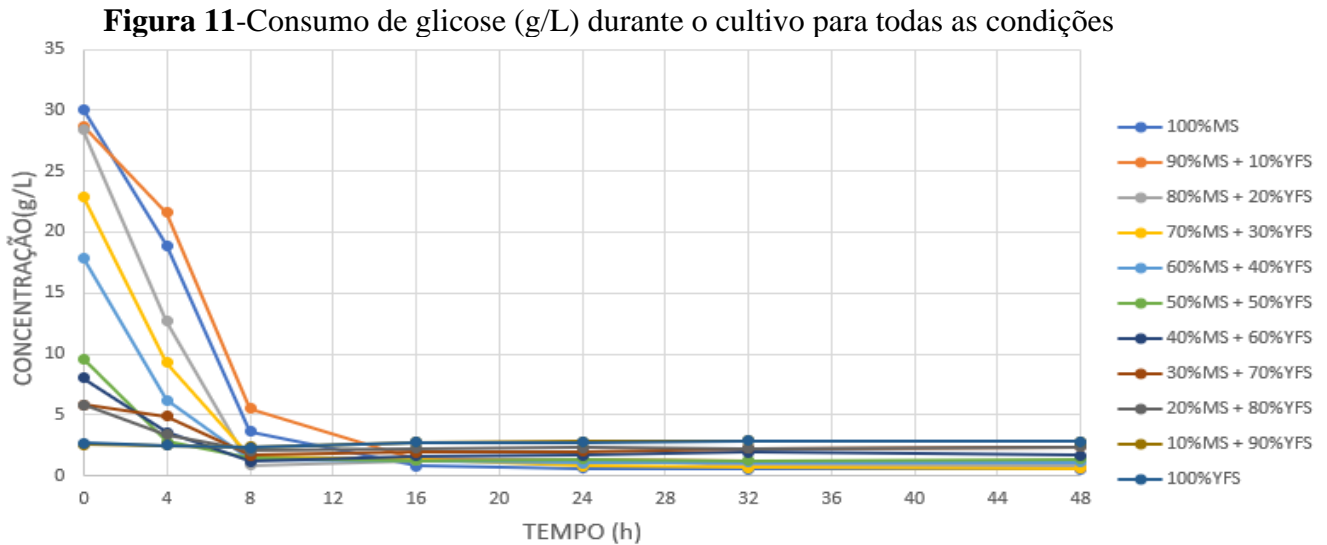
Por fim, nota-se que ao final das 48 horas de cultivo, a condição que apresentou maior concentração celular foi a de 90%MC + 10% YFS, com 11,60 g/L de biomassa. Resultado este, semelhante a concentração de células obtidas por Kitamura (2016), de 11,22 g/L. Por outro lado, Fiorese (2015) que empregou meio composto por soro desproteínizado (100 g/L) e sais, como: uréia (6 g/L), sulfato de magnésio (1,5 g/L), fosfato monobásico de potássio (1,5 g/L) 1) e extrato de levedura (6 g/L) em um cultivo com agitação de 24 horas, 100rpm, 26°C apresentou uma concentração celular máxima de 5,85 g/L, ou seja, a condição de cultivo utilizada no presente trabalho, demonstrou melhor eficiência na produção de biomassa probiótica.

Figura 10- Cinética de crescimento da biomassa celular em todas as condições



Fonte: Próprio autor (2019).

Com relação ao consumo de substrato frente aos diferentes meios avaliados, nota-se que as primeiras horas de cultivo, também proporcionou o máximo consumo de substrato (Figura 11).



Fonte: Próprio autor (2019).

Entretanto, segundo Assunção (2014) o cultivo deste microrganismos pode induzir a formação de ácidos orgânicos, como ácidos succínico, láctico, acético e outros que consequentemente reduzem o pH do meio e o tornam mais ácido, prejudicando a formação de biomassa, a qual alcança uma estabilidade e permanece constante até que a fonte de carbono se esgote (Figuras 10 e 11).

Observa-se ainda na figura 10, que não há necessidade de um cultivo com tempo superior à 16 horas, pois a concentração celular permanece praticamente constante após este tempo, o que torna inviável e dispendioso sua extensão. Assunção (2014), empregando condições de 30°C, agitação de 100 rpm, permeado de soro de leite (20 g/L), sulfato de amônio (9,0 g/L), sulfato de magnésio (3,6 g/L) e fosfato monobásico de potássio (3,0 g/L), chegou conclusão que o tempo de cultivo adequado seria de 24 horas. Já Kitamura (2016), utilizando YM líquido incubado a 30°C e 120 rpm por 24 horas determinou um tempo de 20 horas. Enquanto, Nadai (2015) de 17 horas, nas condições de 30°C, agitação de 100 rpm, permeado de soro de leite (180 g/L), sulfato de amônio (7,5 g/L), sulfato de magnésio (1,25 g/L) e fosfato monobásico de potássio (1,5 g/L) Essa diferença pode advir das diferenças no meio de cultivo e agitação utilizadas.

Observa-se também, que as condições 100% MC e 90% MC + 10% YFS proporcionaram uma maior concentração celular em comparação às demais condições avaliadas, com uma diferença de aproximadamente 20% da condição 80% MS + 20% YFS no tempo de 24 horas, aumentando essa diferença em função do aumento do teor de extrato de resíduo de soja ao meio comercial. O fator principal para esse comportamento, deve-se à maior quantidade de glicose nas condições com maior proporção MC:YFS, conforme pode ser observado na Figura 11.

Observa-se que à medida que se diminui a porcentagem de MC no meio, conseqüentemente a fonte de carbono, o consumo deste substrato é mais rápido (Figura 11). Sendo está a única fonte deste açúcar ofertada, ou seja, à medida que sua quantidade é reduzida o microrganismo recebe menos glicose, conseqüentemente, há falta de substrato para geração de energia pelas células levando a uma menor produção de biomassa, o que refletiu nas condições avaliadas a partir de suplementação de 20% com YFS.

A Tabela 2, apresenta uma análise mais detalhada dos dados do cultivo nas primeiras 16 horas. Verificou-se nesta tabela que a condição 90%MC + 10%YFS proporcionou aumento de 11,56% na concentração celular em relação a condição 100%MC (somente meio comercial) com fatores de conversão ($Y_{X/S}$) de 0,24 e 0,29 respectivamente. Com relação à condição 80%MC + 20%YFS, este também apresentou uma concentração de células no tempo de 16 horas maior que a condição 100% MC, uma diferença de 15,51%.

Assunção (2014) avaliou permeado de soro de leite (20 g/L) como fonte de carbono, acrescido de alguns sais nas mesmas condições avaliadas do presente trabalho e utilizou a mesma levedura. Segundo este autor, em 24 horas de cultivo um fator de conversão de substrato em células de 0,92 g/g foi encontrado, o que correspondeu a uma concentração celular de 8,75 g/L. Apesar de conter um fator de conversão superior a condição de 90%MC + 10%YFS a biomassa celular produzida ao final do processo foi inferior ao observado no presente trabalho.

Resultado semelhante se constata ao trabalho de Müller (2006), que retratou um fator de conversão de 0,41g/g e uma concentração celular de 3,9 g/L no tempo de 12 horas de cultivo, sob as seguintes condições: 30°C, pH de 3,0, agitação de 200 rpm, e meio definido composto por glicose (10 g/L), peptona de carne (2 g/L), extrato de levedura (2 g/L), fosfato monobásico de potássio (0,6 g/L), ureia (0,36 g/L) e sulfato de amônio (0,12 g/L). O meio composição de meio sintético utilizado neste trabalho foi a mesma que a de Müller (2006), alterando somente o pH para 4,5.

Tabela 5-Biomassa celular produzida (ΔX) açúcar consumido (ΔS), conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) e produtividade(P) para o tempo de 16 horas de fermentação

Simbologia	$\Delta X(g/L)$	$\Delta S(g/L)$	$Y_{X/S}$	$P(g/L.h)$
100%MC	7,17465	29,3144	0,244748	0,448416
90%MC + 10% YFS	8,00505	27,4056	0,292095	0,500316
80%MC + 20% YFS	8,28738	27,1695	0,305025	0,517961
70%MC + 30% YFS	6,62654	21,5403	0,307635	0,414159
60%MC + 40% YFS	7,80576	16,6649	0,468395	0,48786
50%MC + 50% YFS	7,45698	8,3989	0,887852	0,466061
40%MC + 60% YFS	7,6895	6,3753	1,206139	0,480594
30%MC + 70% YFS	7,10822	3,868	1,837699	0,444264
20%MC + 80% YFS	6,52694	3,5811	1,822608	0,407934
10%MC + 90% YFS	5,26536	-	-	-
100% YFS	4,20175	-	-	-

Fonte: Próprio autor (2019).

Após a realização do tratamento estatístico do crescimento celular de todas as condições em um tempo de 48 horas de cultivo por meio do método Anova 5 % fator duplo sem repetição obteve-se que tanto o fator tempo quanto o fator concentração são significativos (p-valor igual a 0,011 e 0,00 respectivamente). O método analítico de Tukey 5 %, que avaliou a significância das diferenças de concentrações de todas as condições com todas as condições apontou como significativa somente a diferença de concentração entre as condições 90% MC + 10% YFS e 100% YFS (Tabela 6). Enquanto, o método analítico de Dunnett 5 %, que analisou as diferenças de concentrações de todas as condições somente com a condição 100% MC determinou como insignificante todas as diferenças (Tabela 6). Ou seja, a utilização de uma maior quantidade de extrato de soja no meio de cultivo não reduz e não aumenta a formação de células de forma significativa, fato configurado como positivo, pois é possível reduzir o custo de produção do probiótico sem variar muito a produtividade.

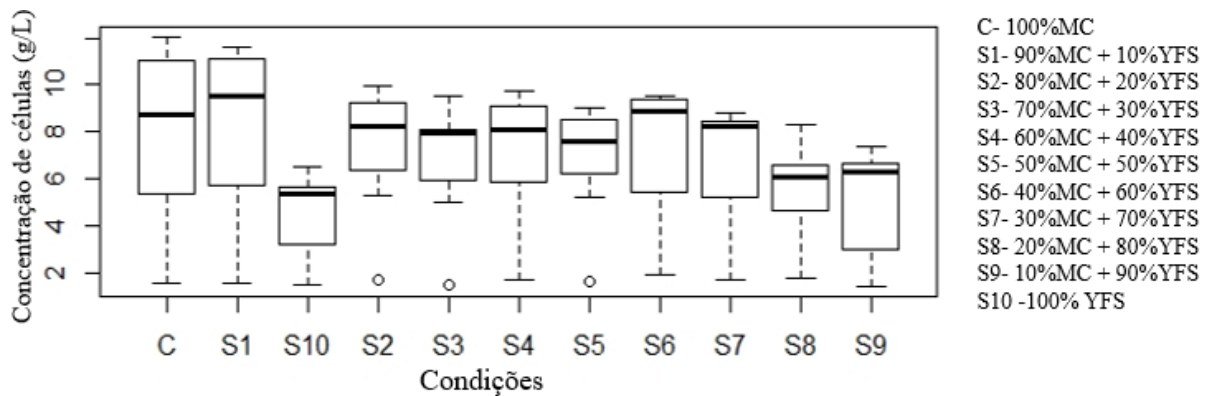
Tabela 6- Análise estatística do Crescimento celular por Turkey 5% e Dunnett 5% para 48 horas de cultivo.

Simbologia	Média de Concentração celular (g/L)	Método analítico de Tukey 5%	Método analítico de Dunnett
100%MC	7,88215	ab	a
90%MC + 10%YFS	8,060092	a	a
80%MC + 20%YFS	7,293753	ab	a
70%MC + 30%YFS	6,714846	ab	a
60%MC + 40%YFS	7,049378	ab	a
50%MC + 50%YFS	6,805003	ab	a
40%MC + 60%YFS	7,132418	ab	a
30%MC + 70%YFS	6,565374	ab	a
20%MC + 80%YFS	5,516698	ab	a
10%MC + 90%YFS	4,911693	ab	a
100%YFS	4,422944	b	a

Fonte: Próprio autor (2019).

Por meio do método analítico de Tukey 5 %, foi também possível obter um blockspot das diferenças de concentrações pelas condições de cultivo, na qual é possível observar que as médias das concentrações celulares não ficaram muito distantes umas das outras, com exceção da condição 100% YFS que teve uma concentração média de biomassa mais baixa. A média mais alta de biomassa obtida foi a da condição 90%MC + 10%YFS.

Figura 12-Blockspot de comparação da diferença de concentração celular (g/L) pelas condições de cultivo



Fonte: Próprio autor (2019).

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que a utilização do extrato do resíduo do beneficiamento da soja, como fonte de nitrogênio, é uma opção viável visando à produção celular probiótica uma vez que mesmo não alcançando seu potencial máximo de fornecimento de nitrogênio obteve bons resultados.

Ademais, a Tabela 7 apresenta uma estimativa do preço de 1L de meio comercial (100%MC), a fim de se comparar com o valor médio de 1L de um meio suplementado com YFS à 10%, a condição com menor quantidade de extrato do resíduo do beneficiamento da soja.

Tabela 7-Estimativa de preço médio dos componentes do meio de cultivo sintético

Componentes do meio de cultivo	Preço para 500g (R\$)	Preço para 1L de meio comercial(R\$)	Preço para 1L de meio 90%MS+10% YFS (R\$)
Glicose	37,64	2,26	2,03
Peptona de carne	358,1	1,43	1,28
Extrato de levedura	321,0	1,20	1,08
Fosfato monobásico de potássio	45,69	0,05	0,045
Ureia	13,48	0,001	0,0009
Sulfato de amônio	18,18	0,004	0,0036
Sulfato de magnésio	16,02	0,008	0,0072
YFS	0,20		0,08
Valor total	-	R\$4,95	R\$4,47

Fonte: Cotações das empresas Synth (2019), Americanas (2019) e Meta química (2019).

Nota-se pela Tabela que o custo médio para a produção de 1L de meio comercial, embasada pelos preços ofertados pelas empresas Synth, Americanas e Meta química chegou a R\$4,95/L. Sendo que este custo reduz para aproximadamente para R\$4,47 quando realizado na condição 90%MC + 10% YFS, ou seja, uma redução de 9,88%. Considerando para este cálculo, o preço do resíduo da soja oferecido pela MF rural de R\$0,40 o quilo.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos durante a realização do presente trabalho conclui-se que o extrato do resíduo do beneficiamento da soja possui grande potencial para substituição de fontes tradicionais de nitrogênio em meios de cultivo para crescimento da levedura *Saccharomyces boulardii.*, uma vez que a redução da concentração celular não foi considerada significativa quando somente este foi utilizado. Verificou-se também, que o tempo de cultivo de 16 horas foi o suficiente para obtenção de máxima concentração celular, não sendo necessário tempos superiores para o cultivo deste microrganismo.

Outro fator importante que confirma sua viabilidade de utilização refere-se ao baixo custo envolvido para sua produção quando comparado com demais fontes de nitrogênio e nutrientes tradicionalmente utilizados em meio de cultivo para microrganismos, como o extrato de levedura.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ressalta-se o caráter inovador da presente proposta se deve, principalmente, pela utilização de um material residual da colheita e processamento de um produto agrícola, no qual o Brasil se destaca por sua grande produção. Também se espera que o presente trabalho propicie

uma fonte alternativa de nitrogênio à meios de cultivos tradicionalmente empregados, visando agregar valor de mercado há um resíduo, bem como à redução do custo de produção de biomassa probiótica.

REFERÊNCIAS

ALTAF, Mohammad; NAVEENA, Basa Janakiram; REDDY, Gopal. **Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L (+) lactic acid from starch by amyolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation.** Food technology and biotechnology, v. 43, n. 3, p. 235-239, 2005.

ALVES, Regina Estevam. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

AMERICANAS. Americanas.com. **Laboratório**. s. d. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.amERICANAS.com.br/categoria/agro-industria-e-comercio/laboratorio>. Acesso em: 16, junho, 2019.

APRASOJA. **Uso e destino da soja no Brasil**. Site Prasoja,2014. Disponível em: <https://aprosojabrasil.com.br/2014/sobre-a-soja/uso-da-soja/>. Acesso em : 26 junho 2018.

ASSUNÇÃO, Grettya Maria et al. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo**. 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n4/a56v34n4.pdf>>. Acesso em: 26 junho 2018.

BADARÓ, Andréa C.L. et al. **Alimentos probióticos: aplicações Como promotores da saúde humana—parte 1**. Nutrir Gerais, v. 2, n. 3, p. 1-29, 2008.

BALAT, Mustafa. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review**. Energy conversion and management, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BERNABÉ, Giseli Aparecida. **Extração e identificação de material lignocelulósico presente durante o processo de compostagem**. 2008. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/97739>. Acesso em: 26 junho 2018.

CASTRO, Heizir F. de. **Processos Químicos Industriais II-Papel e Celulose**. Lorena: USP, 2009. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5840556/434/apostila4papelecelulose.pdf>. Acesso em: 26 junho 2018.

CASTRO, de M., Elisa et al. **Qualidade fisiológica de sementes de soja submetidas a chuva artificial na pré colheita**. Journal of Seed Science, v. 38, n. 1, 2016.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos. V.5 – Safra 2017/18- N.6 – Sexto levantamento, março, 2018**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_03_13_14_15_33_grao_marco_2018.pdf>. Acessado em: 21 de Março de 2019.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. **yeast as probiotics—Saccharomyces boulardii**. Alimentary pharmacology & therapeutics, v. 26, n. 6, p. 767-778, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>. Acesso em: 21 de março de 2019.

DE MEDEIROS, Sérgio Raposo; MARINO, C. T. **Proteínas na nutrição de bovinos de corte**. Embrapa Gado de Corte-Capítulo em livro científico (ALICE), 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/120161/1/Nutricao-Animal-CAPITULO-03.pdf>. Acesso em: 30 set. 2018.

DE RAMOS, Luana Elis et al. **Produção e avaliação de briquetes de resíduos lignocelulósicos**. Pesquisa Florestal Brasileira, v. 31, n. 66, p. 103, 2011. Disponível em: <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/253> Acesso em: 21 de Março de 2019.

DE ROSSI, Eduardo et al. **Pré-tratamentos na produção de etanol de segunda geração**. Revista Monografias Ambientais, v. 13, n. 4, p. 3516-3522, 2014. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/remoa/article/download/13596/pdf>. Acesso em: 21 de março de 2019.

DEPOSITPHOTOS. Planta de soja em um fundo branco.2018. Disponível em: <<https://br.depositphotos.com/162120514/stock-illustration-an-illustration-showing-parts-of.html> editada>. Acesso em: 30 set. 2018.

DE MENEZES COPPOLA, Mario; TURNES, Carlos Gil. **Probióticos e resposta imune**. Ciência Rural, v. 34, n. 4, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n4/a56v34n4.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Atividades Econômicas: Solos. Sistemas de Produção; 1**. ISSN 1679-012, versão eletrônica – 3º edição. Nov, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckl80cd02wx5e0a2ndxy9o28e5x.html>. Acessado em: 25 set. 2018.

EMBRAPA. **Soja em números (safra 2017/2018)**. 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 28 out. 2018

FRANCHINI, J. C., et al. **Variabilidade espacial e temporal da produção de soja no Paraná e definição de ambientes de produção**. Embrapa Soja. Londrina, PR, 2016

FIORESE, M. L.et al. **Quantificação do crescimento celular de Saccharomyces boulardii utilizando diferentes metodologias**. Capítulo de livro. II Encontro de Pesquisa da FATEB – Telêmaco Borba, PR.2015. Disponível em: <http://fatebtb.edu.br/arquivos-ftp/encontro-de-pesquisa-2017/III%20Encontro%20de%20PesquisaVol%20II%20-%20Eng%20Quimica.pdf>Acesso em: 06 junho. 2018.

GABOARDI, Giana Carla. **Produção do probiótico Saccharomyces boulardii em efluente de arroz parboilizado e avaliação da biorremediação**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas. Disponível em: <http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/handle/prefix/3706>. Acesso em: 25 set. 2018

GARCÍA, MaConcepción et al. **Chemical characterization of commercial soybean products**. Food Chemistry, v. 62, n. 3, p. 325-331, 1998. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222748391_Chemical_characterization_of_commercial_soybean_products. Acesso em: 25 set. 2018

GARSTKA, Brendha. **Avaliação de materiais lignocelulósicos oriundos da produção e beneficiamento de soja visando à obtenção de bioetanol**. Monografia(Graduação em tecnologia de processos químicos)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo,2018.

GONÇALVES, Davi Ludvig et al. **Produção de álcool combustível a partir de hidrolizados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose**. 2010. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/30375643.pdf> Acesso em: 25 set. 2018.

GRIESHOP, C.M.; FAHEY, G.C. **Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.49, p.2669-2673, 2001.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas Relatório de Pesquisa**. Brasília, 2012. Disponível em: http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120917_relatorio_residuos_organicos.pdf>. Acesso em: 25 set. 2018.

JUNIOR, Miranda et al. **Estudos fisiológicos com leveduras industriais produtoras de etanol: efeito da natureza da fonte de nitrogênio**. 121 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2012. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/11449/100737/1/mirandajunior_m_dr_araiq.pdf. Acesso em: 25 set. 2018.

KELESIDIS, Theodoros; POTHOUKAKIS, Charalabos. **Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders**. Therapeutic advances in gastroenterology, v. 5, n. 2, p. 111-125, 2012.

KITAMURA, Denise Honda. **Produção de Biomassa probiótica e enriquecida com selênio de *Saccharomyces boulardii* utilizando melaço de cana-de-açúcar**. 2013. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/36281/R%20-%20D%20-%20DENISE%20HONDA%20KITAMURA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 28 out. 2018.

LOPES, Tatiane R.; DE OLIVEIRA PINTO, Miriam Aparecida. **Aplicação terapêutica de *Saccharomyces boulardii* em diarreias: uma revisão**. HU Revista, v. 36, n. 2, 2010. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/875>. Acesso em: 28 out. 2018.

LORENCINI, Patricia. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-11062013-133935/publico/tese.pdf>. Acesso em: 29 out. 2018.

LIU, Hua-Min; LI, Hao-Yang. **Application and Conversion of Soybean Hulls**. In: Soybean-The Basis of Yield, Biomass and Productivity, IntechOpen, 2017. Disponível em: <https://cdn.intechopen.com/pdfs/53518.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2018.

LUCERO, Pilar Eulalia MORENO, Rosario LAGUNAS; **Catabolite inactivation of the sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by the presence of a nitrogen source**, FEMS Yeast Research, Volume 1, Issue 4, 1 January 2002, Pages 307–314.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00049.x>. Acesso em: 29 out. 2018.

METAQUIMICA. **Microbiologia e meios de cultura**. s. d. Jaraguá do Sul, Santa Catarina. Disponível em: <https://www.metaquimica.com/microbiologia-e-meios-de-cultura.html>. Acesso em: 16, junho, 2019.

MAESTRE, Keiti Lopes et al. **Estudo de condições de fermentação alcoólica e acética utilizando subproduto lácteo e diferentes leveduras**. 2017. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/handle/tede/4087>. Acesso em: 10, junho, 2019.

MANDARINO, José Marcos Gontijo. **Composição química média da soja e valor nutricional das suas proteínas**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355202/1529289/Composi%C3%A7%C3%A3o+qu%C3%ADmica+m%C3%A9dia+e+valor+nutricional+dos+gr%C3%A3os+de+soja.pdf/60519771-341d-19ee-6e85-1e62073166b2>. Acesso em: 25 Set. 2018.

MARTINS, F. S. et al. **Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande, v. 5, n. 2, 2005b.

MARTINS, E. H. **Aproveitamento do Resíduo do Processamento da Soja para Produção de Painéis Aglomerados**. UFG. Jataí, GO. Julho de 2015. Disponível em: https://posagronomia.jatai.ufg.br/up/217/o/Disserta%C3%A7%C3%A3o_-_Evelyn_Hoffmamm_Martins_-_2015.pdf. Acesso em: 26 Set. 2018.

MAXWELL. **Conceitos Teóricos e Revisão Bibliográfica**. Disponível em: https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/10700/10700_3.PDF. Acesso em: 26 Set. 2018.

MCFARLAND, L. V. **Common organisms and probiotics: *Saccharomyces boulardii***. In: The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. 2017. p. 145-164.

MEDINA, María Alexandra Puerto. **Efeito de altas pressões e temperaturas em aminoácidos**. 2017. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/169260>. Acesso em: : 26, maio. 2019.

MÜLLER, José Luis. ***Saccharomyces boulardii*: growth in an air-lift fermenter and mechanically stirred flask**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006. Disponível em: <https://siaiap39.univali.br/repositorio/handle/repositorio/1439>. Acesso: 26, maio. 2019

MUNDSTOCK, Claudio Mário; THOMAS, André Luis. **Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005. Disponível em: https://www.ufrgs.br/agronomia/plantas/destaques/livro_soja.php> Acesso em: 26, maio. 2019.

NADAI, Barbara Lepretti de et al. **Efeito da suplementação de nutrientes e da concentração de permeado de soro de leite no crescimento de *Saccharomyces boulardii* em sistema descontínuo**. 2015. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/handle/tede/1858> Acesso em: 18, junho, 2019.

NAGASHIMA, Agnes Izumi. “**Desenvolvimento de rodutos eferv. escentes adicionados dos probióticos *lactobacillus acidophilus* e *saccharomyces boulardii***”. Maringá; Universidade estadual de Maringa,2010.

NEVES, Luiz Carlos Martins das. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando '*Saccharomyces cerevisiae*' W303-181**. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, *University of São Paulo*, São Paulo, 2003. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-08102006.../RevisaoBibliografica.pdf. Acesso em: 26 set. 2018

NEUHANNIG, Camila et al. **Intestinal dysbiosis: Correlation with current chronic diseases and nutritional intervention**. *Research, Society and Development*, 2019. Disponível em: <https://rsd.unifei.edu.br/index.php/rsd/article/view/1054>. Acesso em: 18, junho,2019.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, Teresa Cristina Goulart de; RIBEIRO, Cláudia Mello; GOMES, Maria Isabel Franchi Vasconcelos. **Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais**. *Ciência Rural*, p. 2670-2679, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0103-84782008005000001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 26 set. 2018

OLIVEIRA, Maricê Nogueira de et al. **Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos**. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 1-21, Mar. 2002. Disponível em:http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000100002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 27 Set. 2018.

PARDO, Silvina; GALVAGNO, Miguel Ángel; CERRUTTI, Patricia. **Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del precondicionamiento fisiológico**. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 26, n. 2, p. 155-160, 2009.

PIMENTEL, Tatiana Colombo. **Probióticos e benefícios à saúde**. *Saúde e Pesquisa*, v. 4, n. 1, 2011. Disponível em: <http://177.129.73.3/index.php/saudpesq/article/view/1276>. Acesso em: 07 de julho de 2019.

PINZAN, F. et al. Avaliação do efeito da temperatura e do ph na hidrólise enzimática do óleo de crambe. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1614-1619, 2015.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA W.; POLIKARPOV ,I. **Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to delignification process for enhanced enzymatic digestibility**. *Biotechnology for Biofuels*; 4:54, 2011.

ROBERFROID, Marcel. **Functional food concept and its application to prebiotics**. *Digestive and Liver Disease*, v. 34, p. S105-S110, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1590865802801761>>.>. Acesso em: 25 set. 2018.

ROJAS, Mayerlenis J.**Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São

Carlos, São Carlos, 2012. Disponível em :

<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/4101?show=full> Acesso em: 01 Nov. 2018.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. **Probiotics: Best practice & research.** Clin Gastroenterol, v. 18, p. 299-313, 2004. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002. Acesso em: 25 Set. 2018

SANDERS, M.E. et al. **Recommendations for probiotic use.** Journal of clinical gastroenterology, v. 42, p. S104-S108, 2008. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18542033>. Acesso em: 01 Nov. 2018.

SANTOS, Fernando A. *et al.* **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.** Quím. Nova, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012. Disponível em

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000500025&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 25 Set. 2018.

SANTOS, MSR et al. **Avaliação do pré-tratamento ácido do sabugo de milho visando a produção de etanol.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, p. 7245-7252, 2015. Disponível em: <http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/avaliacao-do-pre-tratamento-cido-do-sabugo-de-milho-visando-a-producao-de-etanol-2g-17540>. Acesso em: 15, junho, 2019.

SILVA, Maria Sebastiana *et al.*, **Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja.** 2006. Disponível em

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000300014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 01 Nov. 2018.

SILVESTRE, Carina Maria Rôlo Ferreira. **O diálogo entre o cérebro e o intestino: qual o papel dos probióticos?** revisão de literatura. 2016. Tese de Doutorado. Disponível em:

<http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/26287/1/CarinaRFSilvestre.pdf>. Acesso em: 27 de Nov, 2018.

SYNTH. Loja Synth. s. d. Diadema, São Paulo Disponível: <https://www.lojasynth.com/> Acesso em: 16, junho, 2019.

SOBRINHO CHEMMÉS, Camila et al. **Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração.** Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, v. 12, n. 1, 2013.

THAKUR, Avinash. et al. **I (+)-Lactic Acid Production by Immobilized *Lactobacillus casei* Using Low Cost Agro-Industrial Waste as Carbon and Nitrogen Sources.** Waste and Biomass Valorization, p. 1-11, 2017. Disponível em: <http://link-springer-com-443.webvpn.jxust.edu.cn/article/10.1007/s12649-017-0129-1>. Acesso em: 18, set., 2018.

TRIGUEROS, D. E. G. et al. **Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.** Biochemical engineering journal, v. 110, p. 71-83, 2016.

Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5303283>. Acesso em: 15, junho, 2019.

ZAMBOM, Maximiliane et al. **Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos.** Acta Scientiarum, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001. Disponível em: <http://ojs.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/viewFile/2648/2169>>. Acessado em: 27 de Nov, 2018.