

FRANCIELO VENDRUSCOLO

**CULTIVO EM MEIO SÓLIDO E SUBMERSO
DO BAGAÇO DE MAÇÃ POR *Gongronella butleri* E AVALIAÇÃO
DO SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Florianópolis - SC

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CULTIVO EM MEIO SÓLIDO E SUBMERSO
DO BAGAÇO DE MAÇÃ POR *Gongronella butleri* E AVALIAÇÃO
DO SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação submetida à Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do
grau de mestre em Engenharia de Alimentos.

Franciolo Vendruscolo

Engenheiro de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Florianópolis

2005

*Aos meus pais e irmãos,
porque sempre acreditaram em mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jorge Luiz Ninow, pela orientação, incentivo, companheirismo e acima de tudo pela amizade.

À professora Elisa Espósito por realizar os testes biológicos na Universidade de Mogi das Cruzes e pela participação na avaliação deste trabalho.

À Yakult S/A Indústria e Comércio, pela concessão do bagaço de maçã para a realização deste trabalho.

Às queridas bolsistas Fernanda Koch e Luana de Oliveira Pitol, pela dedicação, compreensão, convivência e amizade. A participação de vocês foi muito importante para a realização deste trabalho.

Aos grandes amigos e companheiros de moradia, Paulinho e Renata, Gustavo, Júlio e César, pois estiveram todos os dias participando desta etapa em minha vida, além dos vários momentos de alegrias e tristezas. A vocês, muito obrigado.

Aos colegas do laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), Rafael, Érika, Renato, Mônica, Francieli, Lílian, Fernanda, Cristiane, Adriane, Vanessa, Suzane, Murilo, Karen, Ernandes, Denise, Márcio e aos professores Gláucia Maria Falcão de Aragão e Agenor Furigo Jr. pela convivência do dia-a-dia.

Ao meu pai Ademir, minha mãe Adélia e meus irmãos Rafael e Daniele, por demonstrarem muito carinho, amor e acima de tudo compreensão. A vocês, muito obrigado.

À Cristina pelo apoio, carinho, companheirismo e acima de tudo pela compreensão. Cris, a você o meu muito obrigado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de mestrado e iniciação científica.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Bagaço de Maçã e sua Bioconversão	4
2.2 Proteína de Organismo Unicelular (Single Cell Protein)	8
2.3 Cultivo em Meio Sólido	13
2.4 Quitosana	18
2.4.1 <i>Obtenção da Quitosana</i>	19
2.4.2 <i>Quitosana Fúngica</i>	21
2.4.3 <i>Aplicações da Quitosana</i>	22
2.5 Biorreatores Airlift	24
2.5.1 <i>Aplicações dos Biorreatores Airlift</i>	26
2.5.2 <i>Vantagens dos Biorreatores Airlift</i>	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Microrganismo	32
3.2 Preparo do Inóculo	33
3.3 Cultivo Submerso	33
3.3.1 <i>Substrato</i>	33
3.3.2 <i>Condições de Cultivo</i>	34
3.3.3 <i>Dosagem de Biomassa</i>	36
3.3.4 <i>Dosagem de Açúcares Redutores</i>	36
3.3.5 <i>Extração da Quitosana</i>	37
3.3.6 <i>Determinação dos Parâmetros Cinéticos</i>	37
3.4 Cultivo em Meio Sólido	39
3.4.1 <i>Substrato</i>	40
3.4.2 <i>Condições de Cultivo</i>	40
3.4.3 <i>Delineamento Experimental</i>	41
3.4.4 <i>Determinações Analíticas</i>	43
3.5 Testes Biológicos e Parâmetros Biométricos	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Cultivo Submerso	46
4.2 Cultivo em Meio Sólido	51
4.2.1 <i>Caracterização do Bagaço de Maçã</i>	51
4.2.2 <i>Planejamento Experimental Fatorial 3²</i>	52
4.2.3 <i>Primeiro Planejamento Experimental Fatorial 2²</i>	57
4.2.4 <i>Segundo Planejamento Experimental Fatorial 2²</i>	59
4.3 Testes Biológicos e Parâmetros Biométricos	63
5. CONCLUSÃO	70

6. SUGESTÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma simplificado do processamento da maçã (VILLAS BÔAS, 2001).....	4
Figura 2: Estrutura química da (a) quitina e (b) quitosana (DESBRIERES, 2002; TOLAIMATE et al., 2003).....	18
Figura 3: Esquema de biorreatores <i>airlift</i> com (a) circulação interna e (b) com circulação externa (b). (Adaptado de CHISTI, 1989).....	25
Figura 4: Esquema do biorreator <i>airlift</i> utilizado.....	35
Figura 5: Esquema utilizado em fermentação semi-sólida. (1) compressor; (2) regulador de vazão; (3) filtro milipore; (4) umidificador primário; (5) umificador secundário; (6) colunas de Raimbault; (7) termostato.....	41
Figura 6: Produção de biomassa no cultivo de <i>G. butleri</i> sob aeração de 0,3VVM, temperatura de 30°C e pH 4,5.....	46
Figura 7: Produção de biomassa no cultivo de <i>G. butleri</i> em sob aeração de 0,6VVM, temperatura de 30°C e pH 4,5.....	46
Figura 8: Colunas de Raimbault ao final dos cultivos da <i>G. butleri</i> para os ensaios utilizando uréia, sulfato de amônio e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. (a) umidade inicial de 50%, (b) umidade inicial de 60% e (c) umidade inicial de 70%, (1) uréia, (2) sulfato de amônio, (3) nitrato de sódio.....	54
Figura 9: Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta proteína solúvel para os fatores fonte de nitrogênio <i>versus</i> umidade inicial.....	56
Figura 10: Média e desvio padrão para a resposta comprimento inicial e final dos alevinos submetidos às dietas RC e RCB.....	63
Figura 11: Média e desvio padrão para a resposta altura inicial e final dos alevinos submetidos às dietas RC e RCB.....	65
Figura 12: Média e desvio padrão para a resposta massa inicial e final dos alevinos submetidos às dietas RC e RCB.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição físico-química do bagaço de maçã.....	5
Tabela 2: Composição de diferentes POU.....	10
Tabela 3: Características físico-químicas da quitosana comercial.....	19
Tabela 4: Níveis do planejamento experimental fatorial 3^2	42
Tabela 5: Níveis do primeiro planejamento fatorial 2^2	42
Tabela 6: Níveis do segundo planejamento fatorial 2^2	43
Tabela 7: Concentração de biomassa ao longo do cultivo de <i>G. butleri</i> em <i>airlift</i>	47
Tabela 8: Parâmetros cinéticos e resultados obtidos para os cultivos em <i>airlift</i>	48
Tabela 9: Caracterização do bagaço de maçã.....	51
Tabela 10: Variáveis codificadas, variáveis reais e respostas para o planejamento experimental fatorial 3^2	52
Tabela 11: Estimativa dos efeitos e valores de p para a resposta proteína solúvel.....	55
Tabela 12: Variáveis codificadas, variáveis reais e respostas para o primeiro planejamento fatorial 2^2	57
Tabela 13: Estimativa dos efeitos e valores de p para a resposta proteína solúvel.....	58
Tabela 14: Variáveis codificadas, variáveis reais e respostas para o segundo planejamento fatorial 2^2	59
Tabela 15: Estimativa dos efeitos e valores de p para a resposta proteína solúvel.....	60
Tabela 16: Diferença entre médias e análise de variância para o comprimento dos alevinos.....	64
Tabela 17: Diferença entre médias e análise de variância para a altura dos alevinos.....	66
Tabela 18: Diferença entre médias e análise de variância para a massa dos alevinos.....	68
Tabela A1: Dados que geraram a Tabela 12.....	83
Tabela A2: Dados que geraram a Tabela 14.....	84
Tabela A3: Dados que geraram a Tabela 16.....	84
Tabela B1: Procedimentos para realização dos reagentes.....	85

RESUMO

O estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de maçãs, produzindo aproximadamente 400 mil toneladas por ano. Cerca de 30 a 35% desta produção é destinada ao processamento para obtenção de sucos, geléias e concentrados. Este processamento gera grandes quantidades de resíduos, denominado bagaço de maçã, o qual é composto por polpa, casca e semente. Diante da grande produção deste resíduo, surge a necessidade da utilização deste material em aplicações biotecnológicas, pois possui baixo conteúdo protéico e alto conteúdo de açúcares, os quais podem ser utilizados como fonte de carbono para microrganismos em sua forma sólida e/ou através da extração dos açúcares. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo o enriquecimento protéico do bagaço de maçã em fermentação em estado sólido e o cultivo do fungo *Gongronella butleri* em biorreator *airlift* visando à obtenção de quitosana. Os experimentos em fermentação em estado sólido consistiram na avaliação da fonte de nitrogênio, umidade inicial e granulometria do meio de cultivo, tendo como resposta a produção de proteína solúvel e o consumo de açúcares redutores. Este material tratado biologicamente foi empregado na alimentação de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). O enriquecimento protéico do bagaço de maçã atingiu valores máximos 19,24% de proteína solúvel, e quando avaliados como complemento alimentar em dietas para alevinos, estes apresentaram diferenças significativas quando comparados à ração convencional, demonstrando que a quantidade de proteína solúvel no bagaço de maçã possui um alto valor nutritivo, pois foi obtido um aumento de 44% na massa dos alevinos tratados durante um período de 30 dias. Já os experimentos utilizando fermentação submersa visando à obtenção de quitosana foram realizados em reator *airlift* com circulação externa de volume 6,5L, avaliando a fonte de nitrogênio e a aeração do meio de cultivo. Os experimentos utilizando maiores níveis de aeração proporcionaram maiores concentrações de biomassa, atingindo 8,06 e 9,61g.L⁻¹, resultando na produção de 873mg.L⁻¹ e 1062mg.L⁻¹ de quitosana, demonstrando a adequação do biorreator *airlift* no cultivo do microrganismo com ênfase na obtenção de quitosana.

ABSTRACT

The state of Santa Catarina is greatest national producer of apples, by producing approximately 400 a thousand tones per annum. About 30 the 35% of these production is destined to through put for procurement of juices, jellies and concentrates. This processing generates big quantities of detritus, denominated apple pomace, that is composed by pulp, peels and seeds. Before ostentatiously production gave end product, appears the necessity of utilization of this material in aplicaciones biotecnologics, because possesses bass protein content and high content of sugars, that can be utilized as source of carbon for microorganism in hers beefy form and across of extraction of the sugars. Before hence, the gift work did have as objective the protein enrichment of apple pomace in state solid fermentation and the cultivation of fungus *Gongronella butleri* in bioreactor *airlift* by seeking the procurement of chitosan. The experiments in solid state fermentation consisted in the overview of source of nitrogen, initial moisture and granulometry medium of cultivation, by having as answer the production of soluble protein. This material treatise biologically was employed in the alimentation of alevinos of tilápia-of-nile (*Oreochromis niloticus*). The protein enrichment of apple pomace attained values maxima 19,24% of protein soluble, and when appraised as complement to feed in diets for alevinos, these introduced expressive differences when equated to conventional allowance, by demonstrating that the amount of protein soluble in the apple pomace possesses a high food value, because was obtained an accrual of 44% in the mass of the alevinos treaties during a period of 30 days. Already the experiments by utilizing submerged fermentation by seeking the procurement of chitosan went accomplished in choke *airlift* with outward circulation of bulge 6,5L, by evaluating the nitrogen source and the aeration of culture medium. The experiments by utilizing greatest levels of aeration did proportionate greatest concentrations of biomass, attaining 8,06 and 9,61g.L-1, result in the production of 873mg.L-1 and 1062mg.L-1 of chitosan, by demonstrating the adequacy of bioreactor *airlift* in the cultivation of microorganism with emphasis in the procurement of chitosan.

1. INTRODUÇÃO

O Estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de maçãs, produzindo cerca de 400 mil toneladas por ano (ABPM, 2004). A maior parte desta produção é destinada à comercialização interna *in natura*. Uma considerável parcela dos frutos não selecionados para o consumo (30-35%) é destinada ao processamento industrial para obtenção de sucos, aromas e concentrados. O resíduo gerado durante este processamento é denominado bagaço de maçã, o qual tem sido tradicionalmente utilizado como adubo orgânico e ração animal, apesar de possuir baixo conteúdo protéico.

Se disposto no solo, graves problemas ambientais podem ser gerados, devido à quantidade de resíduo produzido e a alta carga orgânica despejada no solo. Se destinado à ração animal sem tratamento algum, este resíduo pode provocar alguns problemas quando ingerido, como o caso da alcoolemia em bovinos. Tal fenômeno é caracterizado pela produção de álcool através da fermentação dos açúcares existentes no bagaço de maçã no rúmen, causando intoxicação do animal.

O bagaço de maçã é uma mistura de casca, polpa e sementes, sendo um resíduo sólido pobre em proteínas, mas rico em fibras e açúcares redutores. Devido ao alto conteúdo de açúcares redutores e a gama de aplicações da biotecnologia, surge uma alternativa para a utilização deste resíduo para a produção de bioprodutos utilizando o bagaço de maçã como fonte de carbono e nutrientes para microrganismos. Este material pode ser utilizado diretamente na forma sólida (fermentação semi-sólida) ou pela extração dos açúcares (fermentação submersa).

A utilização do bagaço de maçã na forma sólida é mais indicada para a obtenção de bioprodutos que não necessitem de várias operações *Downstream*, como o caso das Proteínas de Organismo Unicelular (POU), pois pode inviabilizar o processo dependendo do produto e concentração obtida, bem como a grande quantidade de resíduo sólido a ser removida. Processos como o enriquecimento protéico do bagaço de maçã por fungos filamentosos, que não necessitem de operações que aumentem o custo do produto final, são possibilidades de agregação de valor ao bagaço, pois este é comercializado com produtores agropecuários da região no valor simbólico de US\$1/Ton.

Este bagaço enriquecido proteicamente pode ser utilizado na alimentação animal, como gado e peixes. No caso da alimentação de peixes, a produção de proteína unicelular a partir da utilização do bagaço de maçã pode ser uma alternativa para minimizar custos oriundos da alimentação destes animais com rações convencionais para aquicultura, além de o microrganismo diminuir quantidades significativas da carga orgânica do bagaço, transformando os açúcares redutores em biomassa, produzindo proteínas e componentes celulares, aspectos importantes quando este material é submetido à alimentação de peixes pela Demanda Biológica de Oxigênio apresentar-se menor quando comparado com o bagaço sem tratamento biológico.

No caso da utilização do bagaço de maçã como fonte de carbono através da extração dos açúcares, este pode ser utilizado através do emprego de processos biotecnológicos que operam em sistemas submersos. Uma alternativa para esta utilização é a produção de biomassa visando à obtenção de alguns metabólitos e constituintes celulares, como a produção de quitosana.

A quitosana é um biopolímero produzido através da desacetilação parcial da quitina, componente obtido a partir de resíduos marinhos, processo este que gera grandes quantidades de efluentes concentrados e a não uniformidade do produto final. Devido a suas diversas funções e características, pode ser utilizada em diversas áreas, como: médica, farmacêutica, agricultura, pecuária, têxtil e alimentícia. É o principal constituinte da parede celular de fungos da classe dos Zigomicetos, sendo uma alternativa a utilização destes para a obtenção de quitosana, pois esta é raramente encontrada na natureza.

A maior aplicação da quitosana até o momento é a utilização como agente antimicrobiano em alimentos. Uma grande promessa do mercado da quitosana está enfatizada na aplicação desta em tratamentos odontológicos e de queimaduras, merecendo grande atenção devido a sua aplicabilidade nestas áreas e por possuir a utilização da quitosana com características físicas e físico-químicas homogêneas, podendo-se agregar valor ao produto final.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo o cultivo em meio sólido e submerso do bagaço de maçã pelo fungo filamentosso *Gongronella butleri* e avaliação do seu potencial biotecnológico.

Dentre os objetivos específicos estão:

- avaliar o crescimento do fungo em biorreator do tipo *airlift* para a produção de quitosana e definir as melhores condições de cultivo;
- avaliar a fonte de nitrogênio, umidade inicial e granulometria no enriquecimento protéico do bagaço de maçã utilizando o processo de fermentação em estado sólido;
- Avaliar o valor nutritivo do bagaço de maçã enriquecido como complemento nutricional em dietas para alevinos de tilápia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bagaço de Maçã e sua Bioconversão

O bagaço de maçã é um resíduo produzido a partir da obtenção do suco de maçã por indústrias de sucos, geléias, doces e aromas, gerando grande quantidade de resíduos (BEROVIC e OSTROVERSNICK, 1997; VILLAS BÔAS, 2001). Este resíduo é uma mistura composta pela polpa, casca e sementes. A Figura 1 apresenta o fluxograma da obtenção industrial do suco de maçã.

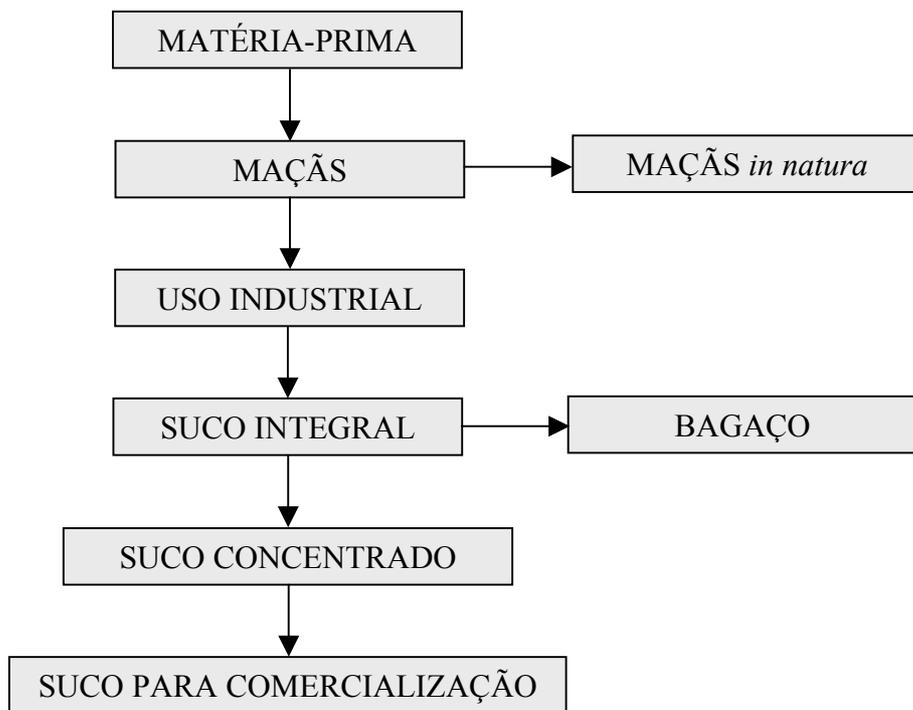


Figura 1: Fluxograma simplificado do processamento da maçã (VILLAS BÔAS, 2001).

Os frutos que não atendem os requisitos para comercialização são destinados para o uso industrial, sendo então limpos e higienizados. Em seguida é feita a extração do suco por prensagem, visando extrair o máximo de suco. O material sólido gerado nesta etapa é denominado bagaço de maçã. Este material possui elevada quantidade de carboidratos e

fibras, constituídas por biopolímeros de alto peso molecular. Possui baixo conteúdo de proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas e sais (FOO e LU, 1999; ZHENG e SHETTY, 1998; ALBUQUERQUE, 2003; ALBUQUERQUE et al., 2003). A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas do bagaço de maçã.

Tabela 1: Composição físico-química do bagaço de maçã.

Componente	% (p/p)
Umidade	79,20
Açúcares Redutores totais	10,10
Nitrogênio Total	0,56
Pectina	7,66
Fibra em detergente ácido	38,20
Fibra em detergente neutro	24,30
Cinzas	2,0

Fonte: ALBUQUERQUE (2003).

O bagaço de maçã é tradicionalmente destinado como adubo orgânico em lavouras ou na alimentação do gado, pois apresenta baixo valor comercial devido ao seu baixo conteúdo protéico. Quando destinado à alimentação animal sem nenhum tratamento biológico, pode provocar o fenômeno conhecido como alcoolemia. Tal fenômeno resulta da fermentação do bagaço no rúmen do animal, com conseqüente produção de álcool, causando intoxicação do animal (VILLAS BÔAS, 2001).

Por apresentar alto conteúdo de açúcares, o bagaço de maçã torna-se um substrato em potencial para utilização em processos biotecnológicos, atuando como fonte de carbono para microrganismos. A conversão deste resíduo em produtos mais nobres vem aumentando nos últimos anos. Várias pesquisas utilizaram o bagaço de maçã como fonte de carbono para

microrganismos, dentre elas: produção de ácido cítrico (SHOJAOSADATI e BABAEUPOUR, 2002), Proteína de Organismo Unicelular (VILLAS BÔAS, 2001; ALBUQUERQUE, 2003; JOSHI e SANDHU, 1996), fungos comestíveis (ZHENG e SHETTY, 1998), enzimas (BEROVIC e OSTROVERSNICK, 1997; HANG e WOODAMS, 1994; ZHENG e SHETTY, 2001), etanol (NGADI e CORREIA, 1992) e quitosana (STREIT, 2004). Na maioria dos processos envolvendo fermentação em estado sólido, a fonte de carbono é oriunda do próprio substrato, na forma solúvel ou insolúvel (ZHENG e SHETTY, 1998).

ZHENG e SHETTY (1998) utilizaram bagaço de maçã para a produção de um alimento rico em proteínas através do fungo *Rhizopus oligosporus*. Investigaram os efeitos da adição de CaCO_3 na correção do pH e adição de fontes de nitrogênio no crescimento do fungo. O pH inicial do bagaço situava-se na faixa de 3,1 a 3,8; sendo que ao adicionar carbonato, o pH aumentou para 5,8 a 7,0, sendo vantajoso utilizar este processo de alcalinização em grande escala por apresentar baixo custo. A umidade inicial do substrato é outro aspecto importante para que o fungo atinja crescimento máximo. Altos conteúdos de umidade resultam no aumento da produção micelial, interferindo na transferência de oxigênio. Baixos teores de umidade reduzem o crescimento fúngico. Outra maneira de expressar o efeito da umidade pode ser relacionada em termos da atividade de água (a_w), indicando a quantidade de água disponível para o crescimento do fungo.

STREDANSKY et al. (2000) avaliaram a viabilidade de produção de ácido γ -linolênico (AGL) por fermentação em estado sólido do bagaço de maçã utilizando o fungo *Thamnidium elegans*. Resíduos de malte e cervejaria foram adicionados ao bagaço impregnado com uma solução nutriente, aumentando assim, a porosidade do leito. A fonte de

nitrogênio adicionada foi o nitrato de sódio e a umidade utilizada foi de 60% (p/p), pois o baixo conteúdo de umidade combinada ao pH ácido do substrato diminui significativamente o risco de contaminação, favorecendo o desenvolvimento do fungo. Maiores resultados na produção do ácido γ -linolênico foram obtidos através da adição de óleo de amendoim, que atuou como precursor na produção do AGL (ácido γ -linolênico) nas células do fungo.

BHALLA e JOSHI (1994) utilizaram os fungos *Trichoderma viride* e *Aspergillus niger* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* combinados no enriquecimento protéico do bagaço de maçã em fermentação semi-sólida e fermentação submersa. Os fungos degradaram primeiramente a celulose e a hemicelulose do bagaço, através de seu potencial em enzimas extracelulares. As leveduras utilizaram os açúcares liberados pela ação enzimática. O cultivo em meio sólido apresentou 200% de aumento no enriquecimento protéico quando utilizada a combinação de *Cândida utilis* e *Aspergillus niger*.

RAHMAT et al. (1995) trataram o bagaço de maçã com as leveduras *Kloeckera apiculata* e *Candida utilis*, empregando cultivo em meio sólido com agitação de 20rpm em biorreator automatizado. A fonte de nitrogênio utilizada foi o sulfato de amônio na concentração de 1% (p/p), obtendo 173% de aumento no teor de proteína bruta com especial aumento nas concentrações de aminoácidos essenciais e o teor de açúcares no substrato se exauriu após 72 horas de fermentação.

O resíduo proveniente do processamento de maçã apresenta elevada umidade, o que gera um enorme custo com transporte. O aproveitamento deste resíduo na própria indústria processadora de sucos é a melhor maneira de tornar viável economicamente a obtenção de produtos de interesse, valorizando este recurso como fonte de carbono, diminuindo

significativamente a disposição do bagaço nos solos e contribuindo para a redução da poluição ambiental (VILLAS BÔAS, 2001).

2.2 Proteína de Organismo Unicelular (Single Cell Protein)

Proteínas de Organismo Unicelular (POU) são células secas de microrganismos, cultivadas em grande escala e utilizadas como fonte de proteína para alimentação humana e animal (KURBANOGLU, 2001; LITCHFIELD, 1983).

Algas, fungos e bactérias são as principais fontes de proteína microbiana, utilizadas como POU (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000). As algas, desde os tempos antigos foram utilizadas como fonte alimentar por povos que habitavam as margens dos Lagos Chad na África e Texcoco no México, os quais utilizavam a microalga *Spirulina platensis* como alimento (SINGH et al., 1998). Dentre os maiores produtores de POU provindos de algas, pode-se citar o Japão, Índia, Estados Unidos, França, Coréia e China (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000). Devido a grande variedade dos tipos de algas que podem ser utilizadas como fonte protéica, alimentos para peixes, anfíbios aquáticos, mamíferos e outros animais, podem ser produzidos com este tipo de SCP (Single Cell Protein) (VASHISTA, 1989).

As bactérias mais utilizadas como fontes de proteínas unicelulares são a *Cellulomonas* e *Alcaligenes*, revelando o seu potencial de bactérias fototróficas para a produção de SCP. Bactérias metanotróficas também são citadas na literatura como fontes de proteína unicelular (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

Fungos filamentosos e leveduras também são citados como fontes de proteínas e podem ser utilizados como POU. *Aspergillus niger* (SINGH et al., 1998; EL-SAADANY et al., 1988), *Saccharomyces cerevisiae* (KOLANI et al., 1996; SINGH et al., 1998), *Fusarium graminearum* (SINGH et al., 1998), *Penicillium cyclopium* (KIM e LEBEAULT, 1981) e fungos brancos de podridão (ZADRAZIL e PUNIYA, 1995) são exemplos de microrganismos que são utilizados mundialmente como fontes de Proteína de Organismo Unicelular.

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. Embora esses microrganismos sejam cultivados principalmente pelo alto conteúdo protéico, que determinará o valor comercial da POU, as células microbianas também possuem lipídeos, vitaminas, além de nitrogênio não protéico, como os ácidos nucleicos. A proteína de origem microbiana pode ainda servir como ingrediente funcional, fornecendo características desejáveis aos alimentos, tais como sabor, formação de espuma, retenção de água e gordura, textura entre outras (LITCHFIELD, 1983).

Fungos em geral, fornecem vitaminas do complexo B, mas podem apresentar micotoxinas. As células de leveduras contêm tiamina, riboflavina, biotina, niacina, ácido pantotênico, colina, ácido fólico, entre outros componentes de alto valor nutricional. Entretanto, mostram-se deficientes em aminoácidos sulfurados e podem apresentar alta concentração de ácidos nucleicos (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000). A Tabela 2 apresenta a composição das células de diferentes tipos de microrganismos.

Tabela 2: Composição de diferentes POU.

Componente (%)	Algas	Fungos	Bactérias
Proteínas	40-60	30-70	50-83
Nitrogênio	45-65	35-50	60-80
Lisina	4,6-7,0	6,5-7,8	4,3-5,8
Metionina	1,4-2,6	1,5-1,8	2,2-3,0
Ácidos Graxos	5-10	5-13	8-10
Ácidos Nucléicos	4-6	9,7	15-16
Sais Minerais	7	6,6	8,6
Aminoácidos	-	54	65

Fonte: ANUPAMA e RAVINDRA (2000).

A quantidade de ácidos nucleicos nas células dos microrganismos tem sido o principal fator limitante para utilização em alimentos para humanos. A ingestão diária acima de 2 gramas desses componentes, pode resultar em elevados níveis de ácido úrico, que se acumula no corpo devido à falta da enzima uricase nos seres humanos, provocando doenças como a formação de pedras nos rins e gota (PARAJÓ et al., 1995).

Segundo ABOUD-ZEID et al. (1994), a biomassa deve conter no máximo 3% (p/p) de ácidos nucleicos para satisfazer os requerimentos protéicos em humanos através da ingestão de SCP (Single Cell Protein). Tentativas de eliminação de ácidos nucleicos destes tipos de produtos vêm sendo desenvolvidas, porém com pouco sucesso (ABDREU et al., 1988; ABURUWAIDA et al., 1988).

LUCCA et al. (1991) reduziram em 40% o teor de RNA das células de *Candida utilis* apenas variando a disponibilidade de fontes de fósforo no meio de cultivo. ABOUD-ZEID et al. (1994) avaliaram três tratamentos para redução do conteúdo de ácidos nucleicos em diferentes tipos de leveduras, consistindo em um tratamento da biomassa com solução alcalina

com NaOH 1N, tratamento com solução salina nas concentrações de 1 a 5% e tratamento térmico nas temperaturas de 60 e 70°C variando o tempo de 5 a 80 segundos. O tratamento com solução contendo 4% de cloreto de sódio apresentou redução de 34,2% no conteúdo de ácidos nucleicos. O tratamento com hidróxido de sódio 1N apresentou redução de 75% do conteúdo de RNA e 81% do conteúdo de DNA. O choque térmico utilizado na temperatura de 70°C durante 80s, reduziu em 69,5% o conteúdo de ácidos nucleicos contidos na biomassa, demonstrando ser boa forma de redução destes compostos por ser de baixo custo e por não utilizar reagentes neste processo.

A produção de SCP é empregada em processos tecnologicamente intensivos que permitem alta produção volumétrica de proteínas. A produção desse tipo de proteínas é independente de efeitos climáticos e alterações ambientais. Destacam ainda que a fonte de carbono representa de 40 a 60% do custo da produção de POU, sendo interessante a utilização de fontes de carbono alternativas que possuam maior disponibilidade e ao mesmo tempo ser economicamente viável (VILLAS BÔAS e ESPÓSITO, 2000). 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 obtidas são fatores importantes na produção de SCP, pois determinam o custo e a viabilidade econômica do processo utilizado (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

Vários substratos podem ser utilizados para o crescimento de microrganismos por apresentarem alto conteúdo de açúcares, atuando como fonte de carbono e energia (KURBANOGLU, 2001). Nitrogênio, fósforo, e vitaminas, também são requerimentos para o crescimento celular. As principais fontes de nitrogênio utilizadas para o crescimento de microrganismos são amônias, sais de amônio, uréia, nitratos e fontes orgânicas como os

hidrolisados protéicos. A composição das SCP pode ser afetada pelas condições de cultivo, especialmente pelo substrato. A relação C:N de aproximadamente 10:1 deve ser mantida durante o cultivo, minimizando o acúmulo de substâncias de reserva favorecendo a síntese protéica (LITCHFIELD, 1983). Espécies de fungos podem ser cultivadas em vários tipos de substratos, geralmente resíduos de indústrias de alimentos, sendo necessária, em muitas vezes, adição de uma fonte de nitrogênio para o crescimento celular (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

CHIOU et al. (2001) produziram proteína celular a partir de *Aspergillus niger* para utilização em alimentação de frangos. O resíduo contendo a biomassa foi seco e acrescentado à dieta dos animais como suplemento protéico em diversas concentrações. A Proteína de Organismo Unicelular apresentou conteúdo de 50,2% de proteínas, baixos teores de carboidratos e fibras, elevada concentração de sais, fator limitante na utilização em alimentação de frangos. Os animais que consumiram a SCP apresentaram alteração no sabor da carne, indicando que este tipo de fonte protéica pode ser adicionado, desde que em baixas concentrações.

EL-NAWWI e EL-KADER (1996) estudaram alguns parâmetros na produção de SCP a partir do bagaço de cana hidrolisado, utilizando o microrganismo *Aspergillus terreus*. Avaliaram a concentração do bagaço de cana nas concentrações de 0,5 a 4% (p/p), pH na faixa de 2 a 8 e temperatura variando de 20 a 50°C durante sete dias de cultivo em *Shaker* e compararam estes resultados ao processo aerado sem agitação mecânica. As condições ótimas determinadas foram 1% de bagaço de cana hidrolisado, pH igual a 4, e a temperatura de cultivo de 35°C em *shaker*, onde obtiveram 28% de proteína e 21% nas mesmas condições com aeração e ausência de agitação mecânica.

ZIINO et al. (1999) produziram *Single Cell Protein* a partir de resíduos da indústria processadora de laranja, utilizando o fungo *Geotricum candidum* em cultivo submerso contínuo e avaliaram o conteúdo de ácidos graxos na biomassa. Resultados apresentaram em maior composição, ácidos graxos insaturados como o ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0). Para os monoinsaturados, o ácido oléico foi predominante e os poliinsaturados em altas proporções o ácido linolênico e linolênico em maior proporção sendo detectado ainda, o ácido oléico (C18:1 ω 9).

DURÁN (1989) realizou uma comparação econômica a respeito da utilização do bagaço de cana de açúcar, utilizando como referência a Usina Santa Luzia, localizada no município de Maringá - PR (usina produtora de álcool e açúcar). O resíduo (1200ton/ano) proveniente da produção industrial sofre o processo de hidrólise e em seguida é exportado para a Europa. As indústrias importadoras pagam à importância de US\$ 45/ton. Caso esse resíduo fosse enriquecido com 6% de proteínas, o valor se elevaria para US\$ 240/ton.

2.3 Cultivo em Meio Sólido

O cultivo em meio sólido é geralmente definido como o crescimento de microrganismos em material sólido, insolúvel e umedecido, na ausência de água livre (HOGSCHAGEN et al., 2001; PANDEY et al., 2001; NAGEL et al., 1999). Este processo permite o cultivo de microrganismos, principalmente fungos, de modo semelhante ao seu crescimento em habitat natural (JECU, 2000).

No Ocidente, até a metade do século passado, as pesquisas utilizando processos de fermentação em estado sólido foram concentradas na produção de enzimas microbianas. Com o surgimento da Segunda Guerra Mundial, o desenvolvimento dos processos que envolviam a fermentação submersa, principalmente visando à produção de penicilina, foram amplamente estudados, negligenciando os processos em estado sólido durante o período (DEL BIANCHI et al., 2001).

Nos últimos dez anos, a fermentação em estado sólido tem voltado a ser objeto de pesquisas e buscas por novas tecnologias que reduzam custos de produção e geração de resíduos. Atualmente a FES está sendo utilizada na bioconversão de resíduos agro-industriais, visando à produção de ração enriquecida com proteína, além de inúmeros metabólitos de interesse. A aplicação da FES em escala industrial para produção de *Single Cell Protein* ajudaria a aumentar rendimentos e melhorar fatores de conversão, reduzindo custos do produto final (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

Nos países em desenvolvimento, onde a situação econômica muitas vezes produz dificuldades para manter-se ao nível dos vários avanços biotecnológicos, a fermentação em estado sólido constitui uma oportunidade para o progresso na produção local de compostos bioativos (BERTOLIN et al., 2001), onde são de especial interesse econômico em países com abundância de resíduos agro-industriais, pois estes podem ser utilizados como matéria-prima de baixo custo (CASTILHO, et al., 2000b).

Muitos microrganismos apresentam capacidade de crescimento em substratos sólidos, sendo os fungos filamentosos (*Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium*) os mais utilizados nos processos envolvendo FES. Esta aplicação deve-se a grande capacidade de crescimento na

ausência de água livre, versatilidade de aplicações, e ainda facilidade de manipulação e adaptação (COSTA, 1996; ANUPAMA e RAVINDRA, 2000; DEL BIANCHI et al., 2001).

Com relação ao crescimento de fungos filamentosos, altos valores para atividade de água (a_w) do meio de cultivo favorecem a esporulação, enquanto que baixos valores de a_w estimulam a germinação de esporos ou o crescimento micelial aéreo (PANDEY, 1992). Microrganismos podem ser selecionados de acordo com o material sólido a ser utilizado. VENDRUSCOLO et al. (*in press*) utilizaram a velocidade de crescimento radial como uma ferramenta para seleção de fungos filamentosos para produção de biossurfactantes. Esta ferramenta pode ser utilizada para selecionar microrganismos adequados para cada tipo de substrato a ser utilizado.

Fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, umidade, atividade de água, pH, aeração, agitação e tamanho de partícula são fatores de fundamental importância nos processos que utilizam fermentação em estado sólido (PANDEY et al., 2001; RAIMBAULT, 1998).

Os substratos sólidos utilizados em FES, geralmente são constituídos por polímeros orgânicos, que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem suplementação de nutrientes (GUTIERREZ-ROJAS et al., 1992). Para o enriquecimento protéico de resíduos sólidos, normalmente se adiciona uma fonte de nitrogênio tais como amônia, uréia, triptona ou soluções sintéticas como sulfato de amônia (PANDEY et al., 2001).

Entre os principais resíduos agro-industriais envolvendo fermentação em estado sólido, podem-se citar: bagaço de cana (BALASUBRAMANIAM et al., 2001; CORDOVA et

al., 1998; CÓRDOVA et al., 1999; MARTINS et al., 2002; FERREIRA et al., 1999; EL-NAWWI e AL-KADER, 1996), bagaço de maçã (BEROVIC e OSTROVERSNICK, 1997; HANG e WOODAMS, 1994; SHOJAOSADATI e BABAEUPOUR, 2002; STREIT, 2004; ALBUQUERQUE, 2003; VILLAS BÔAS, 2001), resíduos de laranja (MARTINS et al., 2002), resíduos de banana (KRISHNA, 1999), resíduos de azeitonas (CORDOVA et al., 1998), resíduos de babaçu (CASTILHO et al., 2000b), grãos e resíduos de soja (ABDEL-FATTAH e OLAMA, 2002; CASTILHO et al., 2000a), farelo e palha de trigo (LAHORE et al., 1998; CASTILHO et al., 2000b; JECU, 2000; MARTINS et al., 2002; FERREIRA et al., 1999; BENJAMIN e PANDEY, 2000; GHANEM et al., 2000), farelo de arroz (RAO et al., 1993; IKASARI e MITCHELL, 1996), farinha de milho (PANDEY et al., 1994).

A produtividade das fermentações em estado sólido é altamente afetada pelo conteúdo de umidade do meio de cultivo de modo que constitui o elemento chave para o controle e otimização dos processos em estado sólido (CASTILHO et al., 2000a). Segundo SANTIN (1993), a elevada umidade causa a compactação do meio, diminuindo sua porosidade e conseqüente redução na difusão do oxigênio e trocas gasosas. Por outro lado, facilita a contaminação através do crescimento de bactérias e proporciona o aumento da formação de micélio aéreo. Baixos teores de umidade levam por sua vez, a uma diminuição do crescimento, diminuição das trocas metabólicas e gradativa redução na produção.

DEL BIANCHI et al. (2001) relata que o tamanho de partícula do substrato pode ser problemático, pois quanto menor o tamanho da partícula, maior a área superficial e, conseqüentemente, maior bioconversão. Por outro lado, o substrato necessita de uma granulometria que permita a circulação de ar através do leito fermentativo, bem como a dissipação de gases e calor produzido durante o crescimento microbiano. Quanto à

porosidade, esta influencia diretamente na capacidade de absorção de água, o que facilita o transporte de enzimas e metabólitos entre o meio de cultivo e as células.

Durante a fermentação, a temperatura tende a aumentar como consequência da liberação de calor pelos microrganismos durante as atividades metabólicas. O controle de temperatura é uma das maiores dificuldades encontradas nos processos de FES, especialmente em grande escala, pois pelo fato do substrato ser heterogêneo, forma-se gradientes de temperatura, o que dificulta a remoção do calor. A temperatura pode ser controlada de forma eficiente através da passagem de ar pelo meio de cultivo (PANDEY et al., 2001).

O controle de pH também pode ser crítico nos processos de fermentação em estado sólido, pois como consequência da degradação dos açúcares, ocorre formação dos ácidos orgânicos que baixam o pH, assim como o consumo de sais de amônio. Por outro lado, se ácidos orgânicos presentes no substrato são consumidos, o pH aumenta, assim como a hidrólise da uréia resulta na alcalinização do meio de cultivo (RAIMBAULT, 1998). De um modo geral, na fermentação em estado sólido os valores de pH são baixos, favorecendo o crescimento de fungos e leveduras e dificultando o crescimento de bactérias (DEL BIANCHI et al., 2001).

Os biorreatores empregados em fermentação em estado sólido podem ser divididos em três tipos: os de bandejas, os agitados (tambor rotativo) e os de leito empacotados (Colunas de Raimbault). Biorreatores de tambor rotativo resultam em maior controle de temperatura, aeração e mistura, servindo para o cultivo em superfície de fungos filamentosos visando o enriquecimento protéico (LINDE, 2000). A maior limitação deste tipo de equipamento está relacionada com a capacidade de carga de 1/3 do volume do cilindro, devido à necessidade do

eixo central estar livre para entrada e saída de ar, caso contrário, dificultará a transferência de oxigênio ao meio (REGULY, 1998). Biorreatores de coluna são os mais estudados, pois além de estarem associados à baixa contaminação bacteriana, minimizam os problemas de gradiente de temperatura, com a substituição do ar de dentro do reator (MORAES, 1999).

2.4 Quitosana

A quitosana é um biopolímero catiônico, consistindo de ligações $\beta(1\rightarrow4)$ ligando 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose, derivado da desacetilação da quitina ($\beta(1\rightarrow4)$ -N-acetil-D-glicosamina), segundo maior polissacarídeo encontrado na natureza, depois da celulose (KITTUR et al., 2003; DESBRIERES, 2002; AMORIM et al., 2003; TSIGOS et al., 2000). A Figura 2 apresenta as estruturas da quitina e quitosana.

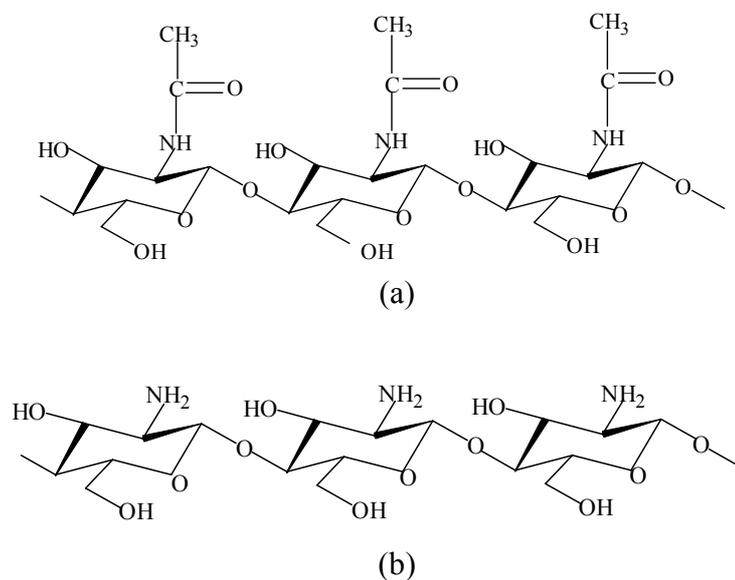


Figura 2: Estrutura química da (a) quitina e (b) quitosana (DESBRIERES, 2002; TOLAIMATE et al., 2003).

A Tabela 3 apresenta as principais características físico-químicas da quitosana comercial.

Tabela 3: Características físico-químicas da quitosana comercial.

Parâmetro	Valores
Peso molecular (Da)	$1,5 \times 10^5$
Grau de polimerização	600-800
Composição idealizada	$C_6H_{11}O_4N$
Umidade (%)	2-10
Grau de desacetilação	60-80
Conteúdo de nitrogênio (%)	7-8,4
Viscosidade (Cps)	250-2500 (1% em sol. Ac. acético)
Degradação térmica	Acima de 280°C

Fonte: LI et al. (1997); MATTUR e KARANG (1990).

Os parâmetros, massa molar e grau de polimerização, são variáveis e dependem da referência bibliográfica utilizada. Os produtos comerciais apresentam baixa massa molar e grau de polimerização devido à degradação inevitável que ocorre durante o processo de extração (STREIT, 2004).

2.4.1 Obtenção da Quitosana

A quitosana é industrialmente obtida através da desacetilação parcial da quitina, principal constituinte da carapaça de caranguejos, lagostas, siris e camarão (DESBRIERES, 2002).

A quitina por não ser solúvel em solventes usuais, modificações em sua estrutura são necessárias para sua utilização, dentre elas a desacetilação da quitina (TOLAIMATE et al.,

2003). Neste processo, os grupamentos acetamido da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino, dando origem a quitosana, sendo então o nome atribuído genericamente ao polímero onde o número de unidades monoméricas contendo o grupamento NH_2 é suficiente para tornar o polímero solúvel em ácidos fracos (SILVA, 2000; KITTUR et al., 2003).

TOLAIMATE et al. (2003) descrevem o processo comercial para a obtenção da quitosana através de resíduos quitinosos. Primeiramente, o material sofre redução de tamanho na faixa de 2 a 5mm. Em seguida, é realizada a desmineralização com ácido clorídrico para reduzir a quantidade de fosfatos e carbonatos existentes, sendo variável esta concentração, dependendo da natureza dos resíduos quitinosos. Após desmineralização, o material é submetido a desproteinização, utilizando NaOH 0,3M a temperatura de 80 a 85°C. A pigmentação do material é reduzida utilizando peróxido de hidrogênio e ácido clorídrico.

Para o preparo da quitosana, TOLAIMATE et al. (2003) citam o método utilizado por BROUSSIGNAC (1972), onde a quitina sofre o processo de desacetilação através da utilização de soluções concentradas de hidróxido de sódio (50%p/p), etanol 96% (25%p/p) e monoetilenoglicol (25%p/p). O material é filtrado e a quitosana é lavada com água até atingir o pH neutro, secando em temperatura ambiente. Soluções concentradas neste processo podem causar degradação da cadeia polimérica da quitosana (MATHUR e KARANG, 1990; KIMURA, 2001), bem como contaminação por proteínas e níveis inconsistentes de desacetilação, originando produtos com propriedades físico-químicas variáveis (RANE e ROOVER, 1993).

2.4.2 Quitosana Fúngica

Atualmente a quitosana é obtida através da desacetilação da quitina proveniente de resíduos marinhos. Este processo utiliza soluções alcalinas concentradas a altas temperaturas, resultando em diferentes propriedades e qualidade da quitosana (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 1997).

Os fungos pertencentes à classe dos Zigomicetos, por apresentarem grandes quantidades de quitosana em sua parede celular, podem ser considerados como uma fonte alternativa para obtenção deste biopolímero (AMORIM et al., 2003; AMORIM et al., 2001; KUMAR, 2000; NWE et al., 2003; SUNTORNSUK et al., 2002; SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 1997; KITTUR et al., 2003; RANE e ROOVER, 1993; YOKOI et al., 1998).

A parede celular dos Zigomicetos é caracterizada pela existência de quitina e quitosana, as quais apresentam funções de proteção e suporte. Quitina, quitosana e β -glucanas são componentes estruturais, enquanto xilamannoproteínas, galactoproteínas e glucuronoproteínas são componentes celulares intersticiais. O material protéico e componentes intersticiais são removidos pela solubilidade em soluções alcalinas. Já a quitosana é obtida, a partir do material remanescente da desproteinização da biomassa, através de uma extração ácida com pH abaixo de 5,5, considerando que a quitina e β -glucanas são insolúveis nestas soluções (RANE e ROOVER, 1993). Processos de extração da quitosana a partir de fungos são simples e moderados quando comparado a processos de obtenção da quitosana a partir de resíduos marinhos, os quais produzem grandes quantidades de efluentes concentrados (TAN et al., 1996).

A utilização de fungos para a produção de quitosana apresenta algumas vantagens frente ao processo tradicional (STREIT, 2004; SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 1997; TAN et al., 1996; ARCIDIACONO et al., 1989):

- o cultivo de microrganismos pode ser realizado em substratos simples e baratos, reduzindo custos do processo;
- a quitosana pode ser produzida durante todo o ano em um ambiente controlado e independente da sazonalidade de matéria-prima;
- os fungos não possuem quantidades significativas de carbonatos, o que facilita o tratamento ácido;
- o rendimento desses polissacarídeos a partir de fungos pode ser eficientemente ajustado através do controle das condições de cultivo, das condições de processamento e também através de manipulações genéticas;
- resíduos de biomassa utilizada na obtenção de enzimas e outros compostos podem ser utilizados como matéria-prima para obtenção da quitosana.

2.4.3 Aplicações da Quitosana

Países como o Japão, Estados Unidos, Índia e Polônia produzem quitina e quitosana industrialmente (KUMAR, 2000), onde o preço da quitosana (Sigma Aldrich) está em torno de US\$ 7,5/10g (SREIT, 2004).

A principal característica que torna possível a utilização da quitosana em diversas áreas é seu potencial catiônico e solubilização em soluções aquosas de natureza ácida (MUZZARELLI, 1996). A quitosana pode ser empregada na remoção de metais, tratamento de efluentes, fármacos, cosméticos, têxtil e alimentícia.

A quitosana possui estrutura similar a glicosamina, podendo ser aplicada em tratamento de queimaduras. MALETE et al. (1986) estudaram o efeito da quitosana e solução salina no tratamento da fibroplasia em ferimentos e tecido epitelial de cães. YANNAS et al. (1982) propôs um modelo de pele artificial aplicável em tratamentos crônicos em longo prazo. Suturas médicas, lentes de contato, microencapsulação de medicamentos e próteses podem utilizar quitosana em sua composição (CUÉLLAR, 2002).

Na área de alimentos, a quitosana possui várias aplicações. ROLLER e COVILL (1999), utilizaram a quitosana como conservante natural, avaliando a inibição no crescimento de 15 leveduras e 7 tipos de fungos. A quitosana, adicionada na concentração de 1 a 5g/L inibiu o crescimento de todas as leveduras utilizadas. Já para os fungos, três cepas demonstraram resistência ao caráter inibitório da quitosana.

DARMADJI e IZUMIMOTO (1994) avaliaram o efeito da quitosana em preservação de carne, analisando a qualidade química, microbiológica e sensorial do produto. Resultados demonstraram que durante a incubação a 30°C por 48 horas, soluções com 0,5 a 1% de quitosana inibiram o crescimento de bactérias deteriorantes, reduzindo a oxidação de ácidos graxos e a putrefação.

LIM e HUDSON (2004) avaliaram a aplicação de derivados de quitosana como agente antimicrobiano e a durabilidade do caráter inibitório da quitosana no processamento de fibra de algodão através de lavagens das fibras. Utilizaram soluções contendo 0; 0,25; 0,5 e 1% de quitosana no crescimento de *Staphylococcus aureus*. Obtiveram resultados satisfatórios, pois as concentrações 0,25; 0,5 e 1% apresentaram redução de 99,88; 99,99 e 100% no crescimento de *S. aureus*.

ANDERSSON e LÖFROTH (2003) apresentam algumas formas da utilização da quitosana em produtos fármacos, podendo ser através de materiais injetáveis, inaláveis e até mesmo via oral. Os mesmos autores pesquisaram um complexo formado por nanopartículas de quitosana e heparina através de agentes de emulsificação. A quitosana utilizada foi obtida comercialmente, com um grau de desacetilação de 70%, sendo adicionada na concentração de 1% para a formação das microemulsões. Obtiveram 16% de emulsificação (límpida e transparente), com diâmetro de partículas na faixa de 1,7 μ m, verificando sua aplicabilidade em produtos fármacos.

A quitosana também pode ser aplicada em tratamentos odontológicos. IKINCI et al. (2002), avaliaram o efeito da quitosana com alta e baixa massa molar no tratamento periodôntico do patógeno *Porphyromonas gingivalis*, considerado como microrganismo agressivo, o qual provoca inflamações prolongadas. A quitosana com alta massa molar propiciou maior eficiência na atividade inibitória de *P. gingivalis*, fato esse devido às interações aniônicas (fosfolípidios e ácidos carboxílicos), responsáveis pelo mecanismo da atividade antimicrobiana.

2.5 Biorreatores *Airlift*

Reatores do tipo *airlift* são reatores pneumáticos, diferentes do reator de coluna de bolhas, dividindo-se em duas regiões de escoamento, sendo uma direcionada para cima e outra para baixo. Os canais possibilitam a circulação de líquido em grande escala ao redor do corpo do reator (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

A primeira zona é denominada *riser*, onde ocorre a expansão do gás injetado pela base do equipamento através de um dispersor, formando uma dispersão gás-líquido. As bolhas de gás sobem através da coluna de líquido contatando-o e deslocando-o. Esta seção possui maior *gás-holdup* (fração volumétrica de gás na zona de dispersão) e é onde ocorre a maior transferência de massa. O líquido deixa o topo do *riser* e entra na zona de desprendimento do gás, com menor quantidade de gás, escoando em sentido contrário através do *downcomer* até o fundo do biorreator, retornando ao *riser*, circulando continuamente (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

Com base em sua estrutura física, os *airlift* são divididos em duas classes: os de circulação externa e os de circulação interna, conforme apresentado na Figura 3. Os de circulação interna são tanques com divisões dentro da coluna de bolhas, de maneira a criar zonas de escoamento. Nos *airlift* com circulação externa, o *riser* e o *downcomer* são conectados por seções horizontais perto do topo e da base para criar a recirculação do líquido (CHISTI, 1989).

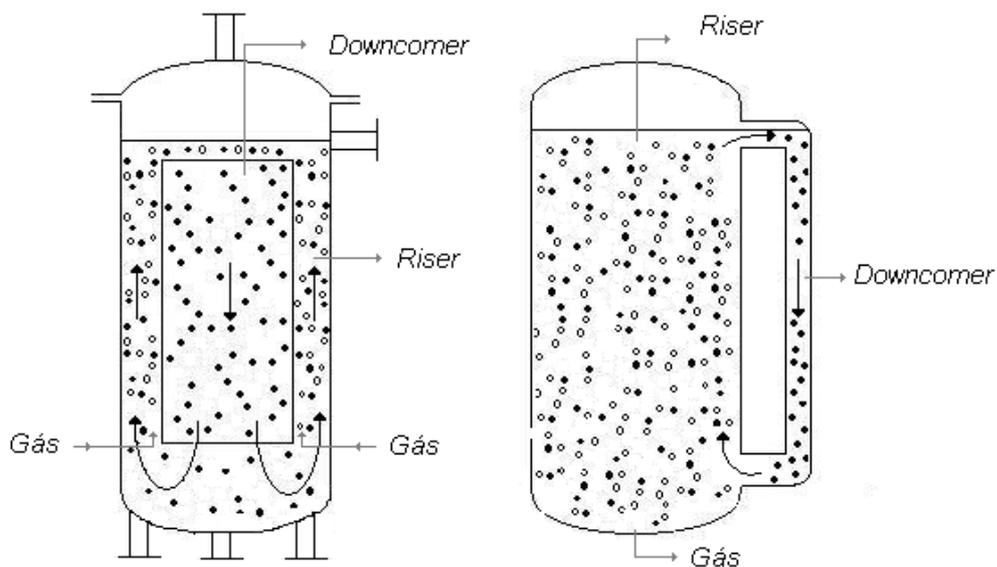


Figura 3: Esquema de biorreatores *airlift* com (a) circulação interna e (b) com circulação externa (b). (Adaptado de CHISTI, 1989).

A principal diferença entre as duas classes de *airlift* é o desenho do separador de gás, que permite ao modelo de circulação externa maior desprendimento de gás, gerando grande influência no comportamento do biorreator (BELLO et al., 1985).

Como a força motriz da circulação de líquido é a diferença de densidade média ou da pressão hidrostática entre as seções do *riser* e do *downcomer*, o *airlift* de circulação externa permite maior desprendimento de gás e maior velocidade de circulação. Conseqüentemente, o *gás holdup* é menor devido à alta circulação de líquido no *riser*, o que resulta em menor transferência de massa (BELLO et al., 1985; POPOVIC e ROBINSON, 1988).

2.5.1 Aplicações dos Biorreatores Airlift

A aplicação dos fermentadores do tipo *airlift* em escala industrial é limitada, devido às questões relacionadas ao *scale-up* desses reatores. Além disso, os *airlift* são menos flexíveis às mudanças de processo do que os STR. Uma vez que os parâmetros geométricos foram selecionados para um determinado processo durante o projeto, a velocidade de fluxo de gás é, em princípio, o único parâmetro de ajuste durante a operação. Portanto, o *airlift* é menos adaptável a outros processos com necessidades muito diferentes de velocidades do líquido, distribuição de gás, intensidade de mistura e características de transferência de massa do que os STR convencionais, onde a aeração e agitação podem ser independentemente controladas (CHISTI, 1989).

Os biorreatores *airlift* possuem várias aplicações, como na obtenção de medicamentos, tratamento de efluentes, produção de polímeros, remoção de metais, produção de proteínas entre outros compostos. Pesquisas em escala de bancada e em escala piloto têm sido

realizadas para uma variedade de microrganismos e culturas celulares, sendo que a maioria dos trabalhos enfoca a cinética de crescimento e propriedades hidrodinâmicas (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

GAVRILESCU e ROMAN (1998) analisaram a distribuição do tempo de residência da fase líquida em um reator *airlift* com circulação interna. Os resultados experimentais revelaram que o reator *airlift* apresentou um fluxo mais uniforme que o reator de coluna tubular e de bolhas. Estas conclusões podem ter grande importância prática, especialmente em aplicações biotecnológicas dos reatores *airlift*, onde culturas aeróbias podem ser facilmente afetadas por fluxos de gás deficiente.

ALLEN e ROBINSON (1991) determinaram a taxa de cisalhamento em biorreatores *airlift* e coluna de bolhas, devido à importância deste parâmetro na destruição das células e na correlação de parâmetros hidrodinâmicos em fluidos não-Newtonianos. Esta taxa de cisalhamento pode ser utilizada para avaliar as viscosidades efetivas dos fluidos não-Newtonianos, que por sua vez, pode prever o comportamento reológico dos fluidos. Esta aproximação, aplicada em biorreator de coluna de bolhas, também pode ser aplicada em biorreatores *airlift* com circulação externa, substituindo-se a velocidade do gás superficial pela velocidade do gás no *riser*.

FRÖHLICH et al. (1991) avaliaram o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em uma planta piloto com *airlift* de tubos concêntricos com um volume de 4m³ e outro em escala laboratorial de 0,8m³ e usando, em ambos, processo de operação contínuo e batelada. Examinaram a mistura axial global, o gás *holdup* local, o diâmetro de bolhas e a velocidade das bolhas, durante o cultivo da levedura em um meio padrão. Este trabalho representa o

primeiro relato de medidas de propriedades locais e dispersão da fase gasosa num reator em escala piloto durante a fermentação. Através dos dados obtidos, concluíram que o *gás holdup* local, tamanho da bolha e a velocidade da bolha apresentaram pouca variação ao longo do comprimento do *riser*.

TYAGI et al. (1990) utilizaram um reator *airlift* com circulação externa em escala laboratorial de 0,023m³ e um *airlift* com circulação externa em escala piloto de 1,15m³ para estudar a digestão aeróbica mesofílica e termofílica de efluentes municipais primários e secundários. O *airlift* em escala piloto, usando ar para aeração, apresentou resultados comparáveis ao do sistema de digestão aeróbia de lodos convencionais que utilizam o oxigênio puro para aeração, apresentando ainda temperaturas termofílicas (53°C), significando um aquecimento autotermal. Uma análise de custo foi realizada, demonstrando que o digestor *airlift* auto aquecido pode representar uma ajuda significativa, tanto no capital quanto no custo de operação, quando comparado com um digestor aeróbio convencional de dois estágios usando o oxigênio puro.

ALEKSIEVA e PEEVA (2000) compararam a produção de proteinase ácida pelo fungo filamentosso *Humicolata lútea* em biorreator *airlift* sob condições contínuas e em batelada com a produção de proteinase utilizando células do fungo, cultivadas em um biorreator de tanque agitado. O desempenho do processo em ambos dispositivos de fermentação foi semelhante com respeito à utilização de substrato, biomassa e concentração de enzima. A produtividade alcançada no biorreator *airlift* em condições contínuas foi aproximadamente 3 vezes maior que no sistema em batelada.

SCARTAZZINI (2001) utilizou um *airlift* de circulação externa e comparou seus resultados com um fermentador convencional na pré-fermentação do mosto de uva, avaliando a capacidade de multiplicação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em sua fase exponencial de crescimento, para posterior utilização do mosto na fermentação alcoólica para produção de vinho. Após 9 horas de cultivo, a concentração celular no *airlift* foi de $3,46\text{g.L}^{-1}$ contra $2,84\text{g.L}^{-1}$ no biorreator convencional. Este aumento na concentração celular melhora a segunda etapa da fermentação alcoólica, implicando em um maior e constante desdobramento dos açúcares, reduzindo em 10 dias o tempo total de fermentação. Destaca ainda, que o biorreator *airlift*, atendeu as necessidades fisiológicas das leveduras, aumentando sua velocidade específica de crescimento e mantendo sua atividade até o final do processo.

PEDROSO (2003) estudou a viabilidade de produção de vinagre de maçã em *airlift*. Foi avaliada a produtividade média em ácido acético, velocidade específica de crescimento, fatores de conversão de substrato em biomassa e substrato em produto. Os resultados foram comparados a um biorreator clássico que simula o processo de produção de vinagre comumente utilizado em indústrias. A eficiência do *airlift* em relação ao biorreator clássico pôde ser comprovada através da produtividade em ácido acético, atingindo $4,2\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, enquanto o biorreator clássico $1,6\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. A velocidade específica de crescimento foi de $0,14\text{d}^{-1}$ e $0,10\text{d}^{-1}$ e os fatores de conversão de substrato em biomassa de $0,56\text{g.g}^{-1}$ e $0,25\text{g.g}^{-1}$. Já o fator de conversão de substrato em ácido acético foi de $0,009\text{g.g}^{-1}$ no biorreator *airlift* e $0,006\text{g.g}^{-1}$ no biorreator clássico, comprovando a eficiência da utilização do *airlift* na produção de vinagre de maçã.

ROSSI (2001) produziu inoculante de fungo ectomicorrízico utilizando biorreator do tipo *airlift*. Efeitos de diferentes composições do meio de cultura, pH e parâmetros cinéticos

foram estudados no crescimento do fungo *Pisolithus microcarpus* e comparados a processos convencionais e processos envolvendo fermentação em estado sólido. O tamponamento com ácido cítrico e citrato de sódio e a modificação na relação C/N de 50/1 para C/N 20/1 melhoraram a produção de *P. microcarpus* em biorreator *airlift*. Estes resultados foram superiores aos disponíveis na literatura, tanto em cultivo em biorreatores convencionais, quanto em fermentação em estado sólido.

2.5.2 Vantagens dos Biorreatores Airlift

Tradicionalmente, o reator químico de tanque agitado (STR) tem sido aplicado como biorreator para fermentações aeróbias. Entretanto este tipo de reator não é o mais adequado para o cultivo de microrganismos. Os reatores pneumaticamente agitados, como o *airlift* e colunas de bolhas, oferecem muitas vantagens em relação ao tanque agitado clássico (POPOVIC e ROBINSON, 1988).

Os reatores *airlift* são de construção simples, possibilitando uma manutenção fácil e barata. Por não existir partes mecânicas móveis necessárias para agitação, há redução do perigo de contaminação, facilitando a limpeza e esterilização. A injeção do gás, serve para aerar e agitar o meio de cultivo, reduzindo o gasto de energia para agitação, e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

Outra vantagem dos *airlift*, sobre os demais biorreatores em processos biotecnológicos, está relacionada com o fato de a força de cisalhamento imposta pelo campo turbulento nas células ou *pellets* (no caso de fungos) suspensos no meio, ser muito menor em biorreatores *airlift*. O grau de agitação requerido para a transferência de oxigênio causa, em

muitos casos, danos aos microrganismos devido ao alto grau de cisalhamento do agitador. Regiões de alto cisalhamento, perto do agitador, e regiões de baixo cisalhamento, afastadas do agitador, expõem os microrganismos a uma variação do ambiente e a áreas de estresse que podem afetá-los adversamente. Além disso, a energia mecânica necessária para realizar a transferência de massa em STR é elevada e antieconômica, sendo também dissipada no fluido na forma de calor, que precisa ser removido para controle da temperatura (ROSSI, 2001).

Muitos processos fermentativos são realizados em fermentadores de grande porte sendo, portanto, o custo de agitação importante para a viabilidade do processo. MALFAIT et al., (1981) obtiveram aumento de aproximadamente 18% (em peso) utilizando um *airlift* de circulação externa, em relação ao reator de tanque agitado na produção de *Monascus purpureus*. Esta melhora no rendimento foi obtida com redução de 50% na energia utilizada, levando a uma redução de 50% no custo da produção da biomassa. O aumento da produtividade em reatores *airlift* em relação ao reator de tanque agitado foi associado ao alto coeficiente de transferência de massa obtido no *airlift*. BONNARME et al., (1993), também destaca a superioridade dos biorreatores *airlift* e coluna de bolhas em relação ao de tanque agitado, na produção de metabólitos por microrganismos sensíveis ao cisalhamento provocado pelos agitadores mecânicos.

Fermentadores do tipo *airlift*, são mais adequados para a produção de proteínas, onde há necessidade de alta eficiência na transferência de massa. Além da produção de proteínas, o uso destes biorreatores tem proporcionado bons resultados na produção de fungos filamentosos e outras células sensíveis (KESLLER, et al., 1993; ERIKSON et al., 1983).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), localizado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Os testes biológicos *in vivo* em alevinos de tilápia foram realizados na Universidade de Mogi das Cruzes - UMC, SP, sob a supervisão da Professora Elisa Espósito.

Os procedimentos experimentais podem ser agrupados da seguinte forma:

- a) Repicagens e manutenção do material biológico para utilização nos ensaios;
- b) Cultivo submerso em biorreator *airlift* para obtenção de quitosana fúngica;
- c) Avaliação das condições de cultivo no enriquecimento protéico do bagaço de maçã através do cultivo em meio sólido;
- d) Realização de testes biológicos em alevinos de tilápia com o bagaço de maçã enriquecido.

3.1 Microrganismo

Foi utilizado o fungo filamentosso *Gongronella butleri* CCT 4274, obtido da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação “André Toselo” (Campinas - SP).

O microrganismo foi mantido em meio PDA, composto por ágar batata dextrose (39g.L^{-1}) e ágar bacteriológico (5g.L^{-1}). A manutenção da linhagem foi realizada em tubos de ensaio contendo ágar inclinado e garrafas de Roux incubadas a 30°C por 7 dias e posteriormente mantidas a 4°C .

3.2 Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado segundo metodologia proposta por NAGEL et al. (1999), onde uma alçada de esporos dos microrganismos mantidos em meio PDA (Potato Agar Dextrose) foi transferida para tubos de ensaio autoclavados contendo 2mL de Tween 80 a 0,05% (p/v). Este material foi utilizado para inocular garrafas de Roux contendo 150mL do meio de cultura PDA, previamente autoclavadas (121°C por 15min) e incubadas a 30°C por 7 dias. Os esporos foram extraídos das garrafas com o auxílio de uma solução de nutrientes, contendo peptona (1,0g.L⁻¹), NaCl (8,5g.L⁻¹) e Tween 80 (0,01g.L⁻¹). Para tanto, 20mL desta solução foram transferidos para as garrafas e os esporos foram raspados da superfície, sendo em seguida filtrado em gaze estéril, recuperados em frasco e mantidos a 5°C. A suspensão de esporos foi submetida à contagem sendo diluída sucessivas vezes e 1mL de cada diluição foi transferido para placas de Petri. Após adição do meio de cultivo PDA, as placas foram incubadas a 30°C por 24/48h, sendo então submetidas à contagem do número de unidades formadoras de colônias.

3.3 Cultivo Submerso

3.3.1 Substrato

O bagaço de maçã foi cedido pela empresa Yakult S/A., localizada no município de Lages-SC. Atualmente a empresa armazena o resíduo recém processado em silos metálicos no pátio da fábrica. O bagaço é então vendido para pecuaristas da região, que buscam o resíduo na empresa e utilizam-no como adubo orgânico ou ração animal.

O bagaço utilizado na realização dos experimentos, após ser processado na indústria, foi mantido a -5°C em câmara fria por 3 horas, sendo então transportado para o Laboratório de Engenharia Bioquímica, acondicionados em sacos plásticos e armazenados a -20°C .

Nos ensaios de cultivo submerso, utilizou-se o extrato aquoso obtido a partir do bagaço de maçã (EABM). Para a obtenção do EABM, o bagaço mantido a -20°C foi descongelado, seco em estufa com aeração forçada a 60°C durante 24 horas, triturado e peneirado, utilizando peneiras da série *Tyler* 0,85; 1,7 e 3,35mm. As frações correspondentes ao diâmetro entre 1,7 e 3,5mm foram utilizadas para obtenção do extrato aquoso, onde 35g do bagaço seco foram adicionados em 315mL de água destilada em Erlenmeyers aletados de 1L e mantidos em banho-maria a 60°C por 3 horas, sendo filtrado em algodão utilizando vácuo e congelado a -20°C .

3.3.2 Condições de Cultivo

Os cultivos foram realizados em um biorreator *airlift* com circulação externa de volume 6,5L, conforme ilustrado na Figura 4.

Foram avaliadas a aeração (0,3 e 0,6VVM) e a fonte de nitrogênio (sulfato de amônio e nitrato de sódio). A concentração inicial de açúcares foi de 40g.L^{-1} , a temperatura de incubação de 30°C e pH 4,5 durante 27 horas de cultivo. A vazão de ar foi regulada através da utilização de um bolhometro. Ao final do cultivo, a biomassa foi coletada através de filtração a vácuo e seca em estufa a 45°C durante 24 horas para posterior quantificação do conteúdo de quitosana.

Para esterilização do biorreator, este foi acoplado em autoclave e vapor a 100°C foi injetado durante 1,5 a 2 horas. Um termômetro foi conectado para verificar a temperatura interna durante a esterilização do equipamento, a qual esteve sempre superior a 97°C. Para verificar a capacidade de esterilização, foi utilizada água destilada estéril e foi simulado um cultivo. Amostras foram coletadas de maneira asséptica a cada três horas, sendo realizado o plaqueamento em meio PCA (Ágar Plate Count), incubadas a 30°C por 24 a 48 horas e posteriormente submetidas à contagem das unidades formadoras de colônias.

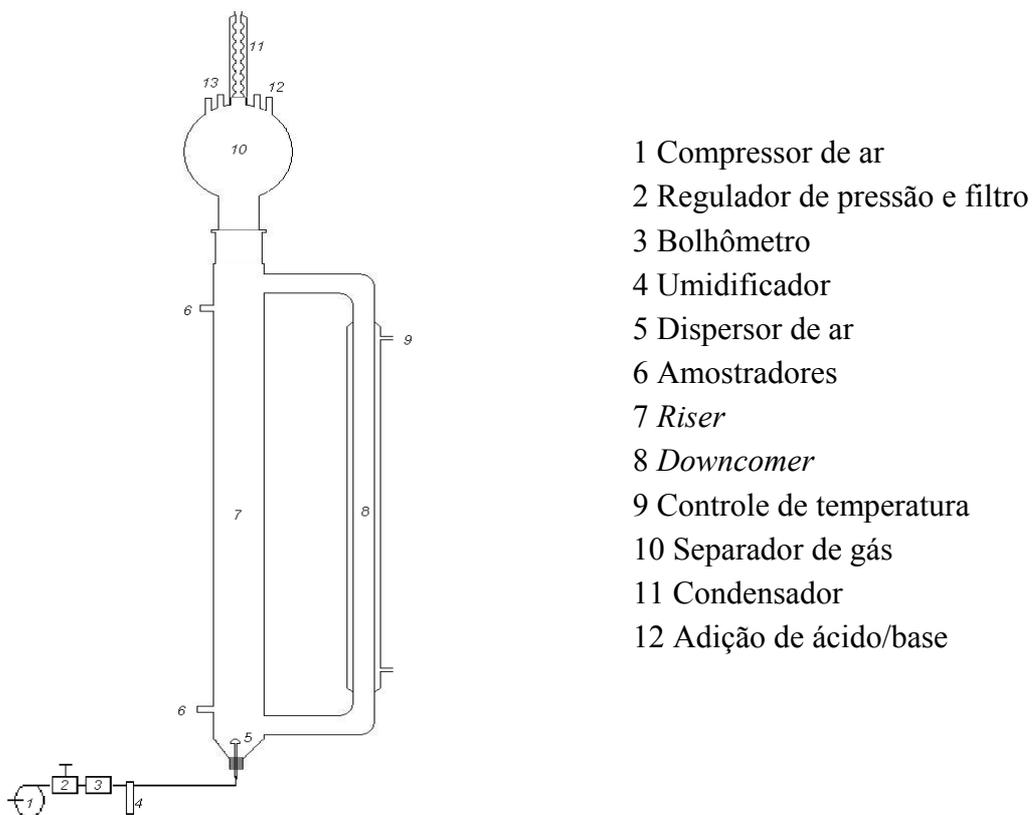


Figura 4: Esquema do biorreator *airlift* utilizado.

3.3.3 Dosagem de Biomassa

A determinação da concentração de biomassa nos cultivos realizados em *airlift* foi realizada diretamente por gravimetria em papel filtro qualitativo secos em forno de microondas durante 15 minutos com potência de 180W. Amostras de 10mL do meio de cultivo foram filtradas em papel filtro qualitativo e estes submetidos à secagem em forno de microondas por 15 minutos com potência de 180W (KILIKIAN et al., 2003). O conjunto foi resfriado em dessecador e pesado, obtendo a quantidade de biomassa retida em um volume de meio conhecido (10mL). Antes da inoculação, foi realizada a tomada de amostra devido à possibilidade da existência de resíduos no meio de cultivo, sendo subtraída a massa obtida de todas as determinações de biomassa ao longo do cultivo.

3.3.4 Dosagem de Açúcares Redutores

Alíquotas de 1,5mL do meio de cultivo foram centrifugadas (10.000rpm/8min) e o sobrenadante foi recuperado e armazenado a -20°C, sendo posteriormente submetido à análise de açúcares redutores.

Para avaliar o consumo de açúcares redutores durante o cultivo do microrganismo, utilizou-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (3,5-DNS), descrito por MILLER (1959). Este método baseia-se na reação de oxidação do grupo aldeído presente nos açúcares redutores, mediante redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico em condições alcalinas.

Em tubo de ensaio contendo 400µL de amostra previamente diluída, foi adicionado 400µL do reativo DNS. A mistura foi incubada em banho-maria a 100°C por 5 minutos, sendo

em seguida resfriada em banho de gelo até a temperatura ambiente. Foi adicionado um volume de 4,0mL de água destilada e, após 15 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Spectronic Unicam modelo Gênese 10vis) a 540nm e comparada a uma curva padrão com glicose em concentrações na faixa de zero a 3,0g.L⁻¹. O procedimento para realização do reagente DNS encontra-se no Anexo B.

3.3.5 Extração da Quitosana

A extração da quitosana foi realizada conforme metodologia modificada proposta por SYNOWIECKI e AL-KHATEEB (1997). Primeiramente a biomassa seca a 45°C durante 24 horas foi tratada com NaOH 2% (1:30 p/v) a 90°C por 2 horas sob agitação de 150rpm em *Shaker*. A fração insolúvel foi coletada através da filtração em papel filtro e lavada com água destilada e com etanol 95%. Em seguida o material sólido foi tratado com ácido acético 10% (1:10p/v) a 60°C por 6 horas com agitação de 150rpm. A fração líquida contendo a quitosana foi separada por centrifugação (3500rpm/5min). A precipitação da quitosana foi realizada, ajustando o pH da solução para 11 com NaOH 40%, sendo o precipitado separado por centrifugação (3500rpm/5min) e lavado com água destilada e com etanol 95%. O material coletado foi submetido à secagem em estufa a 90°C até peso constante.

3.3.6 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Para avaliação cinética dos cultivos de *Gongronella butleri*, foram determinados os parâmetros fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), velocidade específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), produtividade em biomassa (P_X) e produtividade em quitosana (P_Q). As

relações utilizadas nos cálculos destes parâmetros estão baseadas nas apresentadas por HISS (2001).

3.3.6.1 Velocidade Específica de Crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)

A velocidade específica de crescimento é obtida durante a fase exponencial de crescimento, a partir do coeficiente angular da reta formada através da relação existente entre o logaritmo neperiano da concentração celular e o tempo de cultivo, onde a declividade da reta representa o valor de $\mu_{\text{máx}}$, como demonstrada pela Equação 1 (HISS, 2000).

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m t \quad (\text{Eq. 1})$$

onde: X = concentração celular (g.L^{-1});

X_0 = concentração celular inicial (g.L^{-1});

μ_m = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

t = tempo de cultivo (h).

3.3.6.2 Fator de Conversão de Substrato em Biomassa ($Y_{X/S}$)

O fator de conversão de substrato em biomassa foi determinado a partir da plotagem do consumo de açúcares redutores em função da produção de biomassa, onde o coeficiente angular da reta representa o valor de $Y_{X/S}$, conforme apresentado pela equação 2 (HISS, 2000)..

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde: $Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato em célula (g.g^{-1});

X = concentração celular (g.L^{-1});

S = concentração de açúcares redutores (g.L^{-1}).

3.3.6.3 Produtividade em Biomassa (P_X)

Para avaliação do desempenho do processo, determinou-se a produtividade em biomassa, utilizando a relação expressa na Equação 3 (HISS, 2000).

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde: P_X = produtividade em biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

X_f = concentração celular final (g.L^{-1});

X_0 = concentração celular inicial (g.L^{-1});

t_f = tempo de cultivo quando a biomassa é máxima (h).

3.3.6.4 Produtividade em Quitosana (P_Q)

Para avaliação do desempenho do processo, determinou-se a produtividade em quitosana, utilizando a relação expressa na Equação 4 (HISS, 2000).

$$P_Q = \frac{Q_m - Q_0}{t_f} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde: P_Q = produtividade em quitosana ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

Q_f = concentração final de quitosana (g.L^{-1});

Q_0 = concentração inicial de quitosana (g.L^{-1});

t_f = tempo de cultivo quando a biomassa é máxima (h).

3.4 Cultivo em Meio Sólido

Os experimentos utilizando o cultivo em meio sólido foram realizados para avaliar o enriquecimento protéico do bagaço de maçã pelo fungo filamentosso *Gongronella butleri*, tendo como respostas destes experimentos à quantidade de proteína solúvel e a redução no

conteúdo de açúcares redutores. Foram realizados ensaios visando determinar a melhor fonte de nitrogênio, umidade inicial e a granulometria do meio de cultivo.

3.4.1 Substrato

O bagaço de maçã armazenado a -20°C , foi descongelado, seco a 60°C durante 24 horas em estufa com aeração forçada, triturado e peneirado em peneiras da série *Tyler* (0,85; 1,70 e 3,35mm), com a finalidade de reduzir e padronizar a umidade e a granulometria do substrato para a realização dos experimentos.

3.4.2 Condições de Cultivo

Nos experimentos utilizando cultivo em meio sólido, foram realizados ensaios para avaliar a adição de fonte de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de sódio e uréia), umidade inicial (50, 60 e 70%) e granulometria do meio de cultivo através da metodologia do planejamento experimental fatorial, conforme apresentado a seguir no item 3.4.3.

Primeiramente, o bagaço de maçã seco, foi colocado em Becker, sendo a umidade ajustada com uma solução aquosa contendo a fonte de nitrogênio em solução, levando em consideração o volume da suspensão de esporos a ser adicionado. Este material foi autoclavado ($121^{\circ}\text{C}/15\text{min}$) e após resfriamento a temperatura ambiente, foi inoculado com 4×10^6 esporos.g_{meio seco}⁻¹ através da adição da suspensão de esporos (item 3.2). O material inoculado foi transferido para as colunas e posteriormente colocadas em condições assépticas no aparato para realização do processo fermentativo. O tempo de cultivo foi de 7 dias, a temperatura de incubação foi de 30°C com uma vazão de ar de $0,4\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{coluna}^{-1}$, ajustada através de um bolhômetro. Ao final dos cultivos, o bagaço tratado foi retirado das colunas,

sendo uma porção submetida a determinações de umidade, pH, açúcares redutores e proteína solúvel. Outra porção foi seca em estufa a 45°C por 24h com aeração forçada e congelada a -5°C para posteriores determinações analíticas e como contra prova.

Os experimentos foram realizados em biorreatores de colunas empacotadas (Colunas de Raimbault) imersas em banho termostático, conforme apresentado na Figura 5.

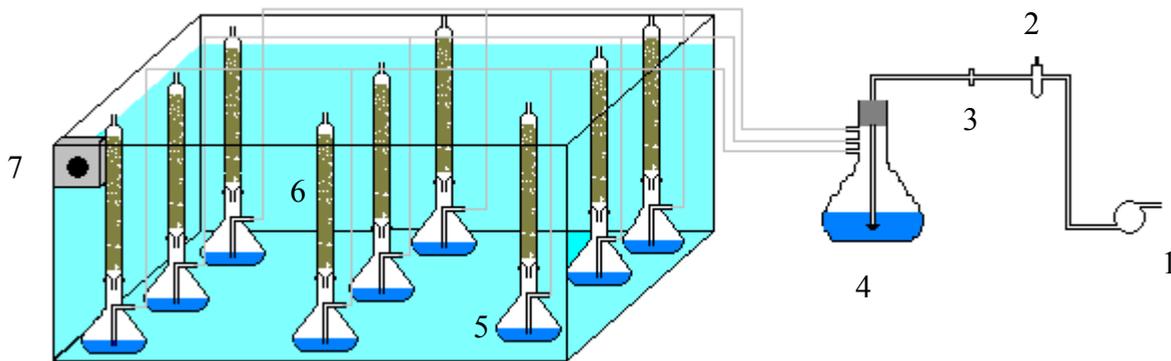


Figura 5: Esquema utilizado em fermentação semi-sólida. (1) compressor; (2) regulador de vazão; (3) filtro milipore; (4) umidificador primário; (5) umidificador secundário; (6) colunas de Raimbault; (7) termostato.

As colunas de Raimbault possuem dimensões de 120mm de altura e 35mm de diâmetro. Os biorreatores foram imersos em banho termostático e aerados no sentido ascendente. O ar injetado ($0,4\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{coluna}^{-1}$), através de um compressor, é filtrado em membrana Milipore de poro $0,44\mu\text{m}$ e umidificado.

3.4.3 Delineamento Experimental

Os parâmetros estudados foram avaliados através da realização de planejamentos experimentais e realizada a estimativa dos efeitos através do Software Statistica 5.11 (BOX et al., 1978).

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam as variáveis estudadas com seus respectivos níveis utilizados nos planejamentos. Primeiramente realizou-se um planejamento experimental fatorial 3^2 para avaliar a fonte de nitrogênio e a umidade inicial do meio de cultivo. A Tabela 4 apresenta os níveis codificados para as variáveis em estudo com seus respectivos níveis reais.

Tabela 4: Níveis do planejamento experimental fatorial 3^2 .

Níveis	Fonte de nitrogênio	Umidade (%)
-1	Sulfato de amônio	50
0	Nitrato de sódio	60
+1	Uréia	70

Como o planejamento experimental 3^2 identificou faixas de operações para a fonte de nitrogênio e para a umidade, foram realizados dois planejamentos experimentais fatoriais 2^2 . No primeiro planejamento, foram avaliadas a fonte de nitrogênio e sua concentração. No segundo planejamento, foram avaliadas as umidades iniciais e a granulometria do meio de cultivo.

A Tabela 5 apresenta os níveis codificados e níveis reais para as variáveis fonte de nitrogênio e concentração para o primeiro planejamento experimental fatorial 2^2 .

Tabela 5: Níveis do primeiro planejamento fatorial 2^2 .

Níveis	Fonte de nitrogênio	Concentração (%)
-1	Nitrato de sódio	2
+1	Uréia	5

A Tabela 6 apresenta os níveis codificados e níveis reais para as variáveis umidade inicial e a granulometria do meio de cultivo para o segundo planejamento experimental fatorial 2².

Tabela 6: Níveis do segundo planejamento fatorial 2².

Níveis	Umidade (%)	Granulometria (mm)
-1	60	0,85 a 1,7
+1	70	1,7 a 3,35

3.4.4 Determinações Analíticas

A metodologia analítica apresentada a seguir foi utilizada para caracterizar o bagaço de maçã antes e após tratamento biológico.

3.4.4.1 Umidade

A umidade do bagaço de maçã antes e após ser cultivado foi determinada conforme metodologia da AOAC (1995), onde 3g do material foram secos em estufa a 105°C até peso constante.

3.4.4.2 Açúcares Redutores Totais

A partir do bagaço de maçã úmido, 5g do material foram adicionadas em balão volumétrico de 100mL e o volume completado com água destilada. Após incubação em banho-maria a 60° durante 3 horas, o material foi filtrado em papel filtro qualitativo e

realizada a determinação do conteúdo de açúcares redutores através do método do 3,5-DNS, conforme apresentado no item 3.3.4.

Os açúcares redutores foram determinados pelo método do 3,5-DNS, conforme apresentado no item 3.3.4.

3.4.4.3 Proteína Solúvel

A concentração de proteína solúvel foi determinada mediante ensaio descrito por LOWRY et al. (1951), modificado por SCOPES (1994). Este método baseia-se na reação do Biureto, onde ligações peptídicas e cadeias laterais polares das proteínas reduzem o cobre sob condições alcalinas que, por sua vez, reage com o reagente fenol. A reação de Follin-Ciocalteau, na qual o fosfo-molibdênio-tungstato presente no reagente de fenol é reduzido devido à reação com resíduos de certos aminoácidos, resulta numa coloração azul.

Mistura-se a 500 μ L de amostra previamente diluída, 2,5mL do reagente C. Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, adiciona-se 250 μ L do reagente D e incubase a amostra por 30 minutos a temperatura ambiente. A absorbância é lida em espectrofotômetro a 750nm e comparada a uma curva padrão com soroalbumina bovina em concentrações variando de zero a 0,5mg.mL⁻¹. Os procedimentos para realização dos reagentes C e D estão apresentados no Anexo B.

3.4.4.4 pH

A partir do extrato obtido na extração realizada no item 3.4.4.2, foi realizada através da medição direta em potenciômetro ANALION AN 2000.

3.5 Testes Biológicos e Parâmetros Biométricos

Os testes biológicos foram realizados em alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) fornecido pela empresa MOGITEC, localizada no município de Mogi das Cruzes, SP. Foram utilizados 30 peixes em cada um dos 4 aquários, onde 2 foram considerados controles e dois testes. Nos controles a ração administrada foi somente a convencional (RC) e nos testes, a ração contendo 70% (RC) e 30% contendo (RCB). Foram realizadas a biometrias nos: 1º, 15º e 30º dias. Como respostas, foram avaliados o comprimento, a altura e a massa dos alevinos e comparados os resultados mediante análise de variância. Todos os ensaios foram realizados na Universidade de Mogi das Cruzes sob a supervisão da Professora Elisa Espósito.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo Submerso

As Figuras 6 e 7 apresentam as curvas de crescimento para o microrganismo *G. butleri* para os quatro experimentos realizados em biorreator do tipo *airlift* variando a fonte de nitrogênio (sulfato de amônio e nitrato de sódio) e a aeração (0,3 e 0,6VVM).

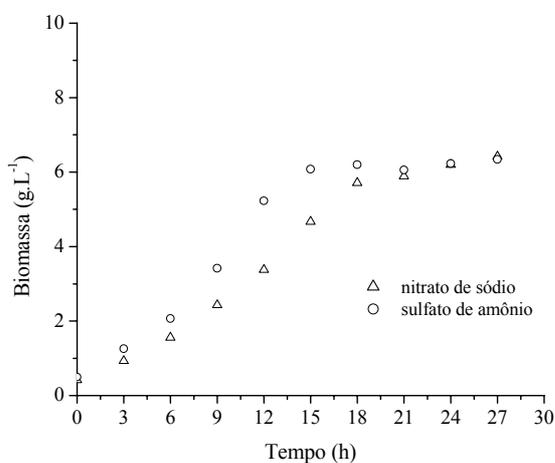


Figura 6: Produção de biomassa no cultivo de *G. butleri* sob aeração de 0,3VVM, temperatura de 30°C e pH 4,5.

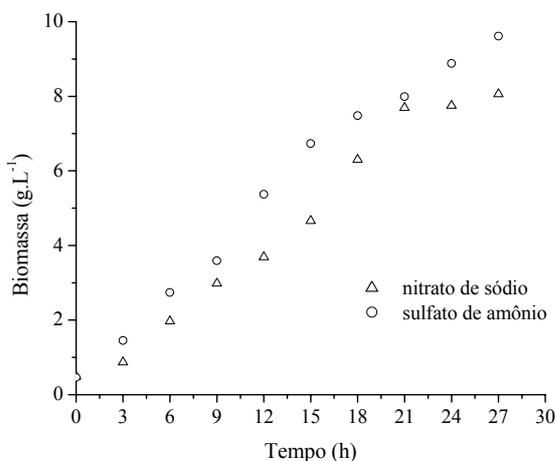


Figura 7: Produção de biomassa no cultivo de *G. butleri* em sob aeração de 0,6VVM, temperatura de 30°C e pH 4,5.

Analisando as Figuras 6 e 7 pode-se verificar que para o tempo de 21 horas entre os cultivos realizados com nitrato de sódio para a aeração de 0,3 e 0,6VVM que a concentração celular é de 5,89 e 7,69g.L⁻¹. O mesmo pode ser verificado quando utilizado o sulfato de amônio para a aeração de 0,3 e 0,6VVM onde a concentração celular obtida foi de 6,06 e 7,99g.L⁻¹ respectivamente, indicando que a aeração possui um papel importante na concentração celular, indicando que a aeração é fundamental para o aumento da biomassa. Já para a fonte de nitrogênio isso não foi verificado.

Na Tabela 7 verifica-se os resultados obtidos para os cultivos realizados em *airlift* variando a fonte de nitrogênio e a aeração.

Tabela 7: Concentração de biomassa ao longo do cultivo de *G. butleri* em *airlift*.

Tempo (h)	Biomassa (g.L ⁻¹)			
	Nitrato/0,3VVM	Nitrato/0,6VVM	Sulfato/0,3VVM	Sulfato/0,6VVM
0	0,42	0,48	0,5	0,46
3	0,93	0,87	1,26	1,45
6	1,56	1,97	2,07	2,74
9	2,43	2,98	3,42	3,59
12	3,38	3,69	5,23	5,37
15	4,67	4,66	6,08	6,73
18	5,71	6,3	6,2	7,48
21	5,89	7,69	6,06	7,99
24	6,2	7,75	6,23	8,88
27	6,42	8,06	6,34	9,61

Analisando a Tabela 7 para os cultivos realizados com sulfato de amônio pode-se verificar o aumento da concentração celular quando a aeração foi aumentada de 0,3VVM para 0,6VVM, passando de 6,34 para 9,61g.L⁻¹, representando aumento de 51,57%. Já para os

ensaios utilizando o nitrato de sódio, a concentração celular foi aumentada de 6,42 para 8,06g.L⁻¹, representando um aumento de 25,54%.

A Tabela 8 apresenta os parâmetros cinéticos e respostas obtidas para os quatro cultivos realizados.

Tabela 8: Parâmetros cinéticos e resultados obtidos para os cultivos em *airlift*.

Cultivo	$\mu_{\text{máx}}$	$Y_{X/S}$	P_X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_Q (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Quitosana (%)
Nitrato/0,3VVM	0,1558	0,354	0,237	22,40	9,45
Nitrato/0,6VVM	0,1535	0,378	0,299	32,41	10,84
Sulfato/0,3VVM	0,1898	0,324	0,235	23,59	10,04
Sulfato/0,6VVM	0,1940	0,362	0,356	39,34	11,05

P_X : Produtividade total em biomassa; P_Q : Produtividade total em quitosana.

Os fatores de conversão de substrato em biomassa estiveram na faixa de 0,324 a 0,378g_x.g_s⁻¹. O maior valor para o fator de conversão foi obtido para o cultivo realizado com nitrato de sódio, seguido pelo fator de conversão de 0,362 g_x.g_s⁻¹ obtido para o cultivo realizado com sulfato de amônio, ambos realizados sob aeração de 0,6VVM.

Em termos da produção de quitosana, esta pode ser verificada através da multiplicação da concentração de biomassa pela quantidade de quitosana na biomassa. A quantidade de quitosana obtida para os cultivos realizados com a aeração de 0,6VVM, resultou em 874mg.L⁻¹ quando utilizado o nitrato de sódio e 1062mg.L⁻¹ quando utilizado o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Já para os cultivos realizados com aeração de 0,3VVM, a produção de quitosana foi menor, resultando em 607mg.L⁻¹ quando utilizado o nitrato de sódio e 637mg.L⁻¹ quando utilizado o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Esta diferença na produção de quitosana obtida para os cultivos realizados com a aeração de 0,3 e 0,6VVM, esta diretamente relacionada à diferença da quantidade de biomassa final dos cultivos, já que a quantidade de quitosana na biomassa não apresentou grandes variações, estando na faixa de 9,45 a 11,05%. Esta pequena variação no conteúdo de quitosana na biomassa pode ser devido à quitosana ser um componente da parede celular, sendo uma característica do microrganismo e não um composto que pode sofrer aumento em sua produção em determinadas condições de cultivo, citando como exemplo a limitação ou excesso de nutrientes.

A produtividade em quitosana, é um aspecto importante a ser avaliado, pois relaciona a quantidade de biomassa produzida com sua respectiva quantidade de quitosana, além do tempo, ou seja, são características que podem definir a utilização de um determinado processo. Avaliando a produtividade total em quitosana, pode-se verificar que os cultivos utilizando a aeração de 0,6VVM resultaram em maiores produtividades de quitosana, atingindo $32,41\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ utilizando o nitrato de sódio e $39,34\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ utilizando o sulfato de amônio. Já os cultivos utilizando a aeração de 0,3VVM, resultaram em uma produtividade total menor, obtendo-se valores de 22,40 e $23,59\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ nos cultivos realizados com o nitrato de sódio e o sulfato de amônio.

STREIT (2004) utilizou o fungo *Gongronella butleri* CCT 4274 na produção de quitosana em Erlenmeyer utilizando como substrato o extrato aquoso do bagaço de maçã. Concentrações celulares de $5,6\text{g.L}^{-1}$ foram as máximas obtidas nos experimentos. A quantidade de quitosana na biomassa esteve na faixa de 4,9 a 21%, obtendo uma máxima concentração de quitosana de 1023mg.L^{-1} ao final de 120 horas de cultivo.

YOKOI et al. (1998) utilizando resíduos de destilaria obtiveram cerca de 7g.L^{-1} de biomassa utilizando o fungo *Gongronella butleri* IFO8080 e *Gongronella butleri* IFO8081 utilizando erlenmeyer como biorreatores. A concentração de quitosana obtida foi de 483 a 529mg.L^{-1} . TAN et al. (1996) obtiveram uma concentração celular máxima de $6,33\text{g.L}^{-1}$ utilizando o fungo *Rhizopus orizae* USDB 0602 e $4,1\text{g.L}^{-1}$ utilizando *Gongronella*, ambos os cultivos realizados em erlenmeyer, obtendo uma concentração de 510mg.L^{-1} de quitosana no cultivo realizado com o fungo *Rhizopus*. HANG (1990) utilizou o fungo *Rhizopus orizae* NRRL 395 crescendo em meios de cultivo a base de arroz e outro a base de milho. Resultados demonstraram que o fungo apresentou maior crescimento no meio de cultivo a base de arroz, produzindo cerca de 700mg.L^{-1} de quitosana, representando 20% do peso seco do microrganismo, o que não foi verificado neste estudo, pois conteúdos de quitosana estiveram na faixa de 9,45 a 11,05% do peso seco da biomassa.

Comparando-se os cultivos realizados em *airlift*, os resultados obtidos para a concentração celular e produção de quitosana foram superiores aos encontrados em literatura quando utilizada a aeração de 0,6VVM, onde se obteve a produção de 873mg.L^{-1} quando utilizado o nitrato de sódio e 1062mg.L^{-1} com o sulfato de amônio.

4.2 Cultivo em Meio Sólido

4.2.1 Caracterização do Bagaço de Maçã

A Tabela 9 apresenta as características físico-químicas do bagaço de maçã utilizado neste trabalho.

Tabela 9: Caracterização do bagaço de maçã.

Componente	Concentração (%)
Umidade	73,34±1,20
Cinzas	3,07±0,24
Proteína solúvel	4,97±0,20
Açúcares Redutores Totais	11,32±0,58
pH	3,94±0,05

Na análise da composição físico-química do bagaço de maçã, pode-se verificar que este substrato é rico em açúcares, podendo ser utilizado como fonte de carbono para microrganismos. Segundo ANUPAMA e RAVINDRA (2000), são os fungos que possuem maior capacidade de explorar estes materiais sólidos ricos em açúcares redutores.

A composição físico-química do bagaço de maçã apresentou composição semelhante à reportada por ALBUQUERQUE (2003), exceto no conteúdo de umidade. Neste trabalho o conteúdo de umidade foi de 73,34%, enquanto que no estudo citado, o material apresentou umidade de 79,90%. Esta diferença é devida a alterações dos equipamentos na indústria Yakult S/A, visando maior extração do suco de maçã. VILLAS BÔAS (2001) e ZHENG e SHETTY (1998) utilizaram o bagaço de maçã com umidade de 80%.

4.2.2 Planejamento Experimental Fatorial 3²

Os resultados obtidos para o planejamento fatorial 3² (duas variáveis e três níveis), avaliando-se a fonte de nitrogênio a 5% (p/p) e a umidade inicial do meio de cultivo, estão apresentados na Tabela 10. As respostas avaliadas – proteína solúvel e redução no conteúdo de açúcares redutores – assim como os resultados obtidos para o controle (C) e para o bagaço de maçã sem ser cultivado (B) também podem ser observados.

Tabela 10: Variáveis codificadas, variáveis reais e respostas para o planejamento experimental fatorial 3².

Exp.	Var. Codificadas		Var. Reais		Respostas	
	FN	Um	FN	Um (%)	PS (%)	RAR(%)
1	-1	-1	Sulfato	50	6,71	3,04
2	-1	0	Sulfato	60	7,58	3,07
3	-1	1	Sulfato	70	7,70	4,12
4	0	-1	Nitrato	50	11,62	34,49
5	0	0	Nitrato	60	14,05	43,38
6	0	1	Nitrato	70	14,89	48,37
7	1	-1	Uréia	50	12,51	38,29
8	1	0	Uréia	60	13,65	45,81
9	1	1	Uréia	70	15,22	50,49
10	0	0	Nitrato	60	13,72	43,44
11	0	0	Nitrato	60	14,50	48,20
C	-	-	-	-	8,72	7,10
B	-	-	-	-	5,94	0,5

FN: Fonte de nitrogênio; Um: Umidade inicial; PS: Proteína solúvel; RAR: Redução no conteúdo de açúcares redutores. Resultados apresentados na Tabela A1 no Anexo A.

Analisando a Tabela 10 pode-se verificar que os maiores valores para a produção de proteína solúvel 14,89 e 15,22%, ocorreram nos experimentos 6, 9 e 11, apresentando um aumento de 2,5 vezes na quantidade de proteína solúvel quando comparado com o bagaço de maçã sem tratamento biológico (B), ambos utilizando a umidade inicial de 70%, diferenciando-se na fonte de nitrogênio utilizada (uréia e nitrato de sódio). Os experimentos 5 e 8 utilizando a umidade de 60% diferenciando-se pela fonte de nitrogênio (uréia e nitrato de sódio), apresentaram resultados próximos, 14,05 e 13,65% no conteúdo de proteína solúvel. Pode-se verificar que tanto a uréia quanto o nitrato de sódio aumentaram consideravelmente a quantidade de proteína solúvel quando utilizadas a umidade inicial de 60 e 70% (experimentos 6 e 9). Os experimentos (1, 2 e 3) utilizando o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, apresentaram baixo crescimento celular, sendo a consequência os baixos resultados obtidos no conteúdo de proteína solúvel e redução no conteúdo de açúcares.

A diferença no crescimento celular pode ser verificada visualmente através da análise da Figura 8, que apresenta as colunas com o bagaço de maçã ao final dos cultivos para as condições variando a fonte de nitrogênio e a umidade.

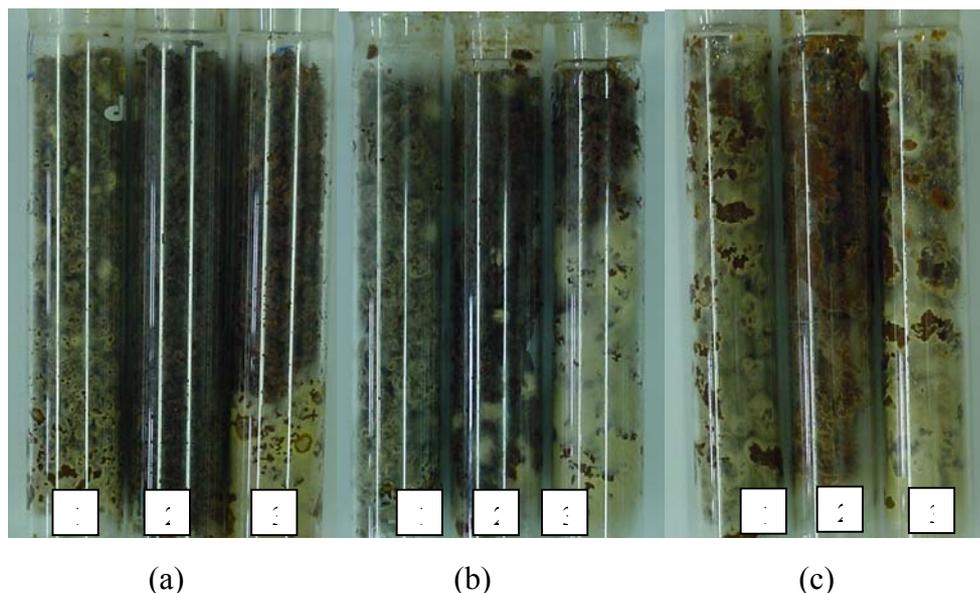


Figura 8: Colunas de Raimbault ao final dos cultivos da *G. butleri* para os ensaios utilizando uréia, sulfato de amônio e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. (a) umidade inicial de 50%, (b) umidade inicial de 60% e (c) umidade inicial de 70%, (1) uréia, (2) sulfato de amônio, (3) nitrato de sódio.

Analisando a Figura 8, verifica-se que os experimentos utilizando o sulfato de amônio apresentaram baixo crescimento celular. Já para o nitrato de sódio e a uréia, o crescimento do fungo é evidente, porém, a forma de crescimento é diferenciada, ou seja, o meio suplementado com uréia, apresentou o crescimento do fungo na forma de esporos, enquanto que o nitrato de sódio propicia o crescimento micelial. Verifica-se também a diferença de crescimento celular do microrganismo para os diferentes níveis de umidade para a mesma fonte de nitrogênio, sendo que a umidade inicial de 70% que apresentou maior crescimento do fungo (Figura 8c).

Os experimentos 6 e 9, diferenciando-se na fonte de nitrogênio (uréia e nitrato de sódio) ambos possuindo a umidade inicial de 70% reduziram em 50,49 e 48,37% a quantidade de açúcares redutores respectivamente. A redução no conteúdo de açúcares redutores, além de ser um indicativo do crescimento celular, é um aspecto importante devido à redução da carga orgânica (JOSHI e SANDHU, 1996), pois quando este material é submetido à alimentação

animal, o conteúdo de açúcares é de extrema importância. Para o caso da alimentação do gado, um alto conteúdo de açúcares provoca a fermentação e conseqüente produção de álcool no rúmen do animal, causando intoxicação (VILLAS BÔAS, 2001). Para alimentação de peixes, o conteúdo de açúcares está diretamente relacionado à carga orgânica adicionada, ou seja, quanto maior o conteúdo de açúcares, maior a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (KURBANOGLU, 2001), podendo ocasionar a morte dos peixes, além de aumentar o custo no sistema de aeração e oxigenação das lagoas de pisciculturas.

A Tabela 11 apresenta a estimativa dos efeitos e valores de p para os fatores fonte de nitrogênio e umidade inicial estudados no planejamento experimental fatorial 3^2 para a resposta proteína solúvel. Esta estimativa foi realizada utilizando o Software Statistica 5.11, ao nível de 0,05.

Tabela 11: Estimativa dos efeitos e valores de p para a resposta proteína solúvel.

	Efeito	Valor p
Média	11,5862	0,0000
Fonte de Nitrogênio	6,4583	0,0000
Umidade	2,3233	0,0069
Fonte de Nitrogênio X Umidade	0,8625	0,126

Analisando a Tabela 11, pode-se verificar que a fonte de nitrogênio possui efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a resposta proteína solúvel, pois quando utilizada a uréia e o nitrato de sódio, o teor de proteína solúvel aumentou 6,45% em média. Este efeito pronunciado da variável fonte de nitrogênio deve-se a baixa concentração de proteína solúvel produzida nos experimentos utilizando o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

O efeito determinado para a variável umidade inicial do meio fermentativo, também apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), aumentando em média 2,32% o conteúdo de proteína solúvel quando utilizada a umidade de 60 e 70%. O planejamento 3^2 , não identificou níveis isolados, mas faixas de operação, o que pode ser mais bem visualizado através da análise da Figura 9, que apresenta a superfície de resposta e a curva de nível para a produção de proteína solúvel, relacionada aos fatores fonte de nitrogênio e umidade inicial do meio de cultivo.

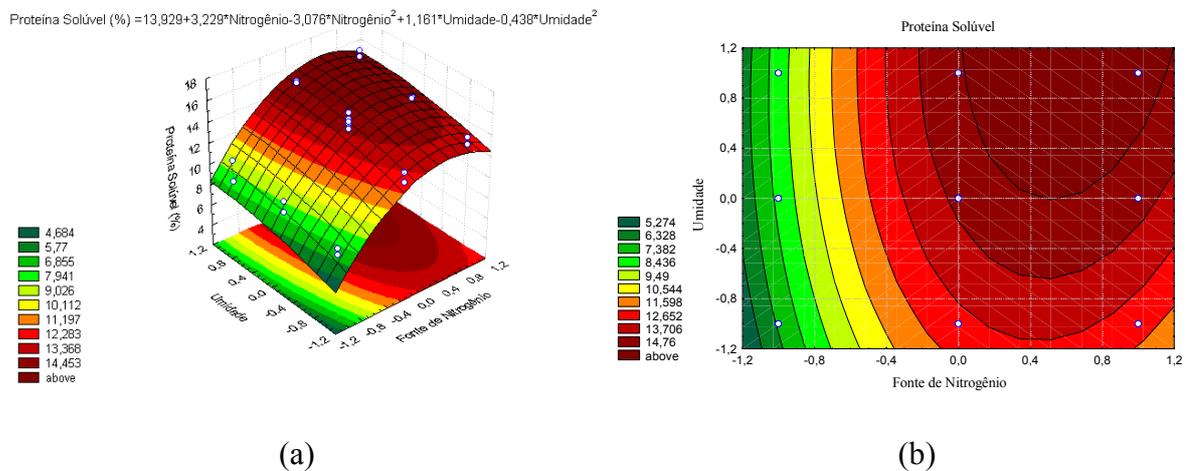


Figura 9: Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta proteína solúvel para os fatores fonte de nitrogênio *versus* umidade inicial

Através da Figura 9, pode-se verificar que a produção de proteína solúvel possui maior aumento quando utilizado o nitrato de sódio (nível 0) e uréia (nível +1) como fonte de nitrogênio e a umidade de 60 (nível 0) e 70% (nível +1). Estes resultados não indicam valores fixos, mas identificam faixas de operações.

A partir destes resultados, foram realizados dois planejamentos experimentais fatoriais 2^2 . O primeiro planejamento consistiu na avaliação da fonte de nitrogênio sendo o nitrato de sódio e a uréia nas concentrações de 2 e 5%(p/p) e o segundo planejamento fatorial 2^2 , consistiu na avaliação da umidade (60 e 70%) e granulometria (0,85 a 1,7 e 1,7 a 3,35mm).

4.2.3 Primeiro Planejamento Experimental Fatorial 2²

A Tabela 12 apresenta a matriz do primeiro planejamento experimental fatorial 2² com as variáveis codificadas, variáveis reais, bem como as respostas proteína solúvel e redução no conteúdo de açúcares redutores do bagaço de maçã.

Tabela 12: Variáveis codificadas, variáveis reais e respostas para o primeiro planejamento fatorial 2².

Exp.	Var. Codificadas		Var. Reais		Respostas	
	FN	CFN	FN	CFN (%)	PS (%)	RAR (%)
1	-1	-1	Nitrato	2	13,71	48,26
2	-1	+1	Nitrato	5	14,96	53,86
3	+1	-1	Uréia	2	14,80	53,61
4	+1	+1	Uréia	5	17,99	64,71

FN: fonte de nitrogênio; CFN: Concentração da fonte de nitrogênio; PS: Proteína solúvel; RAR: Redução no conteúdo de açúcares redutores.

Analisando a Tabela 12, pode-se verificar que o experimento 4, utilizando a uréia na concentração de 5% produziu maiores quantidades de proteína solúvel e consumo de açúcares redutores quando comparado aos demais experimentos, atingindo valores de 17,99% e 64,71%. O aumento da quantidade de proteína solúvel foi mais pronunciado quando utilizada a uréia como fonte de nitrogênio, pois quando a concentração passou de 2 para 5% (exp. 3 e 4), o aumento foi superior quando comparado ao aumento no conteúdo de proteína solúvel quando a concentração de nitrato de sódio passou de 2 para 5% (exp. 1 e 2).

A diferença entre a produção de proteína, pode estar relacionada com a quantidade de nitrogênio adicionada, pois cada molécula de uréia fornece dois átomos de nitrogênio (46% de nitrogênio na uréia). Já o nitrato de sódio, fornece apenas um átomo de nitrogênio (16% de nitrogênio no nitrato de sódio). Isto pode ser verificado pela comparação dos experimentos 2 e 3, onde o nitrato de sódio quando utilizado em maior concentração (5%) produz a mesma quantidade de proteína solúvel quando utilizada a uréia na concentração de 2%.

A Tabela 13 apresenta a estimativa dos efeitos dos fatores fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio na produção de proteína solúvel.

Tabela 13: Estimativa dos efeitos e valores de p para a resposta proteína solúvel.

	Efeito	Valor de p
Média	15,3625	0,0000
Fonte de nitrogênio	2,0600	0,0093
Concentração	2,2200	0,0072
Fonte de N X Concentração	0,975	0,0905

Analisando a Tabela 13, pode-se verificar que o fator fonte de nitrogênio apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de proteína solúvel. A variável fonte de nitrogênio aumenta em média 2,06% a produção de proteína solúvel quando utilizada em seu nível superior (uréia). O aumento da concentração da fonte de nitrogênio de 2 para 5%, aumenta em média 2,22% o conteúdo de proteína solúvel.

Diante dos resultados obtidos para o planejamento experimental fatorial 2^2 , torna-se evidente que os baixos valores obtidos para o conteúdo de proteína solúvel utilizando o sulfato de amônio, estudado no planejamento 3^2 , contribuíram para o alto valor do efeito causado pela fonte de nitrogênio. Neste planejamento, foi avaliada a faixa de operação para a

fonte de nitrogênio, avaliando a uréia e o nitrato de sódio como, indicado pelas respostas do planejamento experimental fatorial 3^2 .

4.2.4 Segundo Planejamento Experimental Fatorial 2^2

A Tabela 14 apresenta a matriz do segundo planejamento experimental fatorial 2^2 com as variáveis codificadas, variáveis reais e as respostas proteína solúvel e redução no conteúdo de açúcares redutores no bagaço de maçã.

Tabela 14: Variáveis codificadas, variáveis reais e respostas para o segundo planejamento fatorial 2^2 .

Exp.	Var. Codificadas		Var. Reais		Respostas	
	Um	G	Um (%)	Gran (mm)	PS (%)	RAR (%)
1	-1	-1	60	0,85 - 1,7	16,21	53,53
2	-1	+1	60	1,7 - 3,35	15,32	54,81
3	+1	-1	70	0,85 - 1,7	19,24	66,79
4	+1	+1	70	1,7 - 3,35	17,35	58,86

Um: umidade inicial; G: Granulometria, PS: Proteína solúvel; RAR: Redução no conteúdo de açúcares redutores.

Analisando a Tabela 14, pode-se verificar que o ensaio 3, utilizando a umidade inicial de 70% e a granulometria na faixa de 0,85 a 1,7mm proporcionou maior produção de proteína solúvel, atingindo valores médios de 19,24%. Este aumento na quantidade de proteína solúvel pode estar relacionado ao aumento da área superficial do leito fermentativo, pois o fungo pode apresentar maior crescimento em pequenas partículas. Segundo ZADRAZIL e PUNIYA (1995), menores granulometrias aumentam a área superficial e conseqüentemente maior contato do microrganismo com o substrato é proporcionado, aumentando o consumo de açúcares redutores e produção de biomassa, embora reduzam a difusividade de oxigênio em alguns casos.

A Tabela 15 apresenta os efeitos e valores de p para os fatores umidade inicial e granulometria do meio de cultivo para a resposta proteína solúvel.

Tabela 15: Estimativa dos efeitos e valores de p para a resposta proteína solúvel.

	Efeito	Valor de p
Média	17,23	0,0000
Umidade	2,64	0,0019
Granulometria	-1,12	0,0374
Umidade X Granulometria	-1,03	0,0478

Analisando a Tabela 15, verifica-se que as variáveis, umidade inicial e granulometria, bem como a interação entre as variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de proteína solúvel. A análise dos efeitos isolados demonstra que a utilização da umidade em seu nível superior (70%) aumenta em média 2,64% o conteúdo de proteína no bagaço de maçã. Já para a variável granulometria, esta aumenta em média 1,12% o conteúdo de proteína solúvel quando utilizado o nível inferior (0,85 a 1,7mm). Como a estimativa dos efeitos apresentou interação entre a variável umidade inicial e granulometria, deve-se analisar esta interação, a qual aumenta 1,03 em média a quantidade de proteína solúvel no bagaço de maçã utilizando a granulometria em seu nível inferior (0,85 a 1,7mm) e a umidade em seu nível superior (70%).

ZADRAZIL e PUNIYA (1995) utilizaram fungos brancos para avaliar o efeito do tamanho de partícula utilizando como substrato o bagaço de cana através de fermentação em estado sólido. Destacam que menores granulometrias favorecem a conversão do substrato em biomassa, pois o material encontra-se exposto com maior área superficial, muito importante nos casos que utilizam materiais lignocelulósicos. Outra abordagem realizada pelos autores, refere-se aos aspectos a serem utilizados durante o processo fermentativo, como umidade,

tamanho de partícula e características do substrato, bem como a escolha adequada do microrganismo para cada material a ser utilizado.

JOSHI e SHANDU (1996) utilizaram três leveduras (*Saccharomyces*, *Cândida* e *Torula*) para a produção de álcool a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido. Após separação do álcool, o bagaço de maçã fermentado foi avaliado quanto ao conteúdo de proteína solúvel, açúcares redutores, lipídeos e valor calórico. Os resultados demonstraram que o conteúdo de proteína solúvel aumentou em 1,5 vezes, reduzindo em 42% o conteúdo de açúcares redutores. O valor calórico do material, sofreu pouca redução, passando de 295 para 263kcal/100g, diferença a qual está relacionada com o consumo de açúcares, reduzindo o valor calórico e aumentando o valor nutricional do produto .

ALBUQUERQUE (2003) utilizou o fungo filamentosso *Rhizopus oligosporus* no enriquecimento protéico do bagaço de maçã, avaliando a fonte de nitrogênio (uréia e o sulfato de amônio) e a adição de uma solução tampão. Resultados demonstraram que o conteúdo de proteína solúvel aumentou em 5 vezes na melhor condição de cultivo (uréia a 5% p/p e adição de tampão). Demais ensaios, apresentaram resultados compreendidos na faixa de 7 a 17% no conteúdo de proteína solúvel, com um máximo de 45% de açúcares redutores consumidos durante três dias de fermentação. Neste estudo, o fungo colonizou todo o substrato em aproximadamente 72 horas de cultivo, mostrando grande potencial na bioconversão do bagaço de maçã.

VILLAS-BÔAS (2001) cultivou *Cândida utilis* e *Pleurotus ostreatus* visando a produção de suplemento para ração animal utilizando o bagaço de maçã. Quando o bagaço foi tratado com *C. utilis* durante 6 dias, foi possível aumentar em 100% o teor de proteína bruta, e

em 60% a concentração de sais minerais, observando ainda, uma redução de até 97% no conteúdo de açúcares livres no substrato, acompanhado de 8,2% no aumento da digestibilidade do material tratado. Por outro lado, após tratamento com *P. ostreatus* o conteúdo de proteína bruta sofreu um aumento de 500% após 60 dias de fermentação, entretanto, o material apresentou menor digestibilidade, devido a alta concentração de lignina no material, concluindo que a utilização do fungo *P. ostreatus* foi inviável economicamente, devido a baixa digestibilidade e longo período de fermentação.

BISARIA et al. (1997) utilizaram o fungo *Pleurotus sajor-caju* na bioconversão de palha de arroz e palha de trigo. Os autores observaram que a suplementação dos resíduos sólidos com fontes de nitrogênio (uréia e nitrato de amônio) aumenta a bioconversão destes materiais, pois o teor protéico foi aumentado de 2,87 para 6,3% na palha de arroz e de 3,1 para 7,5% na palha de trigo.

4.3 Testes Biológicos e Parâmetros Biométricos

Com o objetivo de testar o bagaço de maçã enriquecido como complemento alimentar em ração animal, foi realizado testes biológicos em alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) onde foram realizados 2 tratamentos – ração convencional e ração convencional adicionada de 30% de bagaço de maçã enriquecido – durante um período de 30 dias.

Os testes codificados por RC representam a dieta dos alevinos com ração convencional e RCB a dieta com ração convencional adicionada em 30% com bagaço de maçã enriquecido. Os índices “0” (zero) e “30” (trinta), referem-se às medidas iniciais e finais para a resposta a ser avaliada. A Figura 10 apresenta os resultados obtidos para a resposta comprimento inicial e final dos alevinos submetidos a dietas RC e RCB.

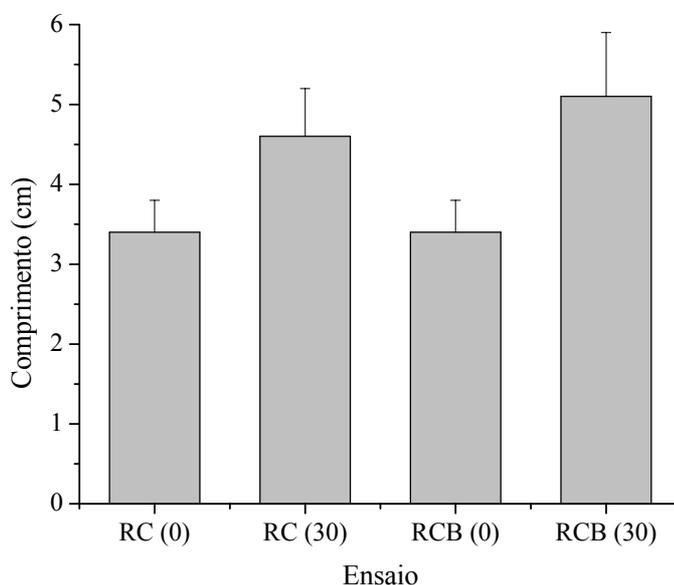


Figura 10: Média e desvio padrão para a resposta comprimento inicial e final dos alevinos submetidos às dietas RC e RCB.

Através da Figura 10, pode-se verificar que o ensaio RCB (30), utilizando a ração convencional adicionada em 30% com bagaço de maçã enriquecido resultou em maior comprimento dos alevinos, atingindo 5,2cm após 30 dias. Já para o teste realizado utilizando somente ração convencional, ao final de 30 dias os alevinos atingiram 4,6cm, ou seja, a fração de 30% de bagaço de maçã enriquecido adicionada aumentou em aproximadamente 13% o comprimento dos alevinos.

As Tabelas 16, 17 e 18 apresentam os resultados para a análise de variância para as respostas comprimento, altura e massa dos alevinos nos ensaios realizados.

Tabela 16: Diferença entre médias e análise de variância para o comprimento dos alevinos.

Comparação	Diferença (cm)	q	Valor de p
RC (0) - RC (30)	-1,202	9,299	<0,001
RC (0) - RCB (0)	0,046	0,392	>0,050
RC (0) - RCB (30)	-1,709	13,840	<0,001
RC (30) - RCB (0)	1,249	10,314	<0,001
RC (30) - RCB (30)	-0,506	4,036	<0,050
RCB (0) - RCB (30)	-1,756	14,218	<0,001

Analisando as Tabelas 16, 17 e 18, pode-se verificar que a comparação RC (0) – RCB (0) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) para as três respostas, indicando que os lotes são homogêneos.

Analisando a Tabela 16, pode-se verificar que a comparação RC (30) – RCB (30), que relaciona a diferença entre o comprimento dos alevinos utilizando a ração convencional e ração convencional adicionada em 30% com bagaço de maçã ao final de 30 dias, apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), proporcionando um aumento de 0,506cm, em média,

indicando que a adição do bagaço de maçã adicionado em dietas para apresenta resultados positivos na alimentação de alevinos.

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para a resposta altura dos alevinos nos testes realizados utilizando ração convencional e ração convencional adicionada em 30% com bagaço de maçã enriquecido.

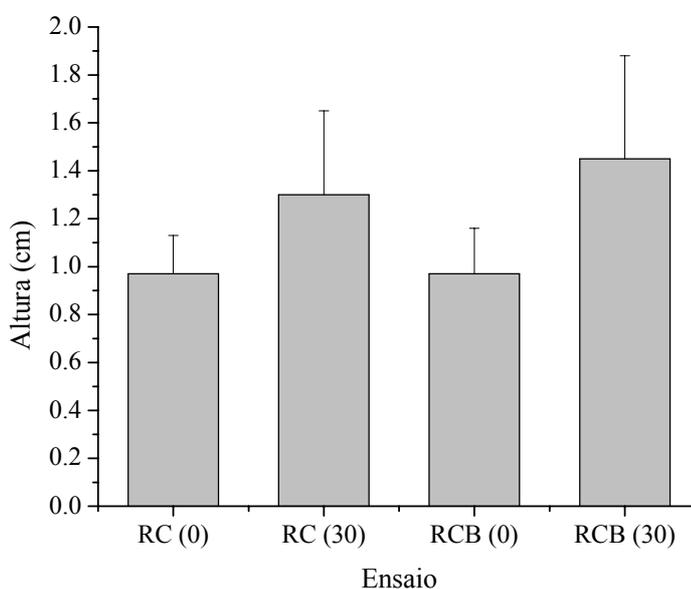


Figura 11: Média e desvio padrão para a resposta altura inicial e final dos alevinos submetidos às dietas RC e RCB.

Através da Figura 11, pode-se verificar a altura dos alevinos no início e ao final de 30 dias de alimentação. O teste RCB (30) atingiu a altura de 1,45cm em média, enquanto que o teste RC (30) utilizando somente ração convencional, aumentou em média 1,30cm. A adição do bagaço de maçã enriquecido proporcionou um aumento de 11,5% na altura dos alevinos, quando comparado à alimentação com a ração convencional.

Estes resultados podem ser mais bem analisados e avaliados através da Tabela 17, a qual apresenta os resultados para a diferença entre médias e a análise de variância para a resposta altura dos alevinos.

Tabela 17: Diferença entre médias e análise de variância para a altura dos alevinos.

Comparação	Diferença (cm)	q	Valor de p
RC (0) - RC (30)	-0,342	6,302	<0,001
RC (0) - RCB (0)	0,003	0,062	>0,050
RC (0) - RCB (30)	-0,491	8,872	<0,001
RC (30) - RCB (0)	0,346	6,364	<0,001
RC (30) - RCB (30)	-0,149	2,647	>0,050
RCB (0) - RCB (30)	-0,495	8,932	<0,001

Analisando a Tabela 17, pode-se verificar que a comparação RC (30) – RCB (30) resultando em -0,1492, indica que o tratamento utilizando a ração convencional adicionada com bagaço de maçã enriquecido, aumentou em média 0,1492cm a altura dos alevinos, aumento de 11,5%, não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos para o comprimento e altura dos alevinos, neste caso, são indicativos para a principal resposta, ou seja, para a massa dos alevinos, pois um aumento nas respostas comprimento e altura podem resultar em aumento da massa. A Figura 12 apresenta as respostas para a massa dos alevinos submetidos as dietas RC e RCB.

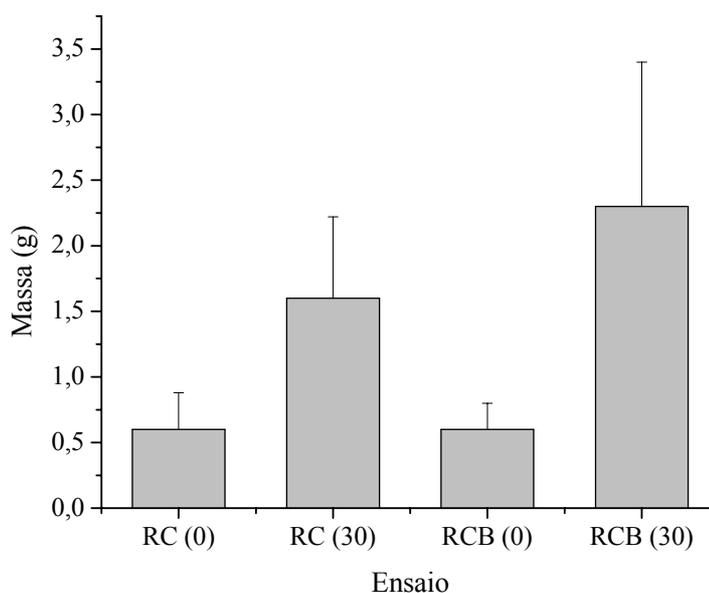


Figura 12: Média e desvio padrão para a resposta massa inicial e final dos alevinos submetidos às dietas RC e RCB.

Analisando a Figura 12, verifica-se que os indicativos do aumento do comprimento e da altura, são ressaltados quando os resultados são reportados em massa, ou seja, o aumento da grandeza massa dos alevinos, está diretamente relacionado às grandezas comprimento e altura.

A dieta utilizando a ração convencional adicionada em 30% de bagaço de maçã enriquecido (RCB (30)) atingiu em média 2,3g, enquanto os testes realizados com ração convencional (RC (30)) atingiu em média 1,6g. Esta diferença de 0,7g representa um aumento em aproximadamente 44% na massa dos alevinos, o que pode ser mais bem verificado através da Tabela 18, que apresenta a análise de variância para a resposta massa dos alevinos.

Tabela 18: Diferença entre médias e análise de variância para a massa dos alevinos.

Comparação	Diferença (g)	q	Valor de p
RC (0) - RC (30)	-0,967	8,314	<0,001
RC (0) - RCB (0)	0,016	0,145	>0,050
RC (0) - RCB (30)	-1,673	14,098	<0,001
RC (30) - RCB (0)	0,984	8,458	<0,001
RC (30) - RCB (30)	-0,705	5,848	<0,001
RCB (0) - RCB (30)	-1,690	14,239	<0,001

Analisando a Tabela 18, pode-se verificar que a comparação RC (30) - RCB (30), analisando a variação da massa para os dois testes realizados, apresentou um resultado de -0,7056 ($p < 0,001$), ou seja, utilizando o tratamento RCB (30) aumenta em média 0,7056g a massa dos alevinos ao final de 30 dias de alimentação, fato este indicado indiretamente pelo aumento do comprimento e da altura dos alevinos.

Estes resultados, demonstram que a proteína produzida pelo fungo filamentosso *Gongronella butleri* no enriquecimento protéico do bagaço de maçã, possibilita sua utilização como complemento alimentar em dietas para alevinos, podendo ser uma ótima forma de destino para o bagaço de maçã e outros resíduos agroindustriais, pois além de ser um resíduo não despejado diretamente na natureza reduzindo os níveis de poluição ambiental, possibilita minimizar custos oriundos com alimentação de peixes, os quais representam cerca de 60% do custo de produção. Outro fator importante é a sua aplicabilidade, ou seja, este material após ser tratado biologicamente, não necessita várias operações secundárias, a não ser redução do conteúdo de umidade e tamanho de partículas para o armazenamento e mistura na ração convencional.

BACCARIN e PEZZATO (2001), avaliaram o efeito da adição de 10% da levedura *Saccharomyces cerevisiae* desidratada, como substituto do suplemento vitamínico em dietas para tilápia-do-nilo. Os resultados não apresentaram influência significativa nos tratamentos sobre o ganho de peso e taxa de crescimento específico. Foi observada, nos peixes alimentados com dietas sem suplemento vitamínico, alta mortalidade. Já os peixes que receberam levedura apresentaram menor conteúdo corporal de proteína e maior de lipídeos. GUR (1997), em trabalhos com tilápia-do-nilo, observou que as quantidades de vitaminas contidas nos ingredientes para rações são suficientes para o crescimento dos peixes, porém não são satisfatórias para o funcionamento do sistema imunológico.

Segundo HEPHER (1988), a substituição total da farinha de peixe pela levedura pode não apresentar diferenças no ganho de peso e conversão alimentar, desde que suplementadas com metionina. DAVIES e WAREHAM (1988) demonstraram, em experimentos realizados com tilápia mossâmbica, que a inclusão de até 10% de proteína unicelular não reduz o desempenho produtivo. Níveis superiores resultaram em substancial redução na taxa de crescimento. MAHNKEN et al. (1980) também não verificaram diferenças significativas entre as dietas quanto ao ganho de peso, utilizando níveis de até 40% de levedura de álcool em substituição a farinha de peixe na alimentação de truta-arco-íris. PADUA (1996) apud BACCARIN e PEZZATO (2001), em ensaios com pacu, avaliou o efeito da substituição crescente da farinha de peixe pela levedura alcoólica sobre o desempenho produtivo, e obteve, embora em grau não significativo, os menores resultados com maiores níveis de levedura.

5. CONCLUSÃO

Maiores resultados para a produção de quitosana foram obtidos utilizando a aeração de 0,6VVM e o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio para o microrganismo, produzindo 1062mg.L⁻¹.

A quantidade de quitosana na biomassa demonstrou ser uma característica do microrganismo, pois esta esteve compreendida entre 9,45 e 11,05%, indicando que a quitosana é um componente da parede celular do fungo.

No enriquecimento protéico do bagaço de maçã a maior concentração de proteína solúvel foi obtida utilizando a umidade inicial de 70%, a uréia na concentração de 5% como fonte de nitrogênio e a granulometria na faixa de 0,85-1,7mm, produzindo 19,24%, aumentando em aproximadamente 4 vezes o conteúdo de proteína solúvel no bagaço de maçã.

O bagaço de maçã tratado com *Gongronella butleri* incorporado à dieta dos alevinos demonstrou ser um produto nutritivo, pois quando adicionado na proporção de 30% com a ração convencional os alevinos apresentaram um aumento de 13% no comprimento, 11,5% na altura e 44% na massa corpórea, apresentando diferenças significativas ao nível de 0,05.

6. SUGESTÕES

Avaliar o pH no cultivo de *Gongronella butleri* em biorreator *airlift* visando atingir maiores concentrações de quitosana na biomassa, enfocando a atividade da enzima quitina desacetilase.

Utilizar o bagaço de maçã em alimentação de tilápias durante maiores períodos de tempo, para verificar se o aumento da massa corpórea é verificado durante todo o tratamento, ou somente no período caracterizado como alevino, bem como utilizar maiores concentrações do bagaço de maçã enriquecido em dietas de alevinos.

Utilizar biorreator de tambor rotativo para o enriquecimento protéico do bagaço de maçã, visando produzir maior quantidade do material tratado.

Realizar a curva de crescimento do fungo *Gongronella butleri* durante o enriquecimento protéico do bagaço de maçã em fermentação em estado sólido e determinar parâmetros cinéticos.

Avaliar a viabilidade econômica da utilização do bagaço de maçã tratado na alimentação de alevinos de tilápia.

Avaliar o potencial da *Gongronella butleri* como probiótico na alimentação de alevinos de tilápia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, Y. R.; OLAMA, Z. A. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**. v.38, p.115-122. 2002.
- ABDREU, G.; BERNAIGES, M. D.; LOPES, J.; SOLÁ, J. A simple method for RNA extraction from yeast. **Biotechnology Bioengineering**. v.32, p.927-929. 1988.
- ABOUD-ZEID, A. Z. A.; KHAN, J. A.; ABULNAJA, K. O. On methods for reduction of nucleic acids content in a single-cell protein from gas oil. **Bioresource Technology**. v.52, p.21-24. 1994.
- ABPM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ – Disponível em:<<http://www.abpm.org.br>> Acesso em: 03 de outubro de 2004.
- ABU-RUWAIDA, S. A.; BANNAT, I. M.; HAMDAM, Y. I. Reduction of nucleic acid content in cell biomass of methanol utilizing mixed bacteria cultures by heat treatment. **Biotechnology Letters**. v.10, p.597-602. 1988.
- ALBUQUERQUE, P. M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã**. Florianópolis: UFSC, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- ALBUQUERQUE, P. M.; KOCH, F.; TROSSINI, T. G.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J. L. Enriquecimento protéico do bagaço de maçã com proteína fúngica através da fermentação em estado. In: Simpósio Nacional de Fermentações, 4, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: UFSC, 2003.
- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicolata lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. **Enzyme. Microbiology and Tecnology**. v.26, p.402-405. 2000.
- ALLEN, G.; ROBINSON, C. On the calculation of shear rate and apparent viscosity in an airlift and bubble column bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**. v.38, p.212-216. 1991.
- AMORIM, R. V. S.; MELO, E. S.; CUNHA M. G. C.; LEDINGHAM, W. M.; TAKAKI, G. M. C. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**. v.43, p.231-235. 2003.
- AMORIM, R. V. S., SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, n.1, p.20-33. 2001.
- ANDERSSON, M.; LÖFROTH, J. E. Small particles of heparin/chitosan complex prepared from a pharmaceutically acceptable microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**. v.257, p.305-309. 2003.

- ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**. v.18, p.459-479. 2000.
- ARCIDIACONO, S.; LOMBARDI, S. J.; KAPLAN, D. L. Fermentation, processing and enzyme characterization for chitosan biosynthesis by *Mucor rouxii*. In: SKAJÄKBREAK, G. et al. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier, 1989. 835p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Ed – **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Washington: AOAC, 1995. 1094p.
- BACARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia-do-nilo. **Pesquisas Agropecuárias Brasileira**. v.36, n.3, p.549-556. 2001.
- BALASUBRAMANIAM, A. K.; NAGARAJAN, K. V.; PARAMASAMY, G. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v.36, p.1241-1247. 2001.
- BELLO, R. A.; ROBINSON, C. W.; MOO-YOUNG, M. Gas-holdup and overall volumetric oxygen transfer coefficient in airlift contactors, **Biotechnology Bioengineering**. v.27, p.369-381. 1985.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.43, n.5, p.453-460. 2000.
- BEROVIC, M.; OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**. v.53, p.47-53. 1997.
- BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; PASQUALI, G. D. L. Glucoamilase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **J. Microbiology and Biotechnology**. v.11, p.13-16. 2001.
- BHALLA, T. C. e JOSHI, M. Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.10, p.116-117. 1994.
- BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**. v.59, n.1, p.5-8. 1997.
- BONNARME, P.; DELATTRE, M.; DROUET, H.; CORRIEU, G.; ASTHER, M. Toward a control of lignin and manganese peroxidase hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**. v.41, p.440-450. 1993.

- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistic for experiments – An introduction to design. Data analysis and mode/building.** Editora John Wiley, New York. 1978.
- BROUSSIGNAC, P. **Un hault polymere naturel per connum dans l'industrie de chitosan.** 1972. 1241p.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology.** v.71, p.45-50, 2000a.
- CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA, G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal.** v.4, p.239-247. 2000b.
- CHISTI, M. Y. **Airlift Bioreactors.** Elsevier Applied Sciences. London, 1989. 345p.
- CHIOU, P. W. S.; CHIU, S. W.; CHEN, C. R. Value of *Aspergillus niger* fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology.** v.91, n.3, p.171-182. 2001.
- CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ALAOU, M. I.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis.** v.5, p.75-78. 1998.
- CÓRDOVA, T. C.; CARRILLO, T. G. R.; CERVANTES, D. D.; LÓPEZ, J. O.; CASTAÑEDA, G. S.; CAMPOCOSIO, A. T.; VÁZQUEZ, R. R. CO₂ evolution and ligninolytic and proteolytic activities of *Phanerochaete chrysosporium* grown in solid state fermentation. **Resources, Conservation and Recycling.** v.27, p.3-7. 1999.
- COSTA, J. A. **Produção de amiloglicosidase por fermentação em estado sólido em biorreator de coluna.** Campinas: UNICAMP, 1996. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- CUÈLLAR, M. A. B. **Qutina-quitosana: los polímeros del futuro.** Santiago de Cali: SENA, 2002. 113p.
- DARMADJI, P. e IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science.** v.38, n.2, p.243-254. 1994.
- DAVIES, S.; WAREHAM, H. A preliminary evaluation of na industrial single cell protein in practical diets for tilapia (*Oreocromis mossambicus*). **Aquaculture.** V.73, p.189-199. 1988.
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAUEWS, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Fermentação em Estado Sólido.** In: SCHMIDELL, W. et al. (Coords). Biotecnologia industrial. v.2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541p.

- DESBRIERES, J. Viscosity of semiflexible chitosan solutions: influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions. **Biomacromolecules**. v.3, p.342-349. 2002.
- DURÁN, N. Bioconversion to single cell protein: Recovery of lignocellulosic materials to produce human food as an integrated process. **Alimentos**. v.14, n.4, p.39-50. 1989.
- EL-NAWWI, S. A.; EL-KADER, A. A. Production of single-cell protein and cellulase from sugarcane bagasse: Effect of culture factors. **Biomass and Bioenergy**. v.11, n.4, p.361-364. 1996.
- EL-SAADANY, R.; KHALAF, H.; EL-MANAWATY, H.; SALOM, F. The production of single cell protein from agricultural wastes by fungi. **Acta-Alimentus**. v.17, n.4, p.376-377. 1988.
- ERIKSON, L. E.; PATEL, S. A.; GLASGOW, A. Effects of viscosity and small bubble segregation on mass transfer in airlift fermenters. **Process Biochemistry**. v.18, n.3, p.16. 1983.
- FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamari* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letters**. v.173, p.335-339. 1999.
- FOO, L. Y.; LU, Y. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. **Food Chemistry**. v.64, n.4, p.511-518, 1999.
- FRÖHLICH, S.; LOTZ, M.; KORTE, T.; LÜBBERT, A.; SCHÜGERI, K.; SEEKAMP, M. Characterization of a pilot plant airlift tower loop bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v.38, p.43-45. 1991.
- GAVRILESCU, M.; ROMAN, R.V. Performance of airlift bioreactors in the cultivation of some antibiotic producing microorganisms. **Acta Biotechnologica**. v.8, p.201-229. 1998.
- GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Bioresource Technology**. v.73, p.113-121. 2000.
- GUR, N. Innovations in tilapia nutrition in Israel. **Aquaculture**. v.49, n.3, p.151-159. 1997.
- GUTIERREZ-ROJAS, M.; HUERTA-OCHOA, S.; ULIBARRI, R. L.; CASTANEDA, G.; TORREZ, E. F.; GONZALEZ, G. V. Solid state fermentation in bioconversion of agro-industrial raw materials. França: In: Il primeiere ARTI à Nimes. 1992.
- HANG, Y. D. Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. **Biotechnology Letters**. v.12, n.12, p.911-912. 1990.
- HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Apple pomace: A potential substrate for production of β -glucosidase by *Aspergillus foetidus*. **Lebensm Wiss. U. Technology**. v.27, p.587-589. 1994.

- HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press, 1988. 406p.
- HISS, H. **Cinética dos processos fermentativos**. In: SCHMIDELL, W. Et al. (Coords.). *Biotechnologia industrial: volume 2*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541p.
- HOGSCHAGEN, M.; ZHU, Y.; AS, H. V.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Influence of wheat type and pretreatment on fungal growth in solid state fermentation. **Biotechnology Letters**. v.23, p.1183-1187. 2001.
- IKASARI, L.; MITCHELL, D. A. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**. v.19, p.171-175. 1996.
- IKINCI, G.; SENEL, S.; AKINCIBAY, H.; KAS, S.; ERCIS, S.; WILSON, C. G.; HINCAL, A. A. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **International Journal of Pharmaceutics**. v.235, p.121-127. 2002.
- JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**. v.11, p.1-5. 2000.
- JOSHI, V. K.; SANDHU, D. K. Preparation and evaluation of an animal feed by product produced by solid-state fermentation of apple pomace. **Bioresource Technology**, v.56, n.2, p.251-255. 1996.
- KESSLER, W. R.; POPOVIC, M. K.; ROBINSON, C. W. Xanthan production in a external-circulations-loop airlift bioreactors. **Canadian Journal of Chemical Engineering**. v.71, p.101-106. 1993.
- KILIKIAN, B. V.; OROZCO, S. F. B.; PEREIRA, D. G. Influência do pH na produção de pigmentos vermelhos e na morfologia de *Monascus purpureus* CCT 3802 em cultivo submerso. In: Simpósio Nacional de Fermentações, 4, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: UFSC, 2003.
- KIM, J. H.; LEBEAULT, J. M. Protein production from whey using *Penicillium cyclopum*: growth parameters and cellular composition. **European Journal Applied Microbiology Biotechnololy**. v.13, p.151-154. 1981.
- KIMURA, I. Y. **Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana**. Florianópolis: UFSC, 2001. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- KITTUR, F. S.; KUMAR, A. B. V.; GOWDA, L. R.; THARANATHAN, R. N. Chitosan analysis by a pectinase isozyme of *Aspergillus niger* – A non-specific activity. **Process Biochemistry**. v.53, p.191-196. 2003.
- KOLANI, S.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; TRAORE, Q.; DOH, A. Optimization of cell yield of *Candida krusei* SO1 and *Saccharomyces* sp. LK3G culture in sorghum hydrolisate. **Bioresource Technology**. v.57, p.275-281. 1996.

- KRISHNA, C. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. **Bioresource Technology**. v.69, p.231-239. 1999.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. v.46, n.1, p.1-27. 2000.
- KURBANOGLU, E. B. Production of single-cell protein from ram horn hydrolysate. **Turkish Journal of Biology**. v.25, p.371-377. 2001.
- LAHORE, H. M. F.; FRAILE, E. R.; CASCONI, O. Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. **Journal of Biotechnology**. v.62, p.83-93. 1998.
- LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A. **Applications and properties of chitosan**. In: GOOSEN, M. F. A. Applications of chitin and chitosan. Lancaster: Technomic, 1997, 336p.
- LIM, S. H.; HUDSON, S. M. Application of fiber-reactive chitosan derivate to cotton fabric as an antimicrobial textile finish. **Carbohydrate Polymers**. v.56, p.227-234. 2004.
- LINDE, G. A. **Produção de Pectinase por Fermentação Semi-sólida em Biorreator de Coluna**. Rio Grande: FURG, 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Departamento de Química, Universidade Federal de Rio Grande, 2000.
- LITCHFIELD, J. H. Single cell proteins. **Science**. v.219, p.740-746. 1983.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v.193, p.265-275. 1951.
- LUCCA, M. E.; ROMERO, M. E. e CALLIERI, D. A. S. Composition and morphology of *Candida utilis* grown in continuous culture with decreasing concentrations of phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.7, p.359-364. 1991.
- MAHNKEN, C. V. W.; SPINELLI, J.; WAKNITZ, F. W. Evaluation of an alkane yeast (*Candida* sp) as a substitute for fish meal in Oregon moist pellet: feeding trials with Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**. v.20, p.41-56. 1980.
- MALETE, W. G.; QUINGLEY, H. J.; ADICKES, E. D. **Chitin in nature**. Ed. Plenum, New York, 1986. 435p.
- MALFAIT, J. L.; WILCOX, D. J. MERCER, D. G.; BRKER, L. D. Cultivation of a filamentous mould in a glass pilot scale fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**. v.23, p.863-877. 1981.
- MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**. v.37, p.949-954. 2002.
- MATHUR, N. K. e KARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**. v.67, p.938-942. 1990.

- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31, n.9, p.426-428. 1959.
- MORAES, R. O. **Estudo da Produção de β -galactosidase por fermentação em substrato sólido em colunas de Raimbault**. Campinas: UNICAMP, 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan-based dietary foods. **Carbohydrate Polymers**. v.29, p.309-316. 1996.
- NAGEL, F. J.; OOSTRA, J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Improved model system for solid-substrate fermentation: effects on pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. **Process Biochemistry**. v.35, n.1, p.69-75. 1999.
- NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F.; MAW, T.; TAN, T. K.; KHOR, E.; WONG, S. M. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. **Carbohydrate Polymers**. v.24, n.3, 68-72. 2003.
- NGADI, M. O.; CORREIA, L. R. Kinetics of solid-state ethanol fermentation from apple pomace. **Journal of Food Engineering**. v.17, n.2, p.97-116. 1992.
- PADUA, D. M. C. **Utilização da levedura alcoólica (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte protéica na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*): aspectos metabólicos e de desempenho produtivo**. São Paulo: UNESP. Dissertação de Mestrado, 1996
- PANDEY, A. Packed-bed column bioreactor for production of enzymes. **Enzyme Microbial Technology**. v.14, p.486-488. 1992.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L. Performance of a column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. **Process Biochemistry**. v.31, n.1, p.43-46. 1994.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid-State Fermentation in Biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech, 2001. 221p.
- PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; DOMÍNGUEZ, H.; VÁZQUEZ, M. Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates. **Food Chemistry**. v.53, p.157-163. 1995.
- PEDROSO, P. R. F. **Produção de vinagre de maçã em biorreator airlift**. Florianópolis: UFSC, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- POPOVIC, M.; ROBINSON, C. W. External-circulation-loop airlift bioreactors: study of the liquid circulating velocity in highly viscous non-Newtonian liquids. **Biotechnology and Bioengineering**. v.32, p.301-312. 1988.

- RAHMAT, H.; HODGE, R. A.; MANDERSON, G. J.; YU, P. L. Solid-substrate fermentation of *Kloeckera apiculata* and *Candida utilis* on apple pomace to produce an improved stock-feed. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.11, n.2, p.168-170. 1995.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.1, n.3, p.1-6. 1998.
- RANE, K. D.; HOOVER, D. G. An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi. **Process Biochemistry**. v.28, n.2, p.115-118. 1993.
- RAO, P. V.; JAYARAMAN, K.; LAKSHMANAN. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 2: Medium optimization and effect of aeration. **Process Biochemistry**. v.28, p.391-395. 1993.
- REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos Fermentativos**. v.1, Ed. Editora e Gráfica Unicersitária-UFPEL. Pelotas, 1998.
- ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**. v.47, p.67-77. 1999.
- ROSSI, M. J. **Produção de inoculante de fungo ectomicorrízico utilizando fermentação no estado líquido em biorreator tipo airlift**. Florianópolis: UFSC, 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- SANTIN, J. A. **Enriquecimento Protéico da casca de Arroz com Uréia Uréase por SSF**. Caxias do Sul: UCS, 1993. Especialização em Biotecnologia: Fermentações Industriais. Instituto de Tecnologia. Universidade de Caxias do Sul, 1993.
- SCARTAZZINI, L. S. **Utilização do biorreator airlift na pré-fermentação do mosto de uva**. Florianópolis: UFSC, 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3.ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 380p.
- SHOJAOSADATI, S. A.; BABAEUPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochemistry**. v.37, p.909-914. 2002.
- SIEGEL, M. H.; ROBINSON, C. W. Application of airlift gas-liquid-solid reactors in Biotechnology. **Chemical Engineering Science**. v.47, p.3387-3394. 1992.
- SILVA, R.C. **Quitosana como polímero modificador de eletrodos sólidos**. Florianópolis: UFSC, 2000. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

- SINGH, A.; ABIDI, A. B.; AGARWAL, A. K.; DHARMWAL, N. S. Single cell protein production from *Aspergillus niger* and its evaluation. **Zentralbl-Microbiology**. v.3, p.149-181. 1998.
- STREDANSKI, M.; CONTI, E.; STREDANKA, S.; ZANETTI, F. γ -LINOLENIC acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. **Bioresource Biotechnology**. v.73, n.1, p.41-45. 2000.
- STREIT, F. **Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica**. Florianópolis: UFSC, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
- SUNTORNUSUK, W.; POCHANAVANICH, P.; SUNTORNUSUK, L. Fungal chitosan production on food processing by-products. **Process Biochemistry**. v.37, n.7, p.727-729. 2002.
- SYNOWIECKI, J. e AL-KHATEEB, N. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**. v.60, n.4, p.605-610. 1997.
- TAN, S. C.; TAN, T. K.; WONG, S. M.; KHOR, E. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**. v.30, p.239-242. 1996.
- TOLAIMATE, A.; DESBRIERES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. **Polymer**. v.44, p.7939-7952. 2003.
- TSIGOS, I.; MARTINOU, A.; KAFETZOPOULOS, D.; BOURIOTIS, V. Chitin deacetylases: new versatile tools in biotechnology. **TIBTECH**. v.18, p.305-312. 2000.
- TYAGI, Z. R. D.; TRAN, F. T.; AGBEBAVI, T. J. Mesophilic e Thermophilic digestion of municipal sludge in an airlift U-Shape bioreactor. **Biological Wastes**. v.31, p.251-266. 1990.
- VASHISTA, B. R. **Botany for degree students-Algae**. Ed. S. Chang and Co. Ltd., New Delhi, 1989. 503p.
- VENDRUSCOLO, F.; GABIATTI JR, C.; PIAIA, J. C. Z; RODRIGUES, R. C.; DURRANT, L. R.; COSTA, J. A. V. Radial growth rate as a tool for the selection of filamentous fungi for use in bioremediation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. in press.
- VILAS BÔAS, S. G. **Conversão do bagaço de maçã por *Cândida utilis* e *Pleurotus ostreatus* visando a produção de suplemento animal**. Florianópolis: UFSC, 2001. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- VILLAS BÔAS, S. G.; ESPÓSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.14, p.38-42. 2000.

- YANNAS, I. V., BURKE, H. F.; ORGILL, D. P.; SKRABUT, E. M. Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. **Science**. v.215, p.174. 1982.
- YOKOI, H.; ARATAKE, T.; NISHIO, S.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. Chitosan production from Shochu distillery wastewater by funguses. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.85, n.2, p.246-249. 1998.
- ZADRAZIL, F.; PUNIYA, A. K. Studies on effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white rot fungi. **Bioresource Technology**. v.54, p.85-87. 1995.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid-state production of beneficial fungi on apple processing wastes using glucosamine as the indicator of growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46, p.783-787. 1998.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of poligalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**. v.35, n.8, p.825-830. 2001.
- ZIINO, M.; CURTO, R. B. L.; SALVO, F.; SIGNORINO, D.; CHIOFALO, B.; GIUFFRIDA, D. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell grown in continuous submerged culture. **Bioresource Technology**. v.67, p.7-11. 1999.

ANEXOS

Anexo A

Tabela A1: Dados que geraram a Tabela 12.

Exp.	FN	Um	PS (%)	RAR (%)
1	-1	-1	7,03	3,29
2	-1	0	8,23	2,45
3	-1	1	8,89	3,98
4	0	-1	12,20	37,61
5	0	0	13,84	40,23
6	0	1	15,02	48,95
7	1	-1	12,12	39,77
8	1	0	13,71	43,69
9	1	1	15,58	52,19
10	0	0	14,21	40,37
11	0	0	15,02	48,16
12	-1	-1	6,39	2,79
13	-1	0	6,94	3,68
14	-1	1	6,51	4,09
15	0	-1	11,04	31,37
16	0	0	14,26	46,53
17	0	1	14,75	47,79
18	1	-1	12,89	36,81
19	1	0	13,58	47,92
20	1	1	14,86	48,78
21	0	0	13,23	46,51
22	0	0	13,97	48,23

Tabela A2: Dados que geraram a Tabela 14.

Exp.	FN	CFN	FN	CFN (%)	PS (%)	RAR (%)
1	-1	-1	Nitrato	2	13,23	45,28
2	-1	+1	Nitrato	5	15,27	54,87
3	+1	-1	Uréia	2	14,23	47,58
4	+1	+1	Uréia	5	17,64	65,24
5	-1	-1	Nitrato	2	14,19	51,23
6	-1	+1	Nitrato	5	14,64	52,85
7	+1	-1	Uréia	2	15,36	59,64
8	+1	+1	Uréia	5	18,34	64,18

Tabela A3: Dados que geraram a Tabela 16.

Exp.	Um	G	Um (%)	G (mm)	PS (%)	RAR (%)
1	-1	-1	60	0,85 - 1,7	16,21	52,64
2	-1	+1	60	1,7 - 3,35	15,32	54,96
3	+1	-1	70	0,85 - 1,7	19,24	67,23
4	+1	+1	70	1,7 - 3,35	17,35	57,31
5	-1	-1	60	0,85 - 1,7	15,71	54,41
6	-1	+1	60	1,7 - 3,35	16,42	54,67
7	+1	-1	70	0,85 - 1,7	20,02	66,34
8	+1	+1	70	1,7 - 3,35	17,61	60,40

Anexo B

Tabela B1: Procedimentos para realização dos reagentes.

Reagente	Procedimento
A	Dissolver 0,5g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 1,0g de citrato de sódio em 100mL de água destilada. Este reagente é estável, pode guardar na geladeira por um bom tempo.
B	Dissolver 20g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 4,0g de hidróxido de sódio (NaOH) em 1,0L de água destilada. Preparar sempre no dia.
C	Misturar 1,0mL do reagente A e 50mL de B.
D	reagente Folin-Ciocalteu e água destilada preparados na proporção 1:1
3,5-DNS	Dissolver 75g de tartarato de sódio e potássio e 4g de NaOH em água destilada. Em seguida adicionar lentamente 2,5g de ácido dinitrosalicílico sob constante agitação e ajustar o volume final para 250mL.