

PROTEÍNA MICROBIANA EM BIOMASSA RESIDUAL DE REATORES ANAERÓBIOS PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE RESÍDUO LÍQUIDO DE FECULARIA¹

Karine Natani Lupatini², Dilemara Cristina Zenatti³, Simone Damasceno Gomes⁴, Shaiane Dal' Maso Lucas⁵,
Douglas Guedes Batista Torres⁶, Kenia Gabriela dos Santos⁷, Caroline Monique Tietz⁸

¹Aceito para publicação, 2º trimestre de 2013.

²Graduada em Tecnologia em Biocombustíveis com Qualificação Profissional de Nível Tecnológico em Meio Ambiente pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina/PR.

³Dr^a em Engenharia Agrícola, Prof^a do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, UFPR - Setor Palotina, Palotina/PR.

⁴Dr^a em Agronomia (Energia na Agricultura), Prof^a do Curso de Engenharia Agrícola, UNIOESTE – Campus Cascavel/PR.

⁵Doutoranda em Engenharia Agrícola – UNIOESTE – Campus Cascavel/PR.

⁶Doutorando em Engenharia Agrícola– UNIOESTE – Campus Cascavel/PR.

⁷Graduada em Tecnologia em Biocombustíveis com Qualificação Profissional de Nível Tecnológico em Meio Ambiente pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina/PR.

⁸Graduada em Tecnologia em Biocombustíveis com Qualificação Profissional de Nível Tecnológico em Meio Ambiente pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina/PR.

Palavras-chave: Single Cell Protein, Digestão anaeróbia, Resíduos agroindustriais.

Resumo

A digestão anaeróbia é amplamente utilizada no processo de tratamento de resíduos líquidos gerados em grandes quantidades em fecularias, que não sabem como proceder para dar finalidade a estes. A digestão anaeróbia surge como solução para tratamento dos resíduos líquidos proporcionando também a produção de hidrogênio na etapa de acidificação. Ao término do processo de acidificação é obtida a água residuária que ao sair dos reatores arrasta porções de biomassa contendo nutrientes de alto valor comercial, como a proteína microbiana que vem se destacando por ser uma fonte não convencional alternativa de proteína. O presente trabalho teve por objetivo a quantificação da biomassa residual proveniente da digestão anaeróbia do resíduo líquido de fecularia para a produção de hidrogênio, e a determinação do

teor de proteína bruta (PB) presente nessa biomassa, estimando também o potencial de produção da PB na fecularia localizada em Toledo/PR. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Campus de Cascavel. O resíduo líquido utilizado foi proveniente de indústria de processamento de mandioca para produção de fécula, localizada no município de Toledo (PR). Foram realizadas as análises de massa seca (MS) por método gravimétrico para a quantificação da biomassa e análises para determinação da PB pelo método Kjeldahal. Obteve-se uma média de MS para o R1 e para o R2 de 249,1 mg.L⁻¹ e 629,6 mg.L⁻¹ respectivamente, sendo constatado que esta diferença de valores esteve relacionada aos diferentes materiais suportes utilizados em cada reator e diferentes pH nas alimentações. Foram quantificados em média 50,5% e 45% de PB para os reatores 1 e 2 respectivamente, considerados altos, levando-se em consideração que não foram realizados controles operacionais para a produção específica da PB, pois a mesma foi obtida do processo de produção do hidrogênio, sendo assim, não fez-se adições de nutrientes, nem utilizou-se microrganismos específicos. Estimou-se que é possível a obtenção de aproximadamente 170 kg de PB por dia na fecularia localizada em Toledo/PR, devido ao grande volume de resíduo líquido gerado diariamente. A fecularia tem grande potencial de produção, podendo ser analisada a relação custo/benefício para instalação de um biodigestor com produção de hidrogênio ou biogás como bioenergia, associada à produção de PB.

Introdução

ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA E A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO (H₂)

Um problema que vem sendo enfrentado pelas fecularias é a geração e disposição dos resíduos gerados no processamento da mandioca. Cereda (2001) citado por Pinto (2008) esclarece que os subprodutos da industrialização da mandioca são partes constituintes da própria planta, gerados em função dos processos tecnológicos adequados.

Inoue (2008) menciona que os resíduos gerados neste processo podem ser sólidos como a casca, entrecasca e farelo, ou líquido como a manipueira. Tratando-se dos resíduos líquidos gerados, de acordo com Laimason (2009), dois tipos diferentes de águas são obtidas durante o processamento da mandioca até fécula. A primeira água é proveniente da lavagem das raízes, denominada água de lavagem, já a segunda é a água utilizada na extração e prensagem da massa ralada da mandioca na confecção da fécula, chamada de manipueira ou água vegetal. No caso de utilização da fécula para a produção de polvilho azedo é adicionado

o terceiro tipo de água, a água de fermentação, onde um volume de água adicional é utilizado para a fermentação da fécula até polvilho.

O efluente gerado apresenta o íon cianeto (CN^{-1}) e o ácido cianídrico (HCN), substâncias tóxicas por sua capacidade de bloquear o transporte de oxigênio no metabolismo de seres vivos (TORRES, 2009). Por essa razão, as indústrias de amido são consideradas altamente poluidoras.

Dentre os métodos de tratamento das águas residuárias, a digestão anaeróbia é uma alternativa que têm sido bastante estudada e utilizada, de maneira a reduzir a carga orgânica e a de cianeto, além de apresentar ainda uma elevada produção de biogás ou hidrogênio, os quais podem ser utilizados como fonte de energia.

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO (H_2) POR DIGESTÃO ANAERÓBIA

O gás hidrogênio, um potencial vetor energético, tornou-se um substituinte promissor dos combustíveis fósseis por apresentar alta densidade energética, aproximadamente 2,75 vezes maior que o petróleo, por ser inesgotável, já que o elemento hidrogênio é o mais abundante do planeta, e pela sua combustão da qual é liberada apenas energia e vapor de água (BOTTA, 2012). O hidrogênio é quimicamente muito ativo, e tem a tendência de se combinar com outros elementos químicos, formando compostos que correspondem a cerca de 70% das substâncias presentes na superfície da Terra (RAMAGE, 2004 citado por ESPINDULA, 2010), em outras palavras, este gás não está prontamente disponível na atmosfera e para que sua utilização seja viabilizada, devem ser estudados métodos de produção com relação custo e benefício satisfatória (BOTTA, 2012).

Dentre as formas de obtenção do H_2 a fermentação tem se destacado por constituir uma alternativa energética menos agressiva ao ambiente, uma vez que se utiliza de matérias-primas renováveis no seu processo, podendo ser realizada independentemente da disponibilidade de combustíveis fósseis que, na maioria das vezes em que são empregados, contribuem para o aumento da concentração de gases do efeito estufa decorrentes da sua combustão (SHIDA, 2008).

Torres (2009) explica que a digestão anaeróbia é um processo pelo qual bactérias que atuam na ausência de oxigênio, processam compostos orgânicos complexos, para produzir composto simples como metano, hidrogênio, dióxido de carbono, água e ácido sulfídrico, extraindo simultaneamente a energia e os compostos necessários para o seu próprio

crescimento. Este processo é realizado por microrganismos que atuam em uma série de reações em cadeia.

Peixoto (2008) considera que o processo de digestão anaeróbia possa ser dividido somente em duas grandes etapas, ou seja, em acidogênese e metanogênese, sendo que a obtenção de hidrogênio só é possível se o processo for interrompido na primeira etapa, pois o hidrogênio caracteriza-se como um intermediário do processo, sendo produzido na primeira etapa e consumido na segunda.

Fernandes (2008) afirma que a etapa fermentativa da digestão anaeróbia é o processo chave na produção de hidrogênio, sendo que nesta, microrganismos acidogênicos decompõem a matéria orgânica (ex. carboidratos, glicose e sacarose) em H_2 , CO_2 e ácidos graxos voláteis de cadeia curta. A Figura 1 ilustra o processo de digestão anaeróbia e os pontos de geração e consumo de hidrogênio.

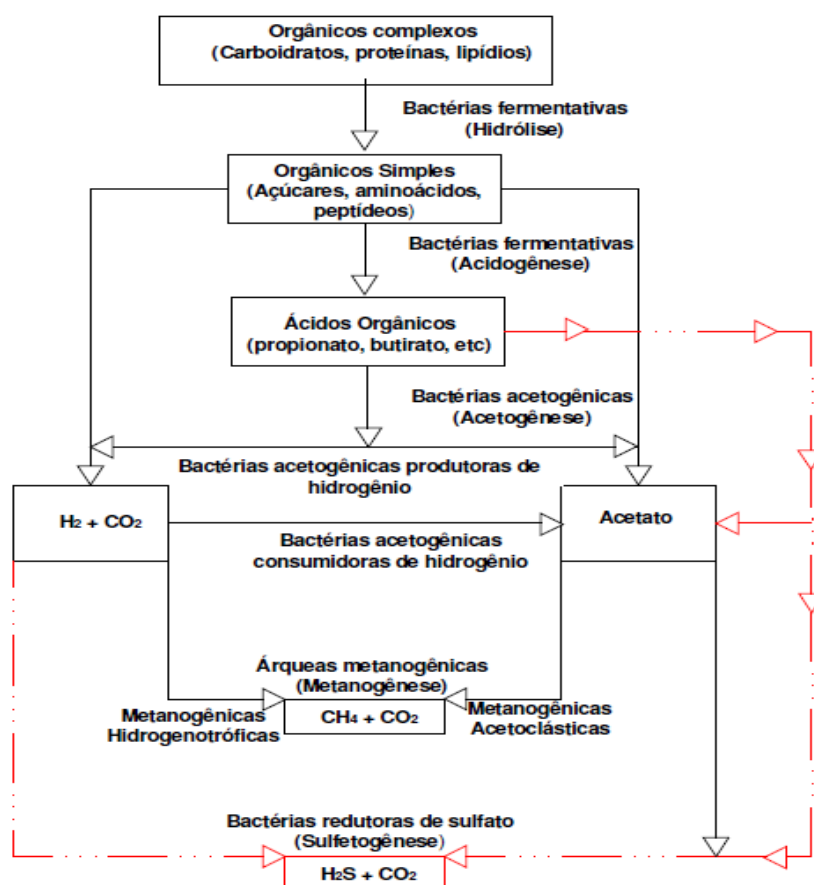


Figura 1. Pontos de geração e consumo de hidrogênio. Fonte: Chernicharo (2007), citado por Torres (2009).

Para a produção de hidrogênio, o processo deve ser interrompido na primeira etapa, sendo assim, Leite *et al.* (2008) aconselham que estratégias de controle operacional sejam

aplicadas aos reatores utilizados com o objetivo de se produzir hidrogênio, como controle de temperatura, o TDH (tempo de detenção hidráulica), pH, substratos, inóculo, configurações dos reatores e influência do material suporte.

Ao término do processo de digestão anaeróbia da produção do hidrogênio, obtêm-se resíduos como o efluente líquido, que ao sair do reator arrasta porções de biomassa. Tais resíduos contêm frações de nutrientes e podem então, receber outra destinação diferente do descarte, que acontece geralmente em corpo hídrico.

REAPROVEITAMENTO DA BIOMASSA RESIDUAL COMO FONTE DE PROTEÍNA UNICELULAR

Proteína unicelular, proteína microbiana ou ainda *Single Cell Protein* (SCP), são termos utilizados para nomear as células secas de microrganismos, cultivadas em grande escala e utilizadas como fonte de proteína na alimentação humana e na ração animal (LITCHFIELD, 1983 citado por ALBUQUERQUE, 2003). Este tipo de proteína trata-se de uma fonte não convencional alternativa. Ferreira *et al.* (2009) comentam as vantagens do uso de tais proteínas: o seu rápido crescimento; a capacidade de usar uma variedade de substratos; o alto rendimento de biomassa; pode ser manipulado geneticamente para aumento de rendimento e melhora na composição e, finalmente, não necessita de grandes áreas para a sua produção.

O elevado teor de proteínas na biomassa determina seu potencial uso na alimentação humana e animal, já que com o aumento alarmante da população mundial, as fontes convencionais como a agricultura, pecuária e pesca, podem não atender a demanda (PÁEZ *et al.*, 2008). O valor nutricional e a utilização da proteína microbiana estão baseados em sua composição, onde o produto final, além de ser nutritivo, deve estar livre de qualquer substância tóxica (VENDRUSCOLO, 2005).

Chacón (2004) afirma que a proteína unicelular pode ser gerada através do crescimento de muitas espécies diferentes de fungos, algas, leveduras e bactérias. A Tabela 1 apresenta tais microrganismos utilizados na produção da SCP, e suas respectivas composições.

Tabela 1 - Composição percentual média em base seca dos principais microrganismos empregados na produção da proteína unicelular.

Componentes	Fungos Filamentosos	Algas	Leveduras	Bactérias
Proteína	30 – 50%	40 – 63%	45 – 56%	50 – 83%

Gordura	2 – 8%	7 – 20%	2 – 6%	1,5 – 3%
Cinzas	9 – 14%	8 – 10%	5 – 9,5%	3 – 7%
Ácidos nucléicos	7 – 10%	3 – 8%	6 – 12%	8 – 16%
Aminoácidos	--	--	54%	65%
Umidade	13,0%	6%	4,5%	2,8%

Pelo fato destes microrganismos multiplicarem-se rapidamente e conterem alto teor de proteína bruta, apresentam-se como um produto atrativo quanto à obtenção de fontes protéicas mais baratas, especialmente se forem cultivados em resíduos agroindustriais (ALBUQUERQUE, 2003).

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA UNICELULAR

Diversos subprodutos agroindustriais têm sido usados como substratos para a produção de proteína unicelular, devido à disponibilidade local e por representarem uma fonte alternativa de baixo valor comercial. Tais substratos fornecem fontes de carbono e energia para o crescimento dos microrganismos e produção de proteína. Anupam e Ravindra (2000) citados por Vendruscolo (2005), explicam que fatores como a velocidade específica de crescimento do microrganismo, substrato utilizado, tipo de biorreator e condução do processo, pH, temperatura, fator de conversão e necessidade de esterilidade, produção de toxinas, valor biológico das proteínas são importantes na produção de SCP, pois determinam o custo e a viabilidade econômica do processo utilizado.

Na literatura, encontram-se trabalhos como o de Reffati *et al.* (2007), no qual se avaliou a bioconversão de resíduos agroindustriais lignocelulósicos de um efluente oriundo de processo de beneficiamento de madeira, utilizando *Lentinula edodes* como microrganismo, com o objetivo principal de produzir proteína unicelular. Os autores obtiveram teores de aproximadamente 17% de proteína, com rendimento de biomassa por litro de efluente de aproximadamente 8 g/L, em biorreator de bancada. Suhet e Fioreze (2011) avaliaram a produção de proteína unicelular na fermentação semissólida do resíduo da industrialização do abacaxi, com adição de uréia, com os fungos *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus niger*, analisando também o melhor tempo de detenção. Os autores obtiveram maiores quantidades de proteína bruta utilizando 0,3% de uréia, considerando pH menor que 4,5, o tempo de fermentação foi de 72 horas, com produção de proteína bruta para o fungo *R. oligosporus* de 12,56%, e para *A. niger* a produção de proteína bruta foi de 13,51%.

Albuquerque (2003) afirma que além das fontes de carbono e energia, os microrganismos requerem fontes de nitrogênio, fósforo e vitaminas. As fontes de nitrogênio mais adequadas para a produção de SCP são amônia, sais de amônio, nitratos, uréia e fontes orgânicas como os hidrolisados protéicos. No trabalho de Suhet e Fioreze (2011) como já citados, fez-se a adição de 0,3% de uréia e obteve-se aumento nas produções de proteína. Quando a uréia foi omitida, houve um aumento linear para o conteúdo protéico para fermentação com ambos os microrganismos, porém, a produção de proteína é menor do que quando faz-se uso da uréia.

Processos tecnológicos sofisticados para produção de proteína unicelular não são comercialmente atrativos, especialmente em regiões mais carentes, por não serem favoravelmente econômicos (SUHET e FIOREZE, 2011), sendo que a combinação entre tratamento de efluentes e a produção de proteína tem sido uma solução para as indústrias que necessitam de alternativas para reduzir os custos com tratamento de seus resíduos líquidos (ALBUQUERQUE, 2003).

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) *Campus* de Cascavel/PR.

SUBSTRATO

O substrato utilizado foi a água residuária proveniente de dois reatores anaeróbios (R1 e R2) produtores de Hidrogênio alimentados com manipueira obtida da fecularia localizada no município de Toledo/PR. A fecularia tem um regime de trabalho de 20 horas por dia, sendo processadas 7 toneladas de mandioca por hora, e consumidos aproximadamente 4 litros de água por quilo de mandioca processada, gerando aproximadamente 560 m³ de resíduo líquido por dia.

ANÁLISES REALIZADAS

A água residuária ao sair dos reatores anaeróbios arrastou parcelas de biomassa devido ao baixo tempo de detenção hidráulico (TDH) de 4 horas, aplicado ao processo. A água residuária foi centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos para a separação da biomassa. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, e a biomassa obtida foi submetida às análises de proteína bruta (PB) e massa seca (MS), apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Análises realizadas durante o experimento

ANÁLISE	MÉTODO	REFERÊNCIA	AUTORES
PB	Kjelhdal	AOAC	Suhet e Fioreze (2011)
MS	Gravimétrico	AOAC	Gonçalves (2001)

Resultados e Discussão

QUANTIFICAÇÃO DE MASSA SECA (MS)

A biomassa coletada na saída dos Reatores foi quantificada em teores de MS, possibilitando conhecer a quantidade da mesma proveniente da saída de cada reator. No gráfico apresentado na Figura 2, observa-se que a quantidade de MS (mg.L^{-1}) que sai do R1 é inferior a do R2, sendo uma média de MS por reator de $249,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para o R1 e $629,6 \text{ mg.L}^{-1}$ para o R2. A diferença entre ambos os reatores pode estar relacionada a alguns fatores.

Torres (2009) afirma que a utilização de meio suporte em reatores anaeróbios tem como princípio o aumento da área de contato dos microrganismos com o resíduo líquido a partir da utilização de material inerte como suporte, proporcionando maior atividade e crescimento da biomassa microbiana. Porém, segundo Leite *et.al.* (2008) o material suporte utilizado pode selecionar microrganismos. Sendo assim, o polietileno utilizado no R2 pode ter proporcionado maior área de contato do microrganismo com o resíduo líquido e melhor adesão do mesmo, proporcionando maior atividade microbiana e maiores quantidades de biomassa do que o bambu presente no R1.

Para a alimentação dos reatores foram realizadas correções de pH somente no resíduo líquido que entrava no R2, sendo o pH elevado até 7, enquanto que no R1 o resíduo líquido entrava com pH ácido em torno de 3 a 4, sem a correção do mesmo. Straatmann (2002) afirma que o pH é um fator que influencia o crescimento microbiano. Cada microrganismo tem uma faixa de pH dentro da qual o crescimento é possível e, usualmente, possui um pH ótimo bem definido. O pH neutro utilizado na alimentação do R2 foi mais adequado para o crescimento microbiano, consequentemente, houve maior quantidade de biomassa do que no R1.

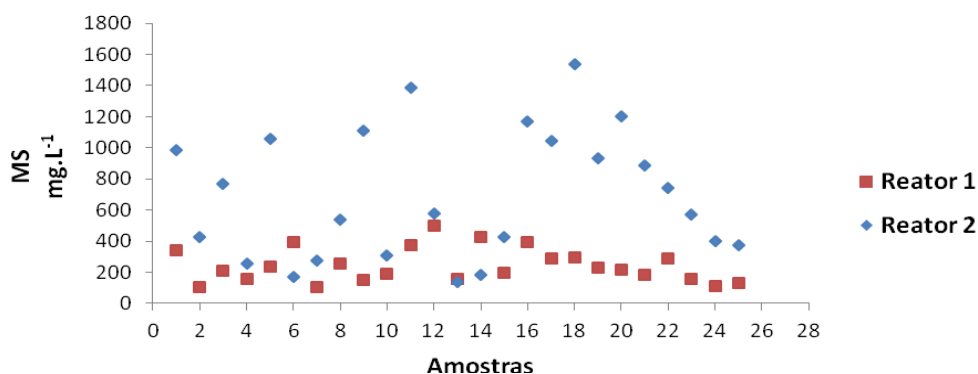


Figura 2 - MS dos reatores 1 e 2 ao longo do experimento.

A quantidade de MS poderia ser maior do que a obtida, pois parte da biomassa encontra-se aderida ao material suporte dentro dos reatores. Considerando que em biodigestores de indústrias processadoras não faz-se uso de material suporte, supõem-se que a quantidade de biomassa a ser obtida seja maior.

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA (PB)

Os teores de PB quantificados nas saídas dos reatores estão apresentados na Tabela 3. Observou-se que a biomassa proveniente do R1 apresentou em média, porcentagem maior de PB de 50,5%, enquanto que no R2 verificou-se 45%.

Os teores de PB quantificados foram considerados satisfatórios, levando-se em consideração que não foram realizados controles operacionais para a produção específica da PB, pois a mesma foi obtida do processo de produção do Hidrogênio, sendo assim, não fez-se adições de nutrientes, nem utilizou-se microrganismos específicos. Os altos teores de PB quantificados tornam possível considerar que a composição do resíduo líquido que entrou nos reatores foi satisfatória para a atividade microbiana.

Tabela 3 - PB (g.L⁻¹ e %) da biomassa dos reatores
PROTEÍNA BRUTA

UNIDADE	R1		R2	
	g.L ⁻¹	%	g.L ⁻¹	%
AMOSTRAS	0,173	50	0,157	16
	0,070	64	0,112	26
	0,064	31	0,441	57
	0,108	46	0,140	54
	0,073	47	0,456	43
	0,211	54	0,096	56
	0,057	55	0,150	54
	0,108	42	0,227	42
	0,138	90	0,411	37

	0,089	46	0,105	34
	0,178	47	0,693	50
	0,285	59	0,252	43
	0,108	69	0,112	82
	0,091	22	0,099	54
	0,084	42	0,133	31
	0,667	27	0,406	34
	0,175	60	0,547	52
	0,087	30	0,670	43
	0,087	38	0,490	52
	0,117	54	0,446	37
	0,103	57	0,460	51
	0,127	44	0,511	69
	0,08	51	0,304	53
	0,084	75	0,145	36
	0,082	62	0,077	20
MÉDIA	0,13784	50,5	0,3056	45

Visando maior produção de PB, diferentes fatores relacionados à produção podem ser avaliados. O autor Reffati *et. al.* (2009) utilizou efluente lignocelulósico do processamento da madeira e o fungo *Lentinula edodes* e avaliou diferentes concentrações de glicose como fonte de carbono e sulfato de amônio presente no próprio resíduo líquido como fonte de nitrogênio e o tempo de fermentação para produção de PB em Shaker Orbital. Utilizando as melhores condições obtidas, conduziu-se a uma otimização do bioprocesso em biorreator, com controle de temperatura, pH e alimentação. A interpretação das respostas consideradas indicou que a melhor condição para a produção de biomassa proteica foi aquela que utilizou o próprio resíduo líquido como fonte de nitrogênio, e 30 dias de tratamento.

Os autores Suhel e Fioreze (2011) utilizaram o resíduo proveniente da industrialização do abacaxi com os fungos *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus niger* em fermentação semissólida e avaliaram a adição de uréia 0,3% como fonte de nitrogênio, pH e tempo de fermentação. As maiores produções de PB foram nas condições com 72 horas de fermentação, pH em torno de 4,5 e com adição de uréia. Os autores quantificaram maiores teores de PB em 96 horas de fermentação, porém, após 72 horas o pH do meio aumentava consideravelmente proporcionando a germinação dos esporos bacterianos, neste sentido, considerou-se melhor parar a fermentação em 72 horas a fim de garantir um produto de qualidade livre de contaminação bacteriana.

Os resultados obtidos nos reatores 1 e 2 e pelos autores citados estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Comparação de resultados obtidos.

	ORIGEM DO EFLUENTE	MICROORGANISMO UTILIZADO	PROTEÍNA BRUTA (%)
R 1	Processamento da mandioca	Cultura mista	50,5
R 2	Processamento da mandioca	Cultura mista	45
REFFATI ET. AL., (2009)	Processamento da madeira	<i>Lentinula edodes</i>	17
SUHET E FIOREZE (2011)	Processamento do abacaxi	<i>Rhizopus oligosporus</i>	12,56
		<i>Aspergillus niger</i>	13,51

Podem ser realizados estudos em busca das melhores condições reacionais como pH, tempo de fermentação e adição de nutrientes, com a finalidade de proporcionar maiores teores de PB.

A PB presente na biomassa do resíduo líquido utilizado na alimentação dos reatores, ou seja, a PB que entra no sistema é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - PB (% e em g.L⁻¹) na biomassa da alimentação dos reatores.

	PROTEÍNA BRUTA	
	g.L ⁻¹	%
ENTRADA	0,1015	23,71

Houve significativo enriquecimento proteico da biomassa de 23,71% para 50,5% e 45% para os Reatores 1 e 2 respectivamente. Mesmo não se utilizando adição de uma fonte de nitrogênio ou quaisquer outros nutrientes, os microrganismos utilizaram como fonte de energia e alimento os nutrientes presentes no resíduo líquido, o qual se mostrou eficiente para a produção de PB na biomassa.

ESTIMAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE PB NA FECULARIA DE TOLEDO/PR

O resíduo líquido obtido dos reatores carrega porções de biomassa que contêm nutrientes como a proteína, quantificada nesta pesquisa, tornando-se um substrato para extração de PB.

Fazendo uso da PB (g.L⁻¹) obtida no R2 e associando-a ao volume do resíduo líquido de 560 m³ gerado por dia na fecularia de Toledo/PR afirma-se que obtém-se em média 170 kg

de PB por dia. A fecularia tem grande potencial de produção de PB devido ao grande volume de resíduo líquido gerado diariamente, podendo ser analisada a relação custo e benefício para instalação de um biodigestor com produção de hidrogênio ou biogás como bioenergia, associada à produção de PB.

Conclusões

Obteve-se uma média de MS para o R1 e para o R2 de 249,1 mg.L⁻¹ e 629,6 mg.L⁻¹ respectivamente, sendo constatado que esta diferença de valores esteve relacionada aos diferentes materiais suportes utilizados em cada reator e diferentes pH na alimentação.

Foram quantificados em média 50,5% e 45% de PB para os reatores 1 e 2 respectivamente, valores constatados altos levando-se em consideração que não foram realizados controles operacionais para a produção específica da PB, pois a mesma foi obtida do processo de produção do hidrogênio, sendo assim, não fez-se adições de nutrientes, nem utilizou-se microrganismos específicos.

Estimou-se que é possível a obtenção de aproximadamente 170 kg de PB por dia na fecularia localizada em Toledo/PR, devido ao grande volume de resíduo líquido gerado diariamente. A fecularia tem grande potencial de produção, podendo ser analisada a relação custo e benefício para instalação de um biodigestor com produção de hidrogênio ou biogás como bioenergia, associada à produção de PB.

Referências Bibliográficas

1. ALBUQUERQUE, P. M. Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, 2003.
2. ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Lei Nº 12.490, de 16.9.2011. 2011. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/?id=582#b>>. Acesso em 03/01/2013.
3. AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Edited by Patricia Cunniff . p. 42 - 44, 2000.
4. AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Washington: Association of Official Agricultural Chemists. p. 937, 1984.
5. BOTTA, L. S. Papel como fonte alternativa para a produção anaeróbia de hidrogênio. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos – SP, 2012.
6. CHACÓN, A. Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) em la agricultura y la indústria. Rev. Agronomía Mesoamericana, v. 15, n. 001, p. 93 – 106, 2004.
7. ESPINDOLA, J. S. Produção fotocatalítica de hidrogênio a partir de soluções de etanol em água. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2010.
8. FERNANDES, B. S. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo. São Carlos – SP, 2008.
9. FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J. G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. Trends in Food Science & Technology, Oxford, v. 21, n. 2, p. 77-84, 2009.
10. FIORETTO, R. A. Uso direto da manipueira em fertirrigação. Rev. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. Série: Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas. v. 04, p. 13 – 37, 2001.
11. INOUE, K. R. A. Produção de biogás, caracterização e aproveitamento agrícola do biofertilizante obtido na digestão da manipueira. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, 2008.
12. LAMAISSON, F. C. Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina – Centro Tecnológico. Florianópolis – SC, 2009.
13. LEITE, J. A. C.; FERNANDES, B. S.; POZZI, E.; BARBOSA, M.; ZAIAT, M. Application on anaerobic packedbed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. International Journal of Hydrogen Energy. v. 33, p. 579 – 586, 2008.
14. PÁEZ, G.; JIMÉNEZ, E.; MÁRMOL, Z.; FERRER, F.; SULBARÁN, B.; OJEDA, G.; ARAUJO, K.; RINCÓN, M. Perfil de aminoácidos de la proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. Rev. Interciência, v. 33, n. 4, 2008.
15. PEIXOTO, G. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerante. Dissertação (Mestrado

- em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo. São Carlos – SP, 2008.
16. PINTO, P. H. M. Tratamento de manipueira de fecularia em biodigestor anaeróbio para disposição em corpo receptor, rede pública ou uso em fertirrigação. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista. Botucatu – SP, 2008.
 17. POMPELLI, M. F.; OROZCO, A. J. J.; OLIVEIRA, M. T.; RODRIGUES, B. R. M.; BARBOSA, M. O.; SANTOS, M. G.; OLIVEIRA, A. F. M.; CORTEZ, J. S. A. Crise energética mundial e o papel do Brasil na problemática de biocombustíveis. Rev. Agronomía Colombiana, p. 231-240, 2011.
 18. REFFATI, P. F.; AGUIAR, C. M.; RODRIGUES, M. B. Estudo da bioconversão de resíduos agroindustriais lignocelulósicos por *Lentinula edodes*: produção e caracterização de proteína unicelular. Rev. Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 01, n. 01, p.1 – 8, 2007.
 19. SHIDA, G. M. Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidificado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo. São Carlos – SP, 2008.
 20. STRAATMANN, G. S. Otimização do uso de óleos-refrigerantes na indústria metal-mecânica. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2002.
 21. SUHETI, M. I.; FIOREZE, R. Produção de proteína unicelular a partir do resíduo da industrialização do abacaxi utilizando fermentação em estado semissólido. Rev. Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 05, n. 02, p. 584 – 592, 2011.
 22. TORRES, D. G. B. Meios Suporte no Tratamento Anaeróbio da Manipueira. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel – PR, 2009.
 23. VAN GINKEL, S.; SUNG, S.; LAY, J.J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. Environmental Science and Technology, v. 35, p. 4726 – 4730, 2001.
 24. VENDRUSCOLO, F. Cultivo em meio sólido e submerso do bagaço de maçã por *Gongronella butleri* e avaliação do seu potencial biotecnológico. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, 2005.