



Silas Granato Villas Bôas

Conversão do bagaço de maçã por *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus* visando a produção de suplemento para ração animal

Florianópolis – SC

2001

Silas Granato Villas Bôas

Conversão do bagaço de maçã por *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus* visando a produção de suplemento para ração animal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margarida Matos de Mendonça.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Esposito.

Florianópolis - SC

2001

**"CONVERSÃO DO BAGAÇO DE MAÇÃ POR *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus*
VISANDO À PRODUÇÃO DE SUPLEMENTO PARA RAÇÃO ANIMAL "**

POR


SILAS GRANATO VILLAS BÔAS

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pela Orientadora e membros
da Comissão Examinadora.**

Comissão Examinadora:



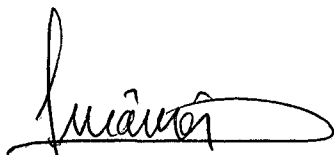
**Profa. Dra. Margarida Matos de Mendonça
orientadora - MIP/CCB/UFSC**



**Profa. Dra. Elisa Esposito - Co-orientadora
Universidade de Mogi das Cruzes/SP**



**Prof. Dr. David Alexander Mitchell
Universidade Federal do Paraná**



**Prof. Dr. Artur Smânia Júnior - MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

Florianópolis, fevereiro de 2001

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

*...À “Dé” (Gasparina da Silva),
pela sua eterna dedicação.*

*Ao amigo Raul,
pelo apoio e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Em nossa vida não conseguimos nada sozinhos, e na pesquisa científica não poderia ser diferente. Para a conclusão deste trabalho muitas pessoas mereceram um muito obrigado e eu gostaria de firmar aqui os meus sinceros agradecimentos:

À professora Dra. Margarida Matos de Mendonça, pela sua inestimável orientação e ensinamentos bem como, por ter aceitado me orientar neste trabalho, mesmo não se enquadrando em sua atual linha de pesquisa.

À professora Dra. Elisa Esposito por ter me confiado a execução deste projeto sob sua orientação e sobretudo por sua presença nos momentos cruciais da pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, em especial ao professor Dr. David Alexander Mitchell por aceitar se deslocar de sua cidade para estar participando da defesa desta dissertação.

Ao professor Dr. Jorge Ninow, por ter aberto as portas do laboratório (ENGEBIO) durante a execução da parte final do projeto.

À EPAGRI de Lages, na pessoa do Sr. Paulo Ramos, pelas inúmeras análises químicas prestadas durante o desenvolvimento da pesquisa.

Às professoras Dra. Célia Regina M. Barardi e Dra. Vetúria Lopes de Oliveira, por ter disponibilizado o uso de equipamentos em seus laboratórios.

Ao Dr. Néelson Durán (IQ-UNICAMP), Dr. André Ferraz (FAENQUIL-SP) e Dra. Josefina A. de Souza (ESAL-MG), pelo inestimável apoio técnico e científico.

Aos colegas de trabalho: Alexandra, Cíntia, Denise, Ernandes, Fátima, João, Leandro, Luciana, Luciane, Márcio, Marcos, Maria Alice, Rafael, Rogério, Roberta e Sílvia, pelo companheirismo, espírito de equipe e amizade.

Ao grande amigo Márcio Rossi por sua paciência e colaboração, como engenheiro químico, nas intermináveis discussões relativas aos estudos cinéticos, apresentados neste trabalho.

Aos grandes amigos Ernandes B. Pereira, Marcos Rabelo e Rogério Luerce pela alegre companhia nas inúmeras noites de fermentação.

Por fim, à CAPES, por ter me propiciado condições financeiras para concluir mais esta etapa acadêmica.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1- INTRODUÇÃO.....	01
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 – Os Recursos Naturais na Alimentação Humana e Animal.....	04
2.2 – Proteína Microbiana (<i>Single Cell Protein</i>).....	09
2.3 – Biodegradação de Resíduos Lignocelulósicos.....	13
2.4 – Enriquecimento Protéico de Resíduos Lignocelulósicos.....	18
2.5 – Melhoramento da Digestibilidade de Resíduos Lignocelulósicos visando a produção de Rações.....	19
2.6 – Fermentação em Estado Sólido (FES).....	24
2.7 – O Complexo Agro-Industrial da Maçã no Brasil.....	27
2.8 – Bioconversão do Bagaço de Maçã.....	28
2.9 – <i>Candida utilis</i>	30
2.10- <i>Pleurotus ostreatus</i>	35
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 – Substratos e Microrganismos.....	42
3.2 – Preparo do Inóculo de <i>Candida utilis</i>	43
3.3 – Fermentação Submersa do bagaço de Maçã.....	44

3.4 – Cálculos dos Parâmetros cinéticos.....	45
3.4.1- Velocidade Específica de Crescimento.....	45
3.4.2- Fator de Conversão de Substrato em Biomassa.....	46
3.4.3- Produtividade em Biomassa.....	46
3.5 – Determinação dos Parâmetros Químicos e Bromatológicos do Bagaço Fermentado por <i>Candida utilis</i>	47
3.5.1- Teor de Proteína Bruta.....	47
3.5.2- Açúcares Redutores Totais.....	47
3.5.3- Carboidratos e Compostos Insolúveis em Meio Ácido, Determinado como Lignina Klason.....	47
3.5.4- Compostos Solúveis em Meio Ácido, Determinado como Lignina Klason Solúvel.....	48
3.5.5- Celulose.....	48
3.5.6- Cinzas Totais.....	49
3.5.7- Ácidos Nucléicos Totais.....	49
3.5.8- Pectina.....	50
3.5.9- Digestibilidade da Matéria Seca <i>in vitro</i> (DMSIV).....	51
3.5.10- Fibras.....	51
3.5.11- Determinação do Teor de Nutrientes Digestíveis Totais (NDT) e Teores de Cálcio, Fósforo e Potássio.....	51
3.6 – Determinação dos Parâmetros Fisiológicos de <i>Candida utilis</i>	51
3.6.1- Determinação da Atividade de Celulase.....	52
3.6.2- Determinação da Atividade de Xilanase.....	52

3.6.3-	Determinação da Atividade de Pectinase.....	53
3.6.4-	Determinação da Atividade de Peroxidasas Extracelulares.....	54
3.6.5-	Determinação da Atividade de Lacase.....	54
3.6.6-	Determinação da Atividade de Manganês Peroxidase.....	54
3.7 –	Fermentação em Estado Sólido do Bagaço de Maçã por <i>Pleurotus ostreatus</i>	55
4 –	RESULTADOS.....	57
4.6 –	Confirmação da Autenticidade da Cepa de <i>Candida utilis</i>	57
4.7 –	Preparo do Inóculo de <i>Candida utilis</i> em Meio LMPD.....	57
4.8 –	Fermentação Submersa do Bagaço de Maçã por <i>Candida utilis</i>	60
4.9 –	Fermentação em Estado Sólido do Bagaço de Maçã por <i>Pleurotus ostreatus</i>	69
5 –	DISCUSSÃO.....	78
5.1 –	Preparo do Inóculo de <i>Candida utilis</i>	78
5.2 –	Fermentação Submersa do Bagaço de maçã por <i>Candida utilis</i>	80
5.3 –	Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Crescimento de <i>Candidas utilis</i> em Bagaço de Maçã.....	84
5.4 –	Aspectos Fisiológicos de <i>Candida utilis</i>	85
5.5 –	Fermentação em Estado Sólido do Bagaço de Maçã por <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>Roseus</i>	87
6 –	CONCLUSÕES	92
6.1 –	<i>Candida utilis</i> e Bagaço de Maçã.....	92
6.2 –	<i>Pleurotus ostreatus</i> e Bagaço de Maçã sem Pré-Tratamento.....	93
6.3 –	<i>Pleurotus ostreatus</i> e Bagaço de Maçã Pré-Tratado com <i>Candida utilis</i>	94
6.4 -	Considerações Finais e Sugestões Futuras.....	94

7 – ANEXOS.....	97
Figura 01 – Processamento da Maçã.....	98
Figura 02 – Etapa de seleção dos frutos na indústria.....	99
Figura 03 – Prensagem dos frutos inadequados ao consumo <i>in natura</i> , com concomitante produção de bagaço.....	99
Figura 04 – Preparação de <i>Candida utilis</i> fixada e corada com safranina 1% (p/v) (1000x).....	100
Figura 05 – <i>Pleurotus ostreatus</i> frutificando sobre tronco de árvore.....	100
Figura 06 – Fluxograma dos procedimentos e materiais utilizados.....	101
Figura 07 – Equipamento usado durante fermentação submersa do bagaço de maçã.....	102
Figura 08 – Equipamento usado durante fermentação em estado sólido do bagaço de maçã.....	102
Figura 09 – Ensaio da medida da velocidade de crescimento linear de <i>Pleurotus ostreatus</i> em tubos de vidro.....	103
Figura 10 – Cálculo do μ_{max} de <i>Candida utilis</i> em meio LMPD (I).....	104
Figura 11 – Cálculo do μ_{max} de <i>Candida utilis</i> em meio LMPD (II).....	104
Figura 12 – Curva de crescimento de <i>Candida utilis</i> em meio LMPD.....	105
Figura 13 – Correlação entre número de células e a biomassa seca.....	106
Figura 14 – Correlação entre biomassa e densidade óptica.....	106
Figura 15 – Cálculo do μ_{max} de <i>Candida utilis</i> durante fermentação do bagaço de maçã não suplementado com fonte extra de nitrogênio.....	107
Figura 16 – Cálculo do μ_{max} de <i>Candida utilis</i> durante fermentação do bagaço de maçã suplementado com 10,0 g. Kg ⁻¹ de sulfato de amônio.....	107

Figura 17 – Placas de Petri contendo bagaço de maçã seco e moído.....	108
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

RESUMO

A produção brasileira de maçãs vem aumentando nos últimos dez anos, com uma produção de cerca de 800.000 mil toneladas em 2000. O Estado de Santa Catarina lidera esta produção, colhendo cerca de 50% do total no país o que corresponde a uma produção anual de 400 mil toneladas. A maior parte da maçã é destinada ao mercado interno e externo da fruta *in natura*, porém, uma considerável parcela dos frutos, principalmente aqueles rejeitados para este mercado são processados industrialmente para obtenção de sucos, aromas e concentrados. Durante o processamento são produzidos grandes quantidades de resíduo composto por cascas, sementes e polpa, denominado "bagaço de maçã". Este trabalho objetivou a avaliação de alguns fatores ecológicos envolvidos em um processo fermentativo cujo substrato foi o bagaço de maçã, utilizando *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus*, isoladamente ou em sequência, de forma a propiciar o enriquecimento nutricional do substrato, e a viabilizar o seu uso como suplemento na alimentação animal. Quando o bagaço foi tratado com *C. utilis* durante 6 dias, foi possível aumentar em 100% o teor de proteínas, e em 60% a concentração de sais minerais, incluindo um aumento substancial nos teores de fósforo, cálcio e potássio. Observou-se ainda uma diminuição no teor de açúcares livres no substrato de até 97% após a fermentação com a levedura, acompanhada de 8,2% de incremento na digestibilidade do substrato. *C. utilis* degradou fragmentos da cadeia de lignina do bagaço, denominada lignina Klason solúvel, e também degradou parte da celulose e da pectina. Foram observadas atividades de celulase, xilanase, pectinase e manganês peroxidase no caldo de cultivo de *C. utilis* em bagaço de maçã. Por outro lado, após tratamento com *P. ostreatus* foi obtida uma elevada conversão de proteínas, observando-se um incremento em até 500% no teor de proteína bruta após 60 dias de fermentação e um aumento no teor de sais minerais. Entretanto, verificou-se uma concentração em massa de lignina Klason, resultando numa menor digestibilidade do produto fermentado. O teor de açúcares livres aumentou após 30 dias de fermentação, principalmente devido à degradação de pectina e hemicelulose. *P. ostreatus* foi sensível à adição de fosfato de amônio e uréia no meio cultura, diminuindo a sua velocidade de crescimento em placas de Petri. Portanto, concluiu-se que o tratamento com *C. utilis* foi eficiente, podendo ser utilizado isoladamente na bioconversão do resíduo de maçã, quando se objetiva produzir suplemento para ração animal. Já o tratamento com *P. ostreatus* e *C. utilis* não foi economicamente viável na bioconversão, tendo em vista os reduzidos valores de digestibilidade do produto fermentado, bem como o longo período de fermentação. Sugere-se a possibilidade do o produto fermentado poder ser empregado como suplemento em alimentação animal, desde que misturado a substratos com maior digestibilidade.

ABSTRACT

Apple production in Brazil has shown a significant increase in the last 10 years, reaching around 800.000 thousand tonnes in 2000. The Santa Catarina State leads the country production, with an annual production of 400 thousand tonnes. Most production is consumed inside the country or exported, however, a considerable fraction of these fruits, mainly those not approved for consumption *in natura*, is industrially processed to produce juices, flavors and concentrates. During industrialization peels, seeds and pulp, which are known as "apple pomace", form large amounts of residues. This research had the objective of evaluating the factors affecting the process of fermentation of apple pomace using *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus* either individually or sequentially in order to obtain a nutritionally enriched substrate, feasible for animal feed supplement. After *C. utilis* treatment protein level increased 100% and mineral content 60% and phosphorus, calcium and potassium concentrations as well. There was a 97% decrease in the free sugars level after fermentation with *C. utilis* accompanied by an 8.2% increase in the digestibility. *C. utilis* was able to degrade lignin chain fragments present in the apple pomace, assessed as soluble Klason lignin, as well as part of the cellulose and pectin polymers. The cellulase, xylanase, pectinase and manganese peroxidase activities were observed in the cultivation medium of *C. utilis* growing in apple pomace. On the other hand, after *P. ostreatus* treatment, a high protein conversion was achieved with 500% of crude protein enrichment after 60 days of fermentation and a considerable increase in the minerals level. However, the Klason lignin content was concentrated resulting in a decreased digestibility of the fermented product. The free sugars level also increased after 30 days of treatment, due to pectin and hemicellulose degradation. The fungus *P. ostreatus* showed great sensibility when ammonium phosphate or urea was added to the culture medium, decreasing its growth rate in solid media. Therefore, we have concluded that *C. utilis* treatment was efficient in the conversion of apple pomace to be used as animal feed supplement. The substrate fermented by *P. ostreatus* also presented the potential to be used as animal feed supplement, but only when mixed with more digestible substrates. The process does not seem to be viable due to the low digestibility values of the product and its long time of fermentation.

1 - INTRODUÇÃO

Na década de noventa, a produção mundial de maçã aumentou consideravelmente, e de acordo com O'Rourke (1998) deverá continuar crescendo nos próximos anos. Esta produção, no entanto, não se expandiu de forma uniforme geograficamente. A Europa e os antigos estados soviéticos devem manter sua produção anual, podendo até decliná-la. Já a América do Norte, Ásia e América do Sul, deverão apresentar um substancial aumento de produção. A China, que foi a maior produtora de maçã na década de noventa, deverá aumentar a sua produção anual, pelo menos até 2005. Dessa forma, a produção mundial de maçã entre 1992 e 2005 deverá aumentar aproximadamente 58%. Durante este período, a previsão de crescimento populacional no planeta está em torno de 22,4 % o que significa, que a demanda da fruta *in natura* diminuirá (O'Rourke, 1998). Conseqüentemente, o processamento industrial de maçã tenderá a aumentar face a maior disponibilidade de produção.

O Brasil ocupa o 12º lugar entre os países produtores de maçã, tendo atingido a produção de 800 mil toneladas de maçãs em 2000 (ABPM, 2000). A China, produziu em 1999 cerca de 20 milhões de toneladas (State Statistical Bureau, 1999) o que evidencia a dimensão do mercado internacional de maçã e o potencial do Brasil para exportação, já que o país tem sua demanda interna para a fruta satisfeita.

O Estado de Santa Catarina lidera a produção nacional de maçã, produzindo anualmente cerca de 400 mil toneladas (ABPM, 2000). A maior parte da produção é destinada ao mercado interno, embora recentemente o estado venha exportando. Entretanto, uma considerável parcela dos frutos, principalmente aqueles não aprovados para consumo *in natura*, são processados industrialmente para obtenção de sucos, aromas e concentrados (Fischer, 2000).

Durante o processamento, os frutos são prensados para extração do suco, sendo que a polpa, sementes e cascas remanescentes são descartadas na forma de resíduo, denominado

"bagaço de maçã". Cerca de 55 mil toneladas de maçãs são processadas anualmente, resultando em cerca de 25 % de bagaço.

Tradicionalmente o bagaço de maçã é utilizado como alimento para gado ou simplesmente dispensado no solo. Entretanto, seu valor comercial é baixo devido ao pequeno teor protéico (Zheng e Shetty, 1998). Recentemente, vem aumentando o interesse na conversão biológica desse resíduo. Vários produtos de maior valor agregado foram gerados a partir da fermentação do bagaço, tal como etanol (Hang, Lee e Woodams, 1982; Gupta e Chand, 1986; Ngadi e Correia, 1992 a e b), ácido cítrico (Hang e Woodams, 1986), biomassa microbiana fúngica e enzimas (Hang e Woodams, 1994 a, b; e 1995).

O bagaço de maçã caracteriza-se por apresentar em sua constituição química elevadas quantidades de fibras, constituídas por biopolímeros com elevada massa molar tal como amido, hemicelulose, celulose, substâncias pécticas e lignina além de vários mono e dissacarídeos. Entretanto o teor de nitrogênio orgânico — proteínas e vitaminas — bem como o de sais minerais, é baixo.

*Diversos pesquisadores vêm sugerindo que o cultivo de determinadas espécies de fungos a partir do resíduo poderá aumentar seu valor nutricional, e conseqüentemente, seu valor agregado, devido ao acréscimo de proteínas e vitaminas de origem fúngica, além de uma maior disponibilização dos sais minerais do substrato, resultante da sua oxidação (Bononi e Trufen, 1986; Bhalla e Joshi, 1994; Rahmat *et al.* 1995; Joshi, Jaiswal e Kaushal, 1998; e Zheng e Shetty, 1998).

O bagaço sem tratamento biológico, e, portanto, apresentando elevados teores de açúcares simples, quando é ingerido pelo gado, fermenta no rúmen produzindo álcool e intoxicando o animal. Esse fenômeno é conhecido como alcolemia e constitui atualmente um problema para os pecuaristas de Santa Catarina que usam o resíduo na alimentação animal.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo principal o estudo dos fatores determinantes na conversão do bagaço de maçã, substrato rico em açúcares livres e fibras, em um suplemento para ração animal enriquecido em proteínas e vitaminas, ao mesmo tempo com maior digestibilidade. Estes fatores foram estudados no decurso de um processo fermentativo individualizado e seqüencial, utilizando-se dois fungos, *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus*.

Os objetivos específicos foram:

1. Diminuir o teor de açúcares livres no substrato através do tratamento com *Candida utilis*;
2. Aumentar a digestibilidade do bagaço através do cultivo com *Pleurotus ostreatus*;
3. Aumentar o teor de proteína bruta, bem como o de sais minerais do resíduo após o cultivo dos microrganismos;
4. Determinar os mecanismos de bioconversão utilizados por ambos microrganismos;
5. Selecionar o melhor tratamento e o melhor processo que resulte na produção de um suplemento para ração animal, enriquecido nutricionalmente e que seja viável economicamente.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Os Recursos Naturais na Alimentação Humana e Animal

O crescimento da população mundial tem como consequência imediata um aumento proporcional na necessidade de alimentos primários — de origem vegetal — e secundários — gorduras e proteínas de origem animal. Além disso, à medida que aumenta o bem estar econômico do país, o consumo de carnes, leite e ovos cresce mais rapidamente do que a procura por alimentos de origem vegetal (Abraldez, 1982).

Os recursos naturais requeridos para manter esta população são limitados e somente um aproveitamento racional e eficiente poderá conduzir à produção de alimentos em quantidades e qualidade adequados para satisfazer as necessidades crescentes do homem.

O aumento da produção de animais domésticos, resultante dos avanços na área de melhoramento genético, trouxe como consequência imediata a necessidade de alimentos com maior valor nutritivo (IPEA/IPLAN, FINEP e SIRBESP, 1978). Bovinos, suínos, caprinos e aves, melhorados para produzir carne, leite e ovos, em condições de alta produtividade, tornaram-se cada vez mais dependentes do homem para sobreviver e produzir economicamente. Se a baixa produtividade de animais não melhorados geneticamente não exigia mais do que o disponível em condições naturais, os atuais níveis de crescimento, de produção e de reprodução exigem não apenas nutrientes em quantidades maiores mas, também, alimentos com composição nutricional equilibrada (IPEA/IPLAN, FINEP e SIRBESP, 1978).

Segundo o levantamento do Sindicato Nacional de Indústrias de Alimentação Animal (SINDERAÇÕES) os segmentos de consumo de rações no Brasil, em 1997, tiveram a seguinte participação: aves (56%); suínos (31%); bovinos (6%); animais de estimação (2%); eqüinos (1%) e peixes (0,2%). Os 3,8 % restantes foram distribuídos por outros tipos de segmentos, tais como perus, codornas, rãs, coelhos, ovinos, caprinos entre outros (Nogueira e Negri, 1998).

A indústria de rações através da sua tecnologia para avaliação, processamento e utilização de novos ingredientes, tem aberto inúmeras oportunidades de uso de substratos que anteriormente não eram aproveitados na alimentação animal (Caldas *et al.* 1999). A compra de grandes volumes destes ingredientes pelas indústrias também tem sido um fator preponderante para que as empresas processadoras de produtos vegetais venham fazendo investimentos no processamento de subprodutos que anteriormente eram desperdiçados. Os Quadros 1 e 2 apresentam as matérias primas mais utilizadas nas formulações de rações, tanto completas como concentrados. Basicamente, uma ração é produzida a partir de produtos agrícolas ou de subprodutos como grãos, farelos e resíduos. Os micro-ingredientes visam a suplementação das necessidades em aminoácidos, em vitaminas e sais minerais, assim como podem funcionar como defensivos e preservativos (Edelstein, 1982).

Recentemente, novos produtos vêm sendo adicionados às rações visando melhorar seu potencial nutricional, destacando os minerais quelados em moléculas de aminoácidos, gorduras protegidas por membranas protéicas, ou endurecidas por hidrogenação ou até mesmo na forma de sais de ácidos graxos, visando facilitar a absorção destes nutrientes pelo organismo

Quadro 2.1: Matérias primas usadas no preparo de rações.

MACRO-INGREDIENTES			
GRAOS	Milho Sorgo Trigo	RESÍDUOS INDUSTRIAIS	Laranja Maçã Cerveja
	Cevada Aveia		Cana de açúcar Mandioca
FARELOS	Soja Algodão Café Amendoim Girassol Colza	FARINHAS	Carne Osso Sangue Penas Ostra Peixe
	Babaçu Arroz Trigo Milho		Sal Calcário Fosfato Bicálcico
		MINERAIS	

Fonte: Edelstein, 1982.

Quadro 2.2: Materiais normalmente adicionados nas rações.

MICRO-INGREDIENTES			
MINERAIS	Cobalto Zinco Ferro Manganês Magnésio Cobre Iodo	INDUSTRIALIZADOS	Aminoácidos Vitaminas Anti-oxidantes Antibióticos Defensivos Medicamentos

Fonte: Edelstein, 1982.

animal (Rueda, 2000 a e b). Recentemente, vem também sendo proposta a adição de enzimas nas rações para animais monogástricos, principalmente aves e suínos (Sartori, 1999; Rueda, 2000c). O interesse no uso de enzimas em rações para aves tem aumentado devido ao custo crescente das matérias primas tradicionais e sua substituição por outros ingredientes alternativos como a cevada, aveia, arroz e trigo, entre outros. As enzimas possibilitam ainda a redução da contaminação ambiental por elementos presentes nas excretas, tais como fósforo, nitrogênio, cobre e zinco. Além disso, a crescente preocupação com os agentes antimicrobianos adicionados às rações torna a utilização das enzimas uma alternativa interessante no aumento da digestibilidade dos alimentos e conseqüente melhor desempenho animal. A escolha da enzima depende do tipo de substrato selecionado, sendo que, geralmente são empregadas enzimas hidrolíticas hábeis em degradar fibras polissacarídicas não amídicas, tais como celulases, xilanases, pectinases, fitases, entre outras (Sartori, 1999).

O uso eficiente das enzimas requer que sua atividade biológica resista aos rigores da fabricação e estocagem da ração, ao baixo pH e à degradação pelas enzimas proteolíticas presentes no trato digestório. Quando a ração é submetida a temperaturas elevadas, como por exemplo nos processos de peletização e extrusão, ocorre uma desnaturação das enzimas, eliminando-se, assim, o benefício de sua inclusão na dieta dos animais (Sartori, 1999).

O uso de enzimas nas dietas propicia alterações nas formulações das rações com minimização do custo, maximizando o uso de ingredientes energéticos e protéicos das rações. O

emprego de enzimas possibilita, ainda, a utilização de alimentos alternativos regionais ou sazonais de menor custo em substituição ao milho e à soja, tradicionalmente utilizados como fontes de energia e proteína, respectivamente (Sartori, 1999).

A indústria de rações vem, nos últimos anos, passando por profundas modificações sobretudo no tocante a formulações das rações (Nogueira e Negri, 1998). Atualmente os grandes criatórios não utilizam mais rações prontas, mas sim adquirem o "premix", ou seja, uma mistura concentrada de macronutrientes e micronutrientes essenciais, e preparam a ração nos recintos de criação. Neste sentido, tanto as indústrias multinacionais como as nacionais voltam sua atenção para estes compostos de vitaminas e sais minerais que resultam em maior controle de qualidade e possibilita maior controle de custos da ração produzida (Nogueira e Negri, 1998).

Quanto à ração pronta, são os setores emergentes — "pet-food", aquicultura, equinocultura — que têm despertado o interesse dos fabricantes. Na realidade tratam-se de produtos de elevada exigência na fabricação, não só porque utilizam matérias-primas mais caras assim como tecnologia mais elaborada, o que resulta em produtos de maior valor (Nogueira e Negri, 1998). Segundo Melo (2000), a indústria de ração equina cresceu cerca de 7 % no ano de 1999, registrando produção de 282 mil toneladas, quando em 1998 atingiu apenas 265 mil, ficando com praticamente 1% do total fabricado. A previsão para o ano 2000 da Associação Nacional de Fabricantes de Alimentos para Animais (ANFAL), é atingir 300 mil toneladas, correspondendo a um faturamento de R\$75 milhões/ano.

A produção agrícola brasileira apresenta atualmente excedentes em relação às necessidades internas (Oliveira, 1997). Estes excedentes são exportados, como no caso do farelo de soja, ou são escoados através de atividades industriais como é o caso do milho, que constitui matéria prima para produção de óleo, glutens, glicose, fubá, germe, dentre outros. A indústria de alimentos para animais é a maior consumidora de milho no Brasil (Oliveira, 1997).

Segundo levantamento do SINDERAÇÕES, de uma safra total de 32,4 milhões de toneladas de milho, em 1996, 15,85 milhões de toneladas (49%) foram destinados aos fabricantes de rações para aves, suínos, bovinos eqüinos e demais atividades criatórias (Oliveira, 1997). O milho tem participação de 63% e o farelo de soja de 20 % na composição das rações brasileiras (Nogueira e Negri, 1998). Os outros subprodutos agrícolas, como os farelos de arroz, trigo, algodão, amendoim e mandioca têm como único escoamento a alimentação animal, assim como os subprodutos da indústria de abate, tanto avícola como pecuárias, que somente têm utilidade como componentes de ração animal (Edelstein, 1982).

No que se refere à utilização de resíduos, oriunda das fábricas de conservas alimentares e processamento de frutas, seu aproveitamento é sazonal. Fato que explica o desinteresse por parte das indústrias de rações, sendo utilizados somente quando existe grande disponibilidade. Esses resíduos são aproveitados normalmente nas regiões de produção, pois seu baixo custo e elevado preço do frete tornam economicamente inviável o seu emprego na fabricação de rações (IPEA/IPLAN, FINEP e SIRBESP, 1978). Dentre os poucos resíduos utilizados nas formulações de rações, encontra-se a polpa cítrica, que é um subproduto das fábricas de suco, de enlatamento de frutas ou de seus sub-produtos.

A polpa é constituída por cascas e resíduos das partes internas, inclusive de sementes. As cascas podem ou não ter sido submetidas à extração do óleo. Algumas fábricas separam as sementes para extração do óleo, e seu resíduo é denominado farelo de semente de *Citrus*. A polpa cítrica ou polpa de *Citrus*, como também é conhecida, é, em geral, desidratada e moída. Antes da secagem, é tratada com água e calcário e, em seguida, prensada para retirada do suco. O suco pode ser condensado por evaporação para se produzir o melaço cítrico. A polpa cítrica tem boa palatabilidade, alto teor de fibras, baixo nível protéico, é rica em carboidratos e pobre em gordura (IPEA/IPLAN, FINEP e SIRBESP, 1978).

Embora rica em fibras, a polpa é de fácil digestibilidade. Entretanto, pelo seu volume, não é alimento apropriado para as aves e os suínos. Em razão da adição do calcário usado no processo de secagem, o produto, que possui quantidade regular de niacina, torna-se rico em cálcio. Porém, tem baixo teor de fósforo e é pobre nas restantes vitaminas do complexo B, além de não dispor de caroteno e vitamina D. Quando disponível, é empregada principalmente na formulação de rações para gado leiteiro (IPEA/IPLAN, FINEP e SIRBESP, 1978).

A maior parte das matérias primas utilizadas na produção de rações inclui produtos nobres que poderiam servir diretamente na alimentação humana (Ferreira *et al.* 1991; Fialho *et al.* 1991; Brum and Albino, 1993; Pieniz *et al.* 1993; Lima *et al.* 1998; Brum *et al.* 1999b). Por outro lado, na maioria das vezes os subprodutos agro-industriais, rejeitos das indústrias de alimentos, são pobres em nutrientes tal como proteínas e vitaminas e ricos em fibras com baixa digestibilidade (Gomes, *et al.* 1990; Brum and Albino, 1993; Lima *et al.* 1999; Brum *et al.* 1999 a e b; Lima *et al.* 2000). Uma solução consiste na utilização de microrganismos, principalmente fungos, na conversão de resíduos agro-industriais em um produto de maior valor nutritivo (Durán, 1989; Durán *et al.* 1994;).

A biomassa microbiana pode ser consumida pelos animais, sendo fonte interessante de alimento, porque os microrganismos podem ser cultivados em diversos resíduos ou subprodutos industriais, com elevada produção de células ricas em proteínas e vitaminas, contendo na maioria das vezes, todos os aminoácidos essenciais (Pelczar, Chan e Krieg, 1996, Brum *et al.* 1999).

2.2 - Proteína Microbiana (*Single Cell Protein*)

A produção de proteína microbiana pode ser considerada um processo tecnologicamente intensivo que permite alta produção volumétrica de proteínas, independente de efeitos climáticos e alterações ambientais (Sinskey e Batt, 1987). Entretanto, tais processos requerem

investimentos substanciais de capital e devem ser operados com máxima eficiência (Durán, 1989). A fonte de carbono representa cerca de 40-60% do custo de produção e por esta razão, tem sido de grande interesse o uso de fontes alternativas de carbono que sejam disponíveis e viáveis economicamente.

Os produtos enriquecidos com proteínas microbianas podem ser usados como suplemento protéico na alimentação humana, ingredientes alimentícios que funcionam como aromatizantes, dispersantes, suplemento protéico para ração animal, dentre outros. (Sinskey e Batt, 1987).

Conney, Rha e Tannenbaum (1980); Reed (1983); Litchfield (1983) e Sinskey e Batt (1987) descreveram métodos para produção de proteína microbiana a partir de vários substratos, utilizando tanto microrganismos fotossintetizantes como não-fotossintetizantes. O principal valor da biomassa microbiana como componente de rações ou alimentos é sua contribuição na nutrição protéica. A composição química das células de vários tipos de microrganismos está apresentada na Tabela 2.1, sendo o conteúdo protéico mais elevado nas bactérias do que nos fungos filamentosos, e intermediário para as algas e leveduras (Reed, 1983).

Tabela 2.1: Parâmetros nutricionais das células de diferentes microrganismos.

Tipos de Microrganismo	Parâmetros			
	Proteína Bruta	Ácidos Nucléicos	Cinzas	Lípídeos
	----- % (p/p) -----			
Fungos Filamentosos	31 - 50	9	9 - 14	2 - 8
Algas	47 - 63	3 - 8	8 - 10	7 - 20
Leveduras	47 - 56	6 - 12	5 - 9,5	2 - 6
Bactérias	72 - 83	8 - 16	3 - 7	1,5 - 3

Fonte: Reed *et al.* (1983).

O conteúdo de ácidos nucléicos pode variar de 3 a 16 % dependendo do organismo e das condições de crescimento utilizadas. Estas substâncias não têm, entretanto, valor nutricional para animais não ruminantes e na alimentação humana o seu consumo está limitado a 2 gramas de ácidos nucléicos por dia, de forma a evitar a formação de cálculo renal ou gota (Durán, 1989). Sabe-se que esta elevada concentração de ácidos nucléicos nas células dos microrganismos é decorrente da elevada concentração de RNA nas células microbianas (Lucca, Romero e Callieri, 1995). Nos últimos anos, tentativas de eliminação de ácidos nucléicos deste tipo de produtos vêm sendo desenvolvidas, porém com pouco sucesso (Gomez, Suarez e Garcia, 1986; Abdreu *et al.* 1988; Abu-Ruwaida, Banat e Hamdam, 1988, Gibert, 1988, etc.). Lucca *et al.* (1995) reduziram em 40 % o teor de RNA das células de *Candida utilis* apenas variando a disponibilidade de fontes de fósforo no meio de cultivo. Por outro lado, observa-se que a tendência atual é a utilização da proteína microbiana combinada ao substrato de cultivo, de forma a diluir a concentração de ácidos nucléicos presentes nestas células.

Em todos os processos de produção de proteína microbiana o principal objetivo é obter o máximo de produtividade, ou seja, concentração celular multiplicada pela velocidade específica de crescimento, e coeficiente de rendimento de biomassa, que é a massa seca do substrato por unidade de biomassa de substrato. Ao mesmo tempo, o produto deverá ter um alto teor protéico, diferenciada composição de aminoácidos, baixo teor de ácidos nucléicos, principalmente se for utilizada para fins de alimentação humana, ser palatável, apresentar cor, aroma e textura apropriados e estar livre de resíduos tóxicos ou carcinogênicos (Sinskey e Batt, 1987). Estes resultados geralmente não são atingidos quando se desenvolvem processos cujo objetivo principal não foi a produção de biomassa (Durán, 1989).

Quando o substrato lignocelulósico é enriquecido com proteínas microbianas seu valor agregado aumenta consideravelmente. Como exemplo, no Brasil, a Usina Santa Luiza, em Matão (SP), exporta para Europa 1.200 Ton./ano de bagaço de cana pré-hidrolisado para ser

utilizado como ração animal, a um preço de US\$ 45/Ton. Caso o resíduo fosse enriquecido com 6% de proteínas, o valor se elevaria para US\$ 240/Ton. O custo da produção é de aproximadamente US\$ 30, sendo 25% dispendido com a matéria prima (Durán, 1989).

Segundo Pelczar, Chan e Krieg (1996), existem diversas vantagens na utilização da proteína de origem microbiana como suplemento ou substituto alimentar animal. Os microrganismos dispõem de elevadas taxas de crescimento e podem ser produzidos em grande quantidade — um bovino de 450 kg ganha 0,45 kg de proteína por dia; em contraste, 450 kg de leveduras podem resultar em diversas toneladas de proteínas no mesmo período. O conteúdo de proteína das células microbianas é elevado, em torno de 60% (Tabela 1). Para efeito de comparação, podemos citar a carne, que tem aproximadamente 20% de proteína, e a soja com 35%. As proteínas microbianas contêm, geralmente, todos os aminoácidos essenciais (Durán, 1994). Para além disso, alguns microrganismos, particularmente as leveduras, produzem altos teores de vitaminas. Os substratos para produção de biomassa microbiana podem conter esterco ou dejetos animais, ou ainda subprodutos industriais, tais como hidrocarbonetos de refinarias de óleo, líquidos com enxofre eliminados pela indústria de polpa e papel, melação de beterraba e cana-de-açúcar, hidrolisados de madeira, resíduos lignocelulósicos, dentre outros.

É importante frisar que, os fungos filamentosos apresentam numerosas vantagens em relação às leveduras e bactérias em se tratando de fonte protéica (Tabela 1). O valor nutricional e o teor de aminoácidos sulfurados nas proteínas dos fungos filamentosos é mais elevado quando comparado a outros microrganismos. Ademais, estes fungos podem ser propagados sobre uma grande variedade de substratos geralmente descartados como resíduos de produtos alimentícios. Resíduos celulósicos como as palhas, podem também ser utilizados e portanto convertidos em biomassa com valor nutricional (Sinskey e Batt, 1987; Vazquez *et al.* 1993).

2.3 - Biodegradação de Resíduos Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são os mais abundantes na Terra, compreendendo 50 % de toda biomassa e apresentando uma produção anual estimada de 50×10^9 toneladas (Smith *et al.* 1988). Estima-se ainda, que aproximadamente a metade da produção total de vegetais provenientes de processos agrícolas e industriais não são aproveitados pelo homem (palhas, folhas, madeiras e cascas) (Smith *et al.* 1988). Entretanto, a maior parte deste material, se não é queimado, é fragmentado e agregado ao solo, como adubo orgânico (Zadrazil, Brunnert e Grabbe, 1983). Os resíduos lignocelulósicos são praticamente inexauríveis e constituem fontes importantes de substratos para o cultivo de microrganismos (Pandey e Soccol, 2000).

A lignocelulose é um complexo cristalino compacto, formado por polissacarídeos de elevada massa molecular, compondo microfibras envolvidas por camadas de lignina, que as protegem contra a atividade de enzimas hidrolíticas e outros fatores externos, servindo como estabilizador da estrutura do complexo (Leonowicz *et al.* 1999). As microfibras de polissacarídeos são compostas na maioria por filamentos de celulose, hemicelulose e em alguns casos, também por pectina.

A degradação de celulose com formação de glicose pelos fungos, requer um número de enzimas com diferentes atividades, muitas vezes agindo em sinergismo (Garzillo *et al.* 1994). As três principais celulasas hidrolíticas são as endoglucanases (EC 3.2.1.4), as exocelubiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as β -glicosidases ou celubiases (EC 3.2.1.21). A atividade global de todas as celulasas no meio de cultura pode ser determinada através de sua ação sobre a fibra de papel, conhecida como atividade FPase. Esta atividade já foi identificada em diferentes fungos filamentosos, protozoários e bactérias, porém, a atividade celulolítica não foi até o presente momento detectada em leveduras (Walker, 1998).

O maior componente das hemiceluloses e o segundo mais abundante polissacarídeo na natureza é a xilana (Anand e Vithayathil, 1996). Existem dois tipos principais de enzimas xilanolíticas que agem diferentemente sobre a cadeia da xilana: as endo-xilanases (EC 3.2.1.6), que agem sobre as ligações glicosídicas, resultando na liberação de fragmentos da cadeia de xilana e as exo-xilanases, que quebram a xilana liberando tanto xilose como xilobiose (Anand e Vithayathil, 1996). A atividade xilanolítica está presente em todos os tipos de microorganismos, abrangendo desde fungos filamentosos até bactérias, leveduras e protozoários. *Candida shehatae* é um exemplo de levedura que degrada hemicelulose, mas em diversas outras espécies têm sido detectada esta atividade (Biely, Mislovicova e Toman, 1985; Walker, 1998).

Substâncias pécticas, comumente chamadas de pectina, são polissacarídeos estruturalmente complexos que ocorrem principalmente na lamela média e parede celular primária de plantas superiores (Blanco, Sieiro e Villa, 1999). Sua estrutura consiste de uma cadeia principal contendo um número variável, porém grande, de subunidades de ácido galacturônico ligadas por ligações do tipo α -1,4 glicosídicas. As enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas são conhecidas como enzimas pécticas, pectinases ou enzimas pectinolíticas e são classificadas em dois grupos principais: as pectinesterases (PE) — que desesterificam a pectina através da remoção de resíduos metoxílicos — e as despolicimerases — que quebram a cadeia principal (Blanco, Sieiro e Villa, 1999). Estas enzimas são produzidas por fungos filamentosos, principalmente os fungos mitospóricos. Entretanto, algumas leveduras, quando cultivadas em meios apropriados, produzem pectinases que degradam a pectina (Blanco, Sieiro e Villa, 1999).

A lignina é o principal polímero responsável pela proteção dos carboidratos vegetais contra o ataque microbiano. É um biopolímero aromático complexo e o maior componente do tecido vascular de plantas superiores e gramíneas, onde se encontra envolvendo a celulose e a hemicelulose, formando a lignocelulose (Kirk e Farrell, 1987). Fungos de degradação branca

são os únicos microrganismos conhecidos que degradam a lignina (Shin e Lee, 2000) e o esclarecimento do mecanismo de biodegradação da lignina é decorrente principalmente de estudos realizados com o *Phanerochaete chrysosporium* (Kerem, Friesem e Hadar, 1992), um típico fungo de degradação branca.

Os degradadores de lignina produzem principalmente dois tipos de peroxidases: lignina peroxidase - LiP (EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase - MnP (EC 1.11.1.13) (Tien e Kirk, 1983; Glenn e Gold, 1985). A LiP catalisa uma variedade de reações envolvidas na degradação da lignina, tais como a clivagem de ligações $C_{\alpha} - C_{\beta}$, a clivagem de ligações éter $\beta - O - 4$, oxidação C_{α} e a abertura do anéis aromáticos (Shin e Lee, 2000). A MnP oxida Mn (II) e a Mn (III); o Mn (III) se reduz oxidando a lignina através da formação de radicais fenox (Wariishi, Akileswaran e Gold, 1991). Recentemente, um terceiro tipo de peroxidase vem sendo isolada e caracterizada (Jonsson, Becker e Nyman, 1994; Collins, O'Brien e Dobson, 1999). Esta peroxidase independente de manganês (MIP), pode desempenhar diferentes papéis na degradação da lignina pelos fungos de degradação branca. Entretanto, existem poucas informações sobre seu mecanismo de ação.

O basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* produz eficientes lacases e peroxidases extracelulares (Kerem, Friesem e Hadar, 1992). A lacase (EC 1.10.3.2) é uma fenol oxidase extracelular produzida por basidiomicetos e por vegetais e apresenta um importante papel na degradação da lignina (Sania *et al.* 1991). Tem sido mostrado que a lacase provoca uma degradação oxidativa na molécula da lignina e também catalisa a polimerização de pequenas moléculas fenólicas, opondo-se a esta degradação (Betts e King, 1991). Entretanto, a lacase isoladamente tem um efeito limitado na degradação de estruturas não fenólicas da molécula de lignina (Leonowicz, Szklarz e Wojtas-Wasilewska, 1985; Bourbonnais e Paice, 1990). Essa enzima pode ainda catalisar reações em conjunto com vários mediadores redox para oxidar as estruturas não fenólicas da lignina (Bourbonnais *et al.* 1997; Call e Mucke, 1997). Por exemplo,

a oxidação do álcool veratrílico, substrato da enzima lignina peroxidase, pela lacase, foi significativa quando um dos substratos da lacase, o ABTS, estava presente (Bourbonnais e Paice, 1990). A degradação eficiente da lignina por fungos deficientes em LiP pode requerer esse modo de ação indireto sobre as porções não fenólicas da lignina. Admite-se atualmente que a maioria dos fungos de degradação branca, eficientes em degradar seletivamente a lignina, são deficientes em lignina peroxidase (Hatakka, 1994). Dessa forma, a lacase foi considerada uma enzima-chave no sistema ligninolítico destes fungos.

Por outro lado, a expressão gênica das enzimas hidrolíticas geralmente é regulada por monossacarídeos como a glicose e frutose (Ilmén *et al.* 1997; Blanco, Sieiro e Villa, 1999). Foi observado em fungos filamentosos, crescendo em meios de cultura com glicose ou frutose como fonte de carbono, uma inibição na produção de celulases (Ilmén *et al.* 1997) e pectinases (Blanco, Sieiro e Villa, 1999). Somente quando se esgotam esses monossacarídeos é que as enzimas hidrolíticas são produzidas. Cho e Choi (1999) também observaram que a expressão de xilanases, produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, foi influenciada pela repressão catabólica.

Os resíduos lignocelulósicos acumulados no planeta e seu potencial para conversão em produtos importantes para o homem é ainda uma questão não resolvida (Durán *et al.* 1994). Os países da América Latina apresentam excelente oportunidade para utilização dos seus recursos naturais, especialmente os subprodutos agro-florestais de baixo valor comercial obtidos a partir do processamento de alimentos e produtos vegetais (Vázquez *et al.* 1993). Diversos estudos que visam o enriquecimento desses resíduos com proteína microbiana, para sua viabilização como alimento animal, têm sido desenvolvidos nos últimos anos (Kamra e Zadrzil, 1988; Moyson e Verachtert, 1991; Tripathi e Yadav, 1992; Fermor, 1993; Kurunandaa, *et al.* 1995; Jalc *et al.* 1996; Adamovic *et al.* 1998; Pandey e Soccol, 1998; Youssef e Aziz, 1999, entre

outros). Entretanto, novas pesquisas empregando diferentes microrganismos lignocelulolíticos e resíduos ainda não estudados, fazem-se necessárias.

Ao selecionar o (s) microrganismo(s) para utilização em processos biotecnológicos de conversão de resíduos agro-industriais, é importante verificar a sua capacidade de produção de proteínas de valor nutricional e de degradação dos componentes não-digestíveis do substrato (Zadrazil e Reiniger, 1988). O substrato, por sua vez, pode ser utilizado sem nenhum pré-tratamento químico ou bioquímico, ou ainda pode ser hidrolisado antes do tratamento biológico. Verificou-se que o tratamento químico de resíduos lignocelulósicos pode produzir co-produtos tóxicos ao cultivo de microrganismos. Entretanto, quando previamente purificados e tratados biologicamente, resultam num produto com maior teor protéico, bem como maior digestibilidade, comparando-se com o tratamento de resíduos sem pré-hidrólise química (Gupta *et al.* 1986; Tentratian e Fields, 1990; Singh *et al.* 1991; Ashour, Elsharabasy e Khalil, 1993). A hidrólise química dos resíduos demanda maior custo, em virtude da necessidade de purificação posterior ao processo. Já a fermentação de resíduos sem pré-tratamento, implica em maior tempo de fermentação, sendo que o rendimento pode ser superior ao processo anterior, não resultando, geralmente, na produção de produtos tóxicos (Ortega *et al.* 1992; Jwanny, Rashad e Abdu, 1995; Karunandaa *et al.* 1995, Adamovic *et al.* 1998).

Uma alternativa eficiente proposta por vários pesquisadores consiste na utilização de resíduos agro-industriais como substrato para o cultivo de fungos comestíveis (Updhyay e Sohi, 1988; Tripathi e Yadav, 1992; Worrall e Yang, 1992; Adamovic *et al.* 1998; Kutlu *et al.* 2000). Esta alternativa resulta na produção de alimento humano de qualidade, cogumelos, ao mesmo tempo permitindo a utilização do substrato residual como suplemento na alimentação animal, devido ao enriquecimento por proteínas e vitaminas fúngicas.

O uso de ingredientes manipulados biotecnologicamente na produção industrial de rações é uma atividade em fase de desenvolvimento. Pesquisas são necessárias para otimização

de processos, viabilizando a aplicação de tais produtos. Dessa forma, são valorizados materiais desperdiçados e acima de tudo, contribui-se para a reciclagem de nutrientes na natureza.

2.4 - Enriquecimento Protéico de Resíduos Lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos podem ser tratados por microrganismos diretamente ou podem ser previamente hidrolisados. São empregados principalmente fungos em fermentações submersas ou em estado sólido. Tripathi e Yadav (1992) otimizaram vários parâmetros relacionados ao processo de fermentação em estado sólido para converter a palha de trigo em alimento animal utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus*. O teor de proteínas da palha aumentou 89 % em apenas 21 dias de incubação, sem pré-tratamento químico. Entretanto, outros pesquisadores obtiveram menor enriquecimento de diversos substratos, inclusive palha de trigo, também empregando fermentação em estado sólido, com maior tempo de fermentação, utilizando um ou mais microrganismos (Balla e Joshi 1994; Gao *et al.* 1997; Adamovic *et al.* 1998; Nigam,1998).

Diversas pesquisas também foram desenvolvidas utilizando substratos pré-hidrolisados. Ashour *et al.* (1993) cultivaram a bactéria celulolítica *Cellulomonas flavigena* sobre palha de arroz previamente hidrolisada, usando fermentação em gradiente descontínuo, obtendo 52% de aumento no teor protéico do substrato, resultando em produto contendo 10 aminoácidos essenciais e nove não essenciais em apenas 32 horas de fermentação. Pessoa, De Mansilha e Sato (1996) hidrolisaram o bagaço de cana usando ácido sulfúrico e trataram o hidrolisado com *Candida tropicalis* e obtiveram um enriquecimento de 31,3% no conteúdo protéico do resíduo utilizando fermentação submersa em reator aerado, à 30° C durante 5 dias. Dessa forma, foi ressaltada a rapidez do processo de produção de proteínas microbianas em substratos hidrolisados (Gupta *et al.* 1986).

O tratamento combinado entre fungos filamentosos e leveduras também tem sido empregado na bioconversão de resíduos ricos em açúcares simples, como é o caso dos resíduos de frutas. Balla e Joshi (1994) cultivaram fungos mitospóricos celulolíticos (*Trichoderma viride* e *Aspergillus niger*) associados com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis*), e observaram um aumento em 200% no teor protéico do bagaço, utilizando fermentação no estado sólido. Nigam, em 1998, cultivou *Candida utilis* sobre bagaço de abacaxi e obteve em torno de 55,3% de enriquecimento protéico.

Entretanto outros parâmetros nutricionais devem ser analisados durante um processo de bioconversão, sendo que para além do teor de proteínas, a digestibilidade do substrato após o tratamento biológico deve ser considerada. Este parâmetro, contudo, nem sempre melhora com o enriquecimento protéico (Kamra e Zadrazil, 1988).

2.5 - Melhoramento da Digestibilidade de Resíduos Lignocelulósicos Visando a Produção de Rações

A qualidade nutricional de um resíduos lignocelulósico pode ser aumentada através do tratamento microbiano. Neste tratamento devem ser atingidos três objetivos: aumento do conteúdo protéico, aumento da digestibilidade do material lignocelulósico e a melhora da palatabilidade do produto seco (Kamra e Zadrazil, 1988), sendo que este último pode ser melhorado facilmente, embebendo, ensilando ou misturando o substrato com outros alimentos mais palatáveis.

Uma vez que a ração se destina a ruminantes, o aumento no conteúdo protéico do lignocelulósico fermentado não é de grande significância, pois a microbiota do rúmen propicia a utilização de fontes de nitrogênio não protéico e a sua conversão em proteína microbiana. A maioria dos estudos que têm sido direcionados para bioconversão de lignocelulose visando à produção de ração animal rica em proteínas, indica que o produto fermentado apresenta menor

digestibilidade quando comparada ao substrato lignocelulósico não fermentado (Kamra e Zadrazil, 1988).

Algumas exceções têm sido reportadas (Moysen e Verachtert, 1991; Nicolini *et al.* 1992; Ortega *et al.* 1992; Karunandaa *et al.* 1995; Jalc *et al.* 1996), tal como verificado por Moysen e Verachtert (1991), que investigaram a influência do cultivo de três fungos de degradação branca, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus sajor-caju* e *Lentinus edodes*, na digestibilidade da palha de trigo. Tanto *P. pulmonarius* como *P. sajor-caju* degradaram a hemicelulose simultaneamente com a lignina, após doze semanas de incubação. A concentração total de lignina foi reduzida de 11,7% para 5,7% no tratamento com *P. pulmonarius*, e de 12,6% para 5,6% no tratamento com *P. sajor-caju*. A digestibilidade do substrato está na maioria das vezes correlacionada com o seu teor de lignina. Dessa forma, a digestibilidade da palha de trigo aumentou de 29,7% para 58,1%, no tratamento com *P. pulmonarius* e de 29,8% para 59,2% no tratamento com *P. sajor-caju*. A fração celulósica do substrato manteve-se praticamente intacta durante os tratamentos biológicos, constituindo fonte energética suficiente para os ruminantes. Já o tratamento com *L. edodes* não apresentou o mesmo resultado, sendo consumida a celulose juntamente com a hemicelulose, ao mesmo tempo que ocorreu baixa degradação de lignina.

A melhoria na digestibilidade de um substrato requer períodos de incubação relativamente longos. A degradação da lignina faz parte do metabolismo secundário dos fungos, ocorrendo geralmente na fase estacionária do crescimento, na qual o substrato foi totalmente colonizado pelo fungo e as enzimas ligninolíticas foram produzidas. Durante a fase exponencial de crescimento são utilizados a hemicelulose e os compostos solúveis em água, e menos freqüentemente a celulose (Moysen e Verachtert, 1991).

O processo de degradação da lignina pode ser completado em duas fases. Na fase inicial ou primária, o fungo coloniza o substrato e o sistema de enzimas ligninolíticas é sintetizado, e na fase secundária a lignina é degradada (Zadrazil, 1977). O metabolismo do nitrogênio na fase

primária desempenha um importante papel na regulação e iniciação ou supressão do metabolismo secundário. A atividade ligninolítica de um fungo é um processo desse tipo (Fenn e Kirk, 1981). A supressão na degradação da lignina foi detectada em substratos ricos em nitrogênio, por diversos autores (Kirk, Connors e Zeikus, 1976; Kirk *et al.* 1978; Zadrazil e Brunnert, 1980, e 1982; Kamra e Zadrazil, 1988). Uma explicação vem sendo apontada para o efeito adverso do nitrogênio sobre a degradação da lignina e se refere ao fato de que o elevado conteúdo de nitrogênio promove rápido consumo das fontes de energia (Kirk, Connors e Zeikus, 1976), aumentando a biomassa, que como consequência promove um aumento da velocidade de respiração (Kamra e Zadrazil, 1988). Uma outra explicação pode residir no fato de que tanto o metabolismo do nitrogênio como a degradação da lignina requerem os mesmos fatores de crescimento.

A fermentação em estado sólido de subprodutos lignocelulósicos apresenta várias vantagens sobre a fermentação submersa agitada, quando se pretende aumentar a digestibilidade de um substrato lignocelulósico. O conteúdo de matéria seca no substrato em fermentação no estado sólido gira em torno de 25-30%, enquanto na submersa se situa em torno de 2-3%. A capacidade de degradação da lignina por fungos depende da penetração das hifas no substrato e do contato físico do substrato com o fungo degradador. O micélio deve manter contato físico com a lignina para que ocorra degradação eficiente (Gottlieb e Pelczer, 1951, Tono, Tani e Ono, 1968) sendo que a agitação rompe este contato (Kirk *et al.* 1978). Portanto, a fermentação em estado sólido ou cultivo em meio líquido não agitado, em camadas finas, apresenta vantagens quando comparada a fermentação submersa agitada, quando o objetivo é a degradação da lignina.

As trocas gasosas entre a atmosfera e o substrato sólido é um dos fatores mais importantes que influenciam a fermentação. Adequada troca gasosa só será possível se a umidade no substrato for controlada dentro de um nível ótimo. A água em excesso impede as

trocas gasosas e cria condições anaeróbicas dentro do substrato; por outro lado, com nível insuficiente de umidade o fungo não atingirá sua atividade ótima. O nível ótimo de umidade no substrato, durante a fermentação em estado sólido, vai depender, portanto, do tipo de substrato, tamanho das partículas e sua capacidade de hidratação (Kamra e Zadrazil, 1988).

O metabolismo primário e secundário são afetados diferentemente pela fase gasosa. O primeiro processo, que estimula o crescimento micelial, pode tolerar elevados níveis de dióxido de carbono. Na fase secundária do metabolismo, quando ocorre a degradação da lignina, o processo é estritamente oxidativo, e dessa forma, necessita da presença de oxigênio a uma pressão parcial igual àquela encontrada na atmosfera (Kamra e Zadrazil, 1988; Zadrazil e Puniya, 1994).

Por outro lado, para se viabilizar um processo de deslignificação de um substrato lignocelulósico, é essencial maximizar tanto a velocidade quanto a especificidade da degradação da molécula de lignina, promovendo as condições de degradação e desencorajando o consumo dos polissacarídeos do substrato (Kerem e Hadar, 1995). O conhecimento de mecanismos regulatórios que leva à deslignificação seletiva é limitado (Platt *et al.* 1983; Reid e Deschamps, 1990; Kerem e Hadar, 1993 b e 1995; Martínez *et al.* 1994; Ardon, Kerem e Hadar 1998). Em pedaços de madeira em apodrecimento, onde a deslignificação seletiva ocorre, o manganês tem sido encontrado como agente redutor (Kerem e Hadar, 1993b e 1995). Este elemento foi considerado componente importante no processo degradativo resultando na remoção seletiva da lignina pelos fungos de degradação branca (Blanchette, 1984). Níveis elevados de manganês em meios de cultura de alguns fungos de degradação branca, resultaram no aumento dos níveis de enzimas ligninolíticas, bem como na degradação da lignina (Perie e Gold, 1991; Perez e Jeffries, 1992; Ruttimann *et al.* 1992; Wariishi, Valli e Gold, 1992; Kuan e Tien, 1993; Vares, Lundell e Hatakka, 1993; Ruttimann-Johnson, Cullen e Lamar 1994).

Kerem e Hadar (1993b e 1995) estudaram o efeito deste elemento na degradação da lignina da palha de algodão usando *Pleurotus ostreatus*. Neste estudo observaram um nítido aumento preferencial na degradação da lignina quando o manganês foi adicionado no meio de fermentação. Sugeriram que os resultados foram decorrentes tanto do aumento das atividades de enzimas ligninolíticas quanto da produção de íons Mn (III), que devem preferencialmente degradar estruturas aromáticas no complexo lignocelulósico. O maior nível de degradação de lignina foi observado quando foi adicionado 600 µg/g de MnSO₄ no substrato, o que resultou na degradação de 50% da lignina e um ligeiro aumento na degradação da celulose. Essa adição de manganês ao substrato proporcionou um aumento de 61% na digestibilidade do composto lignocelulósico enquanto este aumento no composto fermentado sem adição de manganês foi de apenas 53 %.

De outro lado, alguns pesquisadores relatam a existência de substâncias estimuladoras da degradação de lignina na palha de algodão (Platt *et al.* 1983; Ardon, Kerem e Hadar, 1998). Platt *et al.* (1983) mostraram que a degradação da palha de algodão pelo fungo *Pleurotus ostreatus* é mais rápida do que a degradação da palha de trigo, e que a adição de um extrato aquoso de palha de algodão acelera a degradação da palha de trigo. Foi a existência de um componente no extrato de palha de algodão que estimulou o crescimento fúngico. O componente seria solúvel em solventes polares e identificado como um flavonóide. (Ardon, Kerem e Hadar, 1996). Já Ardon, Kerem e Hadar (1998) analisaram o efeito do extrato da palha de algodão sobre a degradação de lignina, marcada com radioisótopos, por *Pleurotus ostreatus*. Observaram que o efeito estimulador da degradação da lignina estava relacionado com a indução de transcrição e tradução de lacase por possíveis compostos fenólicos presentes no extrato. Portanto, pode-se concluir que o extrato continha tanto indutores da atividade de lacase quanto substratos para enzima. Desse modo, ambos fatores contribuíram para o aumento na degradação de lignina por *P. ostreatus*.

2.6 - Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é um método indicado no tratamento biológico de materiais lignocelulósicos de forma a aumentar a digestibilidade ou facilitar a hidrólise enzimática do substrato (Weiland, 1988, Kerem e Hadar, 1993a). FES é a definição mais usual para processos fermentativos onde há crescimento microbiano em substrato sólido sem a presença de água livre (Hesseltine, 1977).

O substrato sólido pode ser fermentado em estado estacionário ou pode ser agitado ou ainda remexido ocasionalmente ou continuamente. O ponto crucial da FES é estabelecer o teor mínimo de umidade do substrato, necessário para que a atividade biológica não cesse. Para a maioria dos substratos sólidos, começa-se a formar água livre no meio, a partir de 80 a 85 % de umidade (Weiland, 1988).

A FES vem sendo usada pelo homem há muitos séculos, principalmente na fabricação de alimentos. Problemas devido à dificuldade em transferência de calor e massa, e o aumento na necessidade de culturas puras de alta eficiência, levou ao desenvolvimento de processos mais elaborados. Inicialmente, processos em superfície líquida foram desenvolvidos, onde o crescimento fúngico ocorria na superfície de um meio de cultura líquido, e posteriormente culturas submersas foram preferidas pois, permitiam um controle muito mais eficiente do processo, além do ótimo desempenho e facilidade de operação (Hesseltine, 1987; Weiland, 1988, Durand, 1998).

Entretanto, a diluição do substrato, do produto e dos microrganismos em culturas submersas resulta geralmente em altos custos para recuperação destes produtos, substrato e microrganismos, quando comparado ao sistema em estado sólido não diluído. Por outro lado, diversos microrganismos produzem biomassa em elevadas taxas de crescimento quando cultivados sobre substratos sólidos. No entanto, o crescimento sobre superfícies sólidas é uma

propriedade típica de fungos filamentosos que decompõem matéria orgânica, sendo, portanto, um processo que mais se aproxima do modo de vida natural. O emprego deste tipo de fermentação para aumentar a digestibilidade de resíduos lignocelulósicos é especialmente recomendado, pois o produto fermentado é diretamente usado na alimentação animal, além do reduzido volume de reator por unidade de substrato convertido, resultado da pequena quantidade de água adicionada no substrato sólido (Hesseltine, 1987; Weiland, 1988, Durand, 1998).

Outra importante vantagem da FES está relacionada com a baixa incidência de contaminação em virtude da ausência de água livre no substrato (Hesseltine, 1987; Durand, 1998). Dessa forma, este tipo de processo permite a utilização de substratos não esterilizados, apenas pasteurizados, ou até mesmo em tanques abertos — situação que dependerá do propósito da fermentação.

Um dos maiores problemas desse tipo de processo está relacionado ao controle da temperatura. Durante o crescimento do microrganismo no substrato, é natural que se libere elevada quantidade de calor, resultante do seu metabolismo. Esse calor só poderá ser eliminado através de ventilação ou resfriamento da câmara de crescimento (Durand, 1998). Já na fermentação em meio líquido, o controle da temperatura é uma questão trivial, visto que a água é uma excelente condutora de calor.

A maioria dos fungos degradadores de lignina, especialmente os Basidiomicetos, tem temperaturas ótimas de crescimento na faixa entre 20 e 30° C, cessando o crescimento a temperaturas acima de 34° C (Zadrazil e Bronnert, 1982). Portanto, o controle da temperatura é um fator fundamental na regulação da FES para otimização do processo de deslignificação. No início da fermentação é importante fornecer calor, de modo a obter uma temperatura ótima de fermentação. Entretanto, durante o curso do processo fermentativo será necessário remover o

calor liberado pelo metabolismo fúngico, de forma a manter a temperatura do processo num nível ótimo (Weiland, 1988).

A pressão parcial de O_2 e CO_2 na atmosfera interna da câmara de fermentação durante um processo de deslignificação é um fator crítico tanto para o crescimento micelial quanto para produção de enzimas extracelulares. O requerimento de gás na atmosfera dependerá completamente da espécie fúngica utilizada (Levonen-Muñoz e Bone, 1985). Na maioria dos casos, a concentração de O_2 deverá ser maior que 18% e a concentração de CO_2 deverá ser menor que 10%, de forma a evitar a inibição da degradação da lignina (Weiland, 1988).

Uma outra dificuldade da FES é a inexistência de biorreatores para uso em escala industrial. Somente uma empresa japonesa (Fujiwara) exporta um tipo de equipamento adaptado a FES e presta consultorias nesta área. O restante do conhecimento em biorreatores para FES atende somente escalas-piloto, provenientes de pesquisas acadêmicas (Durand, 1998).

A mistura do substrato, durante a fermentação, promove a transferência de massa e calor entre as partículas, que resulta em um processo mais uniforme. Há uma maior disponibilização de oxigênio para os microrganismos e uma maior remoção do CO_2 dos espaços entre as partículas. Dessa maneira, a mistura do substrato pode impedir um super aquecimento localizado e melhorar a transferência de água entre as partículas sólidas, uniformizando o suprimento de nutrientes e o pH (Weiland, 1988). A mistura do substrato é mais importante durante operações contínuas, automatizadas e "scale-up".

Por último, a mistura do substrato influencia a morfologia do fungo, podendo alterar o seu metabolismo, ou diminuindo o rendimento do produto ou até mesmo interrompendo sua produção. Muitos fungos são sensíveis ao sicalhamento de seu micélio, e, portanto, o uso de fermentadores agitados para processos fermentativos em estado sólido deverá ser avaliado em cada caso individual (Weiland, 1988).

2.7 - O Complexo Agro-Industrial da Maçã no Brasil

Desde 1962, quando as primeiras mudas de macieira chegaram ao Brasil, a produção nacional de maçãs tem aumentado continuamente (Agrícola Fraiburgo, 2000). A maior parte dos frutos colhidos são destinados ao consumo *in natura* no mercado nacional ou é exportado, principalmente para Europa.

As empresas brasileiras processadoras de maçãs recebem os frutos da lavoura durante a época de colheita, entre outubro e fevereiro, e realizam a limpeza e seleção dos frutos (Anexo, Figs. 7.1 e 7.2). Os frutos que atendem aos padrões de qualidade são destinados a comercialização. Os frutos restantes, classificados como "descarte comercial" são resseleccionados para o processamento industrial. Uma pequena parte deste descarte será realmente descartada e é denominada expurgo.

As maçãs de interesse para o processamento industrial, são limpas e desinfetadas externamente e depois são esmagadas e prensadas (Anexo, Fig. 7.3). Durante esta prensagem, o suco é extraído e o bagaço é descartado. Este descarte inclui polpa, cascas e sementes do fruto prensado. Parte do suco remanescente continua agregado ao bagaço, visto que este é descartado com aproximadamente 80% de umidade. Assim, o bagaço de maçã apresenta altos teores de açúcares livres, principalmente frutose, glicose e sacarose (Villas-Bôas *et al.* 1999).

O suco extraído durante a prensagem é dividido e uma parte é clarificado, utilizando-se pectinases comerciais; é desaromatizado, pois o aroma é extraído e comercializado, e o caldo remanescente é concentrado, formando o chamado suco concentrado. A segunda parte do suco é corrigido quimicamente para produção de mosto destinado à fermentação.

O suco concentrado e desaromatizado é utilizado pelas indústrias de refrigerantes, principalmente na produção do "guaraná", ou seu aroma é reconstituído e vendido como suco

de maçã. O mosto é fermentado e destinado à produção de bebidas, como sidras, vinhos de maçã, aguardentes e vinagre.

2.8 - Bioconversão do Bagaço de Maçã

O resíduo proveniente do processamento de maçã apresenta elevada umidade, altos teores de açúcares livres e fibras. O conteúdo protéico e vitamínico, bem como os sais minerais disponíveis, são baixos. Hang (1987) determinou a composição do resíduo de maçã úmido e seco (Tabela 2.3).

O resíduo de maçã processado pode ser empregado como fonte de carboidratos para o cultivo de vários fungos. Zheng e Shetty (1998) utilizaram três fungos de diferentes gêneros, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Rhizopus* para a bioconversão do bagaço de maçã. Após o tratamento biológico, o substrato fermentado foi utilizado em diversos fins, desde alimento animal até como inoculante na biorremediação de solos. Diversos pesquisadores cultivaram fungos comestíveis em bagaço de maçã e obtiveram alta eficiência biológica na produção de cogumelos (Upadhyay e Sohi, 1988; Worrall e Yang, 1992).

Balla e Joshi (1994) enriqueceram com proteínas fúngicas o resíduo de maçã após o cultivo em co-cultura de fungos mitospóricos (*Trichoderma viride* e *Aspergillus niger*) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*), em diferentes combinações. Os fungos mitospóricos degradaram inicialmente a celulose e a hemicelulose do bagaço, através de suas enzimas extracelulares, e, subseqüentemente, as leveduras fermentaram os açúcares liberados pela ação enzimática. Avaliaram tanto a fermentação em estado sólido (FES) como a fermentação submersa. O enriquecimento protéico do bagaço foi relativamente maior na FES do que na fermentação submersa. A co-cultura de *C. utilis* e *A. niger* foi a melhor combinação, tendo aumentado o teor de proteínas do bagaço seco em 200%.

Tabela 2.3. Composição química do bagaço de maçã

Componentes	Tipo de Resíduo	
	Resíduo Úmido	Resíduo Seco
	-----%(p/p)-----	
Umidade	66,4 - 78,2	11,0 - 12,5
Carboidratos	9,5 - 22,0	54,8 - 59,3
Nitrogênio livre	0,6 - 0,8	1,0 - 1,3
Pectina	1,5 - 2,5	15,0 - 18,0
Fibra Bruta	4,3 - 10,5	15,3 - 20,6
Proteína	1,0 - 1,8	4,4 - 5,7
Gordura (extrato etéreo)	0,8 - 1,4	3,8 - 4,6
Cinzas	0,6 - 2,3	2,1 - 3,5
Potássio	0,2 - 0,6	—
Fósforo	0,4 - 0,7	—

(-) não analisado, Fonte: Hang (1987).

Rahmat *et al.* (1995) trataram o bagaço de maçã com as leveduras *Kloeckera apiculata* e *Candida utilis*, empregando fermentação em estado sólido sob agitação (20 rpm) em biorreator automatizado. Foi adicionado no meio de cultura 1% (p/p) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como fonte adicional de nitrogênio, 1% (p/v) do inóculo incubado 12 horas em extrato de malte, tendo a fermentação se processado durante 72 horas à temperatura ambiente. Os pesquisadores conseguiram um incremento de 173% no teor de proteína bruta, com especial aumento nas concentrações de aminoácidos essenciais, tal como lisina, arginina e leucina. O teor de açúcares livres no substrato praticamente se exauriu após 72 horas de fermentação. Entretanto, foi observado uma maior concentração de fibras não digeríveis no substrato.

2.9 - *Candida utilis*

Candida utilis (Henneberg) — sin. *Pichia jadinii* (Kurtzman e Fell, 1998) — é uma levedura conhecida como Torula, capaz de crescer em etanol, como única fonte de carbono e energia (Straskabova, Páca e Králácková, 1980), e tem sido intensivamente usada na produção de proteína microbiana para fins de alimentação animal (Tauk, 1985; Araújo e Souza, 1986; Silvestrini, 1987; Bhalla e Joshi, 1994; Ahmad e Holland, 1995; Rahmat *et al.* 1995; Villas-Bôas e Esposito, 2000, entre outros). Após três dias de crescimento em extrato de malte e agar, à 25° C, as células são elipsoidais e alongadas, (2,5-8,0) x (4,1-11,2) µm, podendo ocorrer isoladamente ou em pares. Apresentam dimorfismo celular dependendo das condições ambientais e as colônias se apresentam pastosas de cor amarelo-caramelo. A levedura produz pseudomicélio. A margem das colônias é lisa ou infreqüentemente lobadas. A colônia detém um sutil odor de éster (Kurtzman e Fell, 1998).

C. utilis pertence à classe dos Ascomicetos. É homotática, produz de 1 a 4 ascósporos em ascos deliqüescentes não-conjugados na fase sexuada (Kurtzman e Fell, 1998) e tem sido apontada como a fase assexuada de *Pichia jadinii* devido a similaridades fenotípicas. Estudos de reassociação de DNA demonstraram que *C. utilis* e *P. jadinii* possuem 85% de similaridades na seqüência de pares de bases (Kurtzman e Fell, 1998).

De acordo com Kurtzman e Fell (1998), as possibilidades de utilização de *C. utilis* na produção de suplemento alimentar em escala comercial foram primeiramente reconhecidas por pesquisadores alemães, no "Institut für Gärungsgewerbe", em Berlim, durante a Segunda Guerra mundial. Devido ao fato de *C. utilis* poder utilizar pentoses, rejeitos da indústria de papel e celulose vêm sendo usados há mais de quatro décadas como um eficiente substrato para cultivo desta levedura. A aceitação geral da *C. utilis* pelas indústrias de alimentos como uma forma segura e nutritiva de proteína microbiana, vem permitindo a sua utilização em outros

tipos de resíduos biológicos. Tanto *C. utilis* como *P. jadinii* apresentam amplo habitat, tendo sido isoladas de fontes vegetais e animais. Em vista disso, cepas de *C. utilis* que têm uma longa história de uso e de segurança alimentar, devem ser selecionadas, antes de serem empregadas na alimentação humana. As cepas de *C. utilis* que têm sido usadas desde meados dos anos 40, são: NRRL Y-900 (CBS 5609), NRRL Y-1082 (CBS 1517) e NRRL Y-1084 (CBS 841).

Por outro lado, *C. utilis* também tem sido usada na produção de vários compostos orgânicos, tal como acetato de etila (Armstrong, Martin e Yamazaki, 1984; Christen *et al.* 1999), álcoois de cadeia longa (Derrick e Large, 1993), ácido acético (Christen *et al.* 1999; Domenech *et al.* 1999), enzimas (Sim e Hang, 1996), dentre outros produtos.

No que se refere à bioconversão de resíduos agro-industriais, Tauk em 1985, realizou um estudo com *C. utilis* para aproveitamento da polpa de café prensada, na tentativa de minimizar os problemas de poluição ambiental decorrentes do acúmulo deste resíduo durante o beneficiamento do café. *C. utilis* foi utilizada em fermentação submersa para aumentar o valor protéico do substrato lignocelulósico. Para otimizar o processo, foram adicionadas ao meio fermentativo diferentes concentrações de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e fósforo (H_3PO_4) inorgânico. Foi obtida uma velocidade específica de crescimento de $0,43 \text{ h}^{-1}$, acompanhada de excelente produção de biomassa.

Todavia, Lucca *et al.* (1991) e Lucca, Romero e Callieri (1995) mostraram que elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo no meio de cultura de *C. utilis* favoreceram a síntese de ácido ribonucléico (RNA), com maior acúmulo destes ácidos nas células microbianas. Como elevadas concentrações de ácidos nucléicos não são convenientes em alimentos, devido à toxicidade destas moléculas para animais não ruminantes, os pesquisadores sugeriram o cultivo de *C. utilis* em meio limitante de fontes de nitrogênio e fósforo, de forma a obter células com menores teores de ácidos nucléicos.

C. utilis foi também empregada na fermentação de um hidrolizado enzimático de palha de arroz, produzindo 6,6 g/L de biomassa em 24 horas de fermentação (Araújo e Souza, 1986). A biomassa microbiana apresentou 48,1% de proteínas, contendo todos os aminoácidos essenciais.

Ahmad e Holland (1995) realizaram um estudo cinético de produção de proteína microbiana de *C. utilis*, empregando fermentação em estado líquido (FEL), usando meio sintético e tendo como fonte de carbono a glicose. Foi realizada uma fermentação em batelada, sob aeração controlada, utilizando um biorreator de 2 litros, contendo apenas 1,5 litros de meio. Foi concluído que a velocidade específica de crescimento, μ , aumentou à medida que aumentou o inoculum, a agitação, com um limite máximo de 600 rpm, e a temperatura, com um máximo de 34° C. Efeitos opostos foram observados em agitações superiores a 600 rpm e em temperaturas acima de 34° C. Efeito inibitório sobre o μ , também foi observado em vazões de ar acima de 0,84 L.min⁻¹. Por outro lado, alterações na concentração inicial de açúcar não afetaram o valor de μ . A fase lag diminuiu com o aumento do fluxo de ar, com o aumento da temperatura e com o aumento da concentração do inoculum. Porém, a fase lag aumentou à medida que se aumentou a concentração inicial de açúcar, exibindo um nítido efeito "Crabtree", que se caracteriza por uma sensibilidade do microrganismo a altas concentrações de glicose, forçando-o a passar de uma fase oxidativa do metabolismo para uma fase fermentativa, mesmo na presença de oxigênio. Embora *Candida utilis* tenha sido citada como praticamente a única levedura resistente a este efeito (Coppella, 1989; Barford, 1990), os pesquisadores detectaram claramente esse efeito inibitório. Já o grau de agitação teve pouco efeito sobre a duração da fase lag. A constante de saturação de Monod, K_s , aumentou com a concentração de glicose, indicando que a população celular foi afetada negativamente em níveis de substrato relativamente elevados, isso devido à diminuição de afinidade que a *C. utilis* exibe para glicose quando esta se apresenta em altas concentrações no substrato. A constante da velocidade de

reação, k , aumentou significativamente com o aumento da temperatura até 34° C (Efeito "Arrhenius"), enquanto temperaturas mais altas causaram a morte da levedura.

C. utilis apresenta atividade nitrato e nitrito redutase, permitindo a esta levedura se desenvolver em meios de culturas com nitrato ou nitrito como única fonte de nitrogênio (Sengupta, Shila e Rao,1996; Furina *et al.* 1997; Sengupta, Shila e Rao,1997). Essa é uma importante característica metabólica da *C. utilis*, visto que permite a utilização de fontes mais baratas de nitrogênio no seu cultivo.

Diversos fatores ambientais podem alterar a morfologia das células de *C. utilis* (Anexo, Fig. 7.4). Foi notificado por diversos pesquisadores, que a forma e o volume celular variaram de acordo com as condições de cultivo, tais como pH, temperatura, aeração, entre outros. (Pozmogova *et al.* 1978; Straskrabová, Páca e Králícková,1980; Samoilenko e Petrikevich, 1881; Vorob'eva e Filonenko, 1982; Lirova *et al.* 1986; Lucca *et al.* 1991; Votruba e Vraná, 1995).

Pozmogova *et al.* (1978), estudaram o efeito de temperaturas elevadas sobre a morfologia das células de *C. utilis* em meio sintético acrescido de glicerol, utilizando fermentação em batelada alimentada quemostatizada. Com o aumento da temperatura de 30° para 40° C, a densidade de biomassa decresceu gradualmente. Após 3 horas à 40° C, as células aumentaram em tamanho, tornando-se alongadas e elipsoidais, e as células filhas, após atingido o tamanho das células mães, não se separaram delas, formando células duplas. Após 5 horas à 40° C, quase toda a população foi constituída de células duplas. Os núcleos de tais células encontravam-se unidos e entre as duas células. A inabilidade destas células em se separarem umas das outras à 40° C foi explicada por alterações nas propriedades da parede celular, que não podiam mais ser degradadas pelas enzimas intracelulares.

Samoilenko e Petrikevich (1981) também estudaram o efeito de altas temperaturas na morfologia e ultra-estrutura celular de *C. utilis*. Os pesquisadores empregaram fermentações em

batelada alimentada, testando diferentes temperaturas (19° a 41° C), em condições de glicose limitante e não limitante. Foi possível observar que o volume celular aumentou de forma marcante acima de 38° C e abaixo de 25° C. À temperatura constante e com glicose limitante no meio, a velocidade específica de crescimento das células aumentou, bem como o seu volume celular.

O efeito da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura sobre a morfologia e respiração das células de *C. utilis* foi estudado por Vorob'eva e Filonenko (1982) que empregaram dois tipos de fermentação: fermentação em batelada e fermentação em cultura contínua. Amostras coletadas da cultura em batelada, durante a fase exponencial e sem limitação de oxigênio, mostraram predominância de células redondas ou ligeiramente ovaladas, e um número elevado de células de grandes dimensões. Com o decréscimo da concentração de oxigênio no meio, a proporção de células pequenas aumentou e um grande número de células finas e alongadas apareceram no meio de cultura durante a limitação de oxigênio. Um histograma evidenciou a média de comprimento celular de 4,45 μm para as células que cresceram em níveis limitantes de oxigênio, e 6 μm quando crescidas sem limitação de oxigênio. A morfologia das células também foi analisada após 72 horas em fermentação em cultura contínua quemostatizada. A percentagem de células alongadas diminuiu à medida que foi aumentada a concentração de oxigênio. Já em condições de glicose limitante foi observado um aumento na proporção de células pequenas e alongadas na população, contrariando os resultados obtidos por Samoilenko e Petrikevich (1981).

Straskrabová, Páca e Králíková (1980) estudaram o efeito da aeração e concentração de dióxido de carbono no meio de cultura, em fermentação em batelada, sobre a morfologia das células de *C. utilis*. Foi utilizado como fonte de carbono o etanol em meio mineral e verificou-se a agregação celular de 10 a 20 células. Quando o pH foi sub-ótimo (2,3) as células ficaram menores e ocorreu maior proporção de agregados celulares. Este efeito foi também observado

em condições de baixa disponibilidade de CO₂ no meio. Entretanto, durante os experimentos sob baixa disponibilidade de CO₂, não foi observada a formação de pseudomicélio, como ocorre em outras leveduras (Wimpenny, 1969).

Lirova *et al.* (1986) também estudaram alterações morfológicas das células de *C. utilis* durante fermentação em batelada, sob condições limitantes de fonte de carbono (etanol), variações de pH e diferentes pressões de O₂. Os autores também observaram diminuição no tamanho celular e formação de agregados sob baixo valor de pH, além de verificarem que sob baixo valor de pH e pO₂, ocorreu formação de células alongadas, finas e deformadas. Formação de agregados lineares e células deformadas também foi reportado por Votruba e Vraná (1995), quando expuseram as células leveduriformes a valores de pH altos, tal como 6,5.

Por fim, Lucca *et al.* (1991), estudaram as alterações morfológicas das células de *C. utilis* decorrentes da diminuição de fosfato no meio de cultura. Foi observada a formação de células globosas, quando o meio dispunha de baixo nível de fosfato.

Dessa forma, podemos concluir que *Candida utilis* apresenta alterações morfológicas quando as condições ambientais são adversas. Assim sendo, diversos fatores nutricionais devem ser considerados quando se deseja obter uma população celular homogênea desta levedura.

2.10 - *Pleurotus ostreatus*

O gênero *Pleurotus* pertence ao grupo dos Basidiomicetos e é caracterizado por corpos de frutificação (cogumelos) com hastes excêntricas e carpóforos em forma de concha de ostra. Uma grande vantagem destes fungos está relacionada com sua capacidade em crescer numa ampla faixa de temperaturas (Rajaratnam e Bano, 1989). Sua capacidade em colonizar uma grande gama de substratos lignocelulósicos, pobres em nitrogênio, resulta na bioconversão do substrato de crescimento em cogumelos comestíveis que são diretamente palatáveis, apresentando aroma agradável e distinto valor nutritivo e medicinal (Anderson e Anderson,

1980). A biotransformação do substrato de crescimento, onde os polissacarídeos e a lignina são degradados — como um clássico exemplo de fungo de degradação branca — também é outra típica característica destes fungos (Kariishi, 1977).

Os fungos do gênero *Pleurotus* pertencem à família TRICHOLAMATAEAE (Alexopoulos e Mims, 1979). Esta família inclui cogumelos com lâminas unidas que podem ser encontrados sobre diferentes substratos e habitats. Um dos principais representantes do gênero é o *Pleurotus ostreatus* (Anexo, Fig. 7.5). Conhecido na Europa como "cogumelo ostra", no oriente como "hiratake" ou também "shimeji". No Brasil é conhecido como cogumelo gigante ou caetetuba (Ranzani e Sturion, 1998). Os corpos de frutificação apresentam-se geralmente de coloração creme, e são encontrados sobre troncos em decomposição ou em pedaços de madeira formando camadas sobrepostas (Alexopoulos e Mims, 1979). Esta espécie geralmente não apresenta haste nos seus carpóforos, sendo portanto sésil, porém, às vezes apresenta uma haste pequena e lateral.

A produção mundial de cogumelos do gênero *Pleurotus* tem aumentado numa velocidade acelerada nos últimos anos (Yildiz, Karakaplan e Aydin, 1998). Em 1986, a produção de *Pleurotus* spp. contribuiu com aproximadamente 7% da produção mundial de cogumelos comestíveis. Já em 1990, a produção de *Pleurotus* spp. atingiu um milhão de toneladas métricas e constituiu cerca de 24% do total de produção de cogumelos comestíveis (Chang e Miles, 1991a e b; Hayes, 1991; Royse, 1992).

Embora, mundialmente, cogumelos comestíveis do gênero *Agaricus* sejam os mais cultivados (Chang e Miles, 1989; Bononi *et al.* 1995), o interesse nas espécies de *Pleurotus* está relacionado com as facilidades de cultivo desse cogumelo quando comparadas ao primeiro. Entre elas citam-se a existência de espécies que crescem bem em áreas tropicais e subtropicais, como o *P. ostreatus*, o que resulta em menor dispêndio de energia; apresentam uma produtividade maior e de menor custo, e, crescem numa grande variedade de resíduos

agrícolas e industriais, como o bagaço de maçã (Upadhyay e Sohi, 1988; Worrall e Yang, 1992) devido à produção de enzimas lignocelulolíticas (Rajarithnam e Bano, 1989). No Brasil, *Pleurotus* spp. têm sido cultivadas com sucesso em bagaço de cana (Bononi *et al.* 1995) e novos substratos agro-industriais vêm sendo avaliados (Maziero, 1990). O cultivo de *Pleurotus* spp. como cogumelo comestível ganhou importância no mercado mundial, também devido ao curto período de cultivo comparado com *Agaricus* spp. (Zadrazil, 1978), além de que estas espécies apresentam resistência a microrganismos contaminantes que levam à grande perda de rendimento no cultivo de cogumelos (Olivier, 1990; Garcia, Cisneros e Sedrés, 1998).

Quanto ao seu valor nutricional, equipara-se ao de outros cogumelos, sendo mais rico em vitaminas hidrossolúveis que a maioria dos vegetais, bem como apresenta proteínas de melhor qualidade (Chang, 1991b; Kandanda, Tshinyangu e Henebert, 1996; Yildiz, Karakaplan e Aydin, 1998, Manzi *et al.* 1999). *Pleurotus* spp. têm baixo teor de gordura, nenhum colesterol, não contêm amido, são boas fontes de vitaminas do complexo B, principalmente niacina, riboflavina e ácido fólico. São ricos em minerais, especialmente potássio e ferro e, têm baixo teor de sódio (Rajarithnam e Bano, 1989; Vetter 1994; Manzi *et al.* 1999).

Pleurotus têm baixo teor de aminoácidos sulfurados e aromáticos quando comparado com as proteínas do ovo (Rajarithnam e Bano, 1989). Todavia, a qualidade da proteína deste cogumelo, além de depender da espécie e frequentemente da linhagem, é determinada também pelo substrato de cultivo, dada à influência que sua composição exerce no teor de proteína e na sua composição de aminoácidos (Crisan e Sands, 1978; Rajarithnam e Bano, 1989).

Ranzani e Sturion (1998) determinaram a composição de aminoácidos de três espécies de *Pleurotus* cultivados em folhas de bananeira. Independente do substrato de origem e da espécie, os aminoácidos presentes em maior quantidade, em ordem decrescente, foram o ácido glutâmico, o ácido aspártico, a leucina e a lisina. O total de aminoácidos essenciais encontrado

foi cerca de 40%. Dos aminoácidos essenciais presentes em menores quantidades foram a cistina e o triptofano, seguidos da metionina e histidina.

Enquanto o teor de proteínas, a composição de aminoácidos, de sais minerais e vitaminas, dos corpos de frutificação de basidiomicetos vem sendo estudados, poucas informações estão disponíveis sobre esses nutrientes no micélio vegetativo, que é estritamente dependente do meio de cultivo. O valor nutricional e composição química de diferentes espécies de *Pleurotus*, em comparação com outros micélios de fungos comestíveis, foi avaliado por Rajarathnam e Bano (1989) e Di Lena, Vivante e Quaglia (1997), onde concluíram que a composição protéica e de aminoácidos do micélio não variou em relação aquela do basidioma.

Além das propriedades nutricionais, os basidiomas de *P. ostreatus* apresentam também propriedades medicinais reconhecidas cientificamente, tal como a redução do colesterol da corrente sanguínea (Bobek *et al.* 1991 a e b) entre outras.

P. ostreatus cresce em pH relativamente baixo, tal como 3,5, apresentando um pH ótimo de crescimento em torno de 7,0; e temperaturas consideravelmente altas, tal como 34° C, apresentando temperatura ótima em torno de 25° C (Furlan *et al.* 1997). Entretanto, o pH em torno de 5,5 foi o mais recomendado para se obter maior degradação da lignina (Vetter, 1992).

Uma propriedade fisiológica bastante polêmica dos fungos pertencentes ao gênero *Pleurotus*, é a sua possível capacidade de fixação de nitrogênio da atmosfera (Rajarathnam e Bano, 1989). Existem opiniões divergentes sobre esta propriedade do *Pleurotus* desde que Millbank (1969) concluiu que seria improvável que nenhum eucarioto pudesse fixar nitrogênio. Duggar e Davis (1916), Ginterova (1973), Ginterova e Maxianova (1975), Rangaswamy, Kandawamy e Ramaswamy (1975) e Thayumanavan (1980) sugeriram que diferentes espécies de *Pleurotus* fixaram nitrogênio atmosférico com base ao elevado teor de nitrogênio dos basidiomas em relação aos substratos nos quais eles cresceram (Jandiak, 1976).

Considerando o fato que *P. ostreatus* pode absorver nitrogênio atmosférico (Ginterova, 1971 e 1973), Ginterova (1973) acompanharam o balanço de nitrogênio total e a composição de proteínas dos corpos de frutificação, bem como do substrato durante o ciclo de cultivo. Os resultados mostraram que *P. ostreatus* possui uma marcante capacidade em fixar nitrogênio atmosférico, fixando 312 g de nitrogênio total por 100 kg de substrato seco. O substrato de cultivo consistiu de palha e sabugo de milho que foram pasteurizados à 60° C por 50 horas. Alguns pesquisadores sugeriram que provavelmente bactérias fixadoras de nitrogênio, que muitas vezes produzem endósporos, resistentes a pasteurização, fixaram o nitrogênio usado pelo fungo. Entretanto, Kurtzman (1978) provou que estas bactérias não seriam capazes de produzir endósporos resistentes ao calor.

Pleurotus ostreatus produz uma gama de enzimas lignocelulolíticas e vem sendo estudado como excelente produtor de lacase (Valmaseda, Jesus-Martínez e Martínez, 1991; Youn *et al.* 1995; Ardon, Kerem e Hadar, 1996; Giardina *et al.* 1996; Palmieri *et al.* 1997; Amitai *et al.* 1998; Guillén-Navarro, Márquez-Rocha e Sanchez-Vasquez, 1998; Rodrigues, Pickard e Vasquez-Duhalt, 1999, entre outros) e manganês peroxidase (Berker e Sinitsyn, 1993; Asada *et al.* 1995; Kaal, Field e Joyce, 1995; Sarkar, Martínez e Martínez, 1997; Guillén-Navarro, Márquez-Rocha e Sanchez-Vasquez, 1998; Irie *et al.* 2000, entre outros), porém atividades de peroxidases independente de manganês (Kang *et al.* 1993; Vyas e Molitoris, 1995), álcool veratrílico oxidase (Sannia *et al.* 1991; Marzullo *et al.* 1995), cellulases (Valmaseda, Jesus-Martínez e Martínez, 1991; Burla *et al.* 1992), xilanases (Valmaseda, Jesus-Martínez e Martínez, 1991) e até mesmo um tipo especial de lignina peroxidase (Akhmedova, 1996 a e b) têm sido também citado na literatura.

P. ostreatus não produz a enzima lignina peroxidase (LiP). Todavia, esta afirmação é controversa, pois um pesquisador russo, Akhmedova (1996 a e b), conseguiu observar

atividade de LiP em meio de cultura de *P. ostreatus*, alterando as condições de pH da metodologia de medida da atividade enzimática.

Zadrazil (1976) indicou que alguns fungos de degradação branca, incluindo *P. ostreatus*, colonizaram palha de trigo e liberaram substâncias solúveis em água a partir do complexo polimérico do substrato, durante fermentação em estado sólido e usaram a lignina como fonte de carbono. Durante este processo a digestibilidade do substrato fermentado aumentou.

De acordo com Rajarathnam e Bano (1989), após 60 dias de fermentação com espécies de *Pleurotus*, todos os substratos testados, exceto palha de arroz, mostraram maior digestibilidade *in vitro* comparado ao controle. Os resultados negativos com a palha de arroz, provavelmente foram decorrentes da alta incrustação de SiO₂ no substrato. Foram também observadas alterações na digestibilidade *in vitro* decorrente de diferenças na composição química da lignina, especialmente no teor de álcool cumarílico, álcool coniferílico, álcool sinapílico, e na qualidade de polissacarídeos de gramíneas e de outras angiospermas. Zadrazil (1977) discutiu a relação da perda da matéria orgânica com o aumento ou decréscimo na digestibilidade de substratos fermentados para consumo por ruminantes. Nos estágios iniciais da fermentação, a digestibilidade *in vitro* do substrato geralmente decresceu devido à utilização pelo fungo de substâncias de fácil solubilização. Nos estágios subseqüentes, os polímeros foram degradados, resultando na liberação de açúcar e outros componentes do substrato. Durante este período, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) para os microrganismos do rúmen, geralmente aumentou. Outros fungos, tal como *Agaricus aegerita*, não decompositores de lignocelulose, somente degradarão os componentes solúveis do substrato diminuindo a digestibilidade.

Diversas tentativas utilizando *P. ostreatus* têm conseguido melhorar a digestibilidade de substratos lignocelulósicos em fermentação em estado sólido com concomitante enriquecimento protéico (Ortega *et al.* 1992; Tripathi e Yadav, 1992; Ortega *et al.* 1993; Nicolini *et al.* 1992;

Jalc *et al.* 1996; Adamovic *et al.* 1998; Kutlu *et al.* 1999 e 2000). O substrato lignocelulósico mais estudado é a palha de trigo (Tripathi e Yadav, 1992; Jalc *et al.* 1996; Adamovic *et al.* 1998; Kutlu *et al.* 1999 e 2000).

Adamovic *et al.* (1998) aumentaram mais de 30% a digestibilidade da palha de trigo após 120 dias de incubação com *P. ostreatus*. O aumento no teor de proteínas e sais minerais também foi observado, porém, após utilização do substrato na alimentação de gado confinado, foi observado que os animais não consumiam a ração suplementada com mais de 17% de palha de trigo fermentada por *P. ostreatus*. Uma diminuição considerável no ganho de peso diário dos animais foi observada à medida que se aumentou a proporção em massa seca de substrato fermentado na ração.

Por outro lado, Das e Karim (1995) fermentaram palha de cevada com *P. ostreatus* e não conseguiram melhorar a digestibilidade do substrato, pelo contrário, a digestibilidade diminuiu após 30 dias de tratamento; ainda assim, o teor de lignina diminuiu com o tratamento biológico, bem como aumentou o teor protéico.

Existem diversos fatores que podem interferir na eficiência do fungo em melhorar a digestibilidade de um substrato lignocelulósico, e que já foram oportunamente discutidos em itens anteriores desta revisão bibliográfica. Entre eles, a presença do íon manganês (II), presença de compostos fenólicos e baixo nível de fontes de nitrogênio no meio de cultura, têm sido sugeridos para o tratamento de resíduos lignocelulósicos por *P. ostreatus* de forma a obter uma degradação preferencial de lignina, deixando praticamente intacta a concentração de celulose (Platt *et al.* 1983; Vetter, 1992; Kerem e Hadar, 1993a e b, e 1995; Ardon, 1998). Esta é uma condição *sine qua non* para se melhorar a digestibilidade de um substrato lignocelulósico.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e procedimentos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho, estão apresentados no Anexo, Figura 7.6.

3.1 - Substratos e Microrganismos

O bagaço de maçã foi cedido pela empresa FISCHER SUCOS INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA, com sede em Fraiburgo (SC), e foi transportado em sacos plásticos de 50 L, tendo chegado ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Santa Catarina após 48 horas de descarte, com 80% de umidade, 16 % de açúcares redutores totais e pH 5,1.

No laboratório, o bagaço foi fracionado em porções de 2 kg, acondicionado em sacos plásticos menores e mantido congelado a -20° C até o processamento. Após descongelamento das amostras, o bagaço manteve a umidade e o teor de açúcares redutores totais inicial, porém seu pH abaixou para 4,3.

Os meios de culturas semi-sintéticos utilizados na manutenção dos microrganismos foram o LMAPD — extrato de levedura ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$); extrato de malte ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$); peptona ($6,0 \text{ g.L}^{-1}$); dextrose ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) e agar (20 g.L^{-1}) — e o BDA + L — extrato de batata ($200,0 \text{ g.L}^{-1}$); dextrose ($20,0 \text{ g.L}^{-1}$); agar ($16,0 \text{ g.L}^{-1}$) e extrato de levedura ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$).

Para o preparo do inóculo de *Candida utilis* foi utilizado o meio LMPD — extrato de levedura ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$); extrato de malte ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$); peptona ($6,0 \text{ g.L}^{-1}$); dextrose ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) acrescido de terramicina e tetraciclina ($100,0 \text{ mg.L}^{-1}$).

Porém, nos estudos dos parâmetros fisiológicos dos microrganismos empregou-se os meios: MEA — extrato de malte ($100,0 \text{ g.L}^{-1}$) e agar ($20,0 \text{ g.L}^{-1}$), CALP — meio mínimo¹ com

¹ Sais: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$); KH_2PO_4 (1 g.L^{-1}); KCl ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$); $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$); CaCl_2 ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$).

celulose (2,0 g.L⁻¹), extrato de levedura (0,5 g.L⁻¹) peptona (0,5 g.L⁻¹) e agar (20,0 g.L⁻¹). PALP — meio mínimo¹ com pectina de maçã (2,0 g.L⁻¹), extrato de levedura (0,5 g.L⁻¹), peptona (0,5 g.L⁻¹) e agar (20,0 g.L⁻¹). XALP — meio mínimo¹ com xilana "birchwood" (Merk) (0,5 g.L⁻¹), extrato de levedura (0,5 g.L⁻¹), peptona (0,5 g.L⁻¹) e agar (20,0 g.L⁻¹).

Os microrganismos utilizados foram a *Candida utilis* CCT 3469, depositada na Coleção de Culturas Tropical, da Fundação "André Toselo", em Campinas (SP) e o fungo filamentoso *Pleurotus ostreatus* var. *roseus* (sin. *Pleurotus ostreatoroseus* CCT 2603), que também se encontra depositado na mesma coleção de culturas.

C. utilis foi mantida em meio LMAPD, incubada a 30° C durante 72 horas, e após cultivo foi armazenada a 4° C, sendo realizadas repicagens periódicas quinzenais. *P. ostreatus* foi mantido em meio BDA + L, incubado a 25° C durante 7 dias e após cultivo foi também armazenado a 4° C, sendo as repicagens realizadas mensalmente.

A fim de proceder a identificação da cepa de *C. utilis*, foi avaliada a capacidade da levedura metabolizar quinze açúcares utilizados na sua identificação. Foram testados glicose, maltose, sacarose, galactose, lactose, rafinose, inulina, celubiose, trealose, ribose, melizitose, xilose e arabinose. Para tal finalidade foi utilizado um "kit" da AUXACOLOR, fabricado por SANOFI DIAGNOSTIC PASTER²

3.2 - Preparo do Inóculo de *Candida utilis*:

Previamente ao preparo do inóculo de *C. utilis*, foi definida a curva de crescimento da levedura em meio LMPD, de forma a selecionar a fase do crescimento na qual a levedura produziu maior biomassa. Dessa forma, foi inoculado células de *C. utilis* com 72 horas de crescimento em meio LMAPD, recuperadas com alça de platina (3 alças/300 mL) e incubou-se a 30° C sob constante agitação. Em intervalos periódicos de 3 horas foram retiradas alíquotas do

² Sanofi Diagnostic Paster, Inc. 3, Bd Raymond Poincaré 92430, Marnes-la-Coquette – France. Fax (1) 47 419133

meio de cultivo para avaliação do crescimento usando-se como medida a absorbância a 550 nm em espectrofotômetro VIS (modelo Jenway 6100) e também através do número de células, contadas em preparação a fresco, sob microscópio óptico (modelo LABOVAL 4) com aumento de 400x. Foi ainda determinado o número de células viáveis e inviáveis nas alíquotas coletadas, por técnica de contagem direta em preparação entre lâmina e lamínula com o corante vital azul de metileno ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$). O número de células por mL, foi obtido a partir da média das contagens de oito diferentes campos. Com o objetivo de confirmar os valores de velocidade específica bem como a duração da fase exponencial, o ensaio foi repetido.

Após análise da curva de crescimento foi selecionada, como inóculo, uma cultura na fase exponencial com densidade celular correspondente a 0,5 de absorbância óptica a 550 nm, com um fator de diluição igual a 20 e que correspondeu a biomassa aproximada de 5 g.L^{-1} .

3.3 - Fermentação Submersa do Bagaço de Maçã:

Dois erlenmeyers de 2 litros, contendo 300 g de bagaço de maçã úmido em 600 mL de água destilada foram esterilizado a 121° C por 15 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, foram inoculados com 100 mL de inóculo de *C. utilis* preparado conforme metodologia apresentada em 3.2 ($5,0 \text{ g. L}^{-1}$) e cujas células foram centrifugadas a 850 g por 10 min e ressuspendido em solução salina ($8,5 \text{ g.L}^{-1}$).

A fermentação se processou a 30° C , sob aeração constante, auxiliada por mini compressores de ar (Anexo - Fig. 7.7). Após 6 dias de fermentação o bagaço foi seco a 50° C durante 72 horas e foram avaliados os parâmetros químicos — açúcares redutores totais, lignina Klason, lignina Klason solúvel, celulose, pectina e ácidos nucléicos totais — e bromatológicos — proteína bruta, fibras em detergente ácido (FDA), fibras em detergente neutro (FDN), digestibilidade da matéria seca *in vitro* (DMSIV), nutrientes digestíveis totais (NDT), cinzas, fósforo, cálcio e potássio.

Afim de se estudar o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio sobre os parâmetros do processo fermentativo, empregaram-se os mesmos procedimentos descritos acima, porém com a adição de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de diferentes sais nitrogenados: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; NaNO_3 ; $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ e uréia. No final de 72 horas de fermentação foi somente avaliada a concentração de açúcares redutores no bagaço.

Determinaram-se ainda, alguns parâmetros cinéticos da fermentação de *C. utilis* em bagaço de maçã empregando o método de amostras destruídas. Para tal, usaram-se 16 erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio preparado conforme formulação apresentada, tendo sido utilizado inóculo com idêntica concentração celular em todos os frascos e na proporção de 100 mL.L^{-1} . As amostras foram coletadas em duplicatas (dois frascos), medido o pH e posteriormente filtrando-se utilizando peneira de aço com poros de 1mm. Retirou-se uma amostra do filtrado de aproximadamente 2 mL para contagem de células e dosagem de açúcares redutores totais. O filtrado restante foi reincorporado ao bagaço e seco em estufa a 50° C por 72 horas.

Os parâmetros cinéticos avaliados foram o crescimento microbiano, a variação do pH e o consumo de açúcares redutores totais. Avaliou-se também a influência da adição de sulfato de amônio ($10,0 \text{ g.kg}^{-1}$ de bagaço) sobre os parâmetros cinéticos, bem como sobre o teor de proteínas do bagaço fermentado.

O crescimento foi avaliado através da contagem de células em preparação à fresco, utilizando-se lâmina e lamínula em microscópio óptico (400x), de acordo com o procedimento realizado durante o preparo do inóculo.

3.4 – Cálculos dos Parâmetros Cinéticos:

3.4.1 – Velocidade Específica de Crescimento: A velocidade específica de crescimento foi determinada através do coeficiente angular da reta obtida a partir da relação entre o logaritmo

neperiano da biomassa e o tempo na fase exponencial de crescimento, de acordo com a Equação

(3.1)

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (3.1)$$

3.4.2 – Fator de Conversão de Substrato em Biomassa: O fator de conversão do substrato — açúcares redutores livres — em biomassa, foi determinado através do coeficiente angular da melhor reta, obtida a partir da relação entre o consumo de substrato e a produção de biomassa, de acordo com a Equação (3.2)

$$Y_{x/s} (\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \quad (3.2)$$

onde:

X: valor de biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$);

X_0 : valor inicial de biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$);

S_f : concentração de açúcares redutores totais ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$);

S_0 : concentração inicial de açúcares redutores totais ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

3.4.3 – Produtividade em Biomassa: A produtividade em biomassa foi calculada dividindo-se a concentração máxima (X_{max}) pelo tempo de fermentação correspondente, como descrito na Equação (3.3).

$$P_x (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{X_{max}}{t} \quad (3.3)$$

onde:

t: tempo de fermentação em horas, quando a biomassa é máxima.

3.5 - Determinação dos Parâmetros Químicos e Bromatológicos do Bagaço Fermentado por *Candida utilis*:

3.5.1 - Teor de Proteína Bruta: O conteúdo protéico foi determinado a partir da análise de nitrogênio total, obtido pelo método oficial padrão de Kjeldahl, descrito por Clesceri, Greenberg e Trussel (1992). O valor de proteína bruta ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ da amostra seca) foi obtido pelo produto da multiplicação da concentração de nitrogênio total na amostra pelo fator 6,25.

3.5.2 - Açúcares Redutores Totais: O teor de açúcares redutores foi dosado pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), Miller (1959).

Em 200 μL da amostra foi adicionado 200 μL do reativo de DNS³ e a mistura foi mantida em banho-maria em ebulição durante 5 min. Após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 2 mL de H_2O destilada. Deixou-se a amostra em repouso durante 15 min. à temperatura ambiente, e foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm, utilizando uma amostra de água destilada mais reativo de DNS, como branco.

Uma curva padrão de açúcares redutores foi contruída utilizando diferentes concentrações de glicose.

3.5.3 - Carboidratos e Compostos Insolúveis em Meio Ácido, Determinado como Lignina Klason: A quantidade de compostos insolúveis em meio ácido foi determinado de acordo com o método Klason (ASTM, 1966) modificado. Uma amostra de 1g do substrato seco foi transferido para um Becker de 50 mL e tratada com 5 mL de H_2SO_4 72%, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a 45° C por 7 min. A reação foi, então, interrompida com a adição de 25 mL de água destilada. A amostra foi transferida quantitativamente para um erlenmeyer de 250 mL, elevando-se o volume de água para 137,5 mL.

³ Reativo de DNS: 300g de NaKC_4O_6 + 16 g de NaOH dissolvido em H_2O . Adicionou-se aos poucos 10 g de ácido 3,5-Dinitrossalicílico (com suave aquecimento) e completou-se o volume de 1000 mL com H_2O destilada.

Para completa hidrólise dos oligômeros restantes, o erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 15 min a 121° C. Após a descompressão da autoclave, o frasco foi retirado e resfriado à temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada e o hidrolisado transferido e diluído com água destilada em um balão volumétrico de 250 mL e armazenado para posterior análise.

Os sólidos retidos no papel de filtro, previamente tarado, foram lavados com aproximadamente 1 L de água destilada e secos em estufa a 105° C até massa constante.

3.5.4 - Compostos Solúveis em Meio Ácido, Determinados como Lignina Klason Solúvel:

A quantidade de compostos solúveis em meio ácido foi determinada conforme metodologia descrita por Rocha, Silva e Schuchardt (1993).

Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado, obtida no item 3.5.3, foi diluída com água destilada em um balão volumétrico de 100 mL, depois de ter sido alcalinizada com NaOH 6,5 mol.L⁻¹ até pH 12,5.

A absorvância da solução em 280 nm foi determinada em um espectrofotômetro UV/VIS (Ultrospec 3000 – Pharmacia Biotech), usando água destilada como referência. A concentração de compostos solúveis foi calculada com base na absorvância média da lignina em pH 12 que é igual a 25 L.g⁻¹.cm⁻¹.

3.5.5 - Celulose: A concentração de celulose nas amostras de bagaço de maçã foi determinada utilizando a técnica desenvolvida por Updegraff (1969) para determinação de celulose em materiais biológicos.

Tratou-se 100 mg de amostra seca com 3,0 mL de solução aceto-nítrica⁴, deixando em banho-maria a 100° C durante 30 min. Centrifugou-se a amostra a 2124 g por 5 min., descartando o sobrenadante. Lavou-se o precipitado com 10 mL de água destilada,

centrifugando novamente à 2124 g durante 5 min. Adicionou-se 10 mL de H₂SO₄ 67% (v/v) e deixou reagir por 60 min. Retirou-se 1,0 mL do hidrolisado e diluiu-se para 100 mL de água destilada. 1,0 mL desta solução foi colocado num tubo de ensaio e adicionado 4,0 mL de água destilada. O tubo foi posto em um banho de gelo e adicionado 10 mL do reagente de antrona⁵. Misturou-se e foi deixado em banho-maria à 100° C por 16 min. Então o tubo voltou para o banho de gelo por 2-3 min e depois de retornado a temperatura ambiente foi feita a leitura a 620 nm, usando uma amostra em branco, como referência.

Para determinar a concentração de celulose nas amostras lidas, foi construída uma curva padrão com base nos resultados obtidos a partir de celulose pura.

3.5.6 - Teor de Cinzas Totais: Após massa constante, uma amostra seca (M3) foi acondicionada em um cadinho de porcelana previamente tarado (M1). Em seguida, o material foi calcinado inicialmente a 300° C por 1 hora e depois por mais 2 horas a 800° C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a sua massa foi determinada (M2). O teor de cinzas foi calculado pela seguinte equação : $\%czs = (M1-M2) / M3 \times 100$.

3.5.7 - Ácidos Nucléicos Totais: O teor de ácidos nucleicos totais (DNA + RNA) das amostras foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Schäffer, Wöstemeyer e Random (1992).

Foi transferido 200 mg da amostra seca para um eppendorf de 2,0 mL e foi adicionado 800 µL de tampão de extração⁶. Incubou-se a 65° C por 45 min. (banho-maria) e centrifugou-se por 5 min. a 5100 g. Coletou-se a fase aquosa e a transferiu para outro tubo de modo a processar a desproteinização adicionando 500 µL de uma solução de fenol-clorofórmio (1:1) e

⁴ Solução aceto-nítrica foi preparada misturando lentamente 15 mL de ácido nítrico concentrado com 150 mL de ácido acético 80%.

⁵ O reagente de antrona foi preparado no dia da análise, com 0,2 g de antrona em 100 mL de H₂SO₄ concentrado, e mantido pelo menos 2 horas no refrigerador.

misturando suavemente. Foi realizada outra centrifugação a 5100 g por 5 min. e foi coletada novamente a fase aquosa. Repetiu-se o procedimento adicionando 500 μL de clorofórmio.

Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se um volume de isopropanol gelado. Misturou-se algumas vezes e deixou-se em repouso a -20°C durante 2 horas. Após este período, centrifugou-se o tubo a 5100 g por 30 min. descartando o sobrenadante. Lavou-se o “pellet” com solução gelada de etanol 70% e o mesmo foi seco durante 5 min. a 37°C . O “pellet” foi ressuspensionado com 50 μL de tampão de extração e incubado a 37°C por 20 min. A concentração total de ácidos nucleicos foi determinada através da medida da absorbância do material ressuspensionado a 280 nm.

3.5.8 - Pectina: As análises de pectina foram realizadas de acordo com Carré e Haynes (1992). 5,0 g de amostra seca foram colocadas num erlenmeyer de 100 mL e foi adicionado 40 mL de água destilada. Ferveu-se durante uma hora mantendo constante o volume de 40 mL. O conteúdo foi transferido para um balão de 50 mL e foi diluído até o sinal de envase. Esta solução foi filtrada usando papel de filtro Whatman número 4, e tomou-se porções de 10 mL do filtrado. Adicionou-se 10 mL de água destilada e 10 mL de NaOH 1 mol.L^{-1} e deixou repousar durante uma noite. Após o repouso, adicionou-se 5 mL de ácido acético 1 mol.L^{-1} e deixou-se a solução em repouso por 5 min. Depois, lentamente, adicionou-se 2,5 mL de CaCl_2 1 mol.L^{-1} sob constante agitação. Deixou-se em repouso durante 1 hora. A solução então foi aquecida até a ebulição e foi filtrada à quente, usando-se papel de filtro previamente tarado. Lavou-se perfeitamente o papel de filtro com água quente até eliminar todos os traços de cloreto⁷. O papel de filtro, juntamente com seu conteúdo foi dessecado a 105°C por 3 horas.

⁶ Tampão de Extração: 1,5 mL de TRIS-HCl $1,0\text{ mol.L}^{-1}$ (pH 8,0) + 0,6 mL de EDTA $0,5\text{ mol.L}^{-1}$ (pH 8,0) + 4,2 mL de NaCl 5 mol.L^{-1} + 6,0 mL de CTAB 5% + 2,55 mL de H_2O .

⁷ A presença de cloretos no filtrado de lavagem foi testado com solução de AgNO_3 1 mol.L^{-1}

3.5.9 - Digestibilidade da Matéria Seca *in vitro* (DMSIV): A digestibilidade foi determinada incubando-se a amostra com extrato de rúmen de bovinos, a 37° C, por 48 horas, seguido de 24 horas de digestão em pepsina ácida (Marten e Barnes, 1979). Esta análise foi realizada na EPAGRI em Lages (SC).

3.5.10 - Fibras: Os teores de fibras em detergente ácido (FDA) e fibras em detergente neutro (FDN), foram determinados de acordo com os métodos oficiais padrões propostos por Goering e Van Soest (1970), também realizadas na EPAGRI em Lages (SC).

3.5.11 – Determinação do Teor de Nutrientes Digestíveis Totais (NDT) e Teores de Cálcio, Fósforo e Potássio: Estas análises foram realizadas de acordo com a metodologia padrão recomendada, descritas na 16ª edição do AOAC (1995). Análises realizadas na EPAGRI em Lages (SC).

3.6 - Determinação dos Parâmetros Fisiológicos de *Candida utilis*.

Para o estudo da possível capacidade de *C. utilis* hidrolisar polissacarídeos, foi empregada uma metodologia descrita por Teather e Wood (1982), onde se explora a capacidade do corante vermelho Congo em se ligar às ligações β -(1→3)-D-glucanas, presentes nestes polissacarídeos dissolvidos no meio de cultura com agar.

C. utilis foi inoculada nos meios CALP, PALP e XALP que continham como principal fonte de carbono a celulose, a pectina e a xilana, respectivamente. As placas inoculadas foram incubadas a 30° C durante 7 dias. Realizou-se também um teste acrescentando-se 1,0 g.L⁻¹ de glicose no meios CALP e PALP e 10,0 g.L⁻¹ de xilose no meio XALP, afim de se verificar a inibição/indução da expressão enzimática por esses monossacarídeos.

Após o período de incubação, as placas foram encobertas com uma solução aquosa de vermelho Congo (1 mg.mL⁻¹) durante 15 min. A solução de corante foi então descartada e as

placas foram tratadas com solução aquosa de NaCl 1 mol.L⁻¹, durante 15 min, para se observar os halos de hidrólise. Depois as zonas de visualização foram estabilizadas embebendo o agar com solução de HCl 1 mol.L⁻¹ durante 15 minutos. A coloração passou a azul e a atividade enzimática foi inibida.

Após a obtenção dos resultados da hidrólise de polissacarídeos por *C. utilis*, realizou-se uma fermentação submersa do bagaço de maçã com a levedura, nas condições descritas previamente, e após 7 dias de fermentação, o meio foi filtrado em membrana Millipore (0,45 µm) e o filtrado foi utilizado para determinar a presença de atividade de enzimas hidrolíticas e oxidativas.

3.6.1 - Determinação da Atividade de Celulases: A atividade de celulase (E.C.3.2.1.4) foi determinada como a atividade sobre papel de filtro (FPase) segundo metodologia de Mendels, Andreotti e Roche (1976). Incubou-se uma tira de papel de filtro Watman no. 1 (2 x 1 cm), enrolada, com 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 4,8 e 0,5 mL do caldo enzimático filtrado, a 50° C por 60 min., sem agitação (Mandels *et al.* 1976). Após a incubação, foi determinada a concentração de açúcares redutores no meio, utilizando o método de DNS (Miller, 1959), de forma a determinar a quantidade de glicose liberada durante a incubação. Uma amostra sem adição da tira de papel (branco) foi analisada para se obter a concentração de açúcares presentes no caldo enzimático. Uma curva padrão foi obtida a partir da glicose (1 a 5 mmol.L⁻¹) e definiu-se como uma unidade de atividade enzimática a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 µmol de glicose por minuto a 50° C.

3.6.2 - Determinação da Atividade de Xilanases: A atividade de xilanases extracelulares (E.C. 3.2.1.8 / E.C. 3.2.1.32 / E.C. 3.2.1.136) foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da xilana, usando o método de Bailey, Korcak e Anderson. (1992). Uma solução de xilana foi preparada a partir de 1g de xilana comercial (birchwood), dissolvida

em 80 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,3. A solução foi aquecida até a ebulição e após retornar a temperatura ambiente, o volume foi completado para 100 mL usando o mesmo tampão. Foi colocada em tubos de ensaio 0,9 mL da solução de xilana e estes incubados a 50° C por 5 min. Então foi adicionado 100 µL do caldo enzimático, seguido de incubação a 50° C por mais 5 min. Após este período a concentração de açúcares redutores foi determinada de acordo com Miller (1959). Uma curva padrão foi construída utilizando-se diferentes concentrações de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 µmol de xilose por min. a 50° C. Amostras sem adição do caldo enzimático também foram analisadas para se obter o valor da amostra em branco.

3.6.3 - Determinação da Atividade de Pectinases: A atividade global de pectinases foi determinada usando um método espectrofotométrico para pectinase fúngica, proposta por Vilariño *et al.* (1993). Um volume de solução aquosa de verde de bromocresol (0,017%) foi adicionado a 10 volumes de solução aquosa de pectina de maçã (0,5%), e o pH foi ajustado para 5,1 utilizando NaOH 1 mol.L⁻¹. A reação foi monitorada à 617 nm em um espectrofotômetro E-225-D. Após a determinação da absorbância de 1,95 mL da solução de pectina-corante, a reação iniciou-se pela adição de 50 µL de caldo enzimático, anotando-se o decréscimo da absorbância a 617 nm ($\Delta A_{617 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$) após 30 segundos.

Uma curva padrão foi construída usando-se diferentes quantidades de ácido galacturônico em vez da amostra enzimática, de forma a determinar a equivalência entre $\Delta A_{617 \text{ nm}}$ e µmol de grupos carboxílicos liberados. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 µmol de grupo carboxílico por min.

3.6.4 - Determinação da Atividade de Peroxidases Extracelulares: A atividade de peroxidases extracelulares independente de manganês foi determinada através da medida do aumento na A_{525} com seringaldazina $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (dissolvida em etanol) em tampão tartarato de sódio, pH 4,2 ($\epsilon = 65000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), como substrato, na presença de H_2O_2 $4,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar $1 \mu\text{mol}$ de substrato por min.

3.6.5 - Determinação da Atividade de Lacase: A atividade de lacase (E.C. 1.10.3.2) foi determinada de acordo com o método descrito por Buswell *et al.* (1996). Mediu-se no aumento da A_{420} empregando ABTS ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) em tampão acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,0 ($\epsilon = 36.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), como substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar $1 \mu\text{mol}$ de substrato por min.

3.6.6 - Determinação da Atividade de Manganês Peroxidase: A atividade da peroxidase dependente do íon Mn (II), foi medida usando vermelho de fenol ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) como substrato ($\epsilon = 4.460 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de acordo com a metodologia descrita por Kuwahara *et al.* (1984).

Foi adicionado em $500 \mu\text{L}$ do caldo enzimático $100 \mu\text{L}$ de solução estoque de vermelho de fenol ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$), $100 \mu\text{L}$ de lactato de sódio (250 mmol.L^{-1}), $200 \mu\text{L}$ de albumina bovina (0,5%), $50 \mu\text{L}$ de sulfato de manganês (2 mmol.L^{-1}) e $50 \mu\text{L}$ de H_2O_2 (2 mmol.L^{-1}) em tampão succinato (20 mmol.L^{-1}), pH 4,5. A solução resultante foi incubada por 5 min. a 30°C e a reação foi interrompida pela adição de $40 \mu\text{L}$ de NaOH (2 mol.L^{-1}). A absorbância medida a 610 nm e uma unidade de manganês peroxidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar $1 \mu\text{mol}$ de vermelho de fenol por mL por min. Uma análise sem adição de sulfato de manganês foi realizada para garantir a dependência do manganês pela atividade peroxidase observada.

3.7 - Fermentação em Estado Sólido do Bagaço de Maçã por *Pleurotus ostreatus* var. *roseus*:

Foram acondicionados em recipientes metálicos, 40 g de bagaço de maçã pré-tratado com *C. utilis* durante 6 dias e 40 g de bagaço não tratado (puro), em duplicata, e foram esterilizados e inoculados com 10 círculos de micélio-agar provenientes do cultivo em meio BDA + L por 7 dias à 25° C. A incubação ocorreu durante 30 dias a 25° C e os recipientes metálicos foram aerados constantemente através de mini compressores de ar (Anexo - Fig. 7.8).

No final do processo foram avaliados os parâmetros químicos e bromatológicos de acordo com a metodologia proposta para análise do substrato fermentado por *C. utilis*.

Foram também avaliados alguns parâmetros de crescimento e fisiológicos de *P. ostreatus*, de forma a otimizar as condições de fermentação. Um deles foi a determinação da diferença da taxa de crescimento do *P. ostreatus* sobre o bagaço pré-tratado com *C. utilis* e o não tratado, acompanhando-se o crescimento linear do fungo, utilizando tubos de vidros preenchidos com os diferentes substratos (em triplicata) e tampados com algodão de ambos os lados, como está demonstrado na Figura 7.9 (Anexos). O fungo foi inoculado em um dos lados com um círculo de micélio-agar de 10 mm provenientes da cultura em BDA+L e o crescimento micelial linear foi medido a cada 2 dias, até a colonização completa do substrato.

Outro parâmetro fisiológico avaliado foi o efeito da adição de quatro fontes diferentes de nitrogênio, aquelas mesmas usadas na otimização da fermentação submersa do bagaço de maçã por *C. utilis*, sob a velocidade específica de crescimento do *P. ostreatus* em meio semi-sólido. Foram adicionados NaNO_3 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ e Uréia, em duas concentrações (5,0 g.L^{-1} e 10,0 g.L^{-1}), no meio MEA. Os testes foram realizados em duplicatas e o crescimento radial foi medido em quatro direções, a cada 2 dias.

Para se otimizar o processo fermentativo em estado sólido foi realizado outra fermentação utilizando bagaço de maçã fermentado por *C. utilis* durante 36 horas, acrescido de 10,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio. O pH inicial do bagaço foi corrigido para 5,5 com hidróxido de sódio e foi adicionado sulfato de manganês na concentração de 600 µg.g⁻¹. O substrato foi hidratado até apresentar 80% de umidade e foi inoculado de acordo com o primeiro ensaio em estado sólido. O material foi incubado a 25° C durante 60 dias, sem aeração.

4.0 - RESULTADOS

4.1 - Identificação da *Candida utilis*:

Os resultados obtidos do metabolismo de diversos açúcares por *C. utilis* CCT 3469 estão apresentados na Tabela 4.1. Estes resultados foram comparados com a bibliografia (Kurtzman e Fell, 1998). A cepa de *C. utilis* CCT 3469 não apresentou diferenças quanto a capacidade de metabolizar os diferentes açúcares.

Tabela 4.1: Metabolismo de diversos açúcares por *Candida utilis* (CCT 3469)

Açúcares Testados	Leveduras	
	<i>Candida utilis</i> CCT 3469	<i>Candida utilis</i> ¹
Glicose	+	+
Maltose	+	+
Sacarose	+	+
Galactose	-	-
Lactose	-	-
Rafinose	+	+
Inulina	-	+/w
Celubiose	+	+
Trealose	+	+
Ribose	-	-
Melezitose	+	+
Xilose	+	+
Arabinose	-	-

¹ Fonte: Kurtzman e Fell (1998).

4.2 - Preparo do Inóculo de *Candida utilis* em meio LMPD:

C. utilis teve uma velocidade específica de crescimento no meio LMPD de $0,2 \text{ h}^{-1}$ (Anexo, Fig. 7.10 e 7.11). O gráfico da Figura 4.1 mostra o aumento da biomassa (g. L^{-1}) assim como variação no número das células viáveis e inviáveis. Observou-se uma fase lag com 20 horas de duração, seguida por uma fase exponencial de aproximadamente 40 horas, interrompida por uma diauxia que durou cerca de 5 horas. A cultura atingiu a fase

estacionária apresentando cerca de $5,0 \text{ g. L}^{-1}$ de biomassa. Após 70 horas de fermentação as células entraram em declínio, que foi acompanhado pela diminuição da biomassa e acentuado abaixamento no número de células viáveis no meio de cultura. As avaliações do crescimento usando-se a biomassa seca coincidiram com a contagem direta do número de células, mostrando que ambos os métodos foram estimativas viáveis para avaliação do sistema. A correlação encontrada entre biomassa seca e números de células no meio fermentativo está ilustrada no Anexo Fig. 7.13.

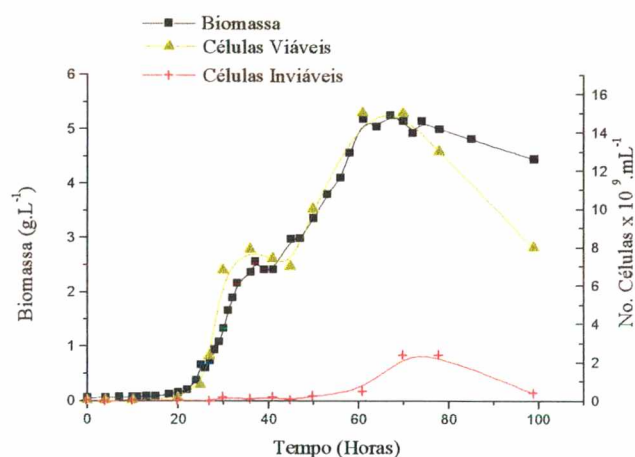


Figura 4.1 – Curva de Crescimento de *C. utilis* em meio LMPD, a 30° C , sob agitação constante, avaliado através da medida de biomassa seca e do número de células viáveis e inviáveis..

O número de células inviáveis durante o cultivo de *C. utilis* em meio LMPD manteve-se bastante reduzido, sendo observado um aumento somente após a cultura ter atingido sua fase estacionária de crescimento.

Os resultados da segunda curva de crescimento de *C. utilis* em meio LMPD efetuada para confirmação da velocidade específica de crescimento e duração da fase lag, repetiram estes valores sendo que a fase lag durou apenas 10 horas. Entretanto a fase exponencial manteve-se a duração aproximada de 40 horas, também apresentando uma diauxia durante a fase exponencial no mesmo período encontrado no primeiro ensaio. A fase estacionária foi alcançada após 50 horas de fermentação, apresentando a mesma concentração de biomassa do primeiro ensaio ($5,0$

g.L^{-1}). Por outro lado, neste segundo ensaio o número de células inviáveis manteve-se baixo durante o período da fermentação. A curva do segundo ensaio está apresentada no Anexo (Fig. 7.12).

O tamanho e o volume celular de *C. utilis* apresentaram alterações durante o processo fermentativo e observou-se um considerável aumento no número de células menores após 40 horas de cultivo no meio LMPD, coincidindo, com o aparecimento da diauxia que interrompeu a fase exponencial. Entretanto, as células menores (atípica) ocorreram mesmo antes da diauxia, entretanto elas estavam em menor percentagem do que às células normais (típicas). Após esta fase, verificou-se um grande aumento na percentagem de células menores na população microbiana do meio fermentativo, como está ilustrado na Figura 4.2.

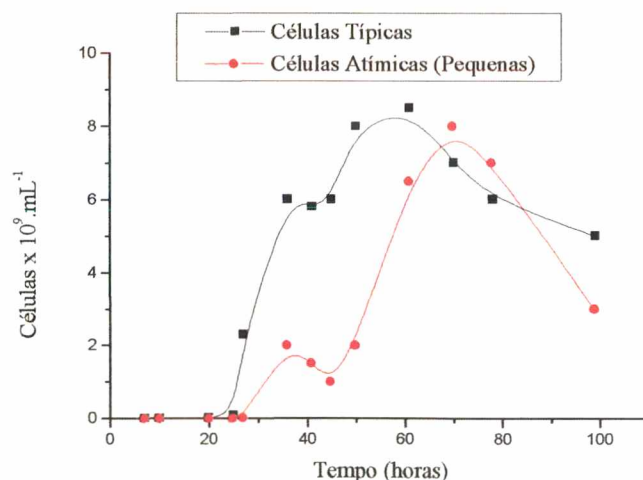


Figura 4.2 – Curva de crescimento de *C. utilis* avaliando o dimorfismo celular durante o cultivo em meio LMPD, a 30°C , sob aeração constante.

A variação na dimensão de *C. utilis* está representada na Figura 4.3, que apresenta a diferença de tamanho entre uma célula típica, maior (A), e uma célula atípica, pequena (B).

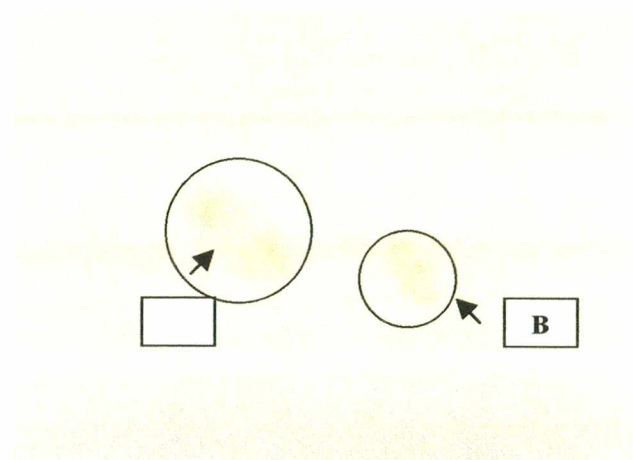


Figura 4.3 – Fotomicrografia de *C. utilis* cultivada em meio LMPD, em preparação a fresco entre lâmina e lamínula, evidenciando a diferença morfológica entre uma célula típica (A) e uma célula que teve seu tamanho alterado (B). Preparação à fresco (1000x).

4.3 - Fermentação Submersa do Bagaço de Maçã por *Candida utilis*:

A fermentação do bagaço de maçã por *C. utilis* proporcionou um decréscimo de 80% no teor de açúcares livres do bagaço, convertendo-o, principalmente em proteínas, que teve seu teor aumentado de 4,1 % (p/p) para 8,3% (p/p), ou seja um aumento de 100%. Verificou-se também aumento na concentração de sais minerais disponíveis de 2,0% (p/p) para 2,6% (p/p), bem como um considerável aumento no teor de nutrientes digestíveis totais (Tabela 4.2).

A digestibilidade da matéria seca *in vitro* aumentou após o tratamento com *C. utilis*, sendo observado 8,2 % de incremento na digestibilidade em apenas 6 dias de fermentação.

O bagaço fermentado foi enriquecido nutricionalmente, visto que, além do aumento no teor protéico e maior digestibilidade, já mencionados acima, o teor de três elementos importantes na dieta dos animais, cálcio (Ca), fósforo (P) e potássio (K). Estes elementos aumentaram após a fermentação em 20%, 30% e 23% respectivamente.

Outro fator nutricional importante é o teor de nutrientes digestíveis no bagaço tratado, que são aqueles nutrientes capazes de serem metabolizados pelos animais. Eles também tiveram um aumento de cerca de 16%, passando de 53,4 % (p/p) para 61,8 % (p/p) .

Tabela 4.2: Parâmetros químicos e bromatológicos do bagaço de maçã antes e após fermentação por 6 dias, com *Candida utilis*.

Parâmetros	Tratamentos	
	Não Fermentado	Fermentado
	-----%(p/p)-----	
açúcares redutores totais	15,0	3,0
Proteína bruta	4,1	8,3
Fibra em detergente ácido (FDA)	29,2	33,8
Fibras em detergente neutro (FDN)	40,3	45,8
Digestibilidade (DMSIV)	58,5	63,3
Nutrientes digestíveis Totais (NDT)	53,4	61,8
Ácidos Nucléicos Totais	0,002	0,003
Cinzas	2,0	2,6
Fósforo	0,07	0,09
Cálcio	0,10	0,12
Potássio	0,43	0,53

O teor de ácidos nucléicos totais, embora tenha aumentado em 50 %, apresentou uma concentração baixa (0,003 % p/p), que dificilmente representaria risco para saúde do animal, principalmente em se tratando de ruminantes, que metabolizam completamente estas moléculas sem danos ao seu organismo (Durán, 1989).

Embora a digestibilidade do bagaço fermentado tenha aumentado, o teor de fibras, tanto FDA como FDN, também aumentou. Ocorreu uma marcante degradação da fração solúvel da lignina, avaliada como lignina Klason solúvel (Figura 4.4). *C. utilis* degradou aproximadamente 76% de lignina Klason solúvel, fato que constitui num resultado inédito no que se refere ao metabolismo de leveduras, que não são citadas na bibliografia como microrganismos degradadores de lignina. Já a fração insolúvel da lignina manteve-se intacta.

Os polissacarídeos dosados também apresentaram uma pequena degradação após a fermentação. O teor de celulose diminuiu 7,8% e o de pectina 16%.

No estudo de otimização do tempo de fermentação e consumo de açúcares, foi observado um consumo de aproximadamente 90 % do açúcares do meio fermentativo, ao final

de 72 horas de fermentação, sem a adição de fontes extras de nitrogênio. Por outro lado, a adição de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de uma fonte extra de nitrogênio aumentou o consumo de açúcares, visto que no mesmo período de fermentação, foi possível consumir cerca de 98% dos açúcares livres quando acrescentado uréia ou fosfato de amônio. A adição de nitrato de sódio e sulfato de amônio permitiu as leveduras consumirem cerca de 97% dos açúcares em 72 horas.

Na definição dos parâmetros cinéticos de crescimento de *C. utilis* no bagaço de maçã verificou-se que o consumo de açúcares no bagaço acrescido de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio, durante 6 dias, atingiu seu valor máximo em apenas 24 horas de fermentação (Figura 4.5- A), consumindo cerca de 90% dos açúcares redutores livres no meio de cultura.

A Figura 4.5 (B) evidencia a variação na concentração de açúcares redutores após as primeiras 24 horas de fermentação. Os resultados expressos no gráfico permitem sugerir que moléculas de açúcares redutores devem estar sendo liberadas a partir da hidrólise de polissacarídeos presentes no substrato.

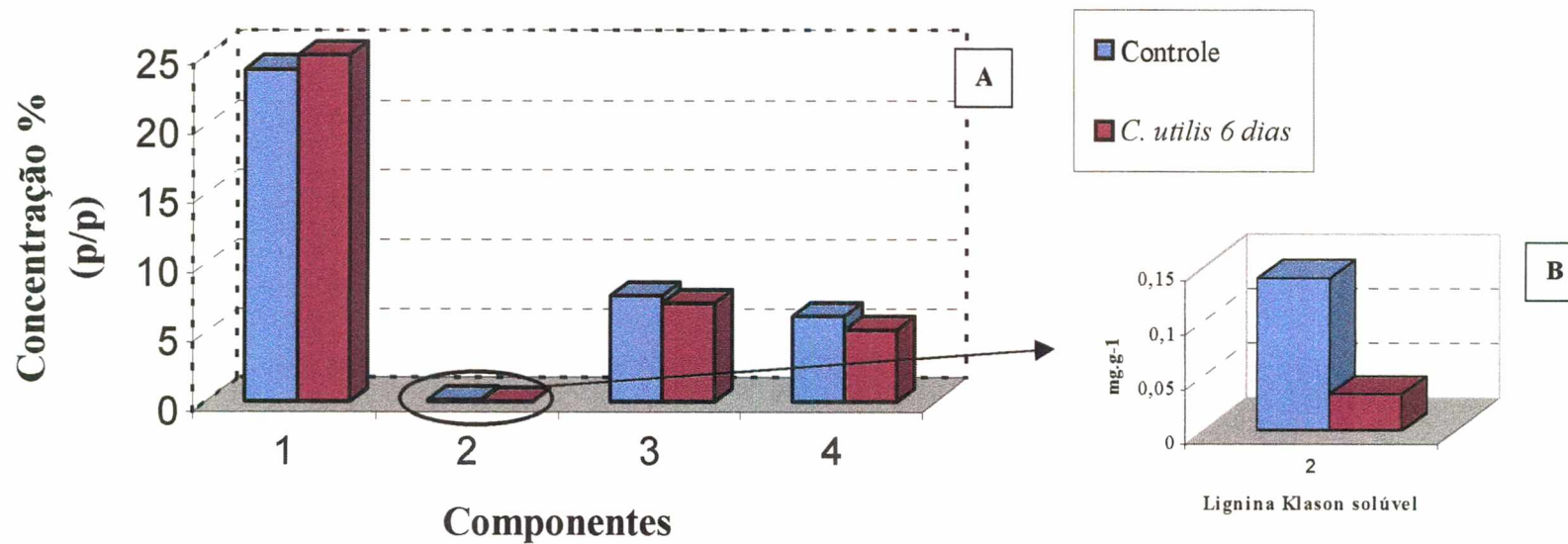


Figura 4.4: A) Concentração dos componentes poliméricos do bagaço de maçã antes e depois do tratamento com *Candida utilis* em fermentação submersa durante 6 dias. 1- Lignina Klason; 2- Lignina Klason solúvel; 3- Celulose e 4- Pectina. B) Concentração de lignina Klason solúvel (mg.g⁻¹).

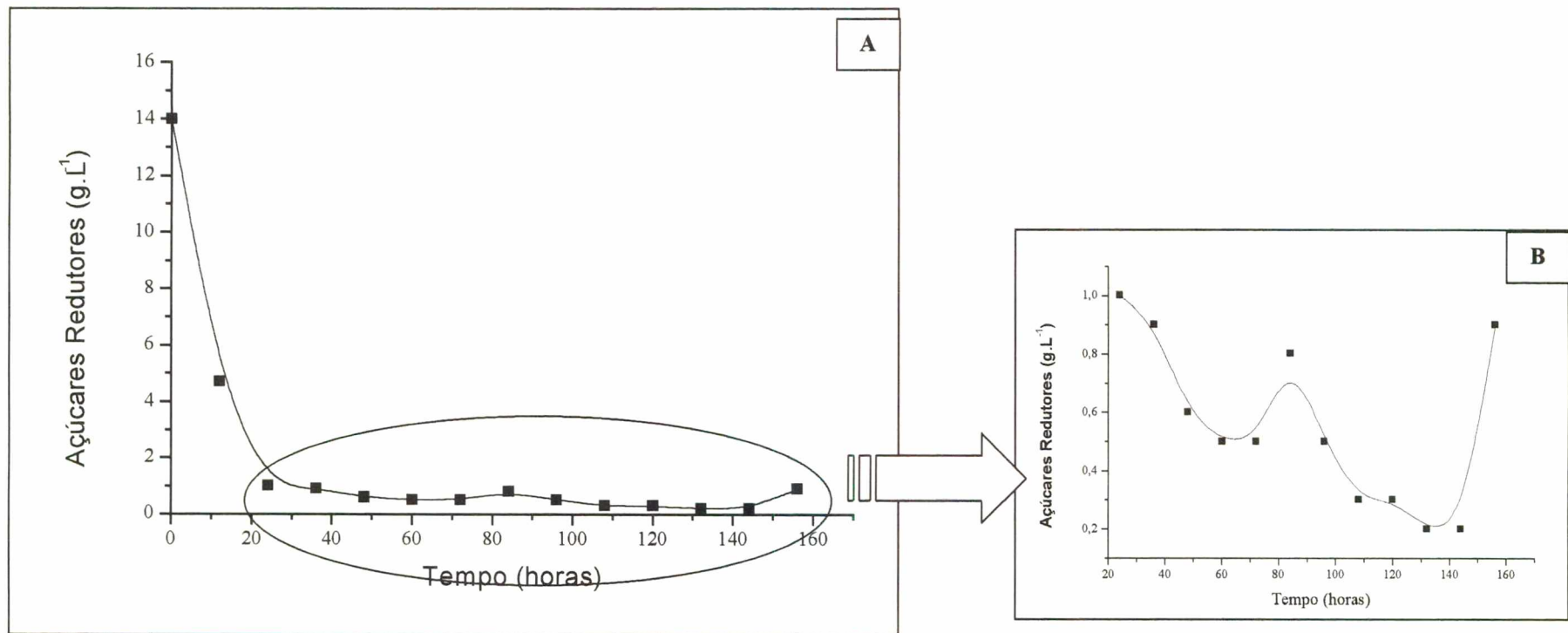


Figura 4.5: A) Consumo de açúcares durante fermentação submersa do bagaço de maçã por *C. utilis*, acrescido de sulfato de amônio 1% (p/v). B) Variação no teor de açúcares após 20 horas de fermentação.

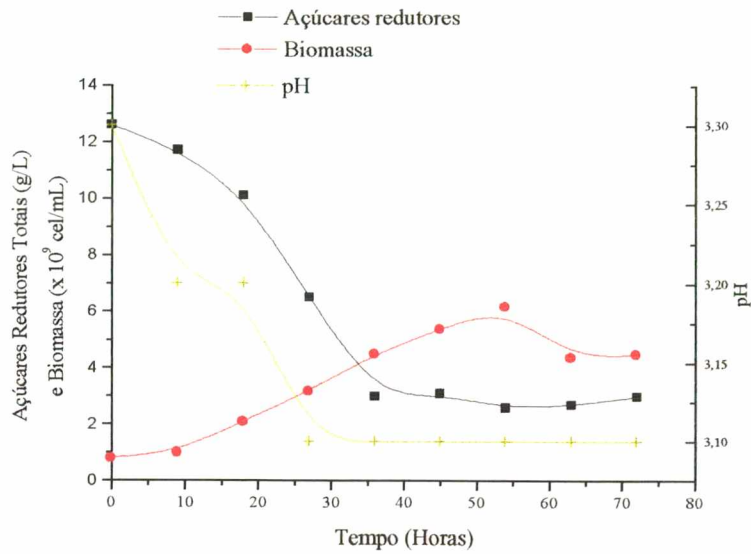


Figura 4.6 - Curva de crescimento de *C. utilis* em bagaço de maçã sem adição de fonte extra de nitrogênio.

A fermentação do bagaço de maçã por *C. utilis* sem adição extra de nitrogênio atingiu o seu consumo máximo de açúcar em torno de 45 horas de fermentação, consumindo cerca de 96 % dos açúcares livres no substrato de cultivo (Figura 4.6). Neste período a cultura atingiu a fase estacionária, apresentando em torno de 6×10^9 cel. mL⁻¹. Não se observou grande redução do pH durante este período, nem a presença de uma fase lag típica.

Já durante a fermentação em que foi adicionado 10,0 g.kg de sulfato de amônio no meio fermentativo, o consumo de açúcares atingiu seu máximo valor após 34 horas de fermentação (Figura 4.7). A biomassa produzida neste período foi de $7,2 \times 10^9$ cel. mL⁻¹, e foi observado uma maior redução do pH. Entretanto, também não foi observada uma fase lag típica.

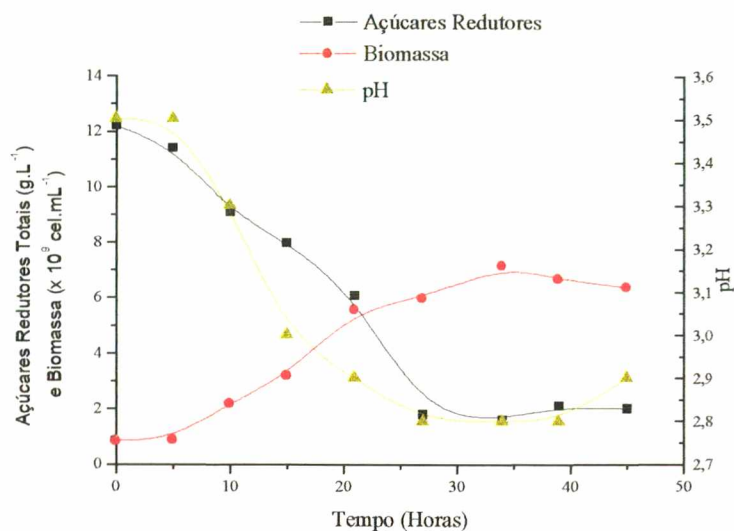


Figura 4.7 - Curva de crescimento de *C. utilis* em bagaço de maçã acrescido de 1% (p/p) de sulfato de amônio.

A velocidade específica de crescimento (μ_{\max}) para *C. utilis* em bagaço de maçã, sem a adição de sulfato de amônio, foi $0,05 \text{ h}^{-1}$ (Anexo, Fig. 7.15), e com a adição do sulfato de amônio esse valor duplicou atingindo $0,09 \text{ h}^{-1}$ (Anexo, Fig. 7.16). Por outro lado, o fator de conversão de açúcares em biomassa, no processo fermentativo sem a adição do sulfato de amônio, foi ligeiramente superior ao encontrado no processo contendo sulfato de amônio (Figuras 4.8 e 4.9). Mas mesmo assim, a produtividade em biomassa do processo com adição de sulfato de amônio foi de $0,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, contra $0,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ sem a adição de fonte extra de nitrogênio.

Todavia, é importante ressaltar que a diminuição no tempo de fermentação refletiu negativamente no teor de proteínas convertidas pela *C. utilis*. Após as 54 horas de fermentação com *C. utilis* sem fonte adicional de nitrogênio, o teor de proteínas do bagaço aumentou cerca de 52,3%. Já na fermentação onde foi adicionado sulfato de amônio no meio fermentativo, o teor de proteínas no bagaço de maçã foi menor, apresentando aumento de somente 31% após 35 horas de fermentação.

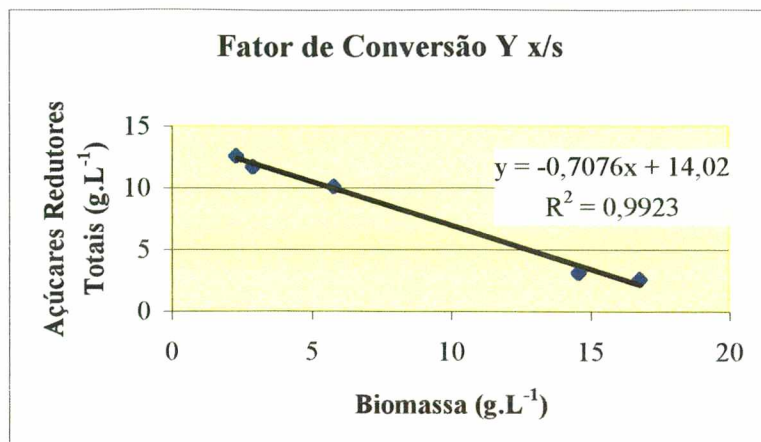


Figura 4.8 - Fator de conversão de substrato em biomassa durante fermentação do bagaço de maçã por *Candida utilis* sem fonte adicional de nitrogênio.

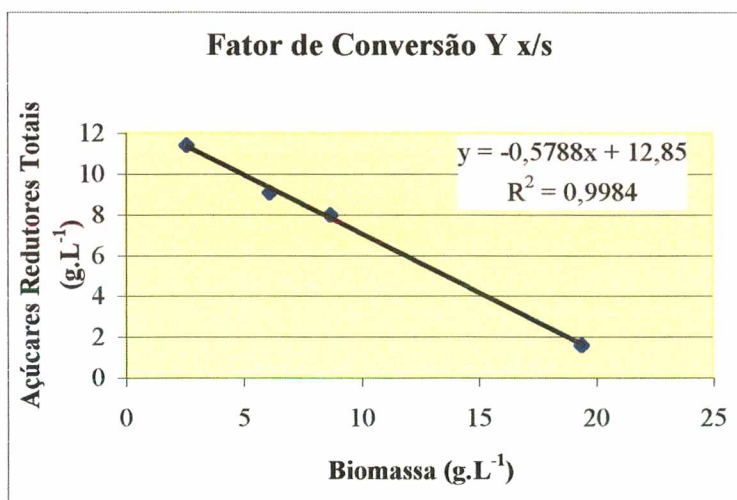


Figura 4.9 - Fator de conversão de substrato em biomassa durante fermentação do bagaço de maçã por *Candida utilis* com fonte adicional de nitrogênio.

Cultivando *C. utilis* em meio mínimo contendo um dos três principais polissacarídeos encontrados no bagaço de maçã — celulose, xilana e pectina — como principal fonte de carbono, verificou-se o desenvolvimento de colônias em todos os três meios. Através do uso do corante vermelho Congo, observou-se a formação de um reduzido halo de hidrólise em torno das colônias, medindo aproximadamente 1-2 mm de espessura (Figura 4.10), o que indica a liberação de enzimas hidrolíticas extracelulares para o meio de cultura.

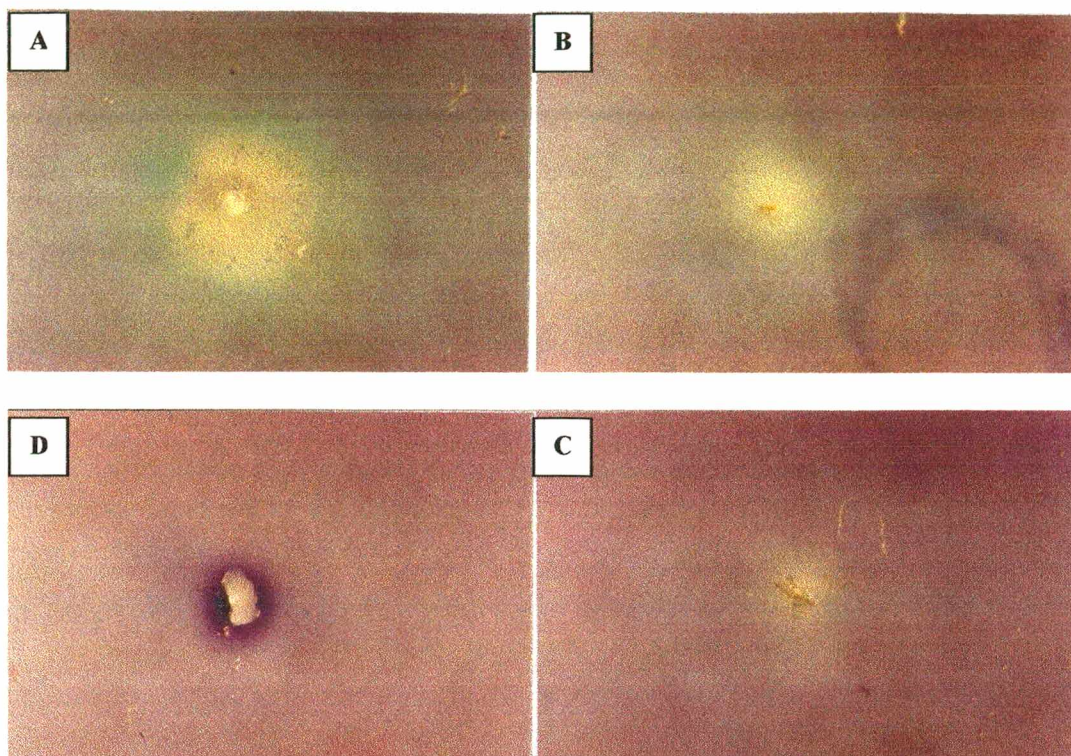


Figura 4.10 - Colônias de *Candida utilis* crescendo em meios de cultura, contendo os polissacarídeos, pectina, celulose e xilana, como única fonte de carbono. Coloração com vermelho Congo para evidenciar os halos de hidrólise dos polissacarídeos em torno das colônias. A) Meio PALP (pectina 0,2% p/v); B) Meio CALP (celulose 0,2% p/v); C) Meio XALP (xilana 0,05% p/v); D) Ponto sem inoculação (controle).

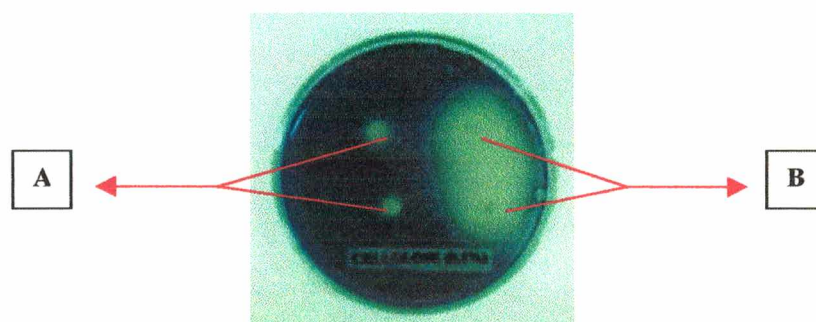


Figura 4.11 - Placa de Petri com cultura de *Candida utilis* (B) e *Saccharomyces cerevisiae* (A), cultivados em meio CALP, após aplicação do corante vermelho Congo, evidenciando os halos de hidrólise em torno das colônias de *C. utilis* (B) e a ausência do halo de hidrólise em torno das colônias de *S. Cerevisiae*(A).

Verificou-se o efeito da glicose no meio de cultura sobre a produção de enzimas celulolíticas por *C. utilis* (Figura 4.11). Observou-se a formação de um halo muito maior (1,0 cm) comparado as colônias crescidas em meio mínimo (Figura 4.10). Neste caso, não se

observou inibição da produção de enzimas celulolíticas pela presença de glicose no meio. Já as colônias crescidas em meio com pectina e glicose, e xilana e xilose, não apresentaram halo de hidrólise após coloração com vermelho Congo, demonstrando que a presença desses monossacarídeos no meio de cultura inibe a hidrólise destes polímeros.

A atividade das enzimas produzidas por *C. utilis* no metabolismo dos biopolímeros presentes no bagaço de maçã está apresentada na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Atividade enzimática de *Candida utilis* cultivada em bagaço de maçã por 7 dias a 30° C em fermentação submersa.

Enzimas	Atividade
	-----U.mL ⁻¹ -----
Pectinase	44,0
Xilanase	18,0
FPAase	17,4
Peroxidase	—
Lacase	—
Manganês Peroxidase	15,1

(—) Não foi observada atividade.

Paralelamente aos resultados obtidos em meio de cultura semi-sólido, o filtrado obtido após fermentação do bagaço de maçã por *C. utilis* durante 6 dias, apresentou atividade pectinolítica, xilanolítica e celulolítica, além da atividade de manganês peroxidase. Por outro lado, não foi observada atividade das enzimas peroxidase independente de manganês e lacase.

4.4 - Fermentação em Estado Sólido do Bagaço de Maçã por *Pleurotus ostreatus*:

Os resultados referentes ao enriquecimento nutricional dos substratos fermentados com *P. ostreatus* estão apresentados na Tabela 4.4. Após a fermentação, o bagaço que apresentava uma coloração marron, no início da fermentação, tornou-se branco e com aroma de nozes (Anexo - Fig. 7.17). O teor protéico do bagaço pré-tratado com *C. utilis* apresentou um enriquecimento de 155% após ter sido tratado com *P. ostreatus*, passando de 4,1% (p/p) de

proteína na amostra controle, para 10,5% (p/p) na amostra fermentada. Este valor superou aquele obtido no bagaço fermentado por *P. ostreatus* sem o pré-tratamento.

Tabela 4.4: Parâmetros químicos e bromatológicos do bagaço de maçã antes e após 30 dias de fermentação em estado sólido por *Pleurotus ostreatus*.

Parâmetros	Substratos			
	I	II	III	IV
	-----% (p/p)-----			
Açúcares redutores totais	15,0	3,0	16,5	9,0
Proteína bruta	4,1	8,3	5,2	10,5
Fibra em detergente ácido (FDA)	29,2	33,8	34,5	35,8
Fibras em detergente neutro (FDN)	40,3	45,8	40,8	44,2
Digestibilidade (DMSIV)	58,5	63,3	62,6	52,5
Nutrientes digestíveis Totais (NDT)	53,4	61,8	61,5	51,0
Ácidos Nucléicos Totais	0,002	0,003	0,003	0,003
Cinzas	2,0	2,6	2,4	3,2
Fósforo	0,07	0,09	0,08	0,13
Cálcio	0,10	0,12	0,12	0,13
Potássio	0,43	0,53	0,58	0,67

(I) - Bagaço não fermentado (controle); (II) - Bagaço fermentado por *Candida utilis* durante 6 dias; (III) - Bagaço sem pré-tratamento, fermentado por *P. ostreatus*; (IV) - Bagaço pré-tratado com *Candida utilis* e fermentado por *P. ostreatus*.

O bagaço fermentado sem pré-tratamento com *C. utilis* apresentou um enriquecimento no teor de proteína de apenas 25%, sendo inferior ao enriquecimento obtido pelo tratamento utilizando somente a levedura (Tabela 4.2), além do período de fermentação ter sido menor para *C. utilis* (6 dias) quando comparado ao período utilizado por *P. ostreatus* (30 dias).

Uma característica favorável ao tratamento com ambos os fungos, além do enriquecimento protéico, foi a maior disponibilização de sais minerais. Observou-se um enriquecimento no teor de fósforo, cálcio e potássio, tendo as porcentagens passadas de 0,07 %, 0,10 % e 0,43%, para 0,13%, 0,13% e 0,67%, respectivamente.

Entretanto, a digestibilidade do substrato fermentado, sequencialmente, por *C. utilis* e *P. ostreatus*, foi reduzida, podendo inviabilizar este produto para alimentação animal. A digestibilidade decresceu 10,2%, como também o teor de nutrientes digestíveis diminuiu 4,5%.

O teor de fibras (FDA e FDN) em ambos substratos tratados aumentou, resultando em uma concentração dos componentes poliméricos do substrato. A Figura 4.12 mostra que tanto a lignina Klason como a celulose tiveram suas massas concentradas após o tratamento com *P. ostreatus* em ambos os substratos avaliados. A concentração de lignina Klason solúvel, no entanto, diminuiu no tratamento com *P. ostreatus* no bagaço sem pré-tratamento, porém foi uma degradação inferior a degradação obtida com *C. utilis* em 6 dias de fermentação. Já a lignina Klason solúvel no bagaço pré-tratado com *C. utilis* não foi degradada. A fração de pectina apresentou degradação em ambos substratos, porém foi maior no substrato que não foi pré-tratado com *C. utilis*.

P. ostreatus não apresentou diferença significativa na sua velocidade específica de crescimento e colonização do bagaço de maçã pré-tratado com *C. utilis* comparado ao bagaço sem pré-tratamento. As Figuras 4.13 e 4.14 mostram os resultados obtidos através da medida de crescimento linear do *P. ostreatus* em tubos de vidro preenchidos com os substratos em questão. Na Figura 7.9 (Anexo) são apresentados os tubos contendo bagaço de maçã, colonizados pelo fungo.

Os ensaios realizados para avaliar a sensibilidade do *P. ostreatus* à diferentes fontes de nitrogênio, mostram que este fungo necessita de um tempo maior para se adaptar à presença de alguns sais nitrogenados (Figura 4.15).

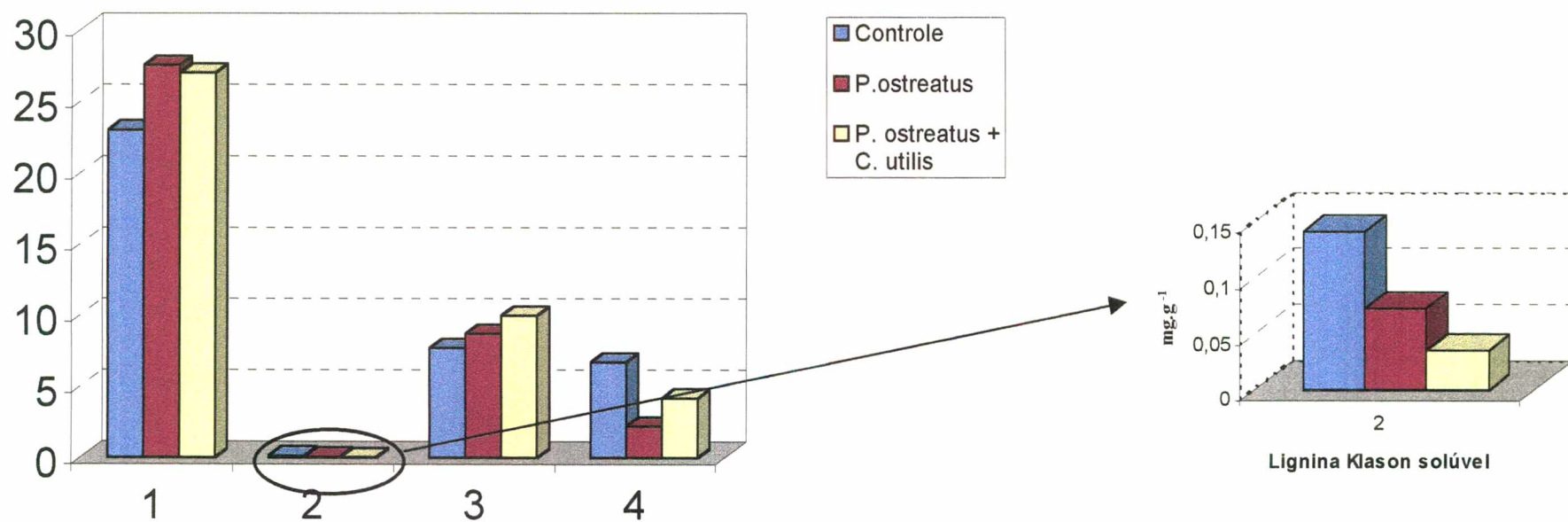


Figura 4.12 - (A) Concentração dos componentes poliméricos do bagaço de maçã antes e após o tratamento com *Pleurotus ostreatus*. **1:** Lignina Klason (% p/p); **2:** Lignina Klason solúvel (mg/g); **3:** Celulose (% p/p); **4:** Pectina (% p/p). (B) Lignina Klason solúvel (mg/g), menor escala.

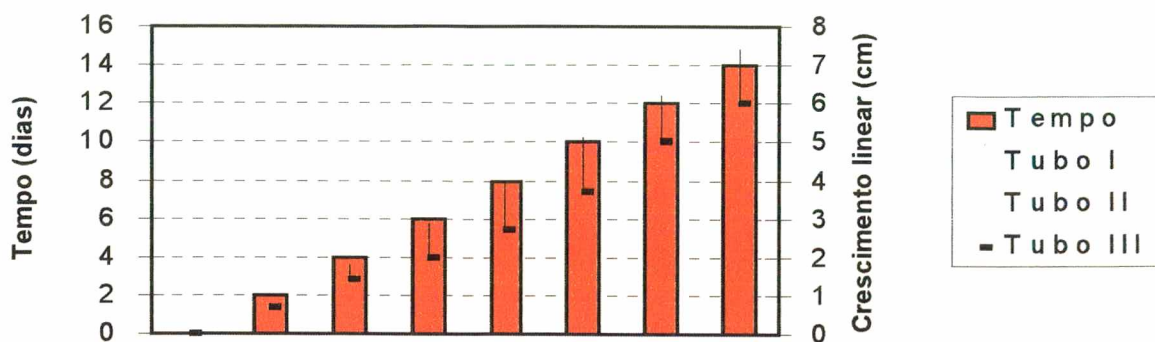


Figura 4.13 - Crescimento linear do fungo *Pleurotus ostreatus* sobre bagaço de maçã não tratado com *Candida utilis*. Os tubos I, II e III são triplicatas.

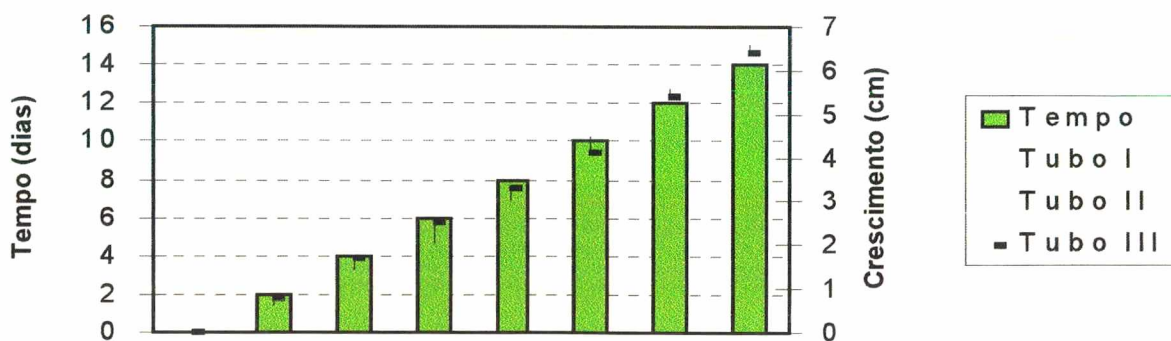


Figura 4.14 - Crescimento linear do fungo *Pleurotus ostreatus* sobre bagaço de maçã tratado com *Candida utilis* durante 6 dias. Os tubos I, II e III são triplicatas.

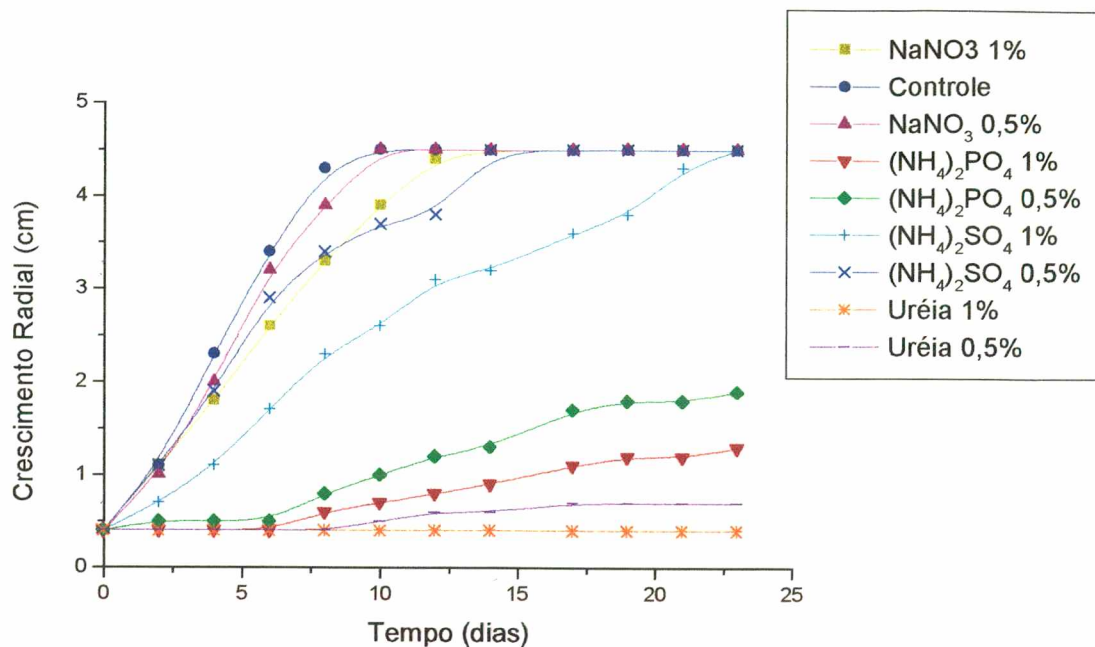


Figura 4.15 - Crescimento radial de *Pleurotus ostreatus* sobre meio MEA acrescido de diferentes sais nitrogenados, a 25° C.

Foi observada uma fase de latência (lag) de crescimento quando *P. ostreatus* foi inoculado em meio MEA acrescido de fosfato de amônio 10,0 g.L⁻¹ e 5,0 g.L⁻¹ e uréia 5,0 g.L⁻¹. A fase lag teve uma duração de 6 a 8 dias de incubação. A adição de nitrato de sódio e sulfato de amônio não impediu a colonização do fungo, porém o período gasto para colonização foi maior do que o meio sem adição de sais (controle). Por outro lado, uréia 10,0 g.L⁻¹ inibiu completamente o crescimento do fungo no meio de cultura.

Embora os meios de cultura contendo sais de nitrato de sódio e sulfato de amônio tenham sido colonizados completamente pelo *P. ostreatus*, as velocidades específicas de crescimento nestes meios foram em média 50% menores que a encontrada no meio controle (Tabela 4.5). As velocidades específicas de crescimento radial menores foram para o meio de cultura contendo fosfato de amônio.

Tabela 4.5: Velocidade específica de crescimento radial de *Pleurotus ostreatus* em meio MEA acrescido de diferentes concentrações e fontes de nitrogênio.

Parâmetro ----- dia ⁻¹ -----	Fontes de Nitrogênio									
	Controle	NaNO ₃		(NH ₄) ₂ SO ₄		(NH ₄) ₂ PO ₄		Uréia		
		5,0	10,0	5,0	10,0	5,0	10,0	5,0	10,0	
		-----g.L ⁻¹ -----								
μ_{\max}	0,44	0,23	0,18	0,24	0,22	0,08	0,06	0,10	0,0	

Por último, quando *P. ostreatus* fermentou o substrato durante 60 dias, não foi verificada considerável degradação da lignina. O teor de lignina Klason foi concentrado durante o processo fermentativo (Figura 4.16), e o teor de lignina Klason solúvel diminuiu significativamente, podendo, entretanto, ter melhorado a digestibilidade do substrato fermentado.

A fração celulósica sofreu uma insignificante degradação de 6,5% e a pectina foi totalmente consumida durante os 60 dias de fermentação. Por outro lado, a concentração de açúcares redutores livres encontrada no bagaço foi praticamente nula e o teor de proteínas teve um aumento de 500% comparado ao bagaço não tratado.

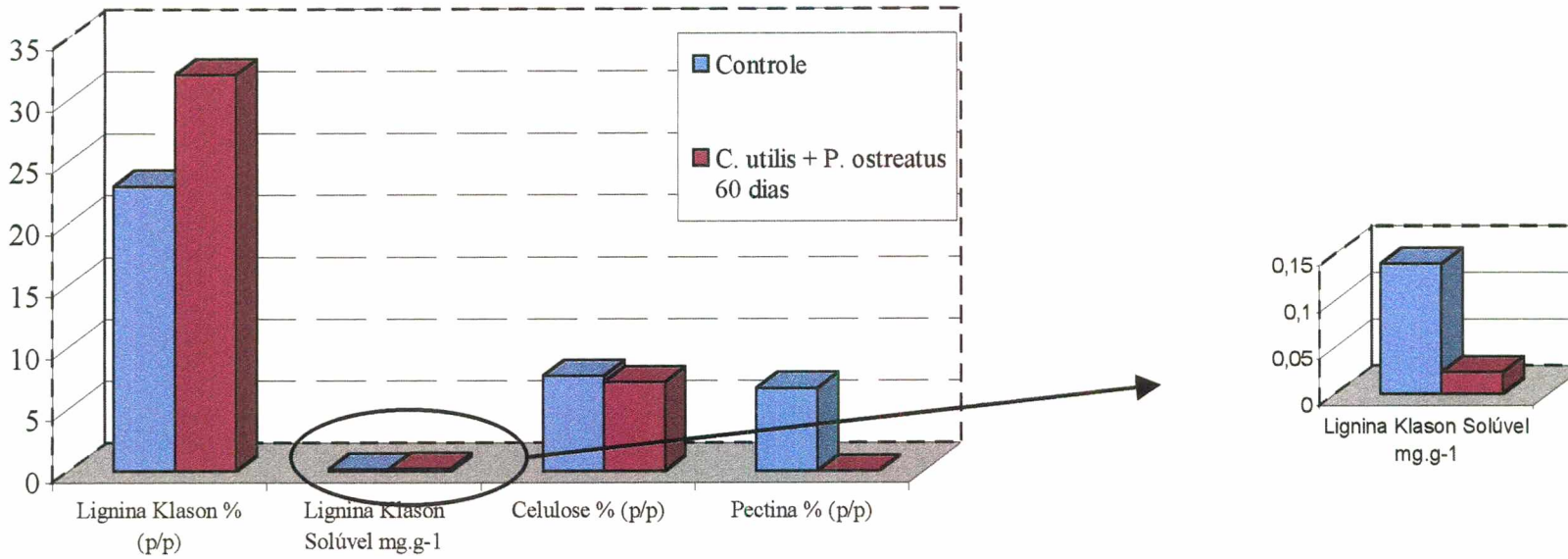


Figura 4.16 - Concentração dos componentes poliméricos do bagaço de maçã, antes e após o tratamento com *Pleurotus ostreatus* durante 60 dias em bagaço de maçã pré-tratado com *Candida utilis*.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Preparo do Inóculo de *Candida utilis*

A fermentação do bagaço de maçã por *Candida utilis* permitiu reduzir o teor de açúcares livres acompanhado do enriquecimento de proteínas e sais minerais bem como do aumento na digestibilidade do substrato.

Para um processo fermentativo ser eficiente a preparação do inóculo é fundamental, existindo certos requisitos que devem ser avaliados. Um deles é a velocidade específica de crescimento do microrganismo no meio de cultura selecionado. *C. utilis* apresentou μ_{max} no meio LMPD de $0,2 \text{ h}^{-1}$, sendo inferior ao resultado obtido por Ahmad e Holland (1995), quando cultivaram esta levedura em fermentação em batelada, usando glicose como única fonte de carbono. Os pesquisadores conseguiram obter um μ_{max} de $0,6 \text{ h}^{-1}$, verificando que a velocidade específica de crescimento de *C. utilis* aumentou a medida que se aumentou o fornecimento de O_2 . Portanto, é possível concluir que o valor de μ_{max} obtido na preparação do inóculo em LMPD possa ser devido a limitação de oxigenação que o sistema utilizado apresentou.

Apesar do valor do μ_{max} na curva de crescimento de *C. utilis* ter sido idêntico nos dois ensaios realizados, a fase lag de crescimento mais longa no primeiro ensaio do que no segundo. Esse fato ocorreu porque a biomassa viável inoculada em cada ensaio variou. No primeiro ensaio a amostra no momento da inoculação apresentou $17 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ viáveis, e no segundo, este valor foi de $117 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$. Esta diferença no inóculo de ambos ensaios resultou da imprecisão no método de inoculação usando alça de platina.

Por outro lado, é importante ressaltar que o número de células inviáveis no meio de cultura, durante o crescimento, só aumentou em apenas um dos ensaios, o primeiro, e ocorreu após a cultura ter atingido a fase estacionária de crescimento. Desta forma, o inóculo constituído por células na fase exponencial incluiu células na sua maioria viáveis.

Outra característica importante na curva de crescimento de *C. utilis* foi a diauxia após aproximadamente 20 horas de fase exponencial, presente nos dois ensaios, e que se caracterizou por uma breve fase estacionária durante a fase log. É possível que a alteração morfológica das células de *C. utilis* durante processo fermentativo, também observada por diversos pesquisadores (Pozmogova *et al.* 1978; Straskrabová, Páca e Králícková, 1980; Samoilenko e Petrikevich, 1881; Vorob'eva e Filonenko, 1982; Lirova *et al.* 1986; Lucca *et al.* 1991; Votruba e Vraná, 1995), tenha afetado o metabolismo celular da levedura, impedido a sua multiplicação, tal como uma típica fase de latência.

Constatou-se marcante diminuição no volume e comprimento das células após a diauxia no decorrer da fase exponencial. Muitas células apresentavam dimensões típicas, porém o número de células atípicas e menores aumentou consideravelmente durante este período de latência (Figuras 16 e 17). Resultados semelhantes foram encontrados por Vorob'eva e Filonenko (1982), que explicaram este tipo de alteração morfológica pelas baixas disponibilidades de oxigênio ou de glicose. Dessa forma, nos dois ensaios realizados a alteração morfológica pode ter decorrido da redução na disponibilidade de glicose no meio de cultura, bem como da oxigenação, em virtude do aumento na concentração celular, embora a velocidade de agitação tenha sido mantida constante.

Lirova *et al.* (1986) observaram também uma diminuição na dimensão das células sob condições limitantes de carbono. Entretanto, estes pesquisadores relacionaram também os valores baixos de pH do meio de cultura, com a diminuição na dimensão celular e formação de agregados. É possível que para além da redução de glicose a consequente redução do pH possa ter influenciado a alteração morfológica da levedura, embora não tenha sido detectada a formação de agregados celulares.

A decisão de se utilizar o inóculo com $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa microbiana, foi estabelecida porque este constitui um valor suficiente de biomassa para se iniciar uma

fermentação em batelada, ao mesmo tempo que pouco tempo (~48 horas) foi requerido para sua obtenção. Outro fator importante considerado foi o fato das células não terem ainda atingido, ao final deste período, a fase estacionária de crescimento, evitando assim um possível aumento no número de células inviáveis.

5.2 – Fermentação Submersa do Bagaço de Maçã por *Candida utilis*

No final da primeira fermentação submersa do bagaço de maçã por *C. utilis*, observou-se uma redução em cerca de 80% no teor de açúcares redutores totais, deixando o bagaço com apenas 3% de açúcares livres. Rahmat *et al.* (1995) conseguiram eliminar totalmente os açúcares do bagaço de maçã empregando *C. utilis* durante 72 horas de fermentação. Entretanto o processo fermentativo em estado sólido e o substrato foi suplementado com 10 g.L⁻¹ de sulfato de amônio.

Já em relação ao incremento no teor de proteínas do bagaço de maçã após o tratamento com *C. utilis* foi alto quando comparado a outros resultados obtidos a partir de substratos lignocelulósicos sem hidrólise prévia (Monteiro, Silva e De Moraes, 1991; Tripathi e Yadav, 1992; Adamovic *et al.* 1998, Nigam, 1998), e mesmo quando comparado à resultados com substratos quimicamente hidrolisados (Gupta *et al.* 1986; Ashour *et al.* 1993, Pessoa, De Mansilha e Sato, 1996).

Entretanto, o valor de enriquecimento protéico, obtido nesse trabalho, foi inferior ao obtido por Rahmat *et al.* (1995), que obteve 173% de aumento no teor de proteínas do bagaço de maçã fermentado por *C. utilis*, durante 72 horas. Porém, esses pesquisadores empregaram fermentação em estado sólido, utilizando substrato suplementado com 10,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio. Bhalla e Joshi (1998), também obtiveram maior aumento no teor de proteínas do bagaço de maçã, tendo atingido 150% de enriquecimento em 7 dias de fermentação submersa, mas foi empregado dois microrganismos, *C. utilis* e *Aspergillus niger*.

Provavelmente, as características físico-químicas do bagaço de maçã, apresentando marcante propriedade higroscópica devido ao seu alto teor de pectina e a presença de elevados teores de açúcares livres, tenha sido o fator principal para a obtenção de incremento protéico, visto que na literatura os incrementos obtidos com outros substratos lignocelulósicos são inferiores. Um bom exemplo para ser comparado é o trabalho realizado por Nigam (1998), que utilizando *C. utilis* para enriquecer o bagaço de abacaxi, conseguiu somente 53% de enriquecimento protéico, além de Adamovic *et al.* (1998) ter conseguido aumentar em apenas 13% o teor de proteínas da palha de trigo e Gupta *et al.* (1986) que obtiveram aumento de 10% no teor protéico quando inocularam diversas espécies fúngicas em hidrolisado de sabugo de milho. Portanto, é evidente que o enriquecimento obtido nesse trabalho foi muito promissor e pode ser comparado a outros trabalhos bem sucedidos.

O aumento da digestibilidade do bagaço de maçã de 8,2%, após cultivo com *C. utilis*, foi um resultado inédito. Este resultado é importante principalmente quando comparado aos valores obtidos após tratamento com fungos filamentosos lignocelulolíticos, que requerem períodos longos para melhorar a digestibilidade de um substrato (Moysen e Verachtert, 1991). Além do mais, não existe citação na literatura que uma levedura fosse capaz de melhorar a digestibilidade de um material lignocelulósico. Geralmente, a maioria das leveduras requer sacarificação das fibras presentes em substratos lignocelulósicos antes de sua utilização como fonte de carbono (Walker, 1998). Embora a capacidade de degradação de hemicelulose e pectina tenha sido detectada em alguns grupos de leveduras, nenhum grupo foi indentificado com capacidade de degradar celulose e lignina (Walker, 1998).

Como foi verificado, a fermentação com *C. utilis* resultou na diminuição da fração de lignina Klason solúvel. Durante a hidrólise ácida na análise de lignina Klason, fragmentos externos da molécula de lignina se solubilizaram, integrando ao hidrolisado, o que resulta em um erro no teor de lignina medida pelo método Klason (Rocha, Silva e Schuchardt, 1993).

Assim sendo, uma diminuição nestes fragmentos no hidrolisado significa que porções externas da molécula da lignina foram degradadas, principalmente àquelas que se encontravam ligadas aos polímeros de polissacarídeos tal como celulose e hemicelulose.

Este resultado na degradação da lignina Klason solúvel foi um dos fatores responsáveis pela maior digestibilidade do bagaço após fermentação com *C. utilis*, uma vez que a digestibilidade de um substrato lignocelulósico está inversamente relacionada com a concentração de lignina no substrato, porque quanto maior for a concentração de lignina menor será a digestibilidade do substrato (Zadrazil, 1977).

De forma oposta, a fração insolúvel da lignina manteve-se praticamente intacta. Este resultado poderia se modificar caso houvesse maior disponibilidade de oxigênio no meio de cultura, como por exemplo, se fosse utilizado um processo de fermentação em estado sólido, pois a degradação da lignina é extremamente dependente da presença de oxigênio (Kamra e Zadrazil, 1988). Entretanto, Rahmat *et al.* (1995), também realizando fermentação do bagaço de maçã utilizando *C. utilis* em fermentação em estado sólido, não detectaram degradação da lignina, celulose e hemicelulose. Ao contrário, a concentração destes polímeros aumentou após a fermentação, indicando ter havido uma concentração em massa destas fibras. Esta discrepância entre os resultados obtidos por estes pesquisadores e aqueles encontrados neste trabalho pode ser explicada pela suplementação de nitrogênio, que pode ter inibido a degradação dos biopolímeros pela levedura. A supressão na degradação da lignina foi detectada em substratos ricos em nitrogênio por diversos autores (Kirk *et al.* 1976 e 1978; Zadrazil e Brunnert, 1980 e 1982; Kamra e Zadrazil, 1988). Outro fator que deve ser levado em consideração é que a degradação de biopolímeros geralmente integra o metabolismo secundário dos microrganismos e na fermentação realizada por Rahmat *et al.* (1995), a duração do processo foi de 72 horas, podendo não ter havido tempo suficiente para a degradação destes componentes em níveis detectáveis.

A fração de celulose do bagaço apresentou uma ligeira degradação de 7,8%, também constituindo um resultado importante, visto que, como já mencionado, a capacidade celulolítica não foi ainda detectada em leveduras (Walker, 1998). A ligeira degradação da fração celulósica do bagaço também colaborou para o aumento da digestibilidade do bagaço fermentado pela levedura. A degradação seletiva da lignina, mantendo praticamente intacta a porção celulósica de um substrato é uma condição fundamental para o aumento da digestibilidade de um material lignocelulósico.

Porém, quando cultivadas em meios apropriados, várias espécies de leveduras degradam substâncias pécticas (Blanco *et al.* 1999), tal como ocorreu com *C. utilis* que degradou 16% da pectina presente no bagaço de maçã.

Por outro lado, é possível relacionar a degradação da celulose e da pectina com a concentração remanescente de açúcares redutores no bagaço de maçã fermentado. Após 6 dias de fermentação submersa, seria improvável não terem sido esgotados os açúcares livres no meio de cultivo da levedura, ao menos que a levedura degradasse algum dos polissacarídeos. Assim, a levedura consumiu os açúcares livres no meio até um limite máximo, quando os polissacarídeos — celulose, pectina e hemicelulose — começaram a serem degradados, voltando o teor de açúcares a apresentar um ligeiro aumento.

Outro resultado importante relativo ao metabolismo da levedura foi o efeito da adição de uma fonte suplementar de nitrogênio ao meio de cultura e a sua eficiência no consumo de açúcares. A adição de nitrogênio favoreceu a diminuição do teor de açúcares do bagaço de maçã quando fermentado por *C. utilis*, pois atingiu-se em 72 horas o mesmo consumo de açúcares do que aquele obtido por Rahmat *et al.* (1996). Este resultado mostra que o nitrogênio é o fator limitante do crescimento da levedura no substrato.

Como não se obtiveram diferenças significativas entre os resultados de consumo de açúcares obtidos a partir da suplementação com os diferentes sais nitrogenados, foi selecionado

o sulfato de amônio para utilização nos experimentos posteriores, visto que o fosfato de amônio implica na suplementação de fosfato, o que provavelmente poderia estimular a produção de ácidos nucleicos, tal como verificado por Lucca, Romero e Callieri, (1995). Já a adição de uréia e de nitrato de sódio produziram, após fermentação, uma coloração escura no bagaço de maçã, deixando-o com um aroma desagradável, fato que poderia interferir na palatabilidade do substrato.

5.3 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Crescimento de *Candida utilis* em Bagaço de Maçã

Os estudos cinéticos permitiram concluir que a adição de sulfato de amônio estimulou o metabolismo da *C. utilis*, melhorando o tempo de consumo dos açúcares, fator que não ocorreu na primeira fermentação que durou 6 dias. Por outro lado, a degradação de polissacarídeos por *C. utilis* ficou evidenciada, visto que as amostras coletadas durante os estudos cinéticos apresentaram uma marcante degradação dos açúcares presentes no meio de cultura em 24 horas de fermentação, e depois, as amostras subseqüentes apresentaram aumentos e diminuições cíclicas no teor de açúcares do meio de cultivo (Figura 19 A e B).

Em comparação aos resultados de Ahmad e Holland (1995), o valor de μ_{\max} para *C. utilis* em bagaço de maçã foi relativamente baixo, o que pode ser devido a alta viscosidade do meio, que deve ter desfavorecido a transferência de oxigênio. Esses pesquisadores verificaram que a velocidade específica de crescimento de *C. utilis* no meio de cultura aumentou a medida que foi aumentada a oxigenação do sistema. Entretanto, quando se adicionou sulfato de amônio no meio de cultura a velocidade de crescimento duplicou, ficando evidente a influência positiva do sulfato de amônio na velocidade específica de crescimento de *C. utilis* em bagaço de maçã, mostrando não ser somente o oxigênio o fator limitante do rendimento do processo.

Por outro lado, mesmo aumentando a velocidade específica de crescimento e o consumo do açúcares do bagaço de maçã, o fator de conversão de substrato em biomassa, que representaria a fonte de proteínas para o bagaço tratado, diminuiu. A biomassa produzida apresentou baixo teor protéico, refletindo num baixo enriquecimento protéico do substrato, visto que ao final de 35 horas de fermentação, com fonte suplementar de nitrogênio se produziu uma quantidade de biomassa consideravelmente superior aquela produzida após 54 horas de fermentação em bagaço puro. Esta poderá constituir a explicação do baixo valor do fator de conversão no meio suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ quando comparado ao substrato sem suplemento. Provavelmente, algum fator de crescimento pode ter limitado a eficiência das células, cultivadas em meio suplementado com sulfato de amônio, a sintetizar as proteínas com a mesma velocidade de multiplicação. Entretanto, Rahmat *et al.* (1995) obtiveram 173% de aumento no teor de proteína bruta do bagaço de maçã, em 72 horas de fermentação em estado sólido, acrescido de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio. É possível que, neste caso, a maior conversão de biomassa em proteína bruta seja resultado do processo fermentativo utilizado.

5.4 – Aspectos Fisiológicos de *Candida utilis*

A detecção da capacidade para produção de enzimas que hidrolisam xilana e pectina por *C. utilis* é uma informação inédita para esta espécie de levedura, visto que quando se considera o gênero *Candida* somente *Candida kefir*, *Candida shehatae* e *Candida pseudotropicalis* foram descritas como degradadoras de pectina, além de *C. shehatae* também ser degradadora de hemicelulose (Walker, 1998).

Além da hidrólise de pectina e xilana, a hidrólise de polímeros de celulose por *C. utilis* consiste em resultados inéditos. De acordo com Biely e Kremnický (1998), ao contrário da maioria dos fungos, as leveduras são geralmente incapazes de utilizar celulose cristalina como fonte de carbono. A não inibição da síntese das enzimas celulolíticas de *C. utilis* constituiu

resultado excepcional, visto que, a síntese de enzimas que degradam biopolímeros sofre normalmente inibição catabólica (Ilmén *et al.* 1997). As celulasas de *C. utilis* podem não estar sujeitas a este tipo de inibição, uma vez que o halo de hidrólise, formado em torno das colônias cultivadas em meio contendo celulose e 10,0 g.L⁻¹ de glicose, foi relativamente maior. Opostamente, as colônias cultivadas em meio contendo pectina e 10,0 g.L⁻¹ de glicose, bem como xilana e 10,0 g.L⁻¹ de xilose, não apresentaram halo de hidrólise, o que indica que essas enzimas hidrolíticas da *C. utilis* foram susceptíveis à inibição catabólica como observado em outros organismos por Blanco, Sieiro e Villa (1999) e Cho e Choi (1999).

Os resultados referentes à capacidade hidrolítica de *C. utilis* corroboraram com a possibilidade de quebra das cadeias dos polissacarídeos durante a fermentação de bagaço de maçã por *C. utilis*, visto que o teor de açúcares não foi exaurido no meio de cultura, mesmo após 6 dias de cultivo. Portanto, foi efetuado a avaliação da atividade dessas enzimas hidrolíticas no meio de cultura de *C. utilis*, não permitindo que nenhuma dúvida ocorresse em relação à capacidade metabólica da levedura, eliminando-se assim, qualquer possibilidade de ocorrência de erro.

Paralelamente, a detecção da atividade da enzima manganês peroxidase, no caldo de cultivo de *C. utilis*, completou a análise fisiológica referente à degradação dos componentes poliméricos do bagaço de maçã pela levedura. Um elevado número de enzimas oxidativas produzidas por bactérias, fungos filamentosos e por plantas vem sendo relatado como tendo papel importante na degradação da lignina e compostos relacionados (Durán e Esposito, 2000). A enzima manganês peroxidase é uma das mais importantes, visto que foi verificado que ela é capaz de catalisar a oxidação de vários compostos aromáticos derivados da lignina através da oxidação do Mn (II) à Mn (III), que ao se reduzir, produz radicais livres oxidantes (Durán e Esposito, 2000). Conseqüentemente, a degradação da lignina Klason solúvel, durante o cultivo de *C. utilis*, foi decorrente da ação desta enzima no meio de cultura.

Ainda que a atividade de peroxidases intracelulares tenha sido detectadas em diversas leveduras (Muncnerova e Augustin, 1994; Zhiltsova *et al.* 1996; Manzano *et al.* 2000), a atividade de peroxidases extracelulares nunca foi mencionada na literatura científica. Por conseguinte, o resultado obtido constitui mais uma importante contribuição para o conhecimento do potencial metabólico das leveduras, e especificamente para a espécie *C. utilis*.

5.5 – Fermentação em Estado Sólido do Bagaço de Maçã por *Pleurotus ostreatus* var. *roseus*

Os resultados referentes ao tratamento com o fungo *Pleurotus ostreatus* mostraram que o tratamento combinado entre *C. utilis* e o fungo filamentososo é o mais indicado quando se tem o intuito de enriquecer o teor de proteínas do bagaço. Em outras palavras, o tratamento do bagaço de maçã por *P. ostreatus*, sem um pré-tratamento com a levedura, apresentou um enriquecimento protéico baixo, não podendo ser comparado nem mesmo ao tratamento com a levedura isoladamente. Tripathi e Yadav (1992) obtiveram até 89% de enriquecimento protéico, tratando a palha de trigo com *P. ostreatus*, durante 21 dias. Entretanto, as condições fisiológicas da fermentação em estado sólido empregada por esses autores, foram exaustivamente estudadas. Esses pesquisadores conseguiram um melhor rendimento protéico quando realizaram a fermentação partindo de um pH inicial de 5,5. Os pesquisadores também verificaram que quanto mais baixo foi este valor do pH, menor foi o enriquecimento protéico. O pH foi um dos fatores responsáveis pelo baixo rendimento protéico do bagaço de maçã tratado com *P. ostreatus*, uma vez que o pH inicial do bagaço não tratado foi de 4,2.

No entanto, quando se empregou *P. ostreatus* na fermentação do bagaço pré-tratado com a levedura *C. utilis*, foi observado um enriquecimento protéico em torno de 150%. Esse enriquecimento foi comparado ao bagaço sem tratamento, porque se considerarmos que o bagaço pré-tratado com *C. utilis* já apresentava 100% de enriquecimento protéico, o tratamento

com o basidiomiceto aumentou apenas 25% o teor de proteínas, a custo de um expressivo tempo de fermentação.

Ainda que tenha sido observado um considerável enriquecimento protéico no bagaço de maçã após tratamento com ambos os fungos, também foi observado um empobrecimento nutricional do bagaço pré-tratado com *C. utilis*, principalmente devido ao abaixamento na digestibilidade do substrato. Isto pode ser explicado pela alta concentração de nitrogênio no substrato pré-tratado em comparação ao não tratado. Como já foram mencionados anteriormente, vários pesquisadores observaram que substratos ricos em nitrogênio inibem a degradação da lignina, desfavorecendo o aumento da digestibilidade do material lignocelulósico (Kirk *et al.* 1976 e 1978; Zadrazil e Brunnert, 1980 e 1982; Kamra e Zadrazil, 1988).

Em adição, outro fator negativo sob o ponto de vista nutricional foi o aumento no teor de açúcares redutores durante o tratamento com *P. ostreatus*, indicando uma elevada degradação de polissacarídeos — compatível com a diminuição da digestibilidade (Zadrazil, 1977) — além de não eliminar o risco do bagaço produzir alcolemia em ruminantes, devido a alta concentração de açúcares.

Paralelamente, o aumento na digestibilidade de 7% após o tratamento com *P. ostreatus* é relativamente baixo se for considerado o tempo de fermentação de 30 dias. *C. utilis* isoladamente aumentou a digestibilidade do bagaço em um período mais reduzido de tempo. Portanto o processo utilizando apenas *P. ostreatus* pode ser economicamente inviável, além do inconveniente teor de açúcares acumulado no substrato após o tratamento.

Diversos autores sugeriram o controle de certos parâmetros durante o processo fermentativo, como por exemplo o pH, a temperatura de cultivo, a presença de micronutrientes, entre outros; como indutores na degradação seletiva da lignina, deixando a celulose praticamente intacta (Kerem e Hadar, 1993, 1994 e 1995; Ardon *et al.* 1996, entre outros). O pH do substrato após fermentação por *C. utilis* foi de 2.5, sendo suficientemente baixo para

inibir a degradação da lignina. Por conseguinte, foram alteradas as condições de fermentação, de modo a melhorar a degradação da lignina e produção de proteína por *P. ostreatus*.

Antes disso, foi verificado que a concentração de lignina Klason solúvel no tratamento com *P. ostreatus* sobre bagaço de maçã pré-tratado com *C. utilis* manteve-se praticamente intacta. Então, verifica-se que a degradação da lignina foi inibida em ambos os processos. Por outro lado, considerando-se que a degradação da lignina integra o metabolismo secundário do fungo (Moysen e Verachtert, 1991) e a duração da primeira fermentação foi de apenas 30 dias, não houve tempo para ocorrer o processo degradativo. Muitos pesquisadores aumentaram a digestibilidade de substratos lignocelulósicos, utilizando *P. ostreatus*, porém o tempo de fermentação na maioria das vezes ultrapassaram 60 dias (Moysen e Verachtert, 1991; Karunandaa *et al.* 1995; Jalc *et al.* 1996).

Como a celulose não apresentou relativa degradação, logo o aumento de açúcares redutores livres no bagaço após fermentação com *P. ostreatus* foi devido principalmente à degradação da pectina e possivelmente da fração hemicelulósica, ainda que esta não tenha sido medida, antes e depois das fermentações. Tripathi e Yadav (1992) mostraram que o tratamento da palha de trigo com *P. ostreatus*, durante 21 dias, apresentou degradação maior que 90% da fração hemicelulósica do substrato, independente das condições de cultivo.

Uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre a velocidade específica de crescimento do bagaço de maçã pré-tratado com *C. utilis* e o não tratado, conclui-se que o tratamento com a levedura não dificultou a colonização do substrato. No entanto, a adição de uma fonte suplementar de nitrogênio no tratamento com a levedura resultou num substrato de maçã enriquecido com fontes extras de nitrogênio. Este fator pode ter duas conseqüências imediatas, ou seja, a inibição do crescimento do *P. ostreatus*, devido a sensibilidade desse fungo aos sais empregados durante o pré-tratamento, e/ou a inibição na

degradação dos componentes poliméricos do bagaço de maçã, dificultando ainda mais o incremento da sua digestibilidade.

Dentre os sais utilizados na suplementação do substrato da fermentação com *C. utilis*, a uréia e o fosfato de amônio foram os que mais inibiram o crescimento do fungo. O efeito da uréia é explicado pela quebra da molécula durante a autoclavagem e consequente liberação de amônia no meio de cultura, que provavelmente aumentou o pH do meio. Portanto foi descartado o uso destes sais durante o pré-tratamento com *C. utilis*. De outro lado, o nitrato de sódio e o sulfato de amônio apresentaram um efeito inibidor moderado, podendo tornar o emprego deles viável durante o pré-tratamento do bagaço.

Todavia, o tratamento empregando o *P. ostreatus* em condições otimizadas de cultivo — pH 5.5 e adição de MnSO_4 — durante 60 dias de incubação — também não apresentou resultados satisfatórios. A degradação da lignina foi ainda inibida. Certamente, a adição de sulfato de amônio ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) durante o pré-tratamento com a levedura, conjuntamente à biomassa formada nesse pré-tratamento, inibiram a expressão das enzimas ligninolíticas. Como já foi estudado, substrato ricos em nitrogênio favorecem o crescimento micelial e consequentemente a colonização do substrato, aumentando a velocidade de respiração do fungo e consumindo fatores de crescimento necessários ao metabolismo da lignina (Kirk *et al.* 1976 e 1978; Zadrazil e Brunnert, 1980 e 1982; Kamra e Zadrazil, 1988).

Além disso, o pré-tratamento do bagaço por *C. utilis* acrescido de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ resultou num substrato seco com elevado teor de sulfato. Embora tenha sido verificado que o sulfato de amônio não inibiu o crescimento do *P. ostreatus*, a velocidade específica de crescimento do fungo, na presença de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ deste sal, decresceu cerca de 50%, em relação ao controle. Dessa forma, a presença de grande quantidade de sulfato no substrato também pode ter sido um fator inibidor do metabolismo da lignina.

Por outro lado, as trocas gasosas certamente foram comprometidas durante a fermentação, visto que o processo foi desenvolvido em frasco com tampão de algodão. Na fase secundária do metabolismo, o processo de degradação da lignina é estritamente oxidativa, e dessa forma, necessita de oxigênio à uma pressão parcial igual aquela encontrada no ambiente (Kamra e Zadrazil, 1988; Zadrazil e Puniya, 1994). Mesmo que tenha sido adicionado sulfato de manganês no meio de cultivo, que serviria de indutor na degradação da lignina (Blanchette, 1984; Kerem e Hadar, 1993 e 1994), seu efeito foi anulado devido a todos os interferentes discutidos.

Ainda que a lignina não tenha sido efetivamente degradada, a pectina foi totalmente consumida e grande parte dessa fonte de carbono foi convertida em proteínas. Em 60 dias de fermentação o bagaço teve seu teor protéico aumentado em mais de 500%. Foi uma excelente conversão, que deve ter convertido não só a pectina como também, a fração hemicelulósica do bagaço. Por outro lado ocorreu um elevado aumento no teor de nitrogênio no bagaço, o que pode indicar uma possível fixação de nitrogênio atmosférico pelo fungo, como já foi observado por diversos autores (Duggar e Davis, 1916; Ginterova, 1973 a e b; Ginterova e Maxianova, 1975; Rangaswamy *et al.* 1975; Thayumanavan, 1980; Ortega *et al.* 1992).

O marcante consumo da fração da lignina Klason solúvel deve também ter aumentado a digestibilidade do substrato, visto que em 6 dias de fermentação com *C. utilis*, que consumiu apenas a fração de lignina Klason solúvel, resultou num considerável incremento da digestibilidade do bagaço fermentado.

É importante ressaltar que o teor de proteína bruta medido pelo método de Kjeldahl não reflete o real valor nutricional protéico do substrato, visto que existem inúmeros interferentes nitrogenados que podem contribuir com o aumento no teor de nitrogênio total. Os ácidos nucléicos e alguns componentes nitrogenados da parede celular dos fungos são alguns exemplos destes interferentes.

6 - CONCLUSÕES

6.1 - *Candida utilis* e Bagaço de Maçã

- O tratamento do bagaço de maçã por *Candida utilis* foi eficiente e atingiu seu principal objetivo, diminuindo o teor de açúcares livres no bagaço em um curto período de tempo, e ainda enriquecendo nutricionalmente o substrato, visto que:
 1. *C. utilis* consumiu 97% dos açúcares redutores livres no bagaço de maçã em apenas 36 horas de fermentação;
 2. O bagaço fermentado ficou enriquecido com proteínas, bem como sais minerais com relativo aumento no teor de cálcio, fósforo e potássio, importantes elementos na nutrição animal;
 3. O aumento no teor de ácidos nucléicos no substrato fermentado não foi marcante;
 4. E ainda, a digestibilidade do resíduo aumentou 8,2% após 6 dias de fermentação.
- O processo de fermentação submersa tem viabilidade potencial na produção de suplemento para alimentação animal, visto que as condições empregadas foram as mais simples possíveis, ou seja:
 1. Não houve necessidade de pré-tratamento químico do substrato, utilizando o resíduo nas condições de saída da fábrica;
 2. A temperatura de fermentação (30° C) se aproxima daquela ambiente na região sul do Brasil, durante o verão, época que coincide com a colheita da maçã;
 3. O processo não requer equipamentos sofisticados de aeração, controle de pH, adição de vitaminas e sais minerais (com exceção de 1% (p/v) de sulfato de amônio, em condições de otimização do consumo de açúcares);

4. O tempo requerido para bioconversão é relativamente curto comparado aos tratamentos utilizando fungos filamentosos, podendo ainda ser otimizado;
 5. E a tecnologia de biorreatores para fermentação submersa encontra-se disponível, o que torna mais fácil a aquisição e manutenção de equipamentos.
- Este trabalho permitiu, ainda, a detecção da capacidade de *C. utilis* em degradar biopolímeros do tipo lignina e celulose, característica que até presentemente não havia sido identificada em leveduras; da mesma forma a capacidade de degradar pectina e xilana, que ainda não tinha sido detectada nesta espécie. *Candida utilis* produziu no meio de cultura pectinases e xilanases quando o nível de monossacarídeos foi baixo no meio, além de manganês peroxidase e celulase, sendo esta última independente da concentração de glicose no meio de cultura. Isto significa que produção de celulases por *C. utilis* não sofre repressão catabólica como acontece na maioria dos microrganismos celulolíticos.

6.2 - *Pleurotus ostreatus* e Bagaço de Maçã sem Pré-Tratamento

- O tratamento do bagaço de maçã diretamente com *P. ostreatus* não foi eficiente na conversão do substrato, pois:
 1. O teor de açúcares livres no bagaço aumentou durante o tratamento com *P. ostreatus*;
 2. O enriquecimento proteico, bem como o de sais minerais, após 30 dias de fermentação foi inferior ao tratamento do bagaço por *C. utilis* ao final de 6 dias;
 3. E o *P. ostreatus* aumentou apenas em 7% a digestibilidade do bagaço após 30 dias de fermentação.

6.3 - *Pleurotus ostreatus* e Bagaço de Maçã Pré-Tratado com *Candida utilis*

- O tratamento do bagaço de maçã previamente tratado com *C. utilis*, utilizando *P. ostreatus* foi eficiente no enriquecimento de proteínas e sais minerais do substrato, porém foi extremamente ineficiente no aumento da digestibilidade do bagaço, visto que:
 1. O teor de proteína bruta aumentou em até 500% após o tratamento sequencial de *C. utilis* e *P. ostreatus*;
 2. O conteúdo de sais minerais aumentou 60%, sendo que os níveis de fósforo, cálcio e potássio aumentaram 86%, 30% e 56% respectivamente;
 3. A digestibilidade do resíduo de maçã diminuiu em 10% após o tratamento com os dois fungos e o teor de lignina ficou praticamente inalterado, mesmo depois da adição de indutores de ligninases.

6.4 – Considerações Finais e Sugestões Futuras

Neste trabalho, realizado em escala laboratorial, foi abordado apenas um dos diversos processos possíveis para se fermentar o bagaço de maçã usando *C. utilis*. Previamente ao aumento de escala, outros processos e fatores determinantes deverão ser estudados, como a fermentação em estado sólido.

Embora o bagaço de maçã seja um resíduo agrícola sazonal e regional, a elevada quantidade do resíduo disponível anualmente possibilitará que quantidades elevadas de suplemento alimentar animal possam ser produzidas em curto período de tempo, a um custo que poderá ser baixo.

Embora as condições de fermentação não tenham sido adequadas, devido ao baixo pH, alta umidade, ausência de indutores de ligninases, entre outras; tentou-se simplificar o tratamento biológico o máximo possível por questões econômicas. Dessa forma, diante das

condições deste estudo, o tratamento com o fungo *P. ostreatus* diretamente sobre o bagaço proveniente da fábrica, constitui uma alternativa inviável e não recomendável, quando se pretende converter o substrato para produção de suplemento alimentar animal.

Embora tenha diminuído a digestibilidade do bagaço de maçã após o tratamento sequencial com *C. utilis* e *P. ostreatus*, o produto fermentado apresentou potencial para ser utilizado como suplemento protéico, agregado à outros substratos com maior digestibilidade, na alimentação animal.

Entretanto, o tempo requerido para se obter o enriquecimento protéico de tal forma que se justifique o seu uso como suplemento alimentar animal é demasiado longo requerendo portanto grande disponibilidade de espaço físico para serem processados grandes volumes de substrato. Além disso, o processo de “scale up” para fermentação em estado sólido envolve o controle de diversos fatores que não foram considerados neste estudo laboratorial, como o controle da temperatura — que aumenta muito na FES, o controle da umidade, da aeração, entre outros.

Ainda, a tecnologia de biorreatores para FES que atenda o processo proposto, não se encontra disponível no mercado. Desta forma o desenvolvimento de um biorreator especialmente para esta bioconversão envolveria gastos talvez não compensadores face aos resultados obtidos.

Não obstante, é importante frisar que, os aspectos nutricionais analisados não refletem o real valor nutritivo que os substratos fermentados apresentam quando ingeridos pelos animais. O potencial existe, mas antes de se decidir qual tratamento a se utilizar, e paralelamente ao estudo de “scale up”, é necessário avaliar a aceitabilidade e a metabolização do produto convertido em um determinado grupo de animais *in vivo*, consistindo, este trabalho numa primeira etapa no desenvolvimento de uma tecnologia de bioconversão do bagaço de maçã.

Pelo menos três diferentes estudos merecem ser desenvolvidos tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho:

1. Estudo das enzimas lignocelulolíticas de *Candida utilis*, visto que esta levedura apresenta um excelente potencial para bioconversão de resíduos agro-industriais;
2. Otimização do processo de fermentação do bagaço de maçã por *Candida utilis*, empregando fermentação em estado sólido e estudo do “scale up” do processo;
3. Otimização da fermentação em estado sólido do bagaço de maçã por *Pleurotus ostreatus* visando o incremento da digestibilidade do substrato.

7 – ANEXOS

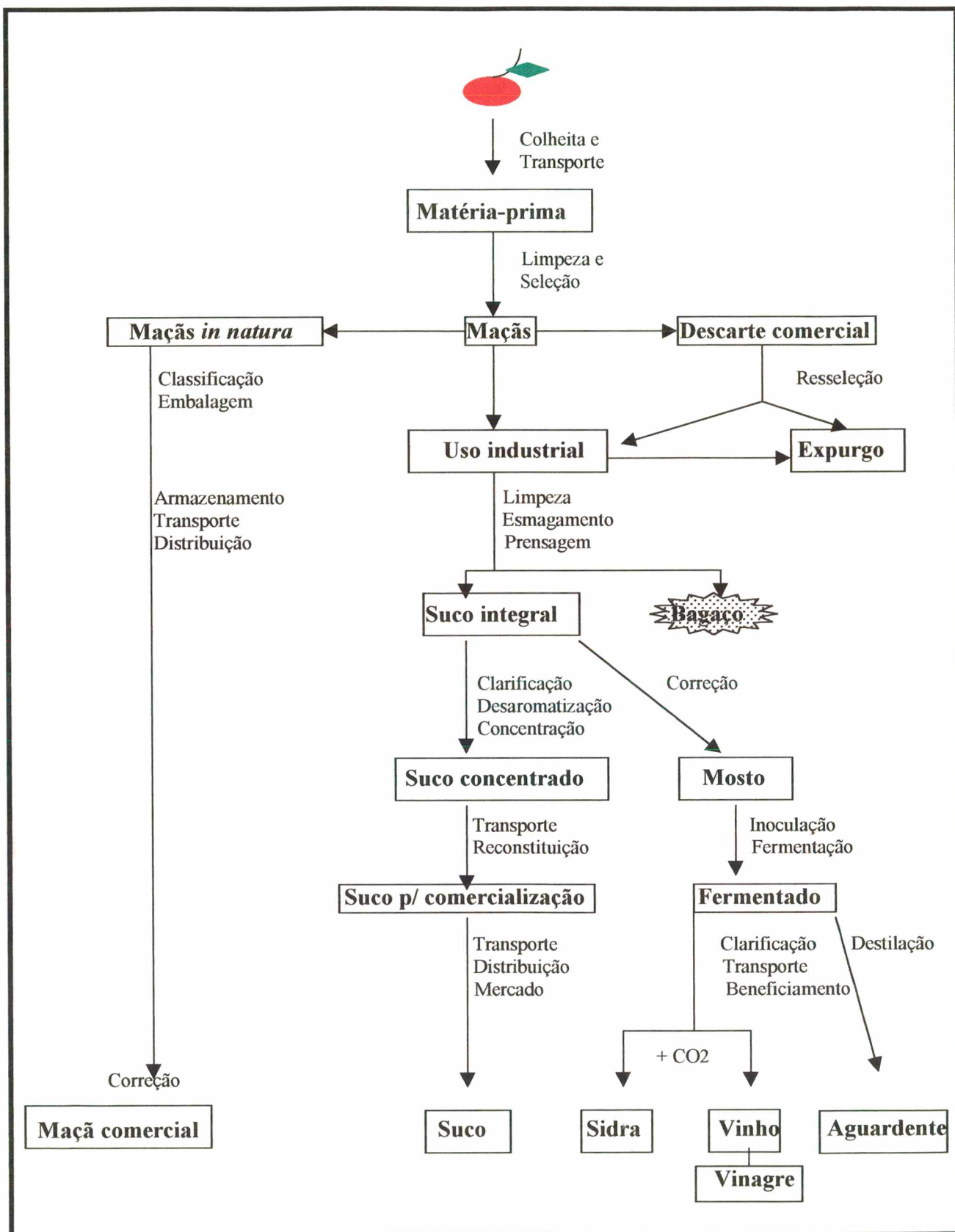


Figura 7.1 - Processamento da maçã (Fischer, 2000).



Figura 7.2 - Etapa de seleção dos frutos na indústria de processamento de maçãs.

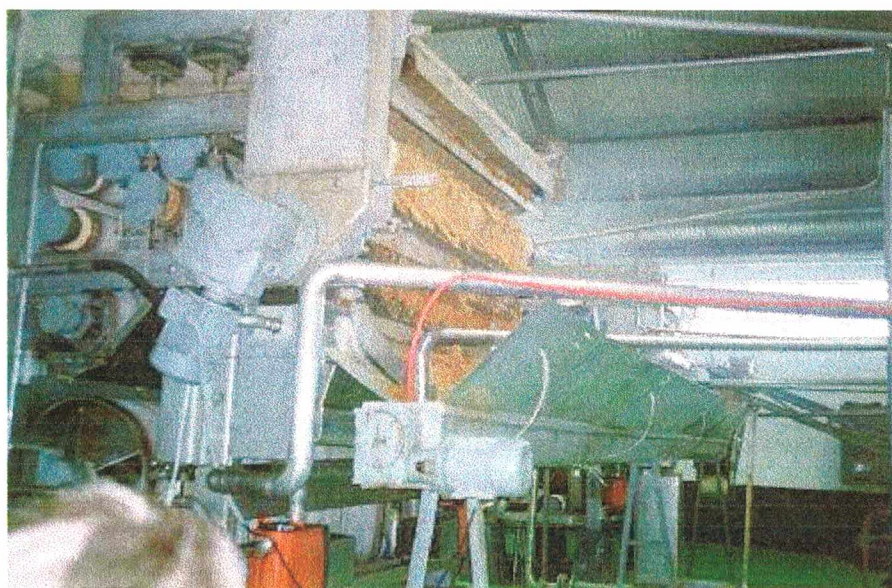


Figura 7.3 - Prensagem dos frutos inadequados ao consumo *in natura*, com concomitante produção de bagaço.

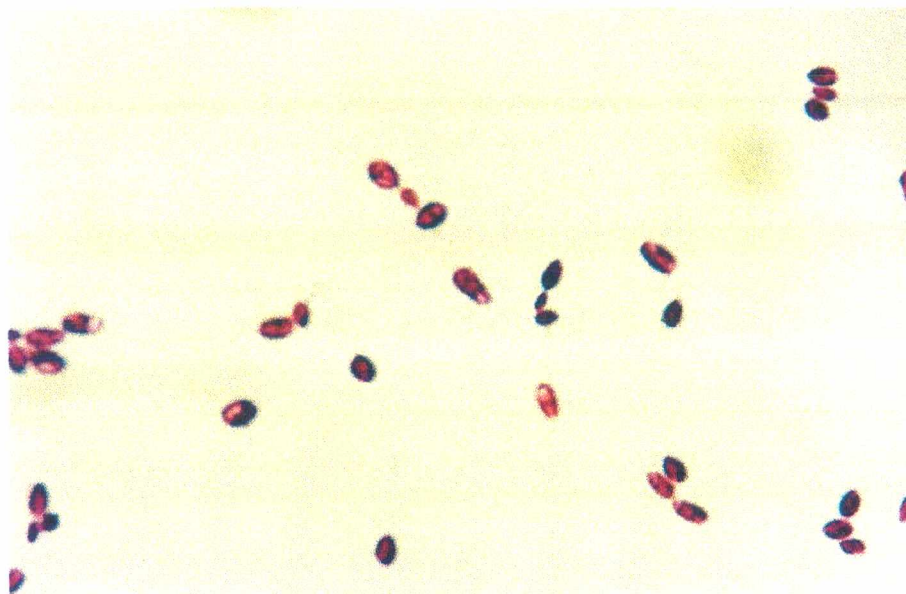


Figura 7.4 - Preparação de *Candida utilis* fixada e corada com safranina 1% (p/v) (1000x)



Figura 7.5 - *Pleurotus ostreatus* frutificando sobre tronco de árvores

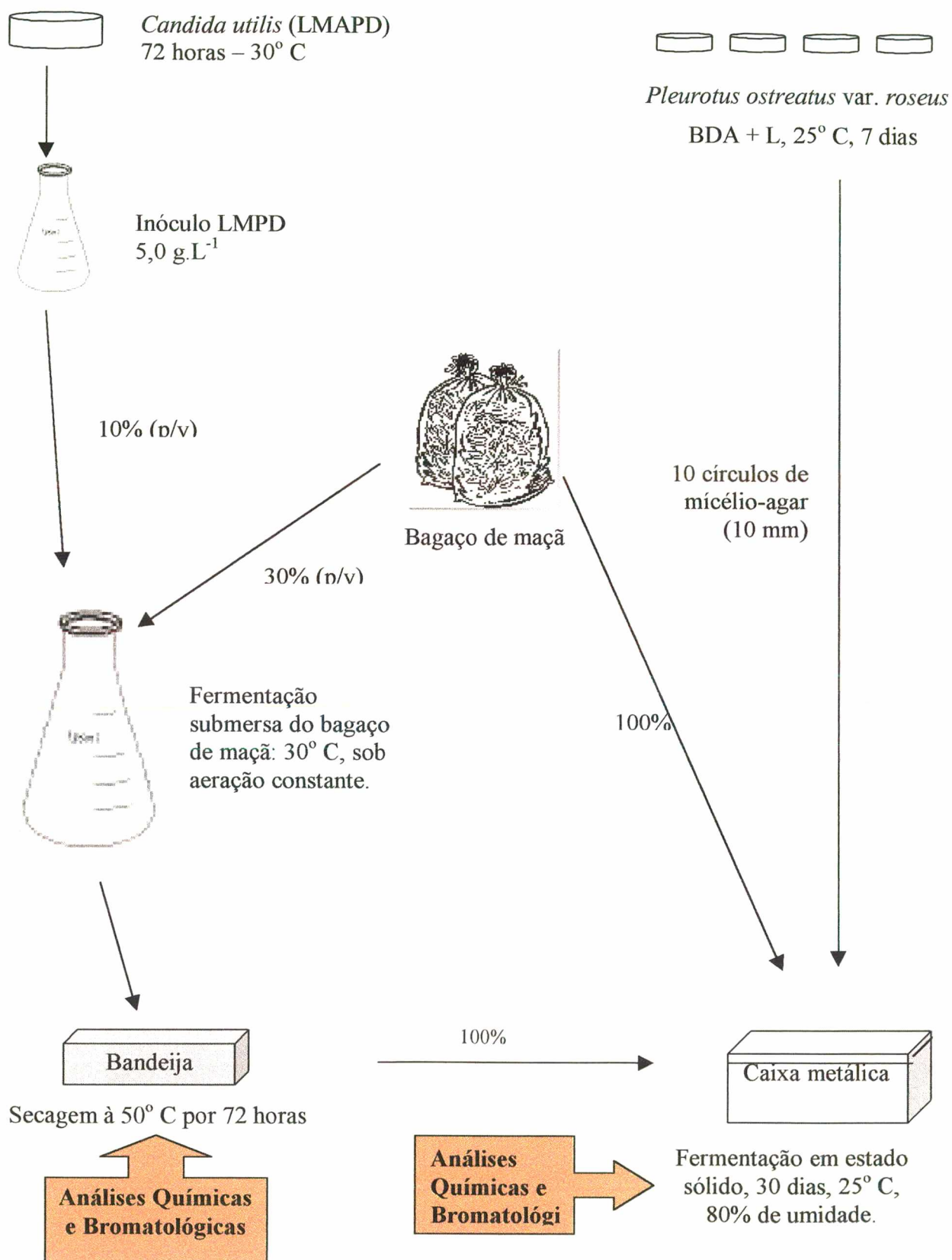


Figura 7.6 - Fluxograma dos procedimentos e materiais utilizados.

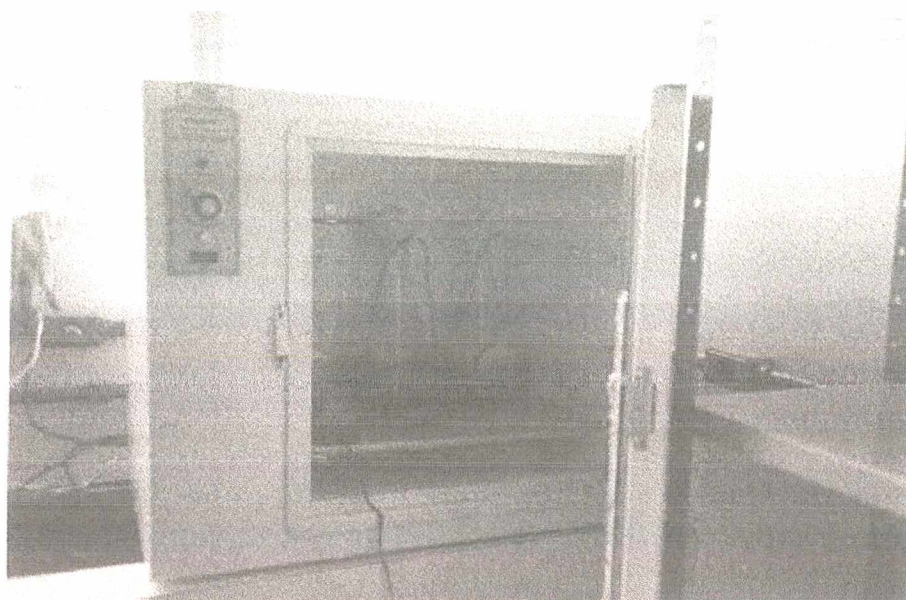


Figura 7.7 - Fermentação submersa do bagaço de maçã



Figura 7.8 - Fermentação em estado sólido do bagaço de maçã

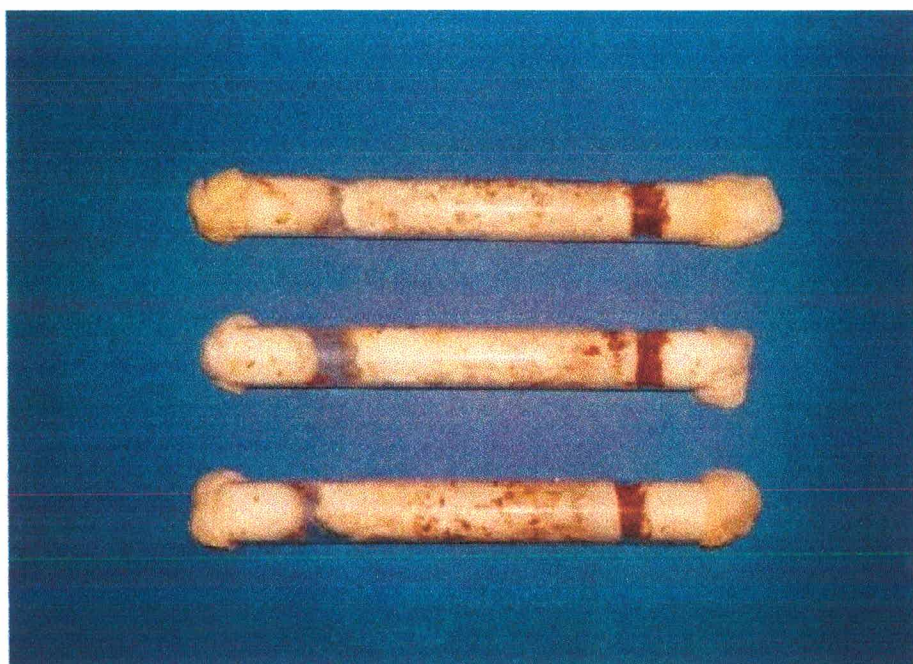


Figura 7.9 - Ensaio de medida da velocidade de crescimento linear de *Pleurotus ostreatus* em tubos de vidro.

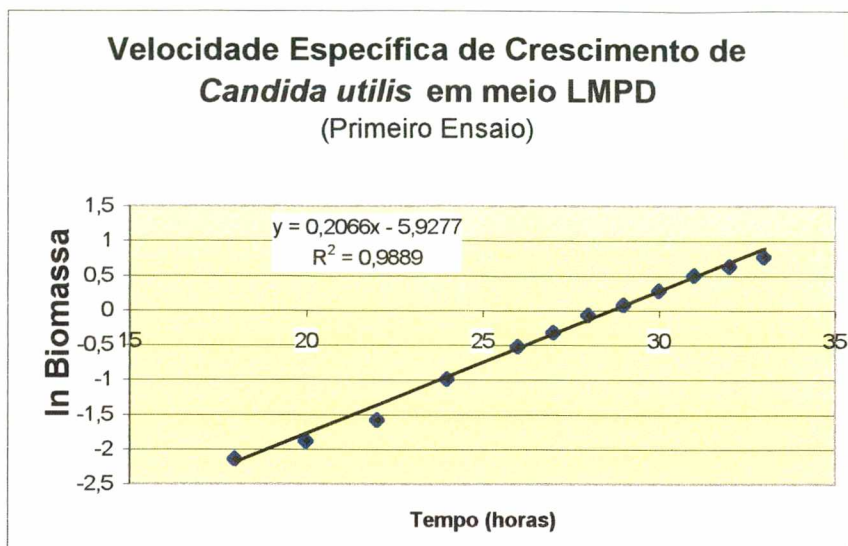


Figura 7.10 - Cálculo do μ_{max} de *Candida utilis* crescendo em meio LMPD (primeiro ensaio).

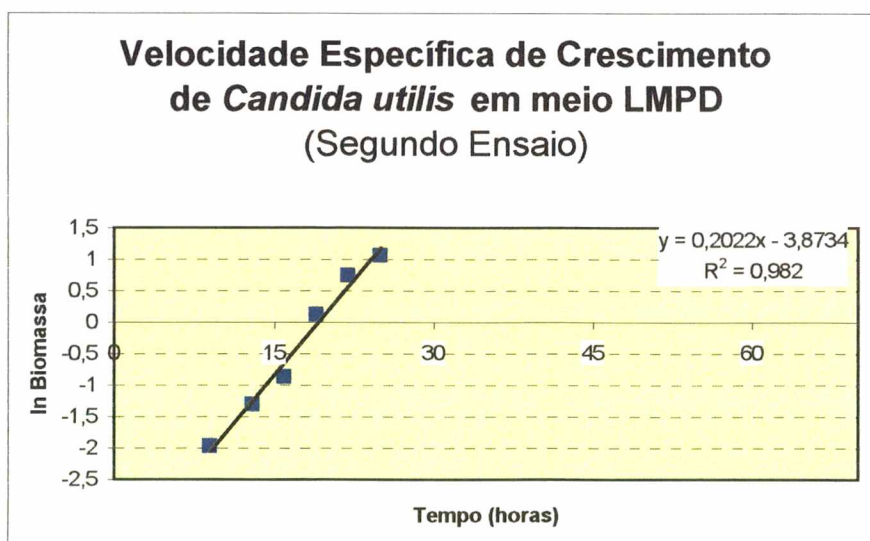


Figura 7.11 - Cálculo do μ_{max} de *Candida utilis* crescendo em meio LMPD (segundo ensaio).

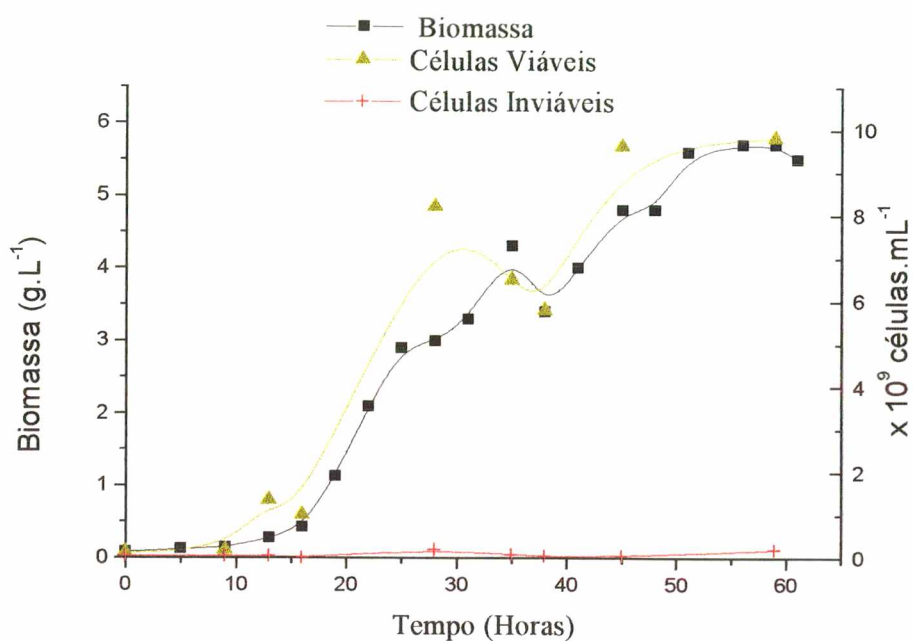


Figura 7.12 – Curva de Crescimento de *Candida utilis* em meio LMPD, à 30° C, sob agitação constante, avaliado através da medida de biomassa seca e do número de células viáveis e inviáveis (repetição).

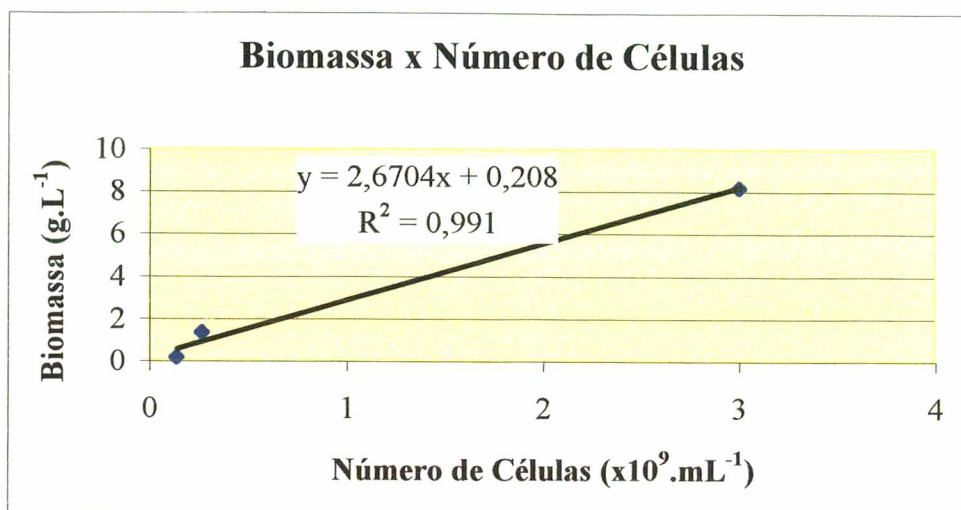


Figura 7.13 - Correlação entre o número de células obtido através da contagem direta sob microscópio óptico em preparação à fresco em lâmina e lamínula, e a biomassa seca.

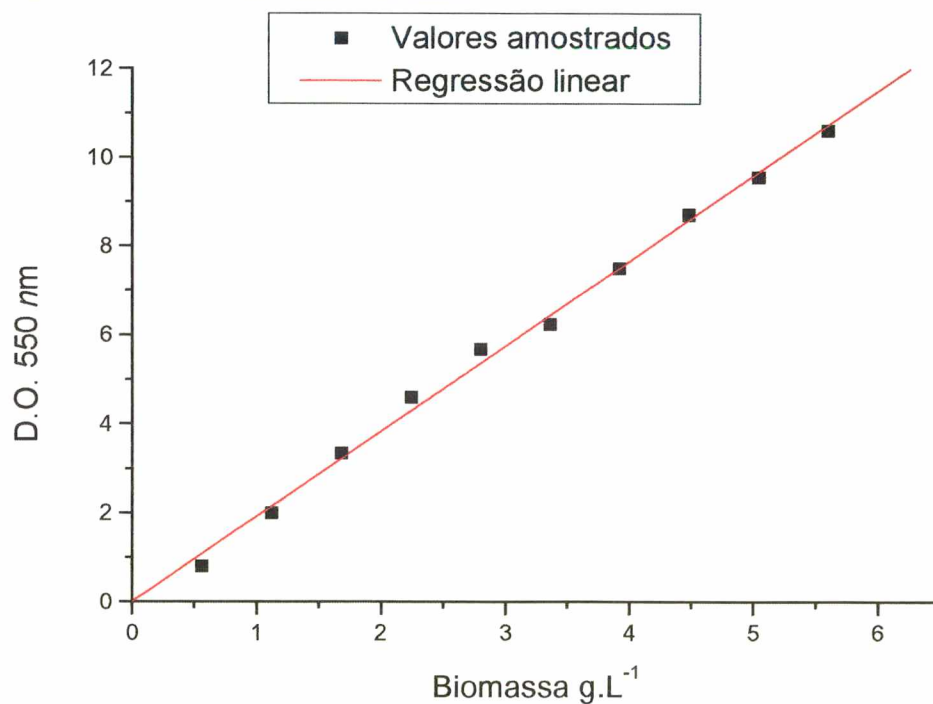


Figura 7.14 - Correlação entre biomassa e densidade óptica durante a produção do inóculo de *Candida utilis* em meio LMPD.

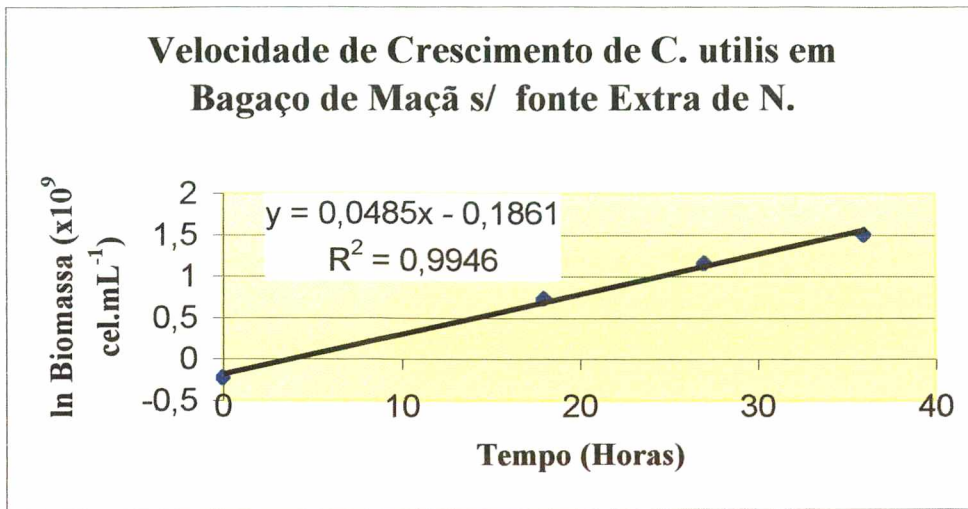


Figura 7.15 - Cálculo do μ_{max} de *Candida utilis* durante fermentação do bagaço de maçã não suplementado com nitrogênio.

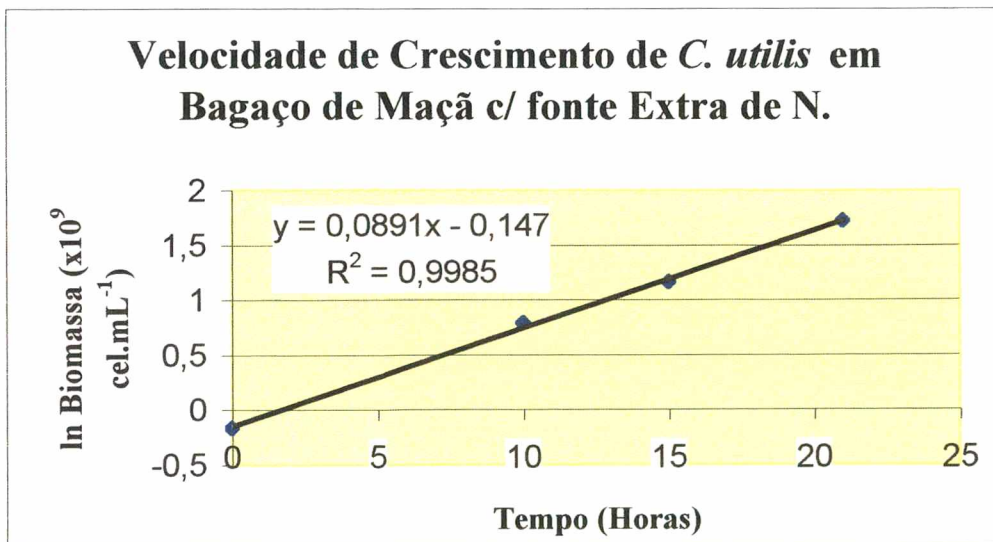


Figura 7.16 - Cálculo do μ_{max} de *Candida utilis* durante fermentação do bagaço de maçã suplementado com 1% (p/p de bagaço) de sulfato de amônio.

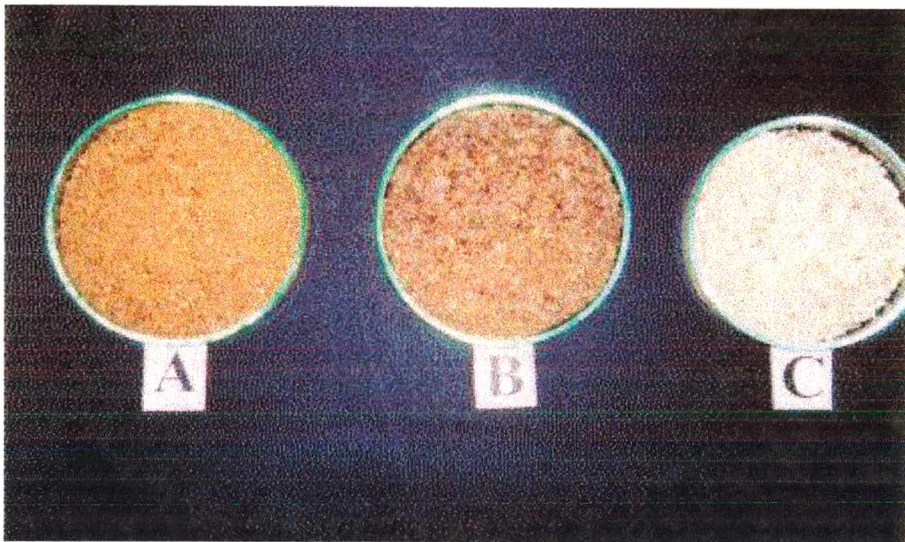


Figura 7.17 - Placas de Petri contendo bagaço de maçã seco e moído. A) Não fermentado; B) Fermentado com *Candida utilis*; C) Fermentado com *Pleurotus ostreatus*.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDREU, G.; BERNAIGES, M. D.; LOPES, J. e SOLÁ, J. - A simple method for RNA extraction from yeast. *Biotechnology Bioengineering* 32: 927 - 929, 1988.
- ABPM. - <http://www.abpm.org.br> [23/12/2000].
- ABRALDEZ, G.J.B. - Os animais sendo melhor alimentados do que o homem. *Anais do 1º Congresso Brasileiro da Indústria de Rações, São Paulo*, 217-227, 1982.
- ABU-RUWAIDA, S. A.; BANAT, I. M. e HAMDAM, Y. I. - Reduction of nucleic acid content in cell biomass of methanol utilizing mixed bacteria cultures by heat treatment. *Biotechnology Letters* 10: 597 - 602, 1988.
- ADAMOVIC, M.; GRUBIC, G.; MILENKOVIC, I.; JOVANOVIC, R.; PROTIC, R.; SRETENOVIC, L. e STOICEVIC, L. J. - The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Animal Feed Science and Technology* 71: 357-362, 1998.
- AGRÍCOLA FRAIBURGO - <http://www.agricolafraiburgo.com.br> [23/12/2000].
- AHMAD, M. N. e HOLLAND, C. R. - Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. *Journal of Food Engineering* 26: 443 - 452, 1995.
- AKHMEDOVA, Z. R. - Ligninolytic enzymes of basidiomycetes: Lignin peroxidases from the fungus *Pleurotus ostreatus* UzBI-ZAX 108.I. Optimization of production and Isolation of ligninase. *Biochemistry (Moscow)* 61(8): 974-980, 1996a.
- _____. - Ligninolytic enzymes of basidiomycetes: Lignin peroxidases from the fungus *Pleurotus ostreatus* UzBI-ZAX 108. II. Isolation, purification, and characterization of isoenzymes. *Biochemistry (Moscow)* 61(8): 981-987, 1996b.
- ALEXOPOULOS, C. J. e MIMS, C. W. eds. - *Introductory Mycology*. 3ª ed. New York, John Wiley & Sons, 1979. 632p.
- AMITAI, G.; ADANI, R.; SOD-MORIAH, G.; RABINOVITZ, I.; VINCZE, A.; LEADER, H.; CHEFETZ, B.; LIEBOVITZ-PERSKY, L.; FRIESEM, D. e HADAR, Y. - Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS letters* 438: 195 - 200, 1998.
- ANAND, L. e VITHAYATHIL, P.J. - Xylan-degrading enzymes from thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce: Action pattern of xylanase and β -glucosidase on xylans, xilooligomers and arabinoxilooligomers. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81(6): 511 - 517, 1996.
- ANDERSON, A. W. e ANDERSON, J. F. - On finding a use for straw. In: SHULER, M. L. ed. - *Utilization and Recycle of Agricultural Wastes and Residues*. Boca Raton (FL), CRC Press, 1980. 273p.

- ARAÚJO, A. e SOUZA, J. D. - Enzymatic saccharification of pretreated rice straw and biomass production. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 1503-1509, 1986.
- ARDON, O.; KEREM, Z. e HADAR, Y. - Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Journal of Biotechnology* 51: 201 - 207, 1996.
- _____. - Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Canadian Journal of Microbiology* 44(7): 676-680, 1998.
- ARMSTRONG, D. W.; MARTIN, S. M. e YAMAZAKI, H. - Production of ethyl acetate from dilute ethanol solutions by *Candida utilis*. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 1038 - 1041, 1984.
- ASADA, Y., WATANABE, A.; IRIE, T.; NAKAYAMA, T. e KUWAHARA, M. - Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1251:205-209, 1995
- ASHOUR, S. A.; ELSHARABASY, M. M. H. e KHALIL, A. M. - Conversion of rice straw to high protein animal feed by discontinuous gradient fed-batch fermentation. *Journal of the University of Kuwait-Science* 20 (2): 275-282, 1993.
- ASTM Methods (1966). D. 1106 – 1156. *Standard test method for lignin in wood*.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. ed. – *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Washington: AOAC, 1995. 1094 p.
- BAILEY, B. A.; KORCAK, R. F. e ANDERSON, J. D. – Alterations in *Nicotiana tabacum*-L CV xanthi cell-membrane function following treatment with an ethylene biosynthesis inducing endoxylanase. *Plant Physiology* 100 (2): 749 – 755, 1992.
- BARFORD, J. P. - A general model for aerobic yeast growth: batch growth. *Biotechnology and Bioengineering* 35: 907 - 920, 1990.
- BECKER, H. G. e SINITSYN, A. P. - Mn-peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: the action on lignin. *Biotechnology Letters* 15(3): 289-294, 1993.
- BETTS, W. B. e KING, J. E. - Oxidative coupling of 2,6-dimethoxyphenol by fungi and bacteria. *Mycology Reserarch* 95: 526 - 530, 1991.
- 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* 10: 116-117, 1994.
- BIELY, P.; MISLOVICOVA, D. e TOMAN, R. – Soluble chromatogenic substrates for the assay of endo-1,4- β -xylanases and endo-1,4- β -glucanases. *Analytical Biochemistry* 144: 142-146, 1985.
- _____. e KREMnickY, L. - Yeasts and their enzymes systems degrading cellulose, hemicellulose and pectin. *Food Technology and Biotechnology* 36(4): 305 - 312, 1998.

- BLANCHETTE, R. A. - Manganese accumulation in wood decayed by white-rot fungi. *Phytopathology* **74**: 725 - 730, 1984.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C. e VILLA, T.G. - Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **175**: 1- 9, 1999.
- BOBEK, P.; GINTER, E.; JURCOVICOVÁ, M. e KUNIAK, L. - Cholesterol-lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Animal Nutrition and Metabolism* **35**: 191-195, 1991a.
- _____.; GINTER, E.; JURCOVICOVÁ, M.; OZDÍN, L' e MEKINOVÁ, D. - Effect of oyster fungus (*Pleurotus ostreatus*) on serum and liver lipids of syrian hamsters with a chronic alcohol intake. *Physiology Research* **40**: 327-332, 1991b.
- BONONI, V. L. R. e TRUFEM, S. F. B ed. - *Cogumelos comestíveis*. 3ª ed. Coleção Brasil Agrícola, São Paulo, Ícone editora Ltda, 1986.
- _____. ; CAPELARI, M.; MAZIERO, R. e TRUFEM, S. F. B eds. -. *Cultivo de Cogumelos Comestíveis*. São Paulo, Icone Editora Ltda, 1995.
- BOURBONNAIS, R. e PAICE, M. G. - Oxidation of non-phenolic substances, an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* **267**: 99 - 102, 1990.
- _____.; PAICE, M. G.; FREIERMUTH, B.; BODIE, E. e BORNEMAN, S. - Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4627 - 4632, 1997.
- BRUM, P:A.R. e ALBINO, L.F.T. - Farinha integral e raspa residual de mandioca na alimentação de frangos de corte. *EMBRAPA/CNPSA, Comunicado Técnico* **199** (Março): 1-2, 1993.
- _____. ; BELLAVER, C.; ZANOTTO, D.L. e LIMA, G.J.M.M. - Determinação de valores de composição química e da energia metabolizável em farinhas de carne e ossos para aves. *EMBRAPA/CNPSA, Comunicado Técnico* **239** (Novembro): 1-2, 1999a.
- _____. ; LIMA, G.J.M.M.; ZANOTTO, D.L. e KLEIN, C.H. - Composição nutritiva de ingredientes para rações de aves. *EMBRAPA/CNPSA, Comunicado Técnico* **241** (Dezembro): 1-4, 1999b.
- BURLA, G.; GARZILLO, A. M.; LUNA, M.; CARDELLI, L. E. e SCHIESSER, A. - Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. *Bioresource Technology* **42**: 89-94, 1992.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S.T.; PEBERDY, J. F.; FU, S. Y. e YU, H. S. - Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **12**: 537 - 542, 1996.
- CALDAS, S. F. NETO. - Mandioca e resíduos das farinheiras na alimentação de ruminantes: digestibilidade total e parcial. Maringá (PR), 1999. [Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual do Paraná]

- CALL, H. P. e MÜCKE, I. - History, overview and applications of mediated lignolytic systems: especially laccase-mediator-systems (lygnozym process). *Journal of Biotechnology* 53: 163 - 202, 1997.
- CARRÉ, M. H. e HAYNES, D. - Pectin determination in biological materials. *Biochemical Journal* 16: 60 - 69, 1992.
- CHANG, S. T. e MILES, P. G. ed. - *Edibles Mushrooms and Their Cultivation*. Boca Raton (FL), CRC Press, 1989.
- _____. - World production of edible mushrooms. *Mushroom Journal* 504: 15-18, 1991a.
- _____. Cultivated mushrooms. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. J. e MARTH, E. H. ed. - *Handbook of Applied Mycology*. New York, Marcel Dekker Inc, 1991b. p.221-240.
- CHO, S. G. e CHOI, Y. S. - Catabolic repression of the xylanase gene (*xynA*) expression in *Bacillus stearothermophilus* no 236 and *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63(12): 2053 - 2058, 1999.
- CHRISTEN, P.; DOMENECH, F.; PACA, J. e REVAH, S. - Evaluation of four *Candida utilis* strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol. *Bioresource Technology* 68(2):193-195, 1999.
- CLESCERI, L. S.; GREENBERG, S. E. e TRUSSEL, R. R. eds. - *APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18^a ed. Washington D.C., American Public Health Association, 1992.
- COLLINS, P.J.; O'BRIEN, M.M. e DOBSON, A.D.W. - Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel extracellular peroxidase from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1343 - 1347, 1999.
- CONNEY, C. L.; RHA, C. e TANNENBAUM, S. R. - Single-cell protein: Engineering, economics and utilization in foods. *Adv. Food Research* 26: 1-52, 1980.
- COPPELLA, S. J. - A detailed analysis of *Saccharomyces cerevisiae* growth kinetics in batch, fed batch and hollow-fiber bioreactors. *Chemical Engineering Journal* 41: B27-B35, 1989.
- CRISAN, E. V. e SANDS, A. - Nutritional value. In: CHANG, S. T. e HAYES, W.A. ed. - *The Biology and Cultivation of Edible Mushroom*. London, Academic Press, 1978. p.137-168.
- DAS, P. e KARIM, M. N. - Mass balance and thermodynamic description of solid-state fermentation of lignocellulosics by *Pleurotus ostreatus* for animal feed production. *Journal of Industrial Microbiology* 15: 25 - 31, 1995.
- DERRICK, S. e LARGE, P. J. - Activities of the enzymes of the ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *Journal of General Microbiology* 139:2783 - 2792, 1993.

- DI LENA, G.; VIVANTE, V. e QUAGLIA, G. B. - Amino acid composition of wheat milling by-products after bioconversion by edible fungi mycelia. *Nahrung* 41(5): 285-288, 1997.
- DOMENECH, F.; CHRISTEN, P.; PACA, J. e REVAH, S. - Ethanol utilization for metabolite production by *Candida utilis* strains in liquid medium. *Acta Biotechnologica* 19(1): 27 - 36, 1999.
- DUGGAR, B. M. e DAVIS, A. R. - Studies on the physiology of the fungi. I. Nitrogen fixation. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 3: 413, 1916.
- DURÁN, N. - Bioconversion to single cell protein: Recovery of lignocellulosic materials to produce human food as an integrated process. *Alimentos* 14(4): 39 - 50, 1989.
- _____ ; RODRIGUEZ, J.; CAMPOS, V.; FERRAZ, A.; REYES, J.L.; AMAYA-FARFAN, J.; ESPOSITO, E.; ADÃO, F.; BAEZA, J.; FREER, J. e URIZAR, S. - Single cell protein quality produced from lignocellulosic materials by the ascomycete *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441 strain). *Revista Brasileira de Microbiologia* 25(1): 31 - 36, 1994.
- _____ e ESPOSITO, E. - Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28: 81 - 99, 2000.
- DURAND, P. A. - La fermentation en milieu solide. *Biofutur* 181: 41 - 43, 1998.
- EDELSTEIN, H. - Disponibilidades Futuras de Matérias Primas: Problemas de quantidade e qualidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA INDÚSTRIA DE RAÇÕES, 1º, São Paulo, 1982. *Anais.* São Paulo, 1982. p.145-165.
- FENN, P. e KIRK, T. K. - Relationship of nitrogen to the onset and suppression of lignolytic activity and secondary, metabolism in *Phanerochaete crysosporium*. *Archives of Microbiology* 130: 59 - 65, 1981.
- FERMOR, T. R. - Applied aspects of composting and bioconversion of lignocellulosic materials: an overview. *International Biodeterioration and Biodegradation* 31: 67 - 106, 1993
- FERREIRA, A. S.; LIMA, G. J.M.M.; GOMES, M.F.M. e ZANOTTO, D.L. - Triticale na alimentação de suínos. *EMBRAPA/CNPSA Comunicado Técnico*, 165 (Janeiro) : 1 - 2, 1991.
- FIALHO, E.T.; OLIVEIRA, P.A.V.; BARBOSA, H.P.; ABREU, J.L.M. e GIROTTO, A.F. - Utilização de soja tostada para suínos em crescimento e terminação. *EMBRAPA/CNPSA, Comunicado Técnico*, 168 (Março): 1-2, 1991.
- FISCHER SUCOS IND. E COM. LTDA - <http://www.fischerfraiburgo.com.br> [23/12/2000].
- FURINA, E. K.; BONARTSEVA, G. A.; ANDREISHCHEVA, E. N.; POLYAKOVA, L. I.; VARTAPETYAN, B. B.; ZVYAGIL'SKAYA, R. A. e L'VOV, N. P. - Specific features of nitrate reduction in the yeast *Candida utilis*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 33(6): 538-544, 1997.

- FURLAN, S. A.; VIRMOND, L. J.; MIERS, D. A.; BONATTI, M.; GERN, R. M. M. e JONAS, R. - Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**: 689-692, 1997.
- GAO, P. J.; QU, Y. B.; ZHAO, X.; ZHU, M. T. e DUAN, Y. C. - Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed. *Enzyme and Microbial Technology* **20** (8): 581-584, 1997.
- GARCÍA, I.; CISNEROS, F. e SEDRÉS, J. M. - Estudio de la actividad antimicrobiana en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* HB 184. *Alimentaria (maio)*: 63 - 65, 1998.
- GARZILLO, A.M.V.; DI PAOLO, S.; RUZZI, M. e BUONOCORE, V. - Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **42**: 476 - 481, 1994.
- GIARDINA, P.; AURILIA, V.; CANIO, R.; MARZULLO, L.; AMORESANO, A.; SICILIANO, R.; PUCCI, P e SANNIA, G. - The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *European Journal of Biochemistry* **235**: 508-515, 1996.
- GIBERT, E. - Method for preparation of SCP with reduced nucleic acid content. *European Pat. Ep.* 252: 900, 1988.
- GINTIROVA, A. - Balance of nitrogen in certain strains of higher fungi during submerged and stationary cultivation (in Slovak). *Cultivating Champignons* **8**: 60, 1971.
- _____. Nitrogen fixation by higher fungi. - *Biologia* **28**: 199, 1973.
- _____. e MAXIANOVA, A. - The balance of nitrogen and composition of proteins in *Pleurotus ostreatus* grown on natural substrates. *Folia Microbiologica* **20**: 246, 1975.
- _____. e LAZAROVA, A. - Degradation dynamics of lignocellulose materials by wood-rooting *Pleurotus* fungi. *Folia Microbiologica* **32**: 434-437, 1987.
- GLENN, J.K. e GOLD, M.H. - Purification and characterization of na extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degradading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives in Biochemistry and Biophysics* **242**: 329 - 341, 1985.
- GOERING, H.K. e VAN SOEST, P.J. - Forage fiber analysis. In: DEPARTMENT OF AGRICULTURE - *Agricultural Handbook no.379*, Washington (USA), Agricultural Research Service, 1970. p. 1-19.
- GOMES, P.C.; LIMA, G.J.M.M.; GOMES, M.F.M. e FIALHO, E.T. - Disponibilidade de fósforo nos farelos de soja, arroz desengordurado e de girassol, para suínos. *EMBRAPA/CNPISA, Comunicado Técnico* **155** (Abril): 1-2, 1990.
- GOMEZ, R.; SUAREZ, M. e GARCIA, L. - Effect of sodium hydroxide of RNA levels in *Hansenula anomala* 926 cells. *Sobre Deriv. Cana Azucar* **20**:6-10, 1986.
- GOTTLIEB, S. e PELCZER, M. J. Jr. - Microbiological aspects of lignin degradation. *Bacteriology Review* **15**: 55 - 76, 1951.

- GUILLÉN-NAVARRO, G. K.; MÁRQUEZ-ROCHA, F. J. e SANCHEZ-VÁZQUEZ, J. E. - Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 302-306, 1998.
- GUPTA, V. K.; PRASAD, K. S.; BAKSHI, M. P. S. e LANGAR, P. N. - Improving nutritive value of groundnut shells through fungal cultivation. *Agricultural Wastes* 16: 161-169, 1986.
- GUPTA, S. K. e CHAND, S. - Bioconversion of sugars to ethanol in a immobilized cell packed-bed bioreactor-dinamic-response to perturbations in process parameters. *Chem. Eng. J. Biochem. Eng.* 43(1): B1-B12, 1986.
- HANG, Y. D.; LEE, C. Y. e WOODAMS E. E. - A solid-state fermentation system for production of ethanol from apple pomace. *Journal of Food Science* 47 (6): 1851-1852, 1982.
- _____. e WOODAMS, E. E. - Apple pomace - A potential substrate for citric-acid production by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 6(11): 763-764, 1986.
- _____. - Improvement of the nutritional value of apple pomace by fermentation. *Nutr. Rep. Int.* 38 (1): 207-210, 1987.
- _____. e WOODAMS, E. E. - Apple pomace - A potential substrate for production of beta-glucosidase by *Aspergillus foetidus*. *Food Science and Technology-Leb* 27(6): 587-589, 1994a.
- _____. - Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. *Food Science and Tecnology-Leb* 27(2): 194-196, 1994b.
- _____. - Beta-fructofuranosidase production by *Aspergillus* species from apple pomace. *Food Science and Technology-Leb* 28(3): 340-342, 1995.
- HATAKKA, A. I. - Lignin modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Review* 13: 125 - 135, 1994.
- HAYES, W. A. - Worldwide cultivation of exotic or specialty mushrooms. In: 9th IRISH MUSHROOM CONFERENCE, Dublin/Ireland, 1991. *Proceeding*. Kinsealy Research and Development Centre, Dublin. p.25-29.
- HESSELTINE, C. W. - Solid state fermentation: Part I. *Process Biochemistry* 12: 24 - 27, 1977.
- _____. - Solid state fermentation: an overview. *International Biodeterioration* 23: 79 - 89, 1987.
- ILMÉN, M.; SALOHEIMO, A.; ONNELA, M. L. e PENTTILA, M. E. - Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(4): 1298 - 1306, 1997.

- IPEA/IPLAN, FINEP e SIRBESP. - A indústria Nacional de rações balanceadas e concentrados. In: *Tecnologia Moderna para Agricultura*, Brasília, Ipea Edições, vol. III, 1978. 277p. (Série estudos para o planejamento 20)
- IRIE, T.; HONDA, Y.; HÁ, H.; WATANABE, T. e KUWAHARA, M. - Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isozyme from the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Wood Science* **46**: 230-233, 2000.
- JALC, D.; NERUD, F.; ZITNAN, R. e SIROKA, P. - The effect of white-rot basidiomycetes on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. *Folia Microbiologica* **41**(1): 73-75, 1996.
- JANDIAK, C. L. - Problems and prospects of *Pleurotus* cultivation. In: SYMPOSIUM ON SURVEY AND CULTIVATION OF EDIBLE MUSHROOMS IN INDIA, 1st, India, 1976. *Proceedings*. Part II, 67.
- JONSSON, L.; BECKER, H. G. e NYMAN, P. O. - A novel type of peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1207**: 255 - 259, 1994.
- JOSHI, V. K.; JAISWAL, S. e KAUSHAL, B. B. L. - Apple pomace: Effect of sulphur dioxide and temperature on its preservation and medium optimization for yeast biomass production. *J. Scient. Ind. Research* **57**(10-11): 692-697, 1998.
- JWANNY, E. W.; RASHAD, M. M. e ABDU, H. M. - Solid-state fermentation of agricultural waste into food through *Pleurotus* cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **50** (1): 71-78, 1995.
- KAAL, E. J.; FIELD, J. A. e JOYCE, T. W. - Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresource Technology* **53**: 133-139, 1995.
- KAMRA, D. N. e ZADRAZIL, F. - Microbiological improvement of lignocellulosics in animal feed production - a review. In: Zadrazil, F e REINIGER, P., ed. - *Treatment of Lignocellulosics with White-Rot Fungi*. Essex (UK), Elsevier Applied Science Publ., 1988. p.56 - 63.
- KANDANDA, TSHINYANGU, K. K. e HENNEBERT, G. L. - Protein and chitin nitrogen contents and protein content in *Pleurotus ostreatus* var. *columbinus*. *Food Chemistry* **57**(2): 223-227, 1996.
- KANG, S.; SHIN, K.; HAN, Y.; YOUN, H. e HAH, Y. C. - Purification and characterization of an extracellular peroxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1163**: 158 - 164, 1993.
- KARIESHIRO, T. - Lignocellulosic agricultural wastes degraded by *Pleurotus ostreatus*. *Development and Industrial Microbiology* **18**: 591, 1977.
- KARUNANANDAA, K.; VARGA, G. A.; AKIN, D. E.; RIGSBY, L. L. e ROYSE, D. J. - Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi - changes in chemical composition and structure. *Animal Feed Science and Technology* **55** (3-4): 179-199, 1995.

- KEREM, Z.; FRIESEM, D. e HADAR, Y. - Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1121 – 1127, 1992.
- _____. e HADAR, Y. - Chemically defined solid-state fermentation of *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology* **15**: 785 – 790, 1993a.
- _____. - Effect of manganese on lignin degradation by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(12): 4115 – 4120, 1993b.
- _____. - Effect of manganese on preferential degradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(8): 3057 – 3062, 1995.
- KIRK, T. K.; CONNORS, W. J. e ZEIKUS, J. G. - Requirement of a growth substrate during lignin decomposition by two wood rotting fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **32**: 192 – 194, 1976.
- _____.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.J.; LORENZ, L. F. e ZEIKUS, J. G. - Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology* **117**: 277 – 285, 1978.
- _____. e FARRELL, R.L. - Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* **41**: 465 – 505, 1987.
- KUAN, I. C. e TIEN, M. - Stimulation of Mn-peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Process in National Academy of Science from USA* **90**: 1242 – 1246, 1993.
- KURTZMAN, P. C. e FELL, J. W., ed. - *The yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier, 1998. p. 314 - 315.
- KURTZMAN, R. H. Jr. - Nitrogen fixation by *Pleurotus*. *Mushroom Science* **10**(1): 427, 1978.
- KUTLU, H. R.; ÖZCAN, N.; BÜYÜKALACA, S.; BAYAKAL, L.; GÖRGÜLÜ, M. e ÖZTÜRKCAN, O. - Effects of mushroom inoculation on nutrient content and nutrient digestibility of wheat straw. *Journal of Agriculture Faculty (Çucurova Üniversitesi)* **14**(3): 77-86, 1999.
- _____.; GÖRGÜLÜ, M.; BAYKAL, L. e ÖZCAN, N. - Effects of *Pleurotus florida* inoculation or urea treatment on feeding value of wheat straw. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* **24**: 169 – 175, 2000.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A. e GOLD, M.H. - Separation and characterization of the extracellular H₂O₂ – dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* **169**: 247-250, 1984.
- LEONOWICZ, A.; SZKLARZ, G. e WOJTAS-WASILEWSKA, M. - The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (Peritan Na). *Phytochemistry* **24**: 393 – 396, 1985.

- _____. ; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N. S.; HOFRICHTER, M. e ROGALSKI, J. - Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175 – 185, 1999.
- LEVONEN-MUÑOZ, E. e BONE, D. H. - *Biotechnology and Bioengineering* 27: 382, 1985.
- LIMA, G.J.M.M.; ZANOTTO, D.L.; PIENIZ, L.C.; GUIDONI, A. L. e GUARIENTI, E. M. - O trigo na alimentação de suínos e aves. *EMBRAPA/CNPSA, Comunicado Técnico* 221 (Maio): 1-3.,1998.
- _____. ; SOUZA, O. W.; BELLAVER, C.; BRANDALISE, V.H.; VIOLA, E.S. e GIÓIA, D. R. - Composição química e valor energético de silagem de grão de milho para suínos. *EMBRAPA/CNPSA, Comunicado Técnico* 240 (Dezembro): 1-2, 1999.
- _____. ; MARTINS, R.R.; ZANOTTO, D.L. e BRUM, P.A.R. - Composição química e valores de energia de subprodutos do beneficiamento de arroz. *EMBRAPA/CNPSA, Comunicado Técnico* 244 (Fevereiro): 1-2, 2000.
- LITCHFIELD, J. H. - Single-cell protein. *Science* 219: 740 – 746, 1983.
- LIROVA, S. A.; SOKOLOV, D. P.; SENYUSHKIN, A. A.; BERESTENNIKOVA, N. D. e RABOTNOVA, I. L. - Effect of cyclic pH and pO₂ variation on morphology of *Candida utilis* chemostat culture. *Microbiology* 55(1): 120-126, 1986.
- LUCCA, M. E.; ROMERO, M. E.; DÍAZ RICCI, J. C.; GARRO, O. A. 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* 7: 359-364, 1991.
- _____. ; ROMERO, M.E. e CALLIERI, D.A.S. - Continuous culture of *Candida utilis*: influence of medium nitrogen concentration. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 515 – 518, 1995.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R. e ROCHE, C. - Measurements of saccharifying cellulase. *Journal of Bacteriology* 73: 269, 278, 1976.
- MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CITTERIO, B.; CONTE, L.; DE BERTOLDI, M.; COMI, G.; SANTOVITO, G.; BELTRAMINI, M. e SALVATO, B. - Biochemical responses in a *Candida famata* strain adapted to high copper concentrations. *Biometals* 13(3): 251-259, 2000.
- MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTE, V e PIZZOFERRATO, L. - Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry* 65: 477-482, 1999.
- MARTEN, G.C. e BARNES, R.F. - Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzyme systems. In: PIGDEN, W. J.; BALCH, C. C. e GRAHAM, M. eds. - *Standardization of Analytical Methodology for Feeds, Proceedings of a Workshop, Ottawa, Canada*. Int. Development Research Centre, Ottawa, pp 61-71, 1979.

- MARTINEZ, A. T.; CAMARERO, S.; GUILLEN, F.; GUTIERREZ, A.; MUÑOZ, C.; VARELA, E.; MARTINEZ, M. J.; BARRASA, J. M.; RUEL, K. e PELAYO, J. M. - Progress in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiology Review* **13**: 265 – 274, 1994.
- MARZULLO, L.; CANNIO, R; GIARDINA, P; SANTINI, M. T. e SANNIA, G. - Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *The Journal of Biological Chemistry* **270**(8): 3823-3827, 1995.
- MAZIERO, R. - *Substratos alternativos para o cultivo de Pleurotus spp.* São Paulo, 1990. [Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo]
- MELO, B. - O novo perfil das rações. *O Estado de São Paulo*, São Paulo, 29 de mar. 2000.
- MILLER, G. L. - Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**: 426 – 428, 1959.
- MILLBANK, J. W. - Nitrogen fixation in moulds and yeasts: a reappraisal. *Archives Mikrobiologie* **68**: 32, 1969.
- MONTEIRO, J. B. R.; SILVA, D. O. e DE MORAES, C. A. - *Trichoderma reesei* and *Rhizopus oligosporus* growth in sugarcane bagasse for protein production. *Revista de Microbiologia* **22** (2): 164-169, 1991.
- MOYSON, E. e VERACHTERT, H. - Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility on the substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**(3): 421 – 423, 1991.
- MUNCNEROVA, D. e AUGUSTIN, J. - Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Bioresource Technology* **48**(2): 97 - 106, 1994.
- NGADI, M. O. e CORREIA, L. R. - Kinetics of solid-state ethanol fermentation from apple pomace. *Journal of Food Engineering* **17**(2): 97-116, 1992a.
- _____ - Solid-state ethanol fermentation of apple pomace as affected by moisture and bioreactor mixing speed. *Journal of Food Science* **57**(3): 667-670, 1992b.
- NICOLINI, L.; VOLPE, C.; PEZZOTTI, A. e CARILLI, A. - Changes in vitro digestibility of oranges peels and distillery grape stalks after solid-state fermentation by higher fungi. *Bioresource Technology* **45**: 17-20, 1992.
- NIGAM, J. N. - Single cell protein from pineapple cannery effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14** (5): 693-696, 1998.
- NOGUEIRA, S. Jr. e NEGRI, A. NETO. Rações. ANSP, 1998. In: <http://www.iea.sp.gov.br/rações.htm> [23/12/2000].
- OLIVEIRA, A. Indústria de rações. *A Tarde - Um Jornal de Verdade*, Salvador (BA), 1997. In: <http://www.atarde.com.br/arq07/ru2407.html> [23/12/2000].

- OLIVIER, J. M. ed. - *Dossier Pleurote*. Bordeaux (France), Publications d'INRA, 1990. 123p.
- O'ROURKE A. D. - Balancing demand and supply in global apple industry. *Fruit Processing* 11: 463 – 466, 1998.
- ORTEGA, G. M.; MARTÍNEZ, E. O.; BETANCOURT, D.; GONZÁLEZ, A. E. e OTERO, M. A. - Bioconversion of sugar cane crop residues with white-rot fungi *Pleurotus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 402-405, 1992.
- _____. ; MARTÍNEZ, E. O.; GONZÁLEZ, P. C.; BETANCOURT, D. e OTERO, M. A. - Enzyme activities and substrate degradation during white rot fungi growth on sugar-cane straw in a solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 210 – 212, 1993.
- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; SCALONI, A.; CAPASSO, A. e SANNIA, G. - A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry* 272(50): 31301 – 31307, 1997.
- PANDEY, A. e SOCCOL, C. R. - Bioconversion of biomass: A case study of lignocellulosics bioconversions in solid-state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 41(4): 379-389, 1998.
- _____. - Economic utilization of crop residues for value addition: A futuristic approach. *Journal of Scientific and Industrial Research* 59 (1): 12 – 22, 2000.
- PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E.C.S. e KRIEG, N.R. - Microbiologia de alimentos: Microrganismos como alimentos. In: _____ - *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. São Paulo, Makron Books, vol. II. 1996. p.390 - 391.
- PEREZ, J. e JEFFRIES, T. W. - Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2402 – 2409, 1992.
- PERIE, F. H. e GOLD, M. H. - Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2240 – 2245, 1991.
- PESSOA, A.; DE MANCILHA, I. M. e SATO, S. - Cultivation of *Candida tropicalis* in sugarcane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. *Journal of Biotechnology* 51 (1): 83-88, 1996.
- PIENIZ, L.C.; ALBINO, L.F.T.; BELLAVER, C. e BRUM, P.A.R. - Utilização da soja integral tostada na alimentação de frangos de corte. *EMBRAPA/CNPSA, Comunicado Técnico* 197: 1-2, 1993.
- PLATT, M. W.; HADAR, Y.; HENIS, Y. e CHET, I. - Increased degradation of straw by *Pleurotus ostreatus* sp. 'florida'. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 17: 140 – 142, 1983.
- POZMOGOVA, I. N.; SHUL'GOVSKAYA, E. M.; MEDVEDEVA, G. A. e ANDREEVA, E. A. - Effect of a high temperature on the morphology of a chemostat culture of yeast

Candida utilis and on the content of nucleic acids in it. *Microbiology* 47(2): 306 – 311, 1978.

RAHMAT, H.; HODGE, R. A.; MANDERSON, G. J. e YU, P. L. Solid-Substrate fermentation of *Kloeckera apiculata* and *Candida utilis* on apple pomace to produce na improved stock-feed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(2): 168-170, 1995.

RAJATHAM, S. e BANO, Z. - *Pleurotus* mushrooms. Biotransformations of natural lignocellulotic waste. *Critical Ver. Food Science Nutr.* 28: 31-123, 1989.

RANGASWAMY, G.; KANDASWAMY, T. K. e RAMASWAMY, K. - *Pleurotus sajo-caju* - protein rich nitrogen fixing mushroom fungus. *Current Science* 44: 403, 1975.

RANZANI, M. R. T. C. e STURION, G. L. - Avaliação da composição em aminoácidos de *Pleurotus* spp. cultivados em folha de bananeira. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 48(4): 339- 348, 1998.

REED, G. - Microbial biomass, single cell protein and other microbial products. In: _____ ed. - *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, AVI Publ. Co. N.Y. USA, 1983. p. 541.

REID, I. D. e DESCHAMPS, A. M. - Nutritional regulation of synthetic lignin (DHP) degradation by the seletive white-rot fuñgus *Phlebia (Merulius) tremellosa*: effects of glucose and other co-substrates. *Canadian Journal of Botany* 69: 147-155, 1990.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T. e SCHUCHARDT, U. - Improvement of a rapid UV spectrophotometric method for determination of lignin in alkaline solutions. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 3rd, Belo Horizonte (MG), Brasil, 1993, *Programe and Abstracts*. Belo Horizonte, 1983. p. 73.

RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M. A. e VAZQUEZ-DUHALT, R. - Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38(1): 27-32, 1999.

ROYSE, D. U. - Recycling of spent shiitake substrate for production of the oyster mushroom, *Pleurotus sajo-caju*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 179-182, 1992.

RUEDA, F. G. Minerais quelados com aminoacidos para la alimentación animal. In: <http://www.mundofree.com/pacogil/minerales.htm> [23/12/2000a].

_____. Grasas protegidas: rumen by-pass. In: <http://www.mundofree.com/pacogil/jabones/htm> [23/12/2000b].

_____. Empleo de enzimas en nutrición animal. In: <http://www.mundofree.com/pacogil/enzimas.htm> [23/12/2000c].

RUTTIMAN, C.; SCHWEMBER, E.; SALAS, L.; CULLEN, D. e VICUNA, R. - Ligninolytic enzymes of the white-rot basidiomycetes *Phlebia breviospora* and *ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 16: 64 – 76, 1992.

- RUTTIMAN-JOHNSON, C.; CULLEN, D. e LAMAR, R. T. - Manganese peroxidases of the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 599-605, 1994.
- SAMOILENKO, V. A. e PETRIKEVICH, S. B. - Effect of temperature on morphology and growth rate of *Candida utilis* during limited and non-limited cultivation. *Microbiology* **50**(5): 873-877, 1981.
- SANNIA, G.; LIMONGI, P.; COCCA, E.; BUONOCORE, F.; NITTI, G. e GIARDINA, P. - Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica e Biophysica Acta* **1073**: 114-119, 1991.
- SARTORI, J. R. - Enzimas em rações. *Revista de Alimentação Animal* **19**, 1999. In: <http://www.bichoonline.com.br/artigo/aa0041.htm> [23/12/2000].
- SARKAR, S.; MARTÍNEZ, A. T. e MARTÍNEZ, M. J. - Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1339**: 23 - 30, 1997.
- SCHÄFFER, C.; WÖSTEMEYER, J. e RANDOM, J. - Primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of oilseed rape pathogen *Phoma lingam*. *Journal of Phytopathology* **136**: 124 - 136, 1992.
- SHIN, K.S. e LEE, Y.J. - A novel extracellular peroxidase of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Mycologia* **92**(3): 537 - 544, 2000
- SILVESTRINI, E. C. - Pilot plant growth of *Candida utilis* on rum distillery slops to lower contamination potential and generate an animal feed supplement. *Journal of Agriculture from University of Porto Rico* **71**(1): 125 - 128, 1987.
- SIM, S. L. e HANG, Y. D. - Sauerkraut brine: a potential substrate for production of yeast β -glucosidase. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology* **29**(4): 365-367, 1996.
- SINGH, A.; ABIDI, A. B.; AGRAWAL, A. K. e DARMWAL, N. S. - Single cell protein production by *Aspergillus niger* and its evaluation. *Zentralblatt fur Mikrobiologie* **146** (3): 181-184, 1991.
- SINGUPTA, S.; SHAILA, M. S. e RAO, G. R. - Purification and characterization of assimilatory nitrite reductase from *Candida utilis*. *Biochemistry Journal* **317**: 147 - 155, 1996.
- _____. - *In vitro* and *in vivo* regulation of assimilatory nitrite reductase from *Candida utilis*. *Archives of Microbiology* **168**: 215-224, 1997.
- SINSKEY, A.J. e BATT, C.A. - Fungi as a source of protein. In: BENCHAT, L. R. ed. - *Food and Beverage* - 2^a ed.. New York, Von Noshand Reinhold Publ., 1987. p.435 - 471.
- SMITH, J.F.; FERMOR, T.R. e ZADRAZIL, F. - Pretreatment of lignocellulosics for edible fungi. In: ZADRAZIL, F e REINIGER, P ed. - *Treatment of Lignocellulosics with White-Rot Fungi*. 1^a ed. Essex (UK), Elsevier Applied Science Publ. 1988. p.3-13.

STATE STATISTICAL BUREAU - <http://www.census.gov/statab/www> [15/09/1999].

STRASKRABOVÁ, V.; PÁCA, J. e KRÁLÍCKOVÁ, E. - Effect of aeration and carbon dioxide on cell morphology of *Candida utilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 40(5): 855 – 861, 1980.

TAUK, S. M. - Efeito da adição de nitrogênio e fósforo no crescimento de *Candida utilis* em suco de polpa de café. *Revista Brasileira de Microbiologia* 16(3): 189 – 194, 1985.

TEATHER, R. M. e WOOD, P. J. - Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 43(4): 777 - 780, 1982.

TENTRATIAN, S. e FIELDS, M. L. - Enrichment of ground corn cobs with cellulolytic microorganisms. *Biological Wastes* 34: 123-131, 1990.

THAYUMANAVAN, B. - Nitrogen-fixation by the fungus *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of Biochemistry* 17: 75, 1980.

TIEN M. e KIRK T.K. - Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221: 661 – 663, 1983.

TONO, T.; TANI, Y. e ONO, K. - Microbial treatment of agricultural wastes. I. Adsorption of lignin and clarification of lignin containing liquor by moulds. *Journal of Fermentation Technology* 46: 569 – 576, 1968.

TRIPATHI, J., P. e YADAV, J. S. - Optimization of solid state fermentation of wheat straw into animal feed by *Pleurotus ostreatus*: a pilot effort. *Animal Feed Science and Technology* 37: 59-72, 1992.

UPADHYAY, R. C. e SOHI, H. S. - Apple pomace: a good substrate for the cultivation of edible mushrooms. *Current Science* 57: 1189-1190, 1988.

UPDEGRAFF, D. M. - Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry* 32: 420 - 424, 1969.

VALMASEDA, M.; JESUS-MARTINEZ, M. e MARTINEZ, A., T. - Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*: Lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 818-823, 1991.

VARES, T.; LUNDELL, T. K. e HATAKKA, A. I. - Production of multiple lignin peroxidases by the white-rot fungus *Phlebia ochraceifulva*. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 664 – 669, 1993.

VÁSQUEZ, D.; LAGE, M. A.; PARAJÓ, J. C. e ALONSO, J. L. - Obtención de proteína unicelular (Single Cell Protein) por procedimientos basados en el fraccionamiento de biomasa lignocelulósica: II. Procesamiento de la corteza de pino. *Afinidad L* 447: 309 – 315, 1993.

VETTER, J. Der abbau verschiedener lignozellulosen durch anbau des austernpilzes (*Pleurotus ostreatus*). *Zeitschrift Für Mycologie, Band 58(2)*: 161 – 172, 1992.

_____. Mineral elements in the important cultivated mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Food Chemistry 50*: 277-279. 1994.

VILARIÑO, C.; DEL GIORGIO, J. F.; HOURS, R. A. e CASCONI, O. - Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol. 26*: 107 - 110, 1993.

VILLAS-BÔAS, S.G.; NEIVA, G. O. e ESPOSITO, E. - Tratamento combinado do bagaço de maçã por *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus* para produção de ração animal. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XX, Salvador (BA), Brasil, 1999. *Anais. Salvador, 1999. p.255, sessão MI-100.*

_____. e ESPOSITO, E. - Bioconversão do bagaço de maçã: Enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 14*: 38 – 42, 2000.

VOROB'eva, G. S. e FILONENKO, N. N. - Effect of oxygen on growth, respiration rate, and cell morphology in *Candida utilis* in batch and continuous cultures. *Microbiology 51(4)*: 581-587, 1982.

VOTRUBA, J. e VRANÁ, D. - Effect of external pH on yield, morphology and cell components of *Candida utilis* growing in continuous culture. *Folia Microbiologica 40(1)*: 104 – 110, 1995.

VYAS, B. R. M. e MOLITORIS, H. P. - Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R. *Applied and Environmental Microbiology 61(11)*: 3919 – 3927, 1995

WALKER, G. M. ed. - *Yeast: Physiology and Biotechnology*. West Sussex (UK), John Wiley & Sons Ltd, 1998. 350p.

WARIISHI, H., AKILESWARAN, L. e GOLD, M. H. - *In vitro* depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry and Biophysics Research Communication 176*: 269 – 276, 1991.

_____.; VALLI, K. e GOLD, M. H. - Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry 267*: 23688 – 23695, 1992.

WEILAND, P. - Principles of solid state fermentation. In: ZADRAZIL, F. e REININGER, P. ed. - *Treatment of Lignocellulosics with White Rot Fungi*. Essex (UK), Elsevier Applied Science Publ., 1988. p.64 - 76.

WIMPENNY, J. W. T. - Oxygen and carbon dioxide as regulators of microbial growth and metabolism. In: MEADOW, P. e PIRT, S. J. ed. - *Microbial Growth*. Cambridge (UK), Cambridge University Press, 1969. p.161-197.

- WORRALL, J. J. e YANG, C. S. - Shiitake and oyster mushroom production on apple pomace and sawdust. *Hortscience* 27: 1131-1133, 1992.
- YILDIZ, A; KARAKAPLAN, M. e AYDIN, F. - Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kum. var. *salignus* (Pers. Ex Fr.) Konr. et Maubl.: cultivation, proximate composition, organic and mineral composition of carpophores. *Food Chemistry* 61(1/2): 127-130, 1998.
- YOUN, H. D.; KIM, K. J.; MAENG, J. S.; HAN, Y. H.; JEONG, I. B.; JEONG, G. J.; KANG, S. O. e HAH, Y. H. - Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology (UK)* 141: 393-398, 1995.
- YOUSSEF, B. M. e AZIZ, N. H. - Influence of gamma-irradiation on the bioconversion of rice straw by *trichoderma viride* into single cell protein. *Cytobios* 97 (386): 171-183, 1999.
- ZADRAZIL, F. - Straw decomposition by fungi (basidiomycetes), with its subsequent use as feed supplement or compost. *Landwirtsch. Forsch. Sonderh.* 32: 153, 1976.
- _____. - The conversion of straw into feed by basidiomycetes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 4: 291-294, 1977.
- _____. - Cultivation of *Pleurotus*. In: CHANG, S. T. e HAYES, W.A. ed. - *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. New York, Academic Press, 1978. p.521-558.
- _____. - Conversion of different plant wastes into feed by basidiomycetes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 9: 243-248, 1980.
- _____. e BRUNNERT, H. - The influence of ammonium nitrate supplementation on degradation and in vitro digestibility of straw colonized by higher fungi. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 9:37-44, 1980
- _____. - Solid state fermentation of lignocellulose containing plant residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. and *Dichomitus squalens* (Karst). *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 16: 45 - 51, 1982.
- _____.; BRUNNERT, H. e GRABBE, K. - Edible mushrooms. In: REHM e REED ed. - *Biotechnology: A comprehensive Treatise in 8 volumes*. Alemanha, Wenheim. 1983. p. 145 - 187.
- _____. e REINIGER, P., ed. - *Treatment of Lignocellulosics with White-rot Fungi*. Essex (UK), Elsevier Applied Science Publ., 1988. 117p
- _____. e PUNIYA, A. K. - Influence of carbon dioxide on lignin degradation and digestibility of lignocellulosics treated with *Pleurotus sajor-caju*. *International Biodeterioration and biodegradation* 237 - 244, 1994.
- ZHENG, Z. e SHETTY, K. - Solid-state production of bebeficial fungi on apple processing wastes using glucosamine as the indicator of growth". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 783-787, 1998.

ZHILTSOVA, T. S.; SHAGOVA, M. V.; GRADOVA, N. B. e GOLUBKINA, N. A. -
Resistance to selenium compounds in yeasts of the genus *Candida*. *Applied Biochemistry
and Microbiology* **32**(5): 511-513, 1996.