

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

PATRÍCIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA
A PARTIR DO BAGAÇO DE MAÇÃ

FLORIANÓPOLIS - SC
FEVEREIRO DE 2003.

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

PATRÍCIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE

Engenheira de Alimentos - UFRGS

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA
A PARTIR DO BAGAÇO DE MAÇÃ

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

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

Florianópolis, fevereiro de 2003.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Jorge Luiz Ninow pela orientação, incentivo, generosidade, credibilidade e, sobretudo pela amizade que construímos durante a nossa convivência.

À Professora Elisa Esposito pelo carinho e apoio dispensados durante os momentos difíceis, sempre sugerindo, estimulando e orientando.

Aos queridos colaboradores Fernanda Koch e Thiago Goulart Trossini pelo valioso auxílio na realização dos experimentos, demonstrando grande interesse e dedicação, contribuindo de forma decisiva no desenvolvimento deste trabalho.

Ao químico João Francisco Gomes Correa pela preciosa colaboração, amizade, alegria e criatividade, presentes no dia a dia do laboratório.

Ao Engenheiro Angelo Miguel Barbosa, da Yakult S/A Indústria e Comércio, por gentilmente ceder o bagaço de maçã utilizado neste estudo.

Ao Engenheiro José Maximiliano Müller Netto e ao técnico Roberto Pereira, da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), pela ajuda e utilização de suas instalações nas análises de nitrogênio total.

À Comissão de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), Fernanda, Cláudia, Ernandes, Denise, Vanessa, Elaine, Paula, Mônica, Alex, Cinthia, Carol, Cris, Claudinha, Cíntia Maria, e aos professores Gláucia Maria Falcão de Aragão e Agenor Furigo Jr., por toda ajuda prestada e pela convivência acolhedora.

Ao amigo Márcio Rossi pela generosidade em suas sugestões e opiniões ao longo de intermináveis trocas de idéias, sempre engrandecedoras e pertinentes.

Às grandes amigas Caroline, Joelma e Tatiana por dividirem comigo as alegrias e as tristezas desta conquista e principalmente por serem quem são: amigas sinceras.

Aos amigos do BIOTECLAB, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: professor Marco Antônio Záchia Ayub, Luís Henrique, Júlio Xandro, Gilvane, Rosane e Aline, pelos inesquecíveis anos em que convivemos durante a iniciação científica.

À minha família, em especial à minha mãe, Vânia e aos meus avós, Lourenço e Marina, sempre presentes nos momentos mais importantes da minha vida, acreditando nos meus sonhos e incentivando-me a alcançá-los.

Ao Paulo Afonso pelo amor, carinho, compreensão, paciência e abnegação. Pela cumplicidade e admiração, fonte de inspiração e coragem na concretização deste trabalho. A você dedico esta obra.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
NOMENCLATURA.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 IMPORTÂNCIA DAS PROTEÍNAS.....	4
2.2 PROTEÍNA MICROBIANA (<i>SINGLE CELL PROTEIN</i>).....	6
2.3 BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS.....	14
2.4 BAGAÇO DE MAÇÃ.....	18
2.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	23
2.6 <i>CANDIDA UTILIS</i>	30
2.7 <i>RHIZOPUS OLIGOSPORUS</i>	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 MICRORGANISMOS.....	37
3.1.1 <i>Candida utilis</i>	37
3.1.2 <i>Rhizopus oligosporus</i>	38
3.2 SUBSTRATO.....	38
3.3 CULTIVO SUBMERSO.....	39
3.3.1 <i>Preparo do inóculo de Candida utilis</i>	39
3.3.2 <i>Condições de cultivo</i>	40
3.3.3 <i>Dosagem de biomassa</i>	41
3.3.4 <i>Dosagem de açúcares redutores</i>	41
3.3.5 <i>Determinação dos parâmetros cinéticos</i>	42
3.3.5.1 <i>Velocidade específica de crescimento</i>	42
3.3.5.2 <i>Fator de conversão substrato em célula</i>	43
3.3.5.3 <i>Produtividade em biomassa</i>	43
3.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	44
3.4.1 <i>Preparo da suspensão de esporos</i>	44
3.4.2 <i>Sistema de colunas de Raimbault</i>	45
3.4.3 <i>Condições de cultivo</i>	46
3.4.4 <i>Análise da proteína solúvel</i>	47
3.4.5 <i>Planejamento fatorial</i>	47
3.5 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS.....	49

3.5.1	<i>Caracterização do bagaço de maçã</i>	49
3.5.1.1	Umidade	49
3.5.1.2	Cinzas	50
3.5.1.3	Nitrogênio total.....	50
3.5.1.4	Carboidratos totais.....	50
3.5.1.5	Açúcares redutores totais.....	50
3.5.1.6	Pectina	50
3.5.1.7	Fibras	51
3.5.1.8	Atividade de água.....	51
3.5.2	<i>Caracterização do extrato de bagaço de maçã</i>	51
3.5.2.1	Resíduo seco	51
3.5.2.2	Sólidos totais / Sólidos insolúveis em água.....	51
3.5.2.3	Índice de refração	52
3.5.2.4	Densidade relativa	52
3.5.2.5	Acidez.....	52
3.5.2.6	Fosfato	52
3.5.2.7	Carboidratos totais / Açúcares redutores totais	52
3.5.2.8	Proteína solúvel	53
3.5.2.9	pH	53
3.5.3	<i>Caracterização da biomassa de Candida utilis</i>	53
3.5.3.1	Nitrogênio total / Proteína bruta	53
3.5.3.2	Lipídios.....	53
3.5.3.1	Cinzas	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	CULTIVO SUBMERSO	54
4.1.1	<i>Caracterização do extrato de bagaço de maçã</i>	54
4.1.2	<i>Preparo do inóculo de Candida utilis</i>	55
4.1.3	<i>Cultivo de Candida utilis no extrato de bagaço de maçã</i>	57
4.1.4	<i>Análise da biomassa de Candida utilis</i>	64
4.2	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	66
4.2.1	<i>Caracterização do bagaço de maçã</i>	66
4.2.2	<i>Primeira série de experimentos</i>	67
4.2.3	<i>Segunda série de experimentos</i>	70
4.2.4	<i>Terceira série de experimentos</i>	73
4.2.5	<i>Quarta série de experimentos</i>	76
5	CONCLUSÕES	82
6	SUGESTÕES	84
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fluxograma do processamento da maçã.	19
Figura 2.2 – Prensagem das maçãs e produção do bagaço.	20
Figura 3.1 – <i>Candida utilis</i> CCT 3469.	37
Figura 3.2 – <i>Rhizopus oligosporus</i>	38
Figura 3.3 – Biorreator BIOFLO III utilizado nos ensaios de cultivo submerso.	40
Figura 3.4 – Sistema de colunas utilizado na realização dos experimentos de FES.	45
Figura 4.1 – Crescimento de <i>Candida utilis</i> CCT 3469 em meio YM, a 30°C e 150 rpm, avaliado por turbidimetria a 550 nm.	56
Figura 4.2 – Curva de crescimento de <i>Candida utilis</i> em meio YM, a 30°C e 150 rpm, avaliada através do peso seco da biomassa produzida.	56
Figura 4.3 – Crescimento de <i>C. utilis</i> no extrato de bagaço de maçã acrescido de (NH ₄) ₂ SO ₄ , com proporção C:N de 6:1, a 30°C, pH 4,5, agitação de 600 rpm e aeração de 1,0 vvm.	58
Figura 4.4 – Produção de biomassa e consumo de substrato ao longo do cultivo de <i>Candida utilis</i> em extrato de bagaço de maçã com proporção C:N de 6:1.	58
Figura 4.5 – Concentração celular de <i>Candida utilis</i> cultivada em extrato de bagaço de maçã com proporção C:N de 6:1 versus a concentração de açúcares redutores.	59
Figura 4.6 – Crescimento de <i>C. utilis</i> no extrato de bagaço de maçã acrescido de (NH ₄) ₂ SO ₄ , com proporção C:N de 10:1, a 30°C, pH 4,5, agitação de 600 rpm e aeração de 1,0 vvm.	60
Figura 4.7 – Crescimento de <i>C. utilis</i> no extrato de bagaço de maçã acrescido de (NH ₄) ₂ SO ₄ , com proporção C:N de 3:1, a 30°C, pH 4,5, agitação de 600 rpm e aeração de 1,0 vvm.	61
Figura 4.8 – Produção de biomassa e consumo de substrato ao longo do cultivo de <i>Candida utilis</i> em extrato de bagaço de maçã com proporção C:N de 3:1.	61
Figura 4.9 – Concentração celular de <i>Candida utilis</i> cultivada em extrato de bagaço de maçã com proporção C:N de 3:1 versus a concentração de açúcares redutores.	62
Figura 4.10 – Produção de proteína solúvel, concentração de açúcares redutores residuais e teor de nitrogênio total do bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 1.	68
Figura 4.11 – Produção de proteína solúvel, concentração de açúcares redutores residuais e teor de nitrogênio total no bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 2.	72
Figura 4.12 – Produção de proteína solúvel, concentração de açúcares redutores residuais e teor de nitrogênio total no bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 3.	75
Figura 4.13 – Produção de proteína solúvel e concentração de açúcares redutores residuais no bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 4.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição de diferentes SCP.....	7
Tabela 2.2 – Composição físico-química do bagaço de maçã.....	18
Tabela 2.3 – Comparação entre cultivo submerso e fermentação sólida.....	25
Tabela 3.1 – Matriz do planejamento fatorial 1.....	48
Tabela 3.2 – Matriz do planejamento fatorial 3.....	48
Tabela 3.3 – Matriz do planejamento fatorial 4.....	49
Tabela 4.1 – Caracterização do extrato de bagaço de maçã.....	54
Tabela 4.2 – Composição celular de <i>C. utilis</i> cultivada em extrato de bagaço de maçã.....	65
Tabela 4.3 – Caracterização físico-química do bagaço de maçã.....	66
Tabela 4.4 – Resultados do planejamento fatorial 1.....	67
Tabela 4.5 – Estimativa dos efeitos para as respostas estudadas no planejamento 1.....	68
Tabela 4.6 – Valores de pH inicial e final do planejamento 1.....	70
Tabela 4.7 – Resultados do planejamento fatorial 2.....	71
Tabela 4.8 – Estimativa dos efeitos para as respostas estudadas no planejamento 2.....	71
Tabela 4.9 – Valores de pH inicial e final do planejamento 2.....	73
Tabela 4.10 – Resultados do planejamento fatorial 3.....	74
Tabela 4.11 – Estimativa dos efeitos para as três respostas estudadas no planejamento 3.....	74
Tabela 4.12 – Valores de pH inicial e final do planejamento 3.....	76
Tabela 4.13 – Resultados do planejamento fatorial 4.....	77
Tabela 4.14 – Estimativa dos efeitos para as respostas estudadas no planejamento 4.....	78
Tabela 4.15 – Valores de pH inicial e final do planejamento 4.....	79

NOMENCLATURA

AGL	ácido γ -linolênico
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DNS	ácido dinitrosalicílico
DQO	demanda química de oxigênio
FAO	food and agriculture organization
FDA	food and drug administration
FDA	fibras em detergente ácido
FDN	fibras em detergente neutro
FES	fermentação em estado sólido
FN	fonte de nitrogênio
PS	proteína solúvel
SCP	single cell protein
ST	solução tampão
UFC	unidade formadora de colônias
C:N	carbono para nitrogênio
μ_m	velocidade específica de crescimento
$Y_{X/S}$	fator de conversão substrato em células
P_X	produtividade em biomassa
CO ₂	gás carbônico

RESUMO

O Estado de Santa Catarina destaca-se como o maior produtor nacional de maçãs, beneficiando anualmente mais de 400 mil toneladas. Destas, cerca de 60 mil toneladas são processadas para a obtenção de suco. Durante o processamento das frutas até 30 % da matéria-prima transforma-se num resíduo rico em carboidratos, com grande potencial para bioconversões: o bagaço de maçã. Neste trabalho o bagaço de maçã foi aproveitado como substrato para a produção de proteína unicelular em dois tipos de cultivo: cultivo submerso, onde a levedura *Candida utilis* CCT 3469 cresceu no extrato obtido a partir da prensagem do bagaço de maçã, em biorreator de bancada; e fermentação em estado sólido, onde o fungo *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 foi empregado no enriquecimento protéico deste resíduo, cultivado em reatores de coluna. O bagaço de maçã mostrou-se rico em açúcares redutores e fibras, servindo como uma excelente fonte de carbono para bioprocessos. *C. utilis* apresentou parâmetros cinéticos abaixo do esperado quando cultivada no extrato de bagaço de maçã, alcançando uma produtividade em biomassa de $0,192 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. As células produzidas apresentaram cerca de 48 % de proteína bruta em peso seco, confirmando o elevado teor protéico da biomassa desta levedura. Na fermentação em estado sólido, após estudar a influência da adição de fontes de nitrogênio e de soluções tampão sobre a produção de proteína e sobre a manutenção do pH do substrato, obteve-se um enriquecimento protéico de mais de 5 vezes sobre o teor protéico inicial do resíduo, em cultivo realizado dentro da faixa de pH considerada ótima para o fungo. O *R. oligosporus* colonizou o substrato em pouco tempo, mostrando grande potencial na bioconversão do bagaço de maçã, chegando a produzir 30 % de proteína na melhor condição de cultivo verificada.

ABSTRACT

Santa Catarina is the largest apple producer in Brazil, producing about 400 thousand tones of this fruit annually. A considering fraction of this production (next to 60 thousand tones) is industrially processed to obtain apple juice, generating large amounts of residues (30 % of raw material). Apple pomace is rich in carbohydrates, with high potential for bioconversions. In this work apple pomace was used as substrate for the production of single cell protein with two kinds of culture: submerged cultivation of *Candida utilis* CCT 3469 in the extract obtained by apple pomace pressing, using a 5 L bioreactor; and solid state fermentation with *Rhizopus oligosporus* CCT 4134, using column reactors, for protein enrichment of this residue. The apple pomace showed to be rich in reducing sugars and fibers, serving as an excellent carbon source for bioprocesses. *C. utilis* showed low kinetic parameters when cultivated in the apple pomace extract, reaching a biomass productivity of 0,192 g.L⁻¹.h⁻¹. The cells produced up to 48 % of crude protein in dry bases, confirming the elevated protein content in *C. utilis* biomass. The solid state fermentation, after studying the influence of adding nitrogen sources and buffer solutions over the protein production and over the maintenance of the substrate pH, promoted an increase of more than 5 fold in the protein content, at a pH range considered optimum for *R. oligosporus*, which produced around 30 % of protein. The fungi colonized the substrate very fast, showing a high potential for the apple pomace bioconversion.

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são componentes alimentares necessários para os mais diversos processos fisiológicos e bioquímicos dos organismos, atuando como fonte de aminoácidos e de energia, ingeridas através dos alimentos. O elevado custo das fontes protéicas tradicionais como carne, leite e ovos, tem incentivado o desenvolvimento de tecnologias alternativas para a produção de alimentos com alto conteúdo protéico, de qualidade nutricional satisfatória e baixo custo.

Países em desenvolvimento como o Brasil, que possuem como base de sua economia o setor primário de produção e, onde a população enfrenta graves problemas como a desnutrição e a fome, têm interesse em promover o aproveitamento de materiais biológicos abundantes, como os resíduos agro-industriais, na obtenção de alimentos mais baratos. A biotecnologia e sua ampla gama de aplicações surge então como uma ferramenta valiosa para a utilização dos mais diversos subprodutos, pois os microrganismos, através da bioconversão desses materiais, além de enriquecê-los nutricionalmente, produzem metabólitos de alto valor agregado, que podem ser usados como insumos na indústria de alimentos e farmacêutica.

O Estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de maçã. O bagaço de maçã, resíduo gerado durante o beneficiamento da fruta para a obtenção de suco, tem sido tradicionalmente utilizado como ração animal, apesar de possuir baixos teores protéicos. Se disposto diretamente no solo causa graves problemas ambientais, pois a produção dá-se em grandes quantidades, sazonalmente e em regiões limitadas, graças a condições de clima e de solo. Composto de casca, semente e polpa, este resíduo pode ser empregado como substrato em bioprocessos, permitindo a obtenção de inúmeros

produtos de maior valor comercial, como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, ácidos graxos essenciais, aminoácidos, proteína unicelular, entre muitos outros.

O termo Proteína Unicelular (do inglês *Single Cell Protein* – SCP) tem sido usado para denominar as células secas de microrganismos utilizadas tanto na alimentação humana como na ração animal. As células de algas, bactérias, leveduras e fungos multiplicam-se rapidamente, podendo conter até 70 % de proteína bruta, mostrando-se como um produto atrativo quanto à obtenção de fontes protéicas mais baratas, especialmente se esses organismos forem cultivados em resíduos agro-industriais.

Visando a valorização biotecnológica do bagaço de maçã, este trabalho tem como objetivo principal utilizar este resíduo como substrato para a produção de proteína unicelular. Para tanto, realizaram-se ensaios de cultivo submerso, onde o extrato líquido obtido da prensagem do bagaço foi empregado como meio de cultura para a produção de biomassa da levedura *Candida utilis*; e ensaios de fermentação em estado sólido, onde o bagaço de maçã foi enriquecido com proteína fúngica de *Rhizopus oligosporus*. Os objetivos específicos deste estudo são: avaliar a capacidade de crescimento da levedura no extrato de bagaço de maçã, calculando os principais parâmetros cinéticos; verificar o teor protéico da biomassa de *Candida utilis* produzida; determinar o tipo e a concentração de fonte de nitrogênio que deve ser adicionada ao bagaço de maçã para favorecer o aumento da produção de proteína pelo fungo *Rhizopus oligosporus* em cultivo sólido; determinar o tipo e a concentração de solução tampão que deve ser adicionada ao bagaço visando a manutenção do pH dentro da faixa ótima estabelecida para o microrganismo e, por fim, selecionar a condição que propiciou o maior incremento protéico ao resíduo.

A levedura *Candida utilis* foi escolhida por ser largamente utilizada na obtenção de proteína unicelular e cultivada em diversos hidrolisados produzidos a partir de subprodutos agro-industriais. Suas células contêm alto teor protéico (em torno de 50 % em peso seco), com alta quantidade de aminoácidos essenciais. Já o fungo

filamentoso *Rhizopus oligosporus* tem sido amplamente reportado como produtor de alimentos fermentados em estado sólido, principalmente nos países asiáticos. Também tem sido usado na bioconversão de resíduos agro-industriais, sendo capaz de colonizar rapidamente esses substratos.

O presente trabalho encontra-se estruturado em capítulos. No capítulo 2 são apresentados conhecimentos teóricos, bem como outros estudos afins reportados na literatura, os quais serão utilizados na avaliação dos resultados. No capítulo 3 estão descritos os materiais e os métodos empregados na condução dos experimentos. Os resultados obtidos estão apresentados no capítulo 4, juntamente com a discussão, embasada na teoria. As conclusões são apresentadas no capítulo 5, as sugestões no capítulo 6 e as referências bibliográficas no capítulo 7.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância das Proteínas

As proteínas são macromoléculas nitrogenadas fundamentais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das funções celulares de todos os organismos vivos. Estão presentes em muitos processos biológicos atuando como enzimas, anticorpos, hormônios, moléculas de transporte, de armazenamento, de motilidade, além de possuir importante função estrutural (LEHNINGER *et al.*, 1993). Resultantes da combinação entre 20 aminoácidos, polimerizados através de ligações peptídicas, as proteínas devem ser ingeridas através da dieta para fornecer os aminoácidos essenciais (CHAMPE E HARVEY, 1996).

O valor biológico de uma proteína depende da sua capacidade de fornecer os aminoácidos essenciais – histidina, fenilalanina, isoleucina, metionina valina, lisina, triptofano e treonina. As proteínas também devem ser facilmente digeríveis e livres de toxicidade ou substâncias antinutricionais (CHEFTEL *et al.*, 1989). As proteínas de origem vegetal são consideradas de baixa qualidade ou incompletas porque não possuem níveis adequados de alguns aminoácidos essenciais. As de origem animal são consideradas de alta qualidade ou completas, pois contêm os requerimentos necessários destes aminoácidos (SGARBIERI, 1996).

O conteúdo protéico dos alimentos varia amplamente. Músculos de mamíferos contêm cerca de 20 % de proteína em peso seco; o ovo possui aproximadamente 15 %; o leite de vaca em torno de 3 %; folhas, talos, raízes e tubérculos possuem de 1 a 2 %; os grãos de cereal têm entre 10 e 15 % e as frutas de 0,4 a 1,5 %. A ingestão diária de

proteína recomendada pela Organização Mundial de Saúde, para um homem adulto moderadamente ativo, consiste em 37 gramas de proteína de alta qualidade (FRANCO, 1997). Nos países em desenvolvimento a ingestão inadequada de proteínas tem sido observada. Os indivíduos afetados pela desnutrição protéica possuem um sistema imune enfraquecido e maior predisposição para doenças (CHAMPE E HARVEY, 1996).

O crescimento populacional dos países em desenvolvimento tem promovido um acréscimo na demanda por alimentos e, como consequência direta, elevado o custo dos alimentos protéicos como carnes, laticínios e ovos (PARAJÓ *et al.*, 1995). A oferta insuficiente aliada ao alto custo da proteína na alimentação humana e na ração animal fez surgir a necessidade de desenvolver tecnologias alternativas para a produção de alimentos que substituam as fontes protéicas convencionais (CHIOU *et al.*, 2001).

Os microrganismos têm sido componentes da alimentação humana há muito tempo. As leveduras usadas na fabricação de pão, vinho e cerveja; as bactérias empregadas na produção de salame e iogurte; e os fungos utilizados na obtenção de queijo e molho de soja, são alguns exemplos de microrganismos úteis ao homem. STEINKRAUS (1997) destaca a qualidade nutricional dos alimentos fermentados, pois em geral a fermentação aumenta a quantidade de proteína, aminoácidos essenciais e vitaminas. A enorme versatilidade dos microrganismos também tem sido explorada através de processos fermentativos na obtenção de metabólitos de alto valor comercial, como vitaminas, enzimas, além da própria biomassa microbiana, rica em proteínas de alta qualidade, que surge como uma alternativa promissora na obtenção de fontes protéicas de baixo custo (DEMAIN, 2000; LITCHFIELD, 1983).

O uso de microrganismos como alimento ou como suplemento protéico tem atraído grande interesse, pois estes são capazes de crescer em diferentes tipos de subprodutos industriais, produzindo grandes quantidades de células, denominadas proteína unicelular ou proteína microbiana (PARAJÓ *et al.*, 1995). A biomassa microbiana, considerada como um concentrado protéico natural, contém proteínas completas, com todos os aminoácidos essenciais (VILLAS BÔAS E ESPOSITO, 2000).

2.2 Proteína Microbiana (*Single Cell Protein*)

LITCHFIELD (1983) define o termo *single cell protein* (SCP) como as células secas de microrganismos, cultivadas em grande escala e utilizadas como fonte de proteína na alimentação humana e na ração animal.

Durante as últimas décadas, a produção de proteína unicelular tem sido objeto de muitos estudos, pois o consumo de microrganismos pode ser uma opção na tentativa de prevenir a desnutrição protéica e energética em países em desenvolvimento (KONLANI *et al.*, 1996). A proteína de origem microbiana também pode ser utilizada como ingrediente funcional, fornecendo aos alimentos características desejáveis, tais como sabor, formação de espuma, retenção de água e de gordura, textura, entre outras (LITCHFIELD, 1983).

As leveduras foram os primeiros microrganismos a serem cultivados em grande escala (LITCHFIELD, 1983). Atualmente, a proteína unicelular tem sido produzida a partir do cultivo de diferentes microrganismos. Algas, leveduras, fungos e bactérias são as principais fontes de SCP. Entre as algas, as mais utilizadas são as espécies de *Spirulina*. As mais populares entre as leveduras são as dos gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Saccharomyces*. Entre as bactérias, *Cellulomonas* e *Alcaligenes* são os gêneros mais frequentemente usados. *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, entre outros, são alguns dos fungos cultivados para a obtenção de SCP. Para o consumo de seres humanos os principais microrganismos utilizados são *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, *Spirulina* e *Chlorella*. Essas espécies são consideradas seguras e aceitas pela FAO para o consumo humano (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000). As leveduras *S. cerevisiae* e *C. utilis* são especialmente interessantes devido ao seu alto conteúdo protéico, que pode chegar a mais de 50 % (ZIINO *et al.*, 1999).

O valor nutricional e a utilidade da proteína microbiana estão baseados na sua composição. O produto final, além de ser nutritivo, deve estar livre de qualquer substância tóxica. Embora esses microrganismos sejam cultivados principalmente pelo seu alto conteúdo protéico, que determinará o valor comercial da SCP, as células

microbianas também contêm lipídios, vitaminas, minerais, carboidratos, além de nitrogênio não protéico, como os ácidos nucleicos (LITCHFIELD, 1983). Fungos em geral fornecem vitaminas do complexo B, mas podem apresentar micotoxinas. As células de leveduras contêm tiamina, riboflavina, biotina, niacina, ácido pantotênico, colina, ácido fólico, entre outros componentes de alto valor nutricional. Entretanto, mostram-se deficientes em aminoácidos sulfurados e podem apresentar alta concentração de ácidos nucleicos. As algas são ricas em lipídios e ácidos graxos essenciais (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000). Na tabela 2.1 a composição das células de diferentes tipos de microrganismos pode ser observada.

Tabela 2.1 – Composição de diferentes SCP (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000).

Componente (%)	Algas	Leveduras	Fungos Filamentosos	Bactérias
Proteína	40-60	47-56	30-70	50-83
Nitrogênio	45-65	7,5-9,0	35-50	60-80
Lisina	4,6-7,0	-	6,5-7,8	4,3-5,8
Metionina	1,4-2,6	-	1,5-1,8	2,2-3,0
Lipídios	5-10	2-6	5-13	8-10
Ácidos nucleicos	4-6	6-12	9	15-16
Cinzas	8-10	5-10	9-14	3-7

A quantidade de ácidos nucleicos nas células de microrganismos tem sido o principal fator limitante da sua utilização em alimentos para seres humanos. A ingestão diária de mais de 2 gramas desses compostos pode resultar em elevados níveis de ácido úrico, que se acumula no corpo devido à falta da enzima uricase nos seres humanos, causando doenças como a formação de pedras nos rins e gota (PARAJÓ *et al.*, 1995). Sendo assim, para satisfazer os requerimentos protéicos em humanos através da ingestão de SCP, o limite superior da concentração de ácidos nucleicos na biomassa deve ser de até 3 % (p/p) em base seca (ABOU-ZEID *et al.*, 1995).

A multiplicação celular acelerada aumenta a formação de ácidos nucleicos, ou seja, se a velocidade específica de crescimento do microrganismo é alta, a máxima rentabilidade esperada na produção de proteína microbiana resulta em elevadas concentrações de ácidos nucleicos, levando à necessidade de submeter a biomassa a tratamentos que reduzam o conteúdo desses compostos (PARAJÓ *et al.*, 1995). A redução do conteúdo de ácidos nucleicos pode ser feita através de métodos químicos ou biológicos (ABOU-ZEID *et al.*, 1995). Os tratamentos químicos, baseados no uso de ácidos, bases e sais podem resultar na alteração do perfil de aminoácidos, bem como na formação de compostos tóxicos, ou ainda na redução da digestibilidade das proteínas. Procedimentos enzimáticos são baseados na utilização de nucleases as quais, além de possuírem alto custo, atuam muito lentamente (PARAJÓ *et al.*, 1995). Modificações das condições de cultivo com respeito às concentrações de nutrientes podem ser usadas na redução de ácidos nucleicos, pois o conteúdo de RNA das células de leveduras depende da relação C:N no meio (LITCHFIELD, 1983). Tratamentos térmicos também têm sido testados (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000).

A SCP deve ser produzida através de processos tecnologicamente intensivos que permitam a alta produção volumétrica. A obtenção desse tipo de proteínas independe de condições climáticas e ambientais, mas requer altos investimentos de capital, devendo ser operados com máxima eficiência (VILLAS BÔAS E ESPOSITO, 2000). A utilização de determinadas espécies depende de alguns fatores, que determinarão o custo do produto final e a viabilidade econômica do processo. Velocidade específica de crescimento do microrganismo, substrato utilizado, tipo de biorreator e de processo (contínuo ou em batelada), rendimento, temperatura, pH, requerimentos de esterilidade e riscos de contaminação, produção de toxinas, métodos de recuperação da biomassa e o valor nutritivo das células obtidas são fatores importantes na produção de proteína microbiana. Apesar de serem muitas e diversificadas as fontes de SCP, as espécies que encontram uma aceitabilidade global, sendo atualmente usadas em muitos países, são as leveduras oriundas de cervejarias, usadas na alimentação humana, e as algas, empregadas na alimentação de peixes e moluscos (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000).

O alto custo de recuperação da biomassa de bactérias tem limitado sua utilização como SCP, embora apresentem μ_m alta (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000). As leveduras crescem mais lentamente que as bactérias, mas são capazes de utilizar diferentes substratos e de crescer em baixos valores de pH, com pouco risco de contaminação. Seu tamanho um pouco maior que o das bactérias facilita sua recuperação, que também pode ser onerosa (RHISHIPAL E PHILIP, 1998). Os fungos filamentosos possuem velocidade específica de crescimento menor que a das leveduras, sendo cultivados principalmente em resíduos lignocelulósicos, numa ampla faixa de pH (de 3,0 a 8,0). Já as algas possuem μ_m baixa e um significativo risco de contaminação, apesar do alto valor nutritivo (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000).

Muitos substratos podem ser utilizados para o crescimento de microrganismos, fornecendo fontes de carbono e energia para a produção de proteína. Em muitos casos, esses materiais têm sido hidrolisados antes do uso através de métodos físicos, químicos ou enzimáticos, facilitando assim a ação microbiana (KURBANOGLU, 2001). A fonte de carbono pode representar até 60 % do custo de produção e por esta razão o uso de fontes alternativas de carbono que sejam mais disponíveis e abundantes como resíduos agrícolas e industriais, são preferidos (VILLAS BÔAS E ESPOSITO, 2000).

Além das fontes de carbono e energia, os microrganismos requerem fontes de nitrogênio, fósforo e vitaminas. As fontes de nitrogênio mais adequadas para a produção de SCP são amônia, sais de amônio, nitratos, uréia e fontes orgânicas como os hidrolisados protéicos. A composição da SCP mostra-se fortemente afetada pelas condições de cultivo, especialmente pelo substrato. A proporção C:N em torno de 10:1 deve ser mantida durante o crescimento, minimizando o acúmulo de substâncias de armazenamento e favorecendo a síntese protéica (LITCHFIELD, 1983). Geralmente, quanto menor a quantidade de carbono, maior a μ_m e menor o teor de lipídios, pois as atividades metabólicas são orientadas para a produção de proteínas (ZIINO, 1999).

Na tentativa de aumentar o rendimento da produção de biomassa de *C. krusei*, KONLANI *et al.* (1996) testaram diferentes concentrações iniciais de glicose utilizando

dois substratos: um meio sintético e um hidrolisado de sorgo. Os maiores fatores de conversão substrato em células foram observados quando baixas concentrações iniciais de glicose foram usadas. A levedura não foi capaz de converter toda a glicose em biomassa e uma porção do açúcar foi transformada em etanol. Este comportamento observado ocorre devido ao efeito Cabtree, ou seja, na presença de altas concentrações de glicose, mesmo em condições aeróbicas estritas, a levedura produz etanol.

A produção de proteína unicelular pode ser realizada em cultivo submerso ou em estado sólido. A transferência de oxigênio tem sido um fator limitante para os microrganismos aeróbios em cultivo submerso e por esta razão os biorreatores devem ser projetados para fornecer a máxima transferência de oxigênio, considerando também a remoção de calor durante o crescimento celular. (LITCHFIELD, 1983). O oxigênio dissolvido no meio estimula o consumo de açúcares e o crescimento celular de leveduras. PESSOA JR. *et al.* (1996) verificaram a influência da aeração sobre os parâmetros cinéticos de *C. tropicalis* na produção de SCP. Foi utilizado como substrato um hidrolisado de bagaço de cana de açúcar, suplementado com uréia e P_2O_5 . Com o aumento da aeração de 1 para 2 vvm a levedura obteve μ_m duas vezes maior.

Rejeitos da indústria de alimentos e os efluentes gerados nos processos de industrialização têm sido aproveitados para produção de SCP. MUKERJEE E MAJUMDAR (1989) determinaram a melhor relação C:N para o crescimento de *Hansenula anomala* var. *schneggi* em extratos produzidos a partir de diferentes resíduos agro-industriais. Os extratos produzidos a partir de resíduos de abacaxi, tomate e soja forneceram as maiores concentrações de biomassa. As células contendo os maiores teores protéicos (41 %) foram obtidas com os extratos de farelo de arroz e de farelo de trigo.

A combinação entre tratamento de efluentes e a produção de SCP tem sido uma solução para as indústrias que necessitam de alternativas para reduzir os custos com o tratamento de seus resíduos líquidos. NIGAM (1998) investigou a viabilidade de usar o efluente produzido pela indústria de abacaxi em calda como substrato para a produção

de SCP de *C. utilis*. Sem a adição de nutrientes, a levedura apresentou um baixo crescimento. O nitrogênio foi consumido rapidamente, limitando assim a utilização dos carboidratos. Quando o efluente foi suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sua utilização foi mais eficiente e obteve-se uma concentração celular maior, conseguindo uma redução de 88 % da DQO e uma boa redução na concentração de carboidratos. A proteína unicelular produzida apresentou 55,3 % de proteína bruta. O perfil de aminoácidos apresentou deficiência em metionina e cisteína, mas altas quantidades de lisina e leucina. A fim de estabelecer condições ótimas para esse processo, NIGAM (1999) realizou ensaios em cultivo contínuo. As vazões específicas de alimentação foram variadas e na melhor condição obtida, a DQO sofreu uma redução de 98 % e a SCP produzida apresentou 56,8 % de proteína, indicando que o processo contínuo foi o mais eficiente.

CHOI E PARK (1999) estudaram as condições de crescimento da levedura osmotolerante *Pichia guilliermondii* no resíduo da produção de kimchi (alimento a base de vegetais fermentados por bactérias lácteas, comum na Coreia), para produção de proteína unicelular. O efluente, que consiste numa salmoura e possui alto potencial poluente, foi usado diretamente no crescimento da levedura. Para aumentar a concentração celular de levedura, os pesquisadores testaram o enriquecimento do efluente com fonte de nitrogênio e de carbono. As células apresentaram 40 % de proteína bruta, 5,9 % de cinzas e 11,7 % de lipídios. Simultaneamente, a queda de cerca de 90 % da DBO foi obtida.

O uso da proteína microbiana em rações tem sido reportado em diversos estudos (VILLAS BÔAS, 2001; BROWN, 1996; LEE E KIM, 2001; KIM E LEE, 2000; CHIOU *et al.*, 2001; EL-SAYED, 1999; VILLAS BÔAS, 2002). O desenvolvimento de processos produtivos inovadores e, sobretudo econômicos, tem sido de grande valor na obtenção de proteína para o consumo animal (PHETTEPLACE *et al.*, 2000). A utilização de SCP de leveduras na ração animal apresenta vantagens por possuir alto conteúdo de proteínas completas e a ausência de compostos tóxicos (LITCHFIELD, 1983).

Comparando a outros microrganismos, as leveduras contêm mais nitrogênio do que algas e fungos e mais cinzas do que as bactérias (PESSOA JR. *et al.*, 1996).

A aceitação de leveduras por ruminantes tem sido alta. Quando utilizadas para alimentar vacas leiteiras, o conteúdo protéico e a digestibilidade do leite produzido aumentam. Entretanto, a suplementação das células de levedura com aminoácidos sulfurados pode ser necessária se a SCP for empregada como única fonte protéica na alimentação do animal (RHISHIPAL E PHILIP, 1998).

No intuito de aproveitar o efluente da produção de glutamato, CHIOU *et al.* (2001) produziram proteína unicelular de *Aspergillus niger* para a alimentação de frangos. O resíduo fermentado pelo fungo foi seco e acrescentado à dieta dos animais como suplemento protéico em diversas concentrações. A SCP produzida apresentou alto teor de proteína bruta (50,2 %), com todos os aminoácidos essenciais (baixos teores de metionina, lisina e arginina), baixo conteúdo de carboidratos e de fibras e uma elevada concentração de sal, o que limitou seu uso na dieta dos frangos. Nenhuma anormalidade foi verificada nos animais que consumiram a SCP, mas o aumento da concentração de proteína microbiana na dieta diminuiu o ganho de peso e alterou o sabor do peito de frango, indicando que este produto pode ser usado, desde que em baixas concentrações, na ração destes animais.

Na alimentação de peixes, os requerimentos protéicos são até quatro vezes mais altos que os dos animais de sangue quente, como mamíferos e aves. Para os bovinos, a necessidade de proteína bruta fica em torno de 12 %, enquanto que os peixes necessitam de 35 a 55 % de proteína (BARLETTA, 2001). Atualmente as formulações de ração para aquicultura contêm a farinha de peixe como fonte protéica, que constitui de 25 a 40 % da ração. A farinha possui alto teor protéico com um balanceado perfil de aminoácidos essenciais, além de ser rica em ácidos graxos, minerais e vitaminas (EL-SAYED, 1999). Tendo em vista o aumento do custo e a instabilidade do fornecimento da farinha de peixe, decorrentes da alta da demanda e da competição pelo seu uso como ração para gado e frango, torna-se evidente que, em pouco tempo, os países em

desenvolvimento não serão capazes de depender da farinha de peixe como a principal fonte protéica das rações para a aquicultura (LEE E KIM, 2001). Conseqüentemente, torna-se essencial que proteínas alternativas sejam testadas visando à suplementação da farinha de peixe. A utilização de biomassa microbiana para substituir parte da proteína requerida na alimentação de peixes pode ser vista como uma solução bastante interessante para este problema (KIM E LEE, 2000).

KIM E LEE (2000) avaliaram a produção de SCP da bactéria fotossintética *Rhodospseudomonas palustris* para ser usada em ração para peixes. Buscando maximizar a produção de biomassa, foram estudados cultivos anaeróbicos em batelada, batelada-alimentada e cultura contínua, usando um meio sintético. As células apresentaram até 74 % de proteína bruta, sem deficiência em metionina e com todos os aminoácidos essenciais. A maior produtividade em biomassa foi alcançada com o cultivo contínuo.

O cultivo de moluscos bivalves depende da produção de grandes quantidades de microalgas, nutriente essencial para os estágios larvais de peixes e moluscos. A produção industrial de microalgas, entretanto, não tem sido suficiente, criando um obstáculo ao cultivo de bivalves (BROWN *et al.*, 1996). A substituição de microalgas por bactérias e leveduras reduziria significativamente o custo de produção dos moluscos, especialmente se os microrganismos pudessem ser adquiridos comercialmente (KIM E LEE, 2000).

Apesar de algumas espécies de algas, fungos e bactérias serem comercializadas, sua aceitação ainda é pequena. Devido ao elevado custo de produção e ao desconhecimento da população, os produtos a base de proteína microbiana são encontrados isoladamente e ainda levarão tempo para ser parte principal de uma dieta. Para melhor explorar o potencial da proteína unicelular, deve-se visar o consumo humano, embora a tecnologia disponível ainda seja limitada. O ideal é que exista uma cooperação entre os centros acadêmicos, governamentais e industriais, viabilizando assim a utilização de SCP (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000).

2.3 Bioconversão de Resíduos Agro-Industriais

Com o aumento da população mundial, assim como da poluição ambiental criou-se a necessidade da utilização mais eficiente e do aproveitamento integral dos recursos agrícolas (VILLAS BÔAS E ESPOSITO, 2000). Milhões de toneladas de resíduos agro-industriais são produzidos anualmente no mundo, gerados a partir do beneficiamento de produtos vegetais e na industrialização de alimentos (CHANDA E CHAKRABARTI, 1996). Esses rejeitos têm sido comumente eliminados no meio ambiente, provocando um acúmulo excessivo de matéria orgânica na natureza, pois apesar desses materiais serem totalmente biodegradáveis, sua produção se dá em grandes quantidades, de forma intensiva, sendo necessário um longo período para que esses resíduos venham a ser reciclados de forma natural. O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, produz grandes quantidades de resíduos agro-industriais (VILLAS BÔAS E ESPOSITO, 2000). Na busca por tecnologias que utilizem os subprodutos industriais na obtenção de produtos de maior valor agregado, a biotecnologia oferece inúmeras alternativas para o uso racional desses materiais (PANDEY *et al.*, 2001).

Os resíduos agro-industriais, constituídos principalmente por polímeros estruturais como celulose, hemicelulose e lignina, são atualmente utilizados como as principais fontes de ração para ruminantes. Entretanto, sua qualidade como ração, especialmente em termos de digestibilidade e valor nutricional, não depende apenas da quantidade desses polímeros, mas também da quantidade de substâncias prontamente disponíveis, como açúcares e aminoácidos, na maioria das vezes ausentes nestes rejeitos (BISARIA *et al.*, 1997). Os subprodutos vegetais, geralmente oriundos das indústrias de alimentos, são pobres em nutrientes como proteínas e vitaminas e muitas vezes ricos em fibras não digeríveis, constituindo rações de baixo valor nutricional (VILLAS BÔAS E ESPOSITO, 2000).

Por outro lado, a utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos fornece uma ampla gama de substratos de baixo custo, disponíveis e extremamente abundantes

em países em desenvolvimento. Esses materiais, tais como, bagaço de mandioca (PANDEY *et al.*, 2000c), bagaço de cana-de-açúcar (PANDEY *et al.*, 2000b), casca e polpa de café (PANDEY *et al.*, 2000a), palha e farelo de trigo (JECU, 2000; CASTILHO *et al.*, 2000; SHOJAOSADATI *et al.*, 1999), farelo de arroz (ANUPAMA E RAVINDRA, 2001), polpa de beterraba (SHOJAOSADATI *et al.*, 1999) casca de frutas cítricas (STREDANSKY E CONTI, 1999; SHOJAOSADATI *et al.*, 1999), talos de banana (KRISHNA, 1999), bagaço de morango (ZHENG E SHETTY, 2000), bagaço de *cramberry* (ZHENG E SHETTY, 2000; ZHENG E SHETTY, 1998a), bagaço de laranja (ZIINO *et al.*, 1999), bagaço de maçã (STREDANSKY E CONTI, 1999; VILLAS BÔAS E ESPOSITO, 2000; ZHENG E SHETTY, 2000; BRAMORSKI *et al.*, 1998; ZHENG E SHETTY, 1998b), entre muitos outros, apresentam grande potencial para serem empregados em diferentes processos biotecnológicos.

Estima-se que mais da metade da produção de vegetais provenientes de processos agrícolas não são aproveitados para o consumo humano (palhas, folhas, sementes e cacas). A bioconversão de resíduos lignocelulósicos vem abrindo caminhos para os setores da produção de alimentos e de energia, buscando a utilização total dos recursos naturais existentes no mundo (VILLAS BÔAS, 2001). Esta tem sido uma maneira natural de recuperar recursos úteis, ricos em fontes de carbono e de reduzir a quantidade de resíduos dispostos no ambiente (JIN *et al.*, 2002). O enriquecimento protéico desses materiais, promovendo a melhora de seu valor nutricional, tem sido extremamente útil na redução do impacto ambiental causado por esses resíduos, bem como na criação de alimentos nutritivos para consumo humano e animal (ARAUJO E D'SOUZA, 1985). A produção de biomassa através da bioconversão de rejeitos agroindustriais tem sido uma alternativa valiosa para as aplicações tradicionais destes resíduos, pois os substratos lignocelulósicos são amplamente disponíveis e de baixo custo, ideais para serem usados na produção de SCP (SHOJAOSADATI *et al.*, 1999).

Nos países tropicais, o processamento industrial de frutas cítricas é intenso e gera, além dos produtos principais, como sucos, óleos essenciais, aromas e polpas, grandes quantidades de resíduos que podem chegar a 50 % da matéria-prima. Isso

representa, em indústrias de médio porte, entre 40 e 80 toneladas por dia (DE GREGORIO *et al.*, 2001). A produção de enzimas pécticas tem sido considerada uma solução parcial para esse problema, mas a utilização total desses resíduos na produção de pectinases tornaria o processo inviável economicamente. A obtenção de outros produtos com valor comercial interessante, como a proteína microbiana, surge então como uma alternativa para o aproveitamento desses rejeitos (ZIINO *et al.*, 1999).

A bioconversão e o enriquecimento protéico de resíduos cítricos têm sido propostos por muitos pesquisadores. DE GREGORIO *et al.* (2001) utilizaram polpa de limão (contendo 11,7 % de proteína) como substrato para o crescimento de *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* e conseqüente obtenção de SCP e poligalacturonase. *A. niger* produziu 25,6 % de proteína bruta e *T. viride* 31,9 %. Ambos os fungos produziram poligalacturonase, enzima utilizada na própria indústria de sucos.

SHOJAOSADATI *et al.* (1999) avaliaram o potencial do fungo *Neurospora sitophila* no enriquecimento protéico de três resíduos em fermentação em estado sólido: polpa de beterraba, farelo de trigo e resíduo cítrico (proveniente do processamento de limão e laranja). Foram testados dois tipos de reatores: de coluna com aeração forçada e frascos erlenmeyer, usando 10 % de inóculo. Os resultados indicaram que 75 %, 54,5 % e 61,5 % da celulose presente na polpa de beterraba, no farelo de trigo e no resíduo cítrico, foram convertidos em proteína, respectivamente. A umidade ótima de cada substrato foi determinada: 75 % para a polpa de beterraba e para o resíduo cítrico e 65 % para o farelo de trigo. Umidades superiores a 75 % diminuiriam a porosidade e a difusão de oxigênio, favorecendo a contaminação bacteriana. A polpa de beterraba obteve um enriquecimento protéico de 2,0 vezes; o farelo de trigo aumentou o teor de proteína em 2,5 vezes e o resíduo cítrico em 3,0 vezes. Com o crescimento do fungo, as hifas cercaram o substrato, formando uma estrutura sólida que impediu a passagem de ar através do leito empacotado. Conseqüentemente, o fator de conversão substrato em proteína no reator de coluna foi menor. A suplementação com nitrogênio e fósforo foi essencial para o aumento da eficiência da bioconversão da polpa de beterraba e do resíduo cítrico.

Uma alternativa eficiente para o aproveitamento de resíduos agro-industriais utilizada há tempos tem sido o cultivo de cogumelos comestíveis. Além de enriquecer o resíduo com proteínas e vitaminas fúngicas, que pode ser usado como ração animal de boa qualidade nutricional, o próprio cogumelo produzido possui um valor de mercado significativo, que vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas (VILLAS BÔAS, 2001).

ZHENG E SHETTY (2000) investigaram a viabilidade da utilização de bagaço de maçã, bagaço de morango e bagaço de *cramberry* para a produção de poligalacturonase por *Lentinus edodes* em fermentação em estado sólido. O fungo comestível, também conhecido por *Shiitake*, apresentou bom crescimento, apresentando maior produção da enzima quando cultivado sobre o bagaço de morango, seguido pelo bagaço de maçã.

BISARIA *et al.* (1997) utilizaram o fungo comestível *Pleurotus sajor-caju* na bioconversão de palha de arroz e palha de trigo para aumentar a digestibilidade e o valor nutricional destes resíduos, visando o seu uso como ração animal. O enriquecimento protéico de 2,9 para 6,3 % foi observado para a palha de arroz e de 3,1 para 7,5 % na palha de trigo. A suplementação dos resíduos com fontes de nitrogênio complexas tornou a bioconversão mais eficiente do que quando os resíduos foram acrescidos de uréia ou nitrato de amônio, pois a disponibilidade de nitrogênio simples fez com que as enzimas oxidativas fossem produzidas mais lentamente, diminuindo a degradação de lignina.

Os resíduos lignocelulósicos acumulados no planeta e o seu potencial para conversão em produtos de interesse para o homem ainda é uma questão não resolvida. Muitos estudos têm sido desenvolvidos nos últimos anos buscando a utilização mais adequada para cada tipo de resíduo. Entretanto, novas pesquisas empregando diversos microrganismos e resíduos ainda não estudados, assim como a otimização de processos já desenvolvidos, fazem-se necessárias (VILLAS BÔAS *et al.*, 2002a).

2.4 Bagaço de Maçã

O processamento de sucos, geléias, doces, aromas, essências, entre outros produtos fabricados a partir de frutas, geram, anualmente, grandes quantidades de resíduos, entre eles o bagaço de maçã (VILLAS BÔAS, 2001). Este resíduo, obtido através da prensagem para a extração do suco de maçã, constitui-se de uma mistura heterogênea de polpa, sementes e cascas. Caracteriza-se por apresentar em sua composição elevadas quantidades de fibras, constituídas por biopolímeros de alto peso molecular, tal como amido, hemicelulose, celulose, pectina e lignina, além de outros mono e dissacarídeos. Entretanto, possui baixos teores de proteínas e aminoácidos essenciais, bem como de vitaminas e sais minerais (FOO E LU, 1999; JOSHI E SANDHU, 1996; ZHENG E SHETTY, 1998b). Na tabela 2.2, a composição físico-química do bagaço de maçã pode ser observada.

Tabela 2.2 – Composição físico-química do bagaço de maçã (VILLAS BÔAS, 2001).

Componente	% (p/p)
Umidade	80,0
Açúcares redutores totais	15,0
Proteína bruta	4,1
Pectina	5,2
Fibra em detergente ácido (FDA)	29,2
Fibra em detergente neutro (FDN)	40,3
Cinzas	2,0

O Estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de maçã, produzindo anualmente cerca de 400 mil toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ, 2002). A comercialização da fruta in natura ocorre tanto no mercado interno como no externo e a sua aplicação na obtenção de sucos, polpas e geléias, tem-se demonstrado crescente. Cerca de 60 mil toneladas de maçãs são processadas por ano (VILLAS BÔAS, 2001), chegando a gerar até 30 % de bagaço (JOSHI E SANDHU, 1996;

ZHENG E SHETTY, 1998b). A figura 2.1 ilustra o fluxograma sintético do processamento da maçã para a obtenção de suco.

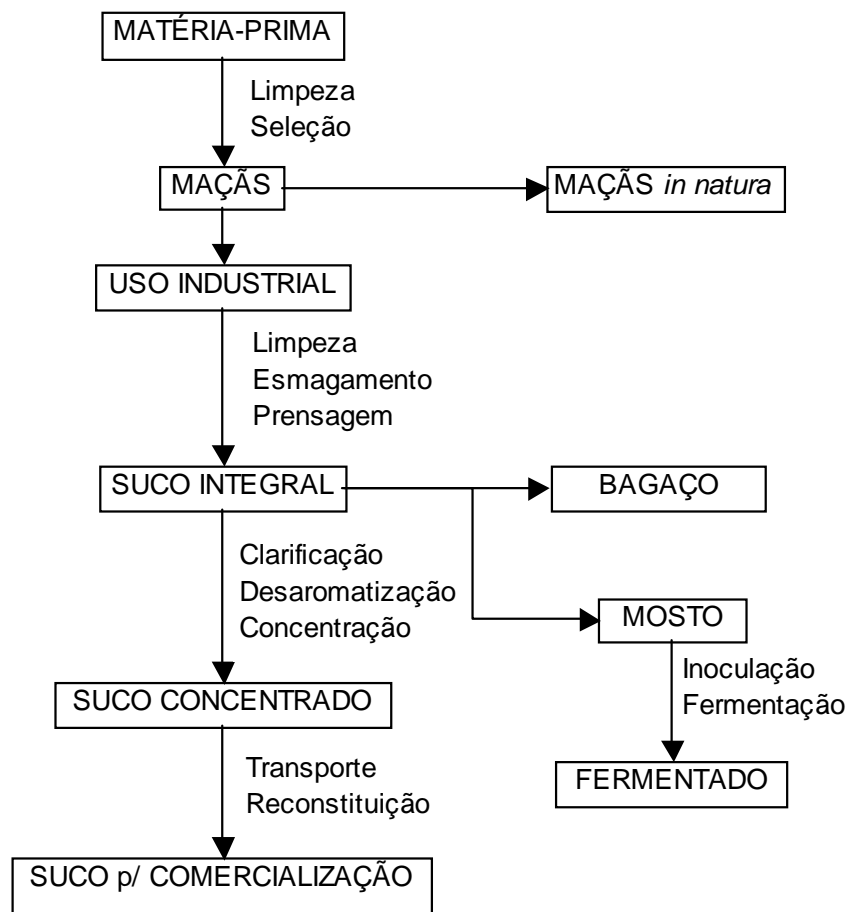


Figura 2.1 – Fluxograma do processamento da maçã (VILLAS BÔAS, 2001).

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. Os que atendem aos padrões de qualidade são destinados à comercialização e os frutos restantes são destinados ao processo industrial, sendo então limpos e higienizados externamente. As maçãs são então prensadas, gerando o bagaço (Figura 2.2). Durante a prensagem, o suco é extraído e o bagaço descartado (VILLAS BÔAS, 2001). Essa operação deve remover a máxima quantidade de suco sem quantidades significativas de sólidos ou de compostos fenólicos oriundos das cascas, que podem causar amargor e escurecimento. Essa condição pode ser alcançada com o uso de baixas pressões e menos passagens pela prensa (FELLOWS, 1988).

O suco extraído durante a prensagem é dividido e uma parte é clarificada. A clarificação do suco envolve a separação de partículas suspensas da matéria coloidal responsável pela turbidez, sendo a pectina a principal sujidade (FELLOWS, 1988). As enzimas pécticas, entre elas a poligalacturonase e a pectina metilesterase, são comumente utilizadas nessa etapa (VALENTAS *et al.* 1957).

Após a clarificação, o suco é desaromatizado e o aroma é comercializado. O caldo remanescente é concentrado, visando a produção de suco de maçã concentrado. A parte do suco não clarificada é corrigida quimicamente para a produção de mosto, destinado à fermentação, sendo utilizado na produção de bebidas como cidra, vinhos de maçã, aguardente e vinagre (VILLAS BÔAS, 2001).



Figura 2.2 – Prensagem das maçãs e produção do bagaço.

A partir do bagaço de maçã, inúmeros produtos de alto valor agregado têm sido obtidos por diferentes pesquisadores através da fermentação em estado sólido: enzimas (DE GREGORIO *et al.*, 2001; ZHENG E SHETTY, 2000; BEROVIC E OSTROVERSNIK, 1997; HANG E WOODAMS, 1994 a; HANG E WOODAMS, 1994b), cogumelos comestíveis (ZHENG E SHETTY, 2000; WORRAL E YANG, 1992), polifenóis (FOO E LU, 1999), polissacarídeos (STREDANSKI E CONTI, 1999), ácidos orgânicos (SHOJAOSADATI E BABAEIPOUR, 2002), etanol (NGADI E CORREIA, 1992), aromas (BRAMORSKI *et al.*, 1998), ácidos graxos (STREDANSKI E CONTI, 2000), entre muitos outros. A bioconversão e subsequente enriquecimento do bagaço de maçã com proteína microbiana também tem sido reportado (VILLAS BÔAS, 2001; ZHENG E SHETTY, 1998b; JOSHI E SANDHU, 1996).

O bagaço de maçã pode ser empregado como fonte de carboidratos para o crescimento de fungos comestíveis. Entre os fungos basidiomicetos de podridão branca, destacados pela habilidade em converter compostos lignocelulósicos e crescer utilizando o bagaço de maçã como substrato, estão o *Pleurotus ostreatus* (VILLAS BÔAS, 2001) e o *Lentinus edodes* (ZHENG E SHETTY, 2000; WORRAL E YANG, 1992). Estes fungos podem aumentar o valor nutricional do bagaço, e conseqüentemente, seu valor agregado, devido ao acréscimo de proteínas e vitaminas, além de uma maior disponibilização dos sais minerais do substrato, resultante da sua oxidação (VILLAS BÔAS, 2001; ZHENG E SHETTY, 1998b).

O emprego de *Rhizopus oligosporus* na bioconversão do bagaço de maçã, produzindo um alimento rico em proteína foi descrito por ZHENG E SHETTY (1998b). Foram investigados os efeitos da adição de CaCO_3 na correção do pH, de água no ajuste da umidade e de fontes de nitrogênio sobre o crescimento do fungo. O pH inicial do bagaço utilizado situava-se em torno de 3,1 a 3,8. O uso de CaCO_3 na neutralização do pH parece ideal, pois este composto possui baixo custo, podendo ser usado em grande escala, elevando o pH do bagaço para valores entre 5,8 e 7,0. A umidade do substrato também deve ser considerada para que o fungo atinja o crescimento máximo. Altos conteúdos de umidade resultam no aumento da produção de micélio, interferindo na transferência de oxigênio. Já os baixos teores de umidade reduzem o crescimento fúngico. O efeito do conteúdo de umidade do meio sólido sobre o crescimento microbiano pode ser mais bem expresso em termos de atividade de água (a_w), que indica a quantidade de água disponível para o crescimento do fungo. Na maioria dos cultivos em meio sólido a fonte de carbono vem do próprio substrato na forma solúvel ou insolúvel, enquanto a fonte de nitrogênio tem sido adicionada. O máximo crescimento foi obtido com a adição de 0,05 g de CaCO_3 , 2 mL de água, atingindo 81 % de umidade e atividade de água de 0,981 e suplementação com 0,05 g de NH_4NO_3 . O bagaço de maçã serviu não só como uma excelente fonte de carbono, mas também como um meio para o cultivo de fungos que podem ser usados como bioinoculantes na desintoxicação e biorremediação de solos. E, tratando-se de um fungo seguro como o *R. oligosporus*, o bagaço fermentado pode ser usado como ração animal.

A produção de enzimas a partir de resíduos de frutas pode ser muito interessante economicamente, pois o rejeito pode ser empregado como substrato para a obtenção de enzimas que são usadas na própria indústria que gerou o resíduo. BEROVIC e OSTROVERSNIK (1997) E HANG E WOODAMS (1994a) utilizaram o bagaço de maçã para a produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* em fermentação sólida. Esta e outras enzimas pécticas têm sido muito usadas na etapa de clarificação de sucos de fruta. Já HANG E WOODAMS (1994b) empregaram o bagaço na produção de β -glicosidase, enzima aplicada no aumento da concentração de aromas em sucos de fruta e vinhos, hidrolisando os precursores de compostos não voláteis.

A obtenção de ácidos graxos poliinsaturados também surge como uma aplicação interessante para o bagaço de maçã, graças à crescente demanda por estes compostos. STREDANSKY *et al.* (2000) avaliaram a viabilidade de produção de ácido γ -linolênico por fermentação em estado sólido do bagaço de maçã utilizando o fungo *Thamnidium elegans*. Resíduos de malte de cervejaria foram adicionados ao bagaço impregnado com uma solução nutriente, aumentando assim a porosidade do substrato. Os grãos de malte constituídos de alta porção de celulose e de outros polissacarídeos insolúveis previnem o empacotamento do meio, além de permitir uma disponibilidade de oxigênio mais alta aos microrganismos. A umidade utilizada para o cultivo foi de 60 % (p/p), pois o baixo conteúdo de umidade combinada ao pH ácido do substrato diminui significativamente o risco de contaminação, favorecendo o desenvolvimento do fungo. Para balancear a relação C:N do resíduo adicionou-se NaNO_3 . A maior produção de ácido γ -linolênico foi obtida quando o bagaço foi suplementado com óleo de amendoim que atuou como precursor na produção de AGL nas células do fungo.

O resíduo proveniente do processamento de maçã apresenta elevada umidade (em torno de 80 %), o que gera um custo elevado de transporte. O aproveitamento deste resíduo na própria indústria processadora de sucos é a melhor maneira de tornar viável economicamente a obtenção de produtos de interesse, valorizando este recurso como fonte de carbono, diminuindo significativamente a disposição do bagaço nos solos e contribuindo para a redução da poluição ambiental (VILLAS BÔAS, 2001).

2.5 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido, ou cultivo em meio semi-sólido, pode ser definido como o crescimento de microrganismos num substrato insolúvel úmido, utilizado como fonte de carbono, em ausência de água livre (NAGEL *et al.*, 1999; MAIORANO, 1990; PANDEY *et al.*, 2001). Este processo permite o cultivo de microrganismos, principalmente de fungos, de modo semelhante ao seu crescimento em habitat natural (JECU, 2000).

A ocorrência da fermentação em estado sólido é, com certeza, mais antiga que o próprio homem, sendo, portanto, muito difícil precisar o início desta prática (PANDEY *et al.*, 2001). Sabe-se, contudo, que vários alimentos processados dessa forma por microrganismos fazem parte da dieta de povos asiáticos há muitos séculos, como, por exemplo, a produção de “miso” na China, já há 2500 anos (MAIORANO, 1990). O processo de fabricação de koji – arroz cozido e fermentado por *Aspergillus orizae* – migrou da China para o Japão através de monges budistas no século VII, sendo em seguida difundido em outros países do sudeste da Ásia (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

No século XVIII a FES foi usada para a produção de vinagre a partir do bagaço de maçã. Já no final do século XIX a compostagem passou a ser empregada no tratamento de resíduos sólidos e, no início do século XX, a produção de metabólitos primários, como enzimas e ácidos orgânicos passou a ser realizada em FES. Também nesse período iniciou-se o desenvolvimento de biorreatores (PANDEY *et al.*, 2001).

No Ocidente, até a metade do século passado, as pesquisas utilizando a FES foram concentradas em torno da produção de enzimas microbianas. Porém, durante o período da Segunda Guerra Mundial, o desenvolvimento dos processos que envolviam a fermentação líquida, principalmente visando a produção de penicilina, foram amplamente estudados, negligenciando os processos em estado sólido. Há citações da produção de ácido cítrico em fermentação em estado sólido até 1936, retornando novamente o interesse nesses estudos somente em 1975. No Japão, o processo tradicional, realizado tradicionalmente em bandejas de madeira ou bambu, foi sendo

aperfeiçoado e por isso hoje o Japão é o país que detém tecnologias cada vez mais avançadas na obtenção de produtos através da FES (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

Um interesse renovado na fermentação em substrato sólido nos últimos dez anos reflete a necessidade da busca por tecnologias que reduzam custos de produção e a geração de resíduos. Atualmente a FES está sendo usada na bioconversão de rejeitos agro-industriais, visando à produção de ração enriquecida com proteína, além de inúmeros metabólitos de interesse. A aplicação da FES em escala industrial para produção de SCP ajudaria a aumentar os rendimentos e melhorar os fatores de conversão, reduzindo os custos do produto final (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000).

Muitos microrganismos são capazes de crescer em substratos sólidos e, entre eles, os fungos filamentosos se sobressaem de maneira significativa quando comparados a bactérias e algas, pois em condições de baixa atividade de água e disponibilidade de substratos insolúveis, os fungos apresentam um excelente crescimento, sendo capazes de explorar o substrato com a produção de hifas (MAIORANO, 1990). Entre os fungos, os que têm grande importância em processos semi-sólidos são os gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium*, além dos fungos de podridão branca (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000; DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

O inóculo para um processo de FES normalmente é composto por células vegetativas quando leveduras e bactérias são empregadas. No caso da utilização de fungos, podem ser usados micélios vegetativos ou uma suspensão de esporos. A inoculação de esporos aumenta a flexibilidade do processo, pois a suspensão pode ser armazenada. A concentração do inóculo é de grande importância, pois biomassa suficiente do microrganismo deve ser adicionada para evitar o crescimento de contaminantes. Por outro lado, aumentando a concentração de inóculo pode levar à excessiva produção de hifas, dificultando a aeração (MITCHELL *et al.*, 2000).

Um dos maiores atrativos da FES é que este processo permite a utilização de materiais baratos como substrato (STREDANSKY *et al.*, 2000). Comparada à fermentação submersa, esta técnica oferece vantagens adicionais, com uma substancial

redução de efluentes, além da possibilidade de utilização de resíduos agro-industriais e alimentícios como matriz sólida, resultando num processo mais favorável ao meio ambiente. A FES certamente será de grande valia para os países em desenvolvimento num futuro próximo, promovendo a obtenção de alimentos nutritivos a partir de substratos sem nenhum valor comercial. Entretanto a tecnologia envolvendo os processos de FES ainda deve ser mais desenvolvida (MITCHELL *et al.*, 2000).

A comparação entre a FES e a fermentação submersa, levando em consideração fatores relevantes aos processos fermentativos, pode ser observada na tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Comparação entre cultivo submerso e fermentação sólida (RAIMBAULT, 1998).

Fator	Cultivo Submerso	Fermentação em Estado Sólido
Substrato	Substâncias solúveis	Polímeros insolúveis
Condições de Assepsia	Esterilização com calor; controle asséptico	Uso de vapor; condições não estéreis
Aeração	Limitação de oxigênio; altos níveis de O ₂ são requeridos	Fácil aeração e alta superfície de troca entre ar e substrato
Água	Grandes volumes de água e de efluentes	Consumo limitado de água, baixa a _w ; sem efluentes
Aquecimento metabólico	Fácil controle de temperatura	Baixa capacidade de transferência de calor
Agitação mecânica	Boa homogeneização	Condições estáticas
Controle de pH	Fácil controle de pH	Substratos sólidos tamponados
Processo	Contínuo	Batelada
Contaminação	Riscos para linhagens específicas	Riscos para fungos com crescimento lento
Consumo energético	Alto consumo de energia	Baixo consumo de energia
Concentração do produto (g.L ⁻¹)	30 - 80	100 - 300

Fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, umidade, atividade de água, pH, aeração, agitação e tamanho de partícula são fatores de fundamental importância nos processos de FES (PANDEY *et al.*, 2001; RAIMBAULT, 1998).

Os substratos geralmente utilizados são resíduos constituídos de celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina, entre outros. A preparação e o pré-tratamento destes substratos muitas vezes fazem-se necessários, a fim de converter estes materiais em substâncias mais prontamente utilizáveis pelos microrganismos, como os açúcares simples. O tratamento do substrato pode ser feito através de métodos físicos, como a redução de tamanho e a secagem ou químicos, como a hidrólise ácida ou enzimática (RAIMBAULT, 1998). Também pode ser incorporada uma solução nutriente ao substrato sólido, visando adequá-lo às condições nutricionais do microrganismo. Para o enriquecimento protéico de resíduos sólidos, normalmente se introduz fonte de nitrogênio tais como amônia, uréia, triptona ou soluções sintéticas como sulfato de amônia (PANDEY *et al.*, 2001). A relação C:N deve ser levada em consideração e, quando da formulação do meio de cultura, deve-se considerar a composição da biomassa e fornecer as percentagens mínimas de cada nutriente necessárias ao desenvolvimento microbiano (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

O tamanho da partícula do substrato pode ser problemático, pois ele define a granulometria do meio e, quanto menor o tamanho, maior a área superficial e, conseqüentemente, maior a bioconversão; por outro lado, o substrato necessita de uma granulometria razoável que permita a circulação de ar entre a massa, bem como a dissipação de gases e de calor produzidos durante o crescimento microbiano. Quanto à porosidade, esta influencia diretamente na capacidade de absorção de água, que facilita o transporte de enzimas e metabólitos por entre o meio e o microrganismo (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

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

O controle de pH também pode ser crítico nos processos de fermentação em estado sólido (NAGEL *et al.*, 1999), pois como consequência da degradação dos açúcares, ocorre a formação de ácidos orgânicos que baixam o pH, assim como o consumo de sais de amônio. Por outro lado, se ácidos orgânicos presentes no substrato são assimilados, o pH aumenta, assim como a hidrólise de uréia resulta na alcalinização do meio (RAIMBAULT, 1998). As mudanças de pH ao longo do cultivo dependem principalmente do microrganismo e do substrato e para amenizar o efeito de uma variação brusca do pH, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções tampão durante a etapa de umidificação do substrato. A adição de sais de amônio ou uréia também pode ser usada no controle do pH. De um modo geral, na FES os valores de pH são baixos, favorecendo o crescimento de fungos e leveduras e dificultando o crescimento de bactérias (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

A umidade é o fator que está intimamente relacionado com a definição da fermentação em estado sólido e com as características do material biológico. A capacidade de retenção de água dos substratos é extremamente variável e depende de suas características de ligação com a água (RAIMBAULT, 1998). A umidade dos substratos utilizados em FES pode variar de 30 a 85 %, e esses valores interferem na cinética de crescimento microbiano. Os requerimentos de água pelos microrganismos são mais bem expressos em termos de atividade de água, que representa a disponibilidade de água no substrato sólido. A redução da atividade de água normalmente alonga a fase lag, diminui a velocidade específica de crescimento, resultando em baixa produção de biomassa (MITCHELL *et al.*, 2000). As bactérias requerem valores altos de atividade de água para crescer e dessa forma, quando baixas atividades de água são mantidas no substrato sólido, evita-se a contaminação por bactérias. Valores típicos de atividade de água para substratos sólidos encontram-se entre 0,95 e 0,98 (PANDEY *et al.*, 2001).

A aeração é responsável por funções importantes na fermentação em estado sólido, como a manutenção das condições aeróbias, a eliminação de CO₂, a manutenção da temperatura e do nível de umidade do substrato. A quantidade de ar

pode influenciar significativamente na produção de biomassa e de enzimas e, para um bom rendimento da fermentação é necessária uma grande área superficial do substrato, no qual o microrganismo pode se desenvolver em contato com o ar (RAIMBAULT, 1998). Dependendo da vazão de ar fornecida ao substrato, pode ocorrer uma perda de umidade devido à exaustão do ar, provocando um ressecamento não desejado no meio. Nesses casos, o uso de umidificadores de ar faz-se necessário (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

A agitação pode solucionar problemas relacionados à heterogeneidade do sistema, reduzindo os gradientes formados em reatores estáticos e aumentando a eficiência das transferências de calor e de massa. Entretanto, dependendo do microrganismo, a agitação pode causar ruptura das células, dificultando o crescimento (PANDEY *et al.*, 2001).

Um dos maiores problemas encontrados na FES é a determinação da concentração celular, pois o micélio do fungo encontra-se intimamente ligado à matriz sólida e não pode ser quantificado separadamente, ou seja, a medição direta da biomassa não é possível, a não ser em condições artificiais. Diferentes métodos podem ser usados para acompanhar o crescimento de microrganismos em FES: avaliação do consumo de oxigênio ou produção de CO₂; acompanhamento da produção de enzimas extracelulares ou metabólitos primários; medição de componentes celulares, como o conteúdo protéico, teores de ácidos nucléicos, concentração de glicosamina (ZHENG E SHETTY, 1998b) ou ergosterol; ou ainda através de métodos físicos, como a medida da condutividade elétrica do meio ou da queda de pressão em reatores de leito empacotado (RAIMBAULT, 1998).

Dependendo das particularidades do substrato e do microrganismo utilizados no processo, diferentes considerações devem ser levadas em conta na escolha do biorreator. Nos processos envolvendo microrganismos de rápido crescimento, a prevenção de contaminantes não é crucial, permitindo que se trabalhe em condições

não assépticas. Entretanto, a remoção de calor passa a ser o maior problema e o biorreator utilizado deve ser capaz de removê-lo (MITCHELL *et al.*, 2000).

Os reatores empregados na fermentação em estado sólido podem ser divididos em três tipos: os de bandeja, os agitados e os de leito empacotado. Os reatores de bandeja são caracterizados por sua simplicidade. O substrato é disposto sobre bandejas de madeira ou aço-inox, normalmente perfuradas, a fim de se facilitar a convecção de ar. Além das bandejas, são utilizadas bolsas plásticas microporosas para o acondicionamento do substrato. Neste tipo de reator, não há aeração forçada nem agitação mecânica. Por esse motivo, para evitar o aquecimento metabólico do meio e para manter condições aeróbias, apenas camadas finas de sólidos devem ser utilizadas (MORAES, 1999).

Entre os reatores agitados incluem-se os rotativos, tradicionalmente em forma de tambor, podendo ou não conter chicanas em seu interior. Existem também os reatores estáticos, em que outros sistemas de agitação asseguram a mistura do meio sólido (MORAES, 1999). A agitação pode ser contínua ou esporádica, o controle de temperatura é difícil, e a mistura do meio é associada com problemas de cisalhamento e danificação das estruturas de alguns microrganismos ou do meio (PANDEY *et al.*, 2001).

Os reatores do último tipo incluem os de leito empacotado e aeração forçada através da camada de substrato. Para uso em laboratório, esses reatores são tipicamente colunas cilíndricas feitas de vidro ou plástico. O controle da temperatura é feito através da colocação da coluna em um banho térmico, ou utilizando colunas encamisadas. A própria aeração forçada permite o controle da temperatura ao forçar a evaporação da água contida no substrato. Os reatores de coluna são os mais estudados, pois além de estarem associados com baixa contaminação bacteriana, minimizam os problemas de gradiente de temperatura, com a substituição do ar de dentro do reator. Entretanto, a diminuição da porosidade do leito com o progresso da reação pode ser problemática neste tipo de reator, devido ao empacotamento (MORAES, 1999).

2.6 *Candida utilis*

A levedura *Candida utilis* (Henneberg) – sinônimo *Pichia jadinii* – também conhecida como Torula, pertence à classe dos Ascomicetos (HAWKSWORTH *et al.*, 1983). Suas colônias têm coloração amarelada, e um sutil odor de éster. Pode exibir dimorfismo celular e agregados de células, dependendo das condições ambientais (VILLAS BÔAS, 2001). Isolada de fontes vegetais e animais, apresenta amplo habitat. Sua aceitação como fonte segura de proteínas pelo FDA, vem permitindo seu emprego em alimentos, bem como em ração animal (STRASKRABOVÁ *et al.*, 1980).

Segundo LITCHFIELD (1983), a tecnologia para a produção de SCP foi criada na Inglaterra em 1879, com a aeração de tanques usados na produção de fermento. Em 1900, nos EUA, a centrifugação foi empregada para separar as células do meio de cultivo. Entretanto, a utilização da biomassa de *Candida utilis* como fonte de proteína na alimentação humana e animal tornou-se popular na Alemanha, durante a Segunda Guerra Mundial. Cultivada em efluentes da indústria de papel e celulose e em hidrolisados de madeira, a levedura mostrou-se promissora como suplemento alimentar, contendo entre 50 e 55 % de proteína. Após a guerra, a produção de *C. utilis* foi introduzida nos EUA, sendo em seguida difundida em diversos países.

As células de *C. utilis* são normalmente cultivadas em processos contínuos ou em batelada, com temperatura em torno de 30°C e pH próximo a 4,5. São recuperadas por centrifugação e totalmente utilizadas na alimentação (CHRISTEN *et al.*, 1999). Por ser uma levedura que não apresenta efeito Cabtree, se condições aeróbicas estritas são fornecidas, não há produção de etanol e sim de biomassa (KONDO *et al.*, 1995).

Microrganismo importante industrialmente, utilizado na obtenção de metabólitos de interesse, *Candida utilis* possui capacidade de crescer em etanol como única fonte de carbono e energia e de utilizar pentoses, além de muitas outras fontes de carboidratos como substrato (STRASKRABOVÁ *et al.*, 1980; RODRIGUEZ *et al.*, 1998; KONDO *et al.*, 1995). Esta levedura tem sido extensamente cultivada em hidrolisados produzidos a partir de resíduos agro-industriais (KURBANOGLU, 2001; PARAJO *et al.*,

1995; ARAÚJO E D'SOUZA, 1985) ou até mesmo em efluentes e subprodutos de diferentes processos (LEE E KIM, 2001; VILLAS BÔAS E ESPOSITO, 2000; NIGAM, 1998; NIGAM, 1999). Em grande escala, *C. utilis* tem sido usada principalmente na produção de SCP. Também tem sido utilizada na obtenção de compostos orgânicos como acetato de etila, ácido acético (CHRISTEN *et al.*, 1999) e acetaldeído (POPA *et al.*, 2001).

Quanto a bioconversão de resíduos agroindustriais, VILLAS BÔAS (2001), realizou um estudo com *C. utilis* visando produzir um suplemento protéico para ração animal, a partir de bagaço de maçã. A levedura foi utilizada para diminuir os teores de açúcares livres no substrato, além de aumentar o conteúdo protéico e a digestibilidade do resíduo. A adição de sulfato de amônio ao bagaço favoreceu o aproveitamento dos açúcares, além de um aumento significativo dos parâmetros cinéticos.

No cultivo sobre o bagaço de maçã também foi verificada a presença de enzimas hidrolíticas e oxidativas como pectinases, xilanases, celulasas e manganês peroxidases. Após o cultivo sobre o bagaço de maçã, 76 % da lignina solúvel foi degradada. A celulose foi reduzida em 7,8 % e a pectina em 16 %. A presença de enzimas que degradam compostos lignocelulósicos em *Candida utilis* explica sua ocorrência num amplo habitat e esta capacidade de utilizar compostos lignocelulósicos pode ser muito útil para diversos processos, como na produção de enzimas industriais e, principalmente, na bioconversão de resíduos agro-industriais, que podem ser usados diretamente como substrato para a produção de *C. utilis* (VILLAS BÔAS *et al.*, 2002b).

O crescimento de *Candida utilis* sobre materiais de baixo valor comercial mostra-se como uma opção promissora na produção de suplementos protéicos para rações. PHETTEPLACE *et al.* (2000) estudaram a utilização de proteína unicelular de *C. utilis*, cultivada num substrato produzido a partir de grãos de milho quebrados, na ração de novilhos. Os bovinos foram alimentados com três rações: a convencional, formulada a base de caroço de algodão e uréia; a ração contendo SCP e a mistura das duas primeiras. A ração contendo SCP foi consumida mais rapidamente do que a ração convencionalmente utilizada. Parâmetros como ganho de peso e eficiência da dieta

foram semelhantes para as três dietas e as carcaças dos animais tratados com SCP não apresentaram diferenças quando comparadas aos animais alimentados com a ração tradicional.

Visando o aproveitamento de fontes de carbono de baixo custo, LEE E KIM (2001) utilizaram melaço, resíduo da produção de açúcar, como meio de cultura para obtenção de SCP de *Candida utilis*, buscando a condição de máxima produtividade em biomassa. Os cultivos foram realizados em batelada, batelada-alimentada e em cultura contínua. A adição de uréia e ácido fosfórico, assim como diferentes concentrações iniciais de açúcar foram avaliadas. Com o aumento da concentração inicial de açúcar, maior a produtividade em biomassa obtida, mas menor o fator de conversão substrato em células. O aumento da concentração inicial de açúcar resultou em produção de etanol, pois altas concentrações de açúcar no meio podem causar inibição de enzimas respiratórias, favorecendo o metabolismo fermentativo. Este problema pode ser superado com o cultivo em batelada-alimentada onde os nutrientes essenciais são complementados durante a cultura.

Hidrolisados de resíduos agro-industriais mostram-se adequados para o cultivo de leveduras. ARAUJO E D'SOUZA (1985) produziram biomassa de *Candida utilis* em hidrolisado de palha de arroz, acrescido de peptona e extrato de malte. Obtiveram células com 48,1 % de proteína bruta e perfil de aminoácidos completo, sendo deficiente apenas em aminoácidos sulfurados.

KURBANOGLU (2001) verificou a viabilidade do uso de hidrolisado de chifre de carneiro, resíduo abundante das indústrias cárneas na Turquia, rico em proteínas fibrosas, para produção de SCP de *Candida utilis*. O hidrolisado foi suplementado com extrato de levedura, glicose e KH_2PO_4 . As células foram recuperadas por centrifugação. A SCP de *Candida utilis* apresentou 49,8 % de proteína e todos os aminoácidos essenciais, com altas quantidades de ácido glutâmico e lisina, mostrando-se como um produto de alto valor agregado, produzido a partir de um resíduo gerado na indústria de alimentos.

2.7 *Rhizopus oligosporus*

O gênero *Rhizopus* pertence ao grupo dos Zigomicetos, da ordem dos Mucorales. Caracteriza-se pelo crescimento rápido em diversos ambientes como solos e vegetais. Em geral estes fungos são glicófilos, desenvolvendo-se em substratos contendo açúcares solúveis e amido. Também têm sido associados ao apodrecimento de frutas (HAWKSWORTH *et al.*, 1983). As colônias possuem aparência de algodão, tornando-se escuras com o tempo. Possuem um micélio vegetativo contínuo ramificado, em parte imerso no substrato, em parte aéreo. O micélio encontra-se conectado às estruturas de reprodução assexuada (esporângios). A reprodução sexuada ocorre a partir da formação de um zigosporo que, sob condições favoráveis, forma esporos que germinam para desenvolver um novo indivíduo (BOCQUET, 1985).

Os microfungos em geral possuem uma série de propriedades que os tornam importantes. Eles desempenham uma importante função nas indústrias de alimentos, pois possuem diferentes tipos de enzimas e são capazes de metabolizar misturas complexas de compostos orgânicos presentes na maioria dos resíduos. O cultivo destes fungos para obtenção de SCP mostra-se particularmente atrativo, pois suas células apresentam bom conteúdo protéico e baixas concentrações de ácidos nucléicos. Outra vantagem seria o fato de que os alimentos produzidos por fungos têm sido tradicionalmente consumidos em muitas partes do mundo. Estes microrganismos podem ser cultivados em quase qualquer tipo de substrato que contenha carboidratos, como os efluentes das indústrias madeireiras, têxteis e de alimentos (JIN *et al.*, 2002).

A espécie *Rhizopus oligosporus* (Saito) – sinônimo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* – tem sido utilizada há séculos na FES, especialmente na Ásia, para a fabricação de diversos alimentos a base de vegetais fermentados. *R. oligosporus* não só aumenta a digestibilidade e o conteúdo protéico dos vegetais como previne a formação de compostos tóxicos (ZHENG E SHETTY, 1998b).

Rhizopus oligosporus é o fungo empregado na fabricação do “tempe”, alimento tradicional na Indonésia e em países asiáticos. Consiste em grãos de soja descascados e

cozidos que são submetidos à fermentação fúngica. Este alimento possui alto teor protéico e tem conquistado um mercado interessante entre os alimentos vegetarianos (SPARRINGA E OWENS, 1999). Durante a produção de tempe o fungo utiliza diferentes enzimas como fosfatases, aminopeptidases e quimiotripsina. Lipases são utilizadas nas primeiras 24 horas de cultivo e após 40 horas de fermentação verifica-se a atuação de endoglucanases e endoxilanases (VARZAKAS, 1998).

Este fungo também possui alta atividade de enzimas amilolíticas e tem sido usado no tratamento de efluentes do processamento de amido, assim como em processos industriais para a produção de amilase. Reportado como excelente produtor de lipases, é capaz de hidrolisar triglicérides, liberando ácidos graxos (JIN *et al.*, 2002; PRINYAWIWATKUL *et al.*, 1996; UL-HAQ *et al.*, 2002; ZHENG E SHETTY, 1998a).

A produção de lipases pelo fungo *Rhizopus oligosporus* em fermentação em estado sólido e a influência de variáveis de processo sobre a produção da enzima foram estudadas por UL-HAQ *et al.* (2002). Diferentes resíduos agro-industriais foram utilizados como substrato, os quais foram umidificados com tampão fosfato, acondicionados em frascos erlenmeyer e autoclavados antes de serem inoculados. O fungo apresentou excelente atividade lipolítica e a atividade máxima foi obtida com o uso de um subproduto de amêndoas como substrato.

A obtenção de biomassa fúngica a partir de resíduos agro-industriais em FES foi estudada por CHRISTEN *et al.* (2000), que avaliaram a bioconversão de bagaço de mandioca, bagaço de maçã e grãos de soja por fungos do gênero *Rhizopus*, produzindo além de biomassa, compostos voláteis como álcoois flavorizantes e ésteres. Os substratos foram misturados em diferentes. O meio de cultivo influenciou significativamente o crescimento dos fungos do gênero *Rhizopus* e a maior produção de biomassa foi obtida com os meios contendo relação C:N entre 10 e 21. A formação de compostos voláteis também foi afetada pela composição do meio de cultivo. O etanol foi o composto volátil mais abundante, favorecido pelas altas relações C:N, além da baixa aeração fornecida nas condições estáticas utilizadas.

Visando a expansão do uso de ervilhas, vegetais ricos em proteína e de baixo custo, PRINYAWIWATKUL *et al.* (1996) verificaram as mudanças nos conteúdos de ácidos graxos, açúcares simples e oligossacarídeos de uma farinha de ervilha que, após cozimento, foi submetida à fermentação pelo fungo *R. oligosporus*. Após o cultivo do fungo a farinha apresentou aumento nos teores de ácidos palmítico, oléico e esteárico. O fungo consumiu toda a sacarose, além dos oligossacarídeos indesejáveis (rafinose e estaquiose) presentes na farinha, transformando-a num ingrediente com grande potencial para ser adicionado aos alimentos, enriquecendo-os nutricionalmente.

Outro vegetal rico em proteína, porém sub-utilizado devido à presença de compostos antinutricionais e altos conteúdos de fibra é o nabo. Os efeitos benéficos da redução destes compostos através da fermentação desse vegetal pelo fungo *Rhizopus oligosporus* foram investigados por VIG E WALIA (2001). O vegetal foi autoclavado para inativar enzimas hidrolíticas que pudessem mascarar o desempenho do fungo, sendo ainda acrescido de água. Após 10 dias de incubação a 25°C, o fungo reduziu significativamente os compostos antinutricionais, apresentando um aumento no teor de nitrogênio de 65,4 % e redução no conteúdo de fibras de 25,5 %. Após a fermentação o nabo passa a ser um vegetal próprio para o consumo humano, de alto teor protéico.

NAGEL *et al.* (1999) estudaram o controle de pH de uma cultura de *Rhizopus oligosporus* num meio sintético formulado a base de glicose, com o uso de soluções tampão. O cultivo foi realizado em meio sólido, em placas de Petri a 30°C. Os autores observaram que sem o controle de pH ocorre uma rápida acidificação do meio, inibindo a produção de biomassa. Já com um controle mínimo de pH a produção de biomassa aumenta consideravelmente. Diferentes soluções tampão com diferentes pHs iniciais foram testadas para encontrar o pH ótimo e o tampão mais adequado para o cultivo. Uma faixa ótima de pH entre 4,0 e 6,5 foi observada e nessa faixa a produção de biomassa não foi influenciada pelo pH. Com o uso de tampão ácido láctico (pH inicial de 4,0), a produção de biomassa foi mais baixa, pois o pH atingiu valores abaixo de 3,5. Isso indica que o crescimento de *R. oligosporus* pode ser dificultado em pHs abaixo de 4,0. O uso do tampão fosfato forneceu a maior produção de biomassa,

seguido do tampão ácido cítrico. Para evitar a contaminação bacteriana durante o cultivo, um ambiente levemente ácido foi preferido e por isso o uso do tampão ácido cítrico no controle do pH foi considerado o mais adequado (pH inicial de 4,9). Também foi verificada a influência da adição de fontes de nitrogênio sobre o crescimento do fungo. A adição de 5,0 g.L⁻¹ de triptona aumentou a μ_m e a produção de biomassa, além de diminuir significativamente a fase lag.

JIN *et al.* (1999) desenvolveram um processo para o tratamento de efluentes da indústria de processamento de amido com a simultânea produção de proteína fúngica e da enzima glucoamilase. *Rhizopus oligosporus* converteu mais de 95 % dos materiais amiláceos presentes do efluente, produzindo 5,2 g de biomassa a partir de um litro de efluente em 14 horas de cultivo a 35°C e pH inicial de 4,0. A biomassa fúngica apresentou 46 % de proteína considerada segura para o consumo humano e animal. O processo foi realizado em biorreator *air lift* em batelada, sem esterilização prévia e sem pré-tratamento do resíduo. A remoção de 95 % da DQO e do total de sólidos em suspensão foi verificada. A suplementação do efluente com nitrogênio e fósforo também foi avaliada. Um pequeno aumento no conteúdo protéico foi observado com a adição de fonte de fósforo. O uso de K₂HPO₄ foi mais efetivo do que o KH₂PO₄, indicando um possível requerimento de potássio.

Dando sequência a este estudo, JIN *et al.* (2002) desenvolveram uma planta piloto de um sistema integrado de tratamento de efluentes da indústria de amido e produção de proteína do fungo *Rhizopus oligosporus*. Dessa forma, desenvolveram uma tecnologia para reduzir potenciais poluentes e produzir proteína microbiana, utilizando o fungo para a conversão do material orgânico presente no efluente. O processo apresentou uma eficiente bioconversão do amido, produzindo 9,2 g.L⁻¹ de células e produtividade em biomassa de 0,88 g.L⁻¹.h⁻¹. A redução da DQO foi de cerca de 97 %, com 75 % de remoção de nitrogênio e fósforo. A biomassa recuperada apresentou conteúdo protéico em torno de 50 % e um bom perfil de aminoácidos, com alta concentração de lisina e pequena deficiência em metionina e tirosina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.1 Microrganismos

3.1.1 *Candida utilis*

Para o cultivo submerso utilizou-se a levedura *Candida utilis* CCT 3469 da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas – SP), apresentada na figura 3.1.

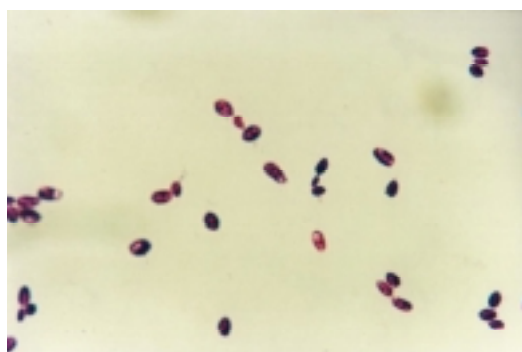


Figura 3.1 – *Candida utilis* CCT 3469 (VILLAS BÔAS, 2001).

O microrganismo foi conservado em meio YMA (*Yeast extract-malt extract agar*) composto por extrato de levedura (3,0 g.L⁻¹); extrato de malte (3,0 g.L⁻¹); peptona (6,0 g.L⁻¹); glicose (10,0 g.L⁻¹) e agar (20,0 g.L⁻¹). A cultura foi repicada

mensalmente em placas de Petri com meio YM, incubada a 30°C durante 72 horas e armazenada a 5°C.

3.1.2 *Rhizopus oligosporus*

O fungo filamentosso *Rhizopus oligosporus* CCT 4134, também depositado na Coleção de Culturas Tropical, apresentado na figura 3.2, foi empregado na fermentação em estado sólido do bagaço de maçã.



Figura 3.2 – *Rhizopus oligosporus* (RHIZOPUS, 2002).

O microrganismo foi conservado em meio de cultura MA (*Malt extract agar*), composto de extrato de malte (20,0 g.L⁻¹) e agar (20,0 g.L⁻¹). A manutenção da linhagem foi feita em placas de Petri contendo meio MA incubadas a 28°C durante sete dias e armazenadas a 5°C.

3.2 Substrato

O bagaço de maçã foi cedido pela empresa Yakult S. A., sediada na cidade de Lages (SC). Atualmente a empresa armazena o resíduo recém-processado num silo metálico localizado no pátio da fábrica. O bagaço é então doado para pecuaristas da região que buscam o resíduo na empresa e utilizam-no como ração.

O bagaço utilizado na realização dos experimentos, após ser processado na indústria, foi e mantido a -5°C em câmara fria por 24 horas, sendo então transportado para o Laboratório de Engenharia Bioquímica, acondicionado em sacos plásticos de 2,5 kg e armazenado a -20°C . Antes de ser utilizado, o bagaço foi descongelado à temperatura ambiente.

Nos ensaios de cultivo submerso utilizou-se o extrato obtido através da prensagem do bagaço de maçã. Para tanto, o bagaço foi acondicionado em sacos de algodão e, com o uso de uma prensa hidráulica, separou-se o extrato líquido do bagaço prensado. O extrato líquido foi filtrado em papel de filtro qualitativo, centrifugado (4000 rpm; 30 min) e armazenado a -20°C . O bagaço prensado também foi armazenado a -20°C , sendo posteriormente utilizado nos ensaios de FES.

Para a caracterização bromatológica e físico-química do bagaço de maçã e de seu extrato empregou-se a metodologia descrita nas NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). As análises efetuadas estão referidas no item 3.5.

3.3 Cultivo Submerso

3.3.1 Preparo do inóculo de *Candida utilis*

A fim de obter um inóculo com células na fase exponencial de crescimento, foi obtida uma curva de crescimento da levedura mediante cultivo em *shaker* (CERTOMAT BS-1, B. Braun Biotech International). Com o auxílio de uma alça de platina, 3 alçadas de *C. utilis*, crescida em meio YMA durante 72 h a 30°C , foram inoculadas em frascos erlenmeyer aletados, contendo 300 mL de caldo YM. Os frascos foram incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm. Aliquotas foram retiradas de 3 em 3 horas e o crescimento foi avaliado através da absorbância a 550 nm em espectrofotômetro (GENESYS 10 VIS, Spectronic Unicam). A relação linear existente entre a absorbância e a concentração celular foi obtida através da construção de uma curva de calibração.

3.3.2 Condições de cultivo

O extrato líquido do bagaço de maçã diluído com água destilada e acrescido de sulfato de amônio foi utilizado como meio de cultura. Testaram-se as seguintes composições de meio de cultura: extrato diluído 2 vezes acrescido de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio (relação C:N de aproximadamente 6:1, expresso em função da concentração de açúcares redutores e da concentração da fonte de nitrogênio); extrato diluído 10 vezes com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio (proporção C:N de 10:1) e extrato diluído 4 vezes com $8,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio (relação C:N de 3:1). O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 min dentro do biorreator e resfriado à temperatura ambiente antes da inoculação. Os ensaios foram realizados num biorreator de bancada (BIOFLO III, New Brunswick Scientific CO.) com volume útil de 4,0 L de meio, apresentado na figura 3.3.

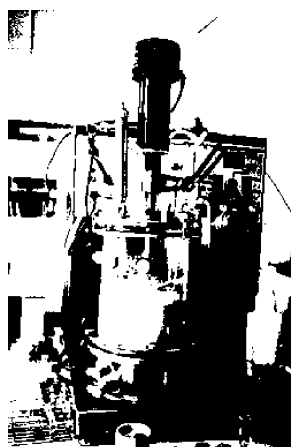


Figura 3.3 – Biorreator BIOFLO III utilizado nos ensaios de cultivo submerso.

O inóculo, preparado conforme descrito anteriormente, foi adicionado a 10 % (v/v). A aeração foi mantida constante em 1 vvm; a agitação em 600 rpm e a temperatura em 30°C . Ajustou-se o pH em 4,5 antes do cultivo, sendo mantido constante durante o ensaio. Alíquotas de 15,0 mL do meio de cultura foram retiradas, primeiramente quando o biorreator foi inoculado, e posteriormente em intervalos de 2 em 2 horas, para avaliação do crescimento e do consumo de açúcares. O experimento foi encerrado quando a levedura entrou na fase de crescimento estacionário.

O meio de cultivo foi centrifugado a 4000 rpm durante 40 minutos, o sobrenadante foi desprezado e a biomassa armazenada a -20°C. As células foram então submetidas a análises de proteína bruta, lipídios e cinzas, referidas no item 3.5.

3.3.3 Dosagem de biomassa

O aumento da concentração celular foi avaliado ao longo do tempo de cultivo indiretamente por turbidimetria e diretamente por gravimetria. Feitas as diluições necessárias, a medida da turbidez do meio de cultura foi obtida através da absorvância a 550 nm, lida em espectrofotômetro. Utilizou-se água destilada como referência.

No método gravimétrico filtrou-se um volume de 10,0 mL do meio de cultura em membrana Milipore de poliamida com poro de 0,80 µm, previamente seca em estufa a 95°C por 24 horas e pesada. As membranas contendo a biomassa foram secas em estufa a 95°C até atingir peso constante. A partir do peso seco das células, num volume de meio conhecido, determinou-se a concentração celular ao longo do cultivo.

3.3.4 Dosagem de açúcares redutores

Alíquotas de 2,0 mL do meio de cultura foram centrifugadas durante 40 min a 4000 rpm e o sobrenadante foi armazenado a -20°C, sendo posteriormente submetido à análise de açúcares redutores.

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

Em tubo de ensaio contendo 200 µl de amostra previamente diluída, adicionou-se 200 µl do reativo DNS¹. A mistura foi incubada em banho-maria a 100°C por 5 minutos, sendo em seguida resfriada em banho de gelo até a temperatura ambiente. Adicionou-se um volume de 2,0 mL de água destilada e, após 15 minutos, a absorbância a 540 nm foi lida em espectrofotômetro. Uma curva-padrão foi preparada com glicose em concentrações na faixa de zero a 2,0 g.L⁻¹.

3.3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para o estudo cinético do cultivo de *Candida utilis* no extrato líquido do bagaço de maçã, foram calculados alguns parâmetros, a partir dos resultados obtidos nas análises de biomassa e de açúcares redutores. As relações utilizadas nos cálculos destes parâmetros estão baseadas nas apresentadas por HISS (2001).

3.3.5.1 Velocidade específica de crescimento

Obtida durante a fase exponencial de crescimento, a partir do coeficiente angular da reta formada através da relação existente entre o logaritmo neperiano da concentração celular e o tempo de cultivo, demonstrada na equação 3.1:

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

onde: X = concentração celular (g.L⁻¹)

X₀ = concentração celular inicial (g.L⁻¹)

μ_m = velocidade específica de crescimento (h⁻¹)

t = tempo de cultivo (h)

¹ Reativo com DNS foi preparado dissolvendo 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 16 g de NaOH em água destilada. Adicionou-se lentamente 10 g de ácido dinitrosalicílico e completou-se o volume para 1,0 L.

3.3.5.2 Fator de conversão substrato em célula

O fator de conversão substrato célula foi determinado através do coeficiente angular da reta, obtida a partir da relação entre o consumo de açúcares redutores e a produção de biomassa, conforme a equação 3.2.

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} \quad (3.2)$$

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

X = concentração celular (g.L^{-1})

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

3.3.5.3 Produtividade em biomassa

Para a avaliação do desempenho do processo, calculou-se a produtividade em biomassa, utilizando a relação expressa na equação 3.3:

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (3.3)$$

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

X_m = concentração celular máxima (g.L^{-1});

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

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

3.4 Fermentação em Estado Sólido

Os ensaios de fermentação em estado sólido foram realizados com o intuito de avaliar a influência da adição de fonte de nitrogênio e de solução tampão sobre a produção de proteína do fungo *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 e sobre a manutenção do pH do meio de cultivo em torno do valor considerado ótimo para o fungo, que segundo NAGEL *et al.* (1999) situa-se na faixa de 4,0 a 6,5. A influência do volume da suspensão de esporos usado como inóculo sobre a produção de proteína fúngica também foi avaliada.

3.4.1 Preparo da suspensão de esporos

A suspensão de esporos foi produzida conforme metodologia descrita por NAGEL *et al.* (1999). Com o uso de uma alça de platina, retirou-se uma alçada de esporos do fungo *Rhizopus oligosporus* mantido em meio MA. Os esporos foram inseridos em tubos de ensaio contendo 2,0 mL de Tween 80 a 0,05 % sendo dispersos nesta solução com o uso de um agitador tipo vortex.

Garrafas de cultura contendo meio composto por glicose (20,0 g.L⁻¹); extrato de malte (20,0 g.L⁻¹); agar (20,0 g.L⁻¹) e peptona (1,0 g.L⁻¹), após serem autoclavadas a 121°C durante 15 minutos e resfriadas, foram inoculadas com os esporos dispersos em Tween 80 e incubadas a 30°C por 7 dias. Para a extração dos esporos adicionou-se às garrafas 10,0 mL de uma solução composta por peptona (1,0 g.L⁻¹); NaCl (8,5 g.L⁻¹) e Tween 80 (0,01 g.L⁻¹). Os esporos foram lavados com esta solução e raspados da superfície das garrafas, sendo em seguida filtrados em gaze cirúrgica estéril e armazenado a 5°C, dentro de um frasco estéril. A suspensão de esporos foi submetida a diluições sucessivas, inoculada em placas de Petri contendo o mesmo meio descrito anteriormente, incubada a 30°C durante 48 horas e submetida à contagem do número de unidades formadoras de colônias.

3.4.2 Sistema de colunas de Raimbault

Para os ensaios de fermentação em estado sólido utilizou-se um conjunto de colunas de Raimbault, construído conforme o sistema utilizado por MORAES (1999). A representação esquemática dos dispositivos utilizados pode ser observada na figura 3.4.

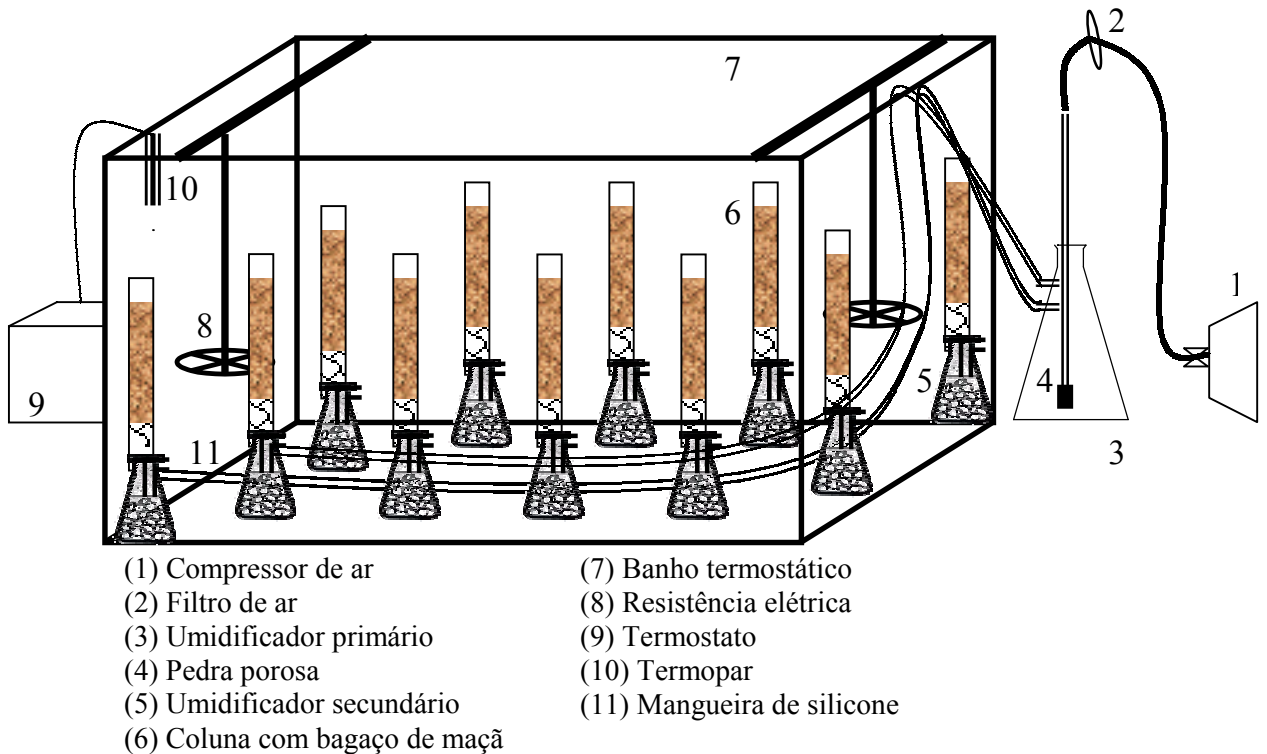


Figura 3.4 – Sistema de colunas utilizado na realização dos experimentos de FES.

As colunas feitas de vidro possuem 120 mm de altura e 35 mm de diâmetro. Os biorreatores foram imersos num banho termostático e aerados no sentido ascendente. O ar, provido por um compressor, antes de chegar às colunas, foi filtrado em membrana Milipore de poro 0,44 μm e umidificado duas vezes, através de um distribuidor de ar (umidificador primário) e de um umidificador secundário.

O distribuidor de ar foi construído a partir de um frasco erlenmeyer de 1000 mL, conectado à saída do compressor por um tubo de vidro contendo uma pedra porosa na extremidade, mergulhada em água destilada. O umidificador primário possui 12 saídas onde foram soldados tubos de vidro de 1,0 mm de diâmetro, cada um conectado a um umidificador secundário por mangueiras de silicone. O umidificador

secundário foi construído a partir de um frasco erlenmeyer de 250 mL, com uma entrada lateral por onde o ar úmido entra, sendo borbuhlado novamente em água destilada antes de ser fornecido às colunas.

3.4.3 Condições de cultivo

Utilizou-se em cada coluna 50 g do bagaço de maçã prensado, acrescido de fonte de nitrogênio e de solução tampão. Misturou-se ao bagaço descongelado, uréia ou sulfato de amônio e tampão fosfato ou tampão ácido cítrico. O bagaço foi então acondicionado nos reatores e autoclavados (121°C; 15 min). O pH inicial foi medido após a autoclavagem. A suspensão de esporos contendo 1×10^7 UFC.mL⁻¹ foi inoculada a 1 % (v/p) na extremidade superior das colunas (já encaixadas ao umidificador secundário) em condições assépticas. As colunas foram imersas no banho termostático a 30°C e conectadas ao umidificador primário. A vazão de ar fornecida às colunas ao longo dos experimentos, medida na saída dos reatores com o uso de um bolhometro, foi ajustada em 0,40 L.min⁻¹. Os ensaios foram conduzidos durante 72 horas.

Após o cultivo, o bagaço fermentado foi retirado das colunas e dividido em duas partes; uma porção foi seca a 60°C durante três dias em estufa e submetida à análise de nitrogênio total. A porção úmida foi utilizada na medição do pH final e nas determinações de proteína solúvel e de açúcares redutores. Na obtenção do pH, adicionou-se 20,0 mL de água destilada a 1,0 g de bagaço e o pH foi medido com o uso de um potenciômetro. Para analisar proteína solúvel e açúcares redutores, preparou-se, a partir de 1,0 g de bagaço úmido, um extrato aquoso. O bagaço foi transferido para um balão volumétrico de 50,0 mL e seu volume foi completado com água. Após incubação em banho-maria a 60°C durante 3 horas, o extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo, sendo então submetido às análises mencionadas.

3.4.4 Análise da proteína solúvel

A proteína solúvel das amostras foi avaliada mediante ensaio descrito por LOWRY *et al.* (1951), modificado por SCOPES (1994). Este método baseia-se na reação do biureto, onde ligações peptídicas e cadeias laterais polares das proteínas reduzem o cobre sob condições alcalinas que, por sua vez, reage com o reagente fenol. A reação de Folin-Ciocalteu, na qual o fosfo-molibdo-tungstato presente no reagente fenol é reduzido devido à reação com resíduos de certos aminoácidos, resulta numa coloração azul. Mistura-se a 500 μL de amostra previamente diluída, 2,5 mL do reagente C². Após incubação na temperatura ambiente por 10 min, adiciona-se 250 μL do reagente D e incuba-se a amostra por 30 minutos na temperatura ambiente. A absorbância é lida em espectrofotômetro a 750 nm. Uma curva-padrão com soroalbumina bovina em concentrações variando de zero a 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi preparada.

3.4.5 Planejamento fatorial

O cálculo dos efeitos e o tratamento estatístico dos resultados obtidos foram realizados com o auxílio do *software* Statistica 5.11. Na primeira série de experimentos utilizou-se um planejamento fatorial 2² (duas variáveis e dois níveis) para verificar em qual condição o fungo *R. oligosporus* produz mais proteína. Avaliou-se o efeito da adição de duas fontes de nitrogênio (uréia e sulfato de amônio) e a influência da adição de duas soluções tampão (tampão fosfato 0,18 M e tampão ácido cítrico 0,25 M) no aumento de proteína solúvel, bem como na manutenção do pH ao longo do cultivo. Um “controle” também foi avaliado, onde não houve adição de

² Reagente C: 1,0 mL do reagente A misturado em 50 mL do reagente B. Reagente A: 0,5 g de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g de citrato de sódio dissolvidos em 100 mL de água destilada. Reagente B (preparado sempre no dia do ensaio): 20g de Na_2CO_3 e 4,0 g de NaOH dissolvidos em 1,0 L de água destilada. Reagente D: reagente de Folin-Ciocalteus diluído em água destilada na proporção 1:1

nitrogênio e de tampão, mantendo as demais condições inalteradas. A matriz do planejamento 1, contendo a descrição dos experimentos e os valores das variáveis estudadas – fonte de nitrogênio (FN) adicionada a 5 % (p/p) e solução tampão (ST) adicionada a 10 % (v/p) – está apresentada na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Matriz do planejamento fatorial 1.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	FN	ST	ST	FN
1	-1	-1	Fosfato	Uréia
2	+1	-1	Ácido cítrico	Uréia
3	-1	+1	Fosfato	(NH ₄) ₂ SO ₄
4	+1	+1	Ácido cítrico	(NH ₄) ₂ SO ₄

Na segunda série de experimentos realizaram-se os mesmos ensaios do planejamento 1, modificando apenas a concentração das variáveis estudadas. Adicionou-se uréia e sulfato de amônio a 1 % (p/p) e soluções tampões mais concentradas: tampão fosfato 0,30 M e tampão ácido cítrico 0,50 M.

No terceiro planejamento duas concentrações de uréia e de tampão fosfato foram comparadas. A seqüência de experimentos encontra-se descrita na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Matriz do planejamento fatorial 3.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	Tampão fosfato (M)	Uréia (%)	Tampão fosfato (M)	Uréia (%)
1	-1	-1	0,18	1,0
2	+1	-1	0,30	1,0
3	-1	+1	0,18	5,0
4	+1	+1	0,30	5,0

Na quarta série de experimentos avaliou-se a influência do volume de inóculo no aumento da proteína solúvel. Utilizou-se um planejamento fatorial 2^3 com ponto central. A matriz do planejamento 4 encontra-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Matriz do planejamento fatorial 4.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	Uréia (%)	Tampão fosfato (M)	Inóculo (mL)	Uréia (%)	Tampão fosfato (M)	Inóculo (mL)
1	-1	-1	-1	3,0	0,24	0,25
2	+1	-1	-1	7,0	0,24	0,25
3	-1	+1	-1	3,0	0,36	0,25
4	+1	+1	-1	7,0	0,36	0,25
5	-1	-1	+1	3,0	0,24	0,75
6	+1	-1	+1	7,0	0,24	0,75
7	-1	+1	+1	3,0	0,36	0,75
8	+1	+1	+1	7,0	0,36	0,75
9	0	0	0	5,0	0,30	0,50
10	0	0	0	5,0	0,30	0,50
11	0	0	0	5,0	0,30	0,50

3.5 Análises Bromatológicas e Físico-Químicas

3.5.1 Caracterização do bagaço de maçã

3.5.1.1 Umidade

A umidade do bagaço de maçã foi obtida pelo método de dessecação, com o aquecimento direto da amostra a 70°C em estufa a vácuo, de acordo com as NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.5.1.2 *Cinzas*

O resíduo mineral fixo foi determinado através da incineração da amostra em mufla a 550°C, segundo as NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.5.1.3 *Nitrogênio total*

O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl, baseando-se no método proposto pelo AOAC (1990). Esta análise foi realizada na CIDASC.

3.5.1.4 *Carboidratos totais*

A determinação de carboidratos totais foi feita com o uso do método descrito por DUBOIS *et al.* (1956), baseado na reação que forma uma coloração amarela estável quando açúcares simples, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivativos são tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado. Em 500 µL de amostra previamente diluída, adicionou-se 500 µL de fenol a 5 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico. Após agitação, incubou-se na temperatura ambiente por 30 min e a absorvância a 490 nm foi lida em espectrofotômetro. A curva-padrão foi preparada com glicose de 0 a 0,1 g.L⁻¹.

3.5.1.5 *Açúcares redutores totais*

Os açúcares redutores foram dosados pelo método do DNS, referido em 3.3.4.

3.5.1.6 *Pectina*

A percentagem de ácido péctico da amostra foi obtida por gravimetria, conforme as NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.5.1.7 Fibras

Os teores de fibras em detergente ácido e fibras em detergente neutro foram obtidos segundo os métodos de GOERING E VAN SOEST (1970).

3.5.1.8 Atividade de água

Para a determinação da atividade de água utilizou-se o método da interpolação gráfica, descrito por LANDROCK E PROCTOR (1951). Foi pesado cerca de 1,0 g de amostra em recipientes previamente tarados. As amostras foram colocadas em dessecadores contendo diferentes soluções salinas supersaturadas, de umidades relativas conhecidas. Após 3 horas as amostras foram pesadas e a perda de peso em cada recipiente foi graficado em função da sua umidade relativa. O valor da atividade corresponde ao ponto onde não há perda nem ganho de peso.

3.5.2 Caracterização do extrato de bagaço de maçã

3.5.2.1 Resíduo seco

Para avaliação dos sólidos existentes no extrato obtido da prensagem do bagaço de maçã, foi determinada a percentagem de resíduo seco (p/v), segundo metodologia das NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.5.2.2 Sólidos totais / Sólidos insolúveis em água

Os sólidos totais e sólidos insolúveis do extrato foram quantificados de acordo com as NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.5.2.3 *Índice de refração*

A concentração de sólidos solúveis do extrato foi obtida pelo índice de refração, medida num refratômetro de Abbé, previamente aferido com água destilada a 20°C.

3.5.2.4 *Densidade relativa*

A densidade do extrato foi medida em um picnômetro, utilizando a água como líquido de referência.

3.5.2.5 *Acidez*

A determinação de acidez do extrato de bagaço de maçã foi avaliada segundo as NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), por titulação da amostra com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, utilizando como indicador a fenolftaleína.

3.5.2.6 *Fosfato*

A dosagem de fósforo inorgânico foi realizada com o uso de um kit colorimétrico (DOLES REAGENTES).

3.5.2.7 *Carboidratos totais / Açúcares redutores totais*

Os carboidratos totais foram obtidos pelo método de DUBOIS *et al.* (1956), referido em 3.5.1.4 e os açúcares redutores pelo método de DNS, descrito em 3.3.4.

3.5.2.8 *Proteína solúvel*

A dosagem de proteína solúvel foi feita pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

3.5.2.9 *pH*

O pH foi medido com o emprego de um potenciômetro previamente calibrado.

3.5.3 Caracterização da biomassa de *Candida utilis*

3.5.3.1 *Nitrogênio total / Proteína bruta*

O nitrogênio e a proteína bruta foram determinados pelo método de Kjeldahl. O fator 6,25 foi usado para o cálculo do teor de proteína bruta na amostra.

3.5.3.2 *Lipídios*

O extrato etéreo foi obtido por extração com éter de petróleo em aparelho extrator de Soxhlet, segundo as NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.5.3.1 *Cinzas*

As cinzas foram determinadas conforme descrito em 3.5.1.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo Submerso

4.1.1 Caracterização do extrato de bagaço de maçã

As determinações foram feitas em duplicata e as médias dos resultados obtidos são apresentadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Caracterização do extrato de bagaço de maçã.

Componente	Concentração no extrato
Resíduo seco (%)	11,82
Sólidos totais (%)	14,02
Sólidos insolúveis em água (%)	0,031
Índice de refração (°Brix)	1,3527
Densidade relativa	1,051
Acidez titulável (%)	0,130
pH	4,00
Proteína solúvel (g.L ⁻¹)	0,556
Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	188,68
Açúcares redutores totais (g.L ⁻¹)	107,94
Fosfato (g.L ⁻¹)	0,045

As características do extrato obtido da prensagem do bagaço de maçã foram determinadas a fim de se conhecer os principais componentes do substrato utilizado no

cultivo de *Candida utilis*. Como pode ser observado na tabela 4.1, o extrato apresenta elevados teores de carboidratos, mostrando-se como uma excelente fonte de carbono, rico em açúcares redutores. Se comparado ao hidrolisado produzido a partir de bagaço de cana de açúcar por PESSOA JR. *et al.* (1996), que apresentou $25,4 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares redutores, o extrato de bagaço de maçã destaca-se positivamente.

O extrato de bagaço de maçã possui baixa concentração de nitrogênio e por esta razão adicionou-se sulfato de amônio ao meio de cultivo. VILLAS BÔAS (2001) observou um aumento significativo da velocidade específica de crescimento de *Candida utilis* cultivada em bagaço de maçã com adição de sulfato de amônio, de $0,05 \text{ h}^{-1}$ para $0,09 \text{ h}^{-1}$, confirmando a necessidade de suplementação do bagaço de maçã com fonte de nitrogênio.

O extrato possui a consistência de uma calda, com densidade de 1,051 em relação à água destilada. Apresenta cor laranja e aroma adocicado. Com 14 % de sólidos totais, possui índice de refração a 20°C de 1,3527 que corresponde a 13,13 % de sólidos solúveis. A acidez titulável de 0,13 indica pouca degradação por microrganismos contaminantes, provavelmente inibidos pelo baixo pH de 4,0.

O extrato foi filtrado e centrifugado para que não ocorresse precipitação do meio após a autoclavagem, o que poderia interferir nas dosagens de biomassa e açúcares redutores ao longo do cultivo.

4.1.2 Preparo do inóculo de *Candida utilis*

No cultivo em meio YM em *shaker* a levedura apresentou uma velocidade específica de crescimento de $0,196 \text{ h}^{-1}$. O aumento do ln da absorbância a 550 nm em função do tempo de cultivo pode ser observado na figura 4.1.

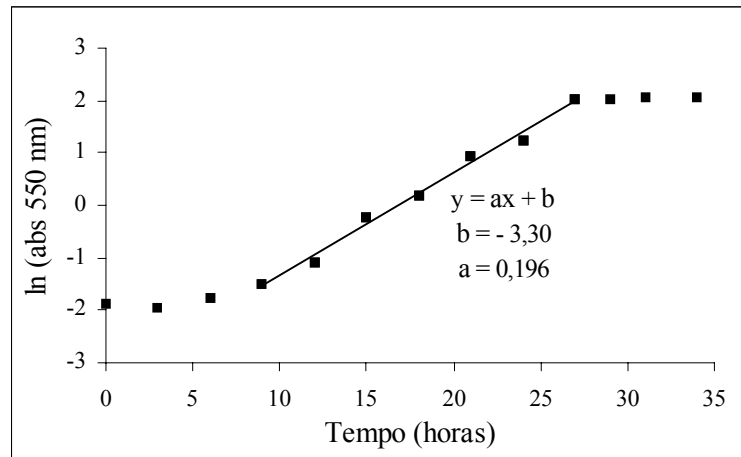


Figura 4.1 – Crescimento de *Candida utilis* CCT 3469 em meio YM, a 30°C e 150 rpm, avaliado por turbidimetria a 550 nm.

Observou-se uma fase lag com 9 horas de duração, seguida por uma fase exponencial de cerca de 18 horas. A levedura alcançou a fase estacionária de crescimento após 27 horas do início da cultura, atingindo uma concentração celular de 4,2 g.L⁻¹. O aumento da biomassa ao longo do cultivo pode ser visualizado na figura 4.2, que apresenta a curva de crescimento da levedura em meio YM.

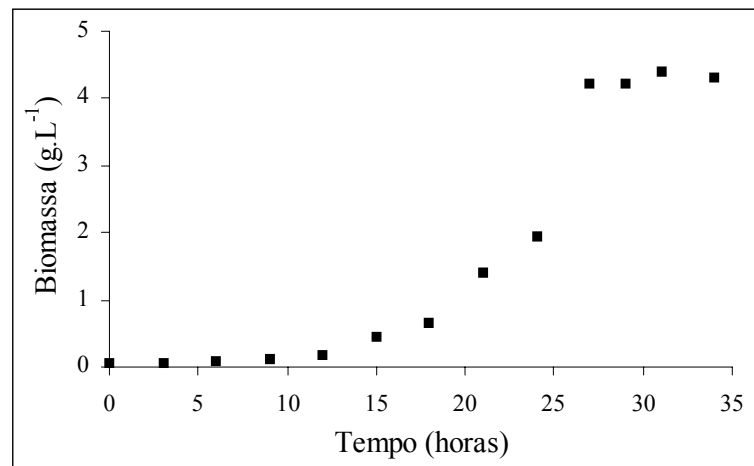


Figura 4.2 – Curva de crescimento de *Candida utilis* em meio YM, a 30°C e 150 rpm, avaliada através do peso seco da biomassa produzida.

Segundo CARVALHO E SATO (2001), para que um processo fermentativo seja eficiente o inóculo deve ser preparado de forma a obter uma concentração celular adequada, com capacidade produtiva elevada, garantindo bons rendimentos e/ou produtividades. Em cultivos visando a produção de biomassa, consegue-se produzir

maiores concentrações celulares se o inóculo contiver células na fase logarítmica de crescimento. Desta forma, após análise da curva de crescimento, o inóculo de *C. utilis* CCT 3469 utilizado nos cultivos em extrato de bagaço de maçã foi obtido com 27 horas de cultura em meio YM, com $4,2 \text{ g.L}^{-1}$ de células no final da fase exponencial.

A velocidade específica de crescimento de $0,196 \text{ h}^{-1}$ está de acordo com a encontrada por VILLAS BÔAS (2001), que também preparou o inóculo de *Candida utilis* em meio YM. Entretanto, o autor relata a ocorrência de diauxia após a fase exponencial de crescimento de cerca de 5 horas de duração, o que não foi verificado neste experimento. VILLAS BÔAS (2001) obteve um inóculo com μ_m de $0,20 \text{ h}^{-1}$ e concentração celular de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ com 48 horas de cultivo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 300 rpm. O autor considera que a μ_m obtida foi baixa quando comparada a outros estudos, devido à limitação de oxigenação do sistema utilizado para o cultivo. O fornecimento de oxigênio em cultivos realizados em *shaker* limita a produção de biomassa, pois não há aeração direta no meio. No presente estudo, para aumentar a transferência de oxigênio durante o preparo do inóculo de *C. utilis*, foram utilizados frascos erlenmeyer aletados.

KONLANI *et al.* (1996) utilizaram um meio sintético com $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose para o cultivo de *Candida krusei* em *shaker* (150 rpm). A levedura apresentou μ_m de $0,350 \text{ h}^{-1}$, quase o dobro da observada para *Candida utilis* neste estudo. Entretanto, a concentração celular produzida foi de apenas $2,58 \text{ g.L}^{-1}$. Essa diferença entre os resultados se deve provavelmente à diferença entre as espécies ao fato de que o meio sintético utilizado deve suprir todas os requerimentos nutricionais da levedura.

4.1.3 Cultivo de *Candida utilis* no extrato de bagaço de maçã

O cultivo de *Candida utilis* no extrato obtido através da prensagem do bagaço de maçã foi realizado em biorreator, com três diferentes composições de meio de cultivo, buscando uma condição que proporcionasse uma alta produtividade em biomassa, parâmetro de fundamental importância na produção de proteína unicelular.

O primeiro experimento foi realizado utilizando-se o extrato de bagaço de maçã com concentração inicial de açúcares redutores de $55,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com proporção C:N de aproximadamente 6:1. A levedura apresentou μ_m de $0,082 \text{ h}^{-1}$, como pode ser observado na figura 4.3, que mostra o aumento do ln da absorbância em função do tempo de cultivo. A concentração de biomassa e o consumo de substrato ao longo do tempo de cultivo, podem ser visualizados na figura 4.4.

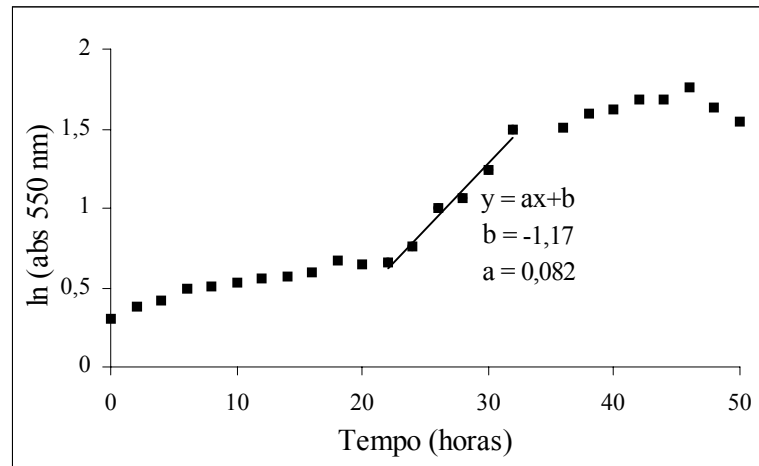


Figura 4.3 – Crescimento de *C. utilis* no extrato de bagaço de maçã acrescido de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com proporção C:N de 6:1, a 30°C , pH 4,5, agitação de 600 rpm e aeração de 1,0 vvm.

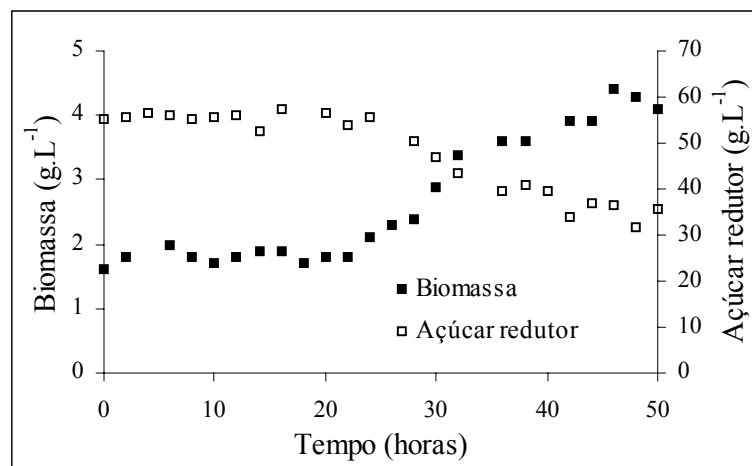


Figura 4.4 – Produção de biomassa e consumo de substrato ao longo do cultivo de *Candida utilis* em extrato de bagaço de maçã com proporção C:N de 6:1.

O crescimento de *C. utilis* no extrato de bagaço de maçã contendo 55 g.L^{-1} de açúcares redutores apresentou uma fase de adaptação extensa. A levedura demorou 20 horas para começar a utilizar os açúcares redutores na produção de biomassa. A fase

de crescimento exponencial durou cerca de 10 horas e, após 32 horas de cultivo, *Candida utilis* entrou na fase de crescimento estacionária, sendo então encerrado o experimento após 50 horas, com apenas 34 % dos açúcares redutores consumidos, alcançando $4,4 \text{ g.L}^{-1}$ de concentração celular.

Neste primeiro cultivo *Candida utilis* obteve um fator de conversão substrato em células de $0,109 \text{ g.g}^{-1}$, determinado pelo coeficiente angular da reta apresentada na figura 4.5. A produtividade em biomassa foi de $0,096 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

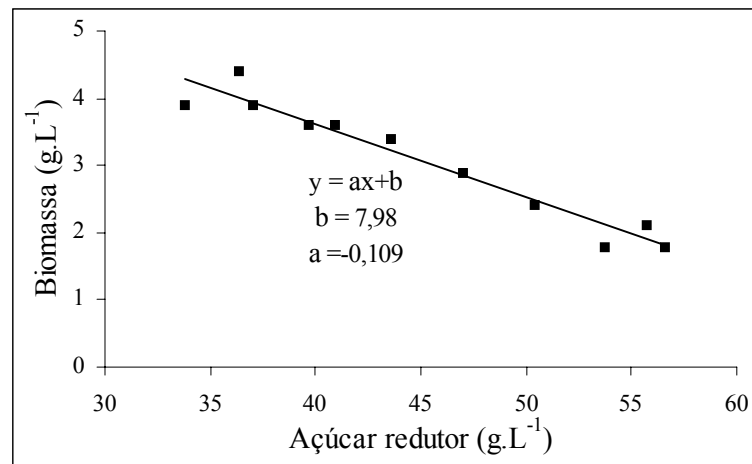


Figura 4.5 – Concentração celular de *Candida utilis* cultivada em extrato de bagaço de maçã com proporção C:N de 6:1 versus a concentração de açúcares redutores.

No segundo ensaio a concentração de açúcares redutores no meio de cultivo foi ajustada para $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio foi adicionado como fonte de nitrogênio. Nestas condições a levedura apresentou velocidade específica de crescimento extremamente baixa, de apenas $0,022 \text{ h}^{-1}$, cerca de 4 vezes menor do que no cultivo anterior. A diluição do extrato em 9:1 provavelmente limitou o crescimento da levedura em algum nutriente. O aumento do ln da absorbância a 550 nm ao longo do cultivo pode ser observado na figura 4.6. *Candida utilis* obteve uma fase lag curta, de apenas 4 horas, seguida por uma fase de crescimento exponencial de 12 horas. Entretanto, o microrganismo produziu pouca biomassa, alterando discretamente a turbidez do meio de cultura.

Como pode ser observado na figura 4.6, após 25 horas de experimento *Candida utilis* apresentou novamente um aumento de biomassa, mas após 32 horas de cultivo a

turbidez do meio entrou em declínio, indicando a diminuição da concentração celular. O experimento foi então finalizado e, em função do baixo desempenho da levedura nessas condições de cultivo, as análises de consumo de açúcares redutores e de aumento da concentração celular não foram realizadas.

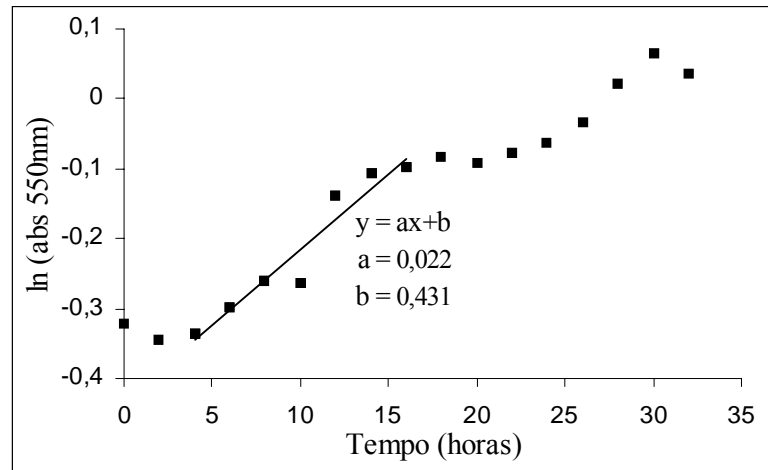


Figura 4.6 – Crescimento de *C. utilis* no extrato de bagaço de maçã acrescido de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com proporção C:N de 10:1, a 30°C, pH 4,5, agitação de 600 rpm e aeração de 1,0 vvm.

Para o terceiro ensaio ajustou-se a concentração de açúcares redutores do extrato em $25,0 \text{ g.L}^{-1}$ e adicionou-se $8,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio. A levedura apresentou velocidade específica de crescimento de $0,084 \text{ h}^{-1}$, como pode ser observado na figura 4.7 que mostra o aumento do ln da absorvância do meio de cultura ao longo do tempo de experimento.

A fase lag mostrou-se curta, de apenas 6 horas, seguida pela fase logarítmica que durou somente 7 horas. *Candida utilis* entrou na fase de crescimento estacionária após 13 horas de cultivo, atingindo $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Em 15 horas a concentração celular entrou em declínio e o experimento foi encerrado após 24 horas de crescimento com 56 % dos açúcares redutores consumidos.

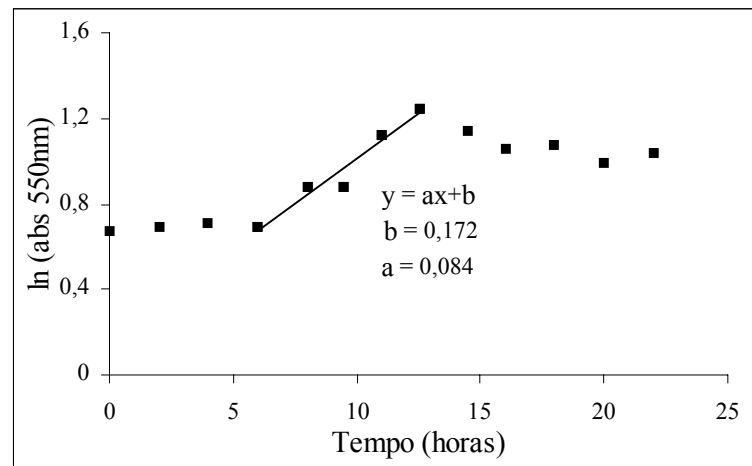


Figura 4.7 – Crescimento de *C. utilis* no extrato de bagaço de maçã acrescido de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com proporção C:N de 3:1, a 30°C, pH 4,5, agitação de 600 rpm e aeração de 1,0 vvm.

O aumento da concentração de biomassa e o consumo de açúcares redutores durante o cultivo podem ser observados na figura 4.8.

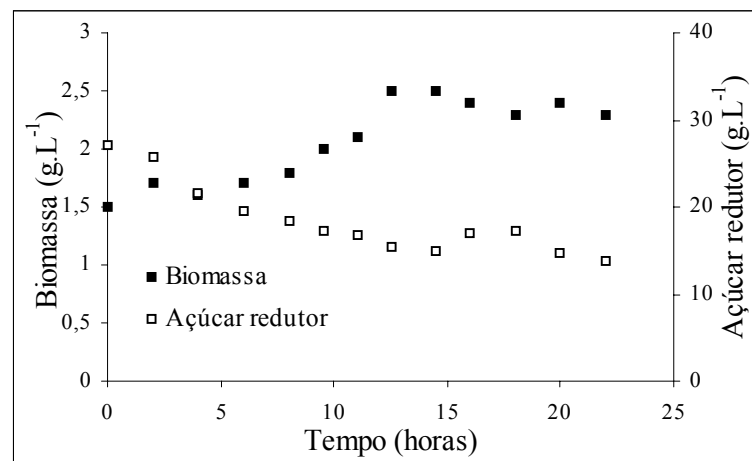


Figura 4.8 – Produção de biomassa e consumo de substrato ao longo do cultivo de *Candida utilis* em extrato de bagaço de maçã com proporção C:N de 3:1.

O fator de conversão substrato em células obtido neste experimento, onde o extrato foi preparado numa proporção C:N de 3:1, foi de $0,193 \text{ g.g}^{-1}$, como pode ser observado na figura 4.9 que apresenta a relação observada entre o aumento da concentração celular e o consumo de açúcares redutores durante o cultivo. A produtividade em biomassa foi de $0,192 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

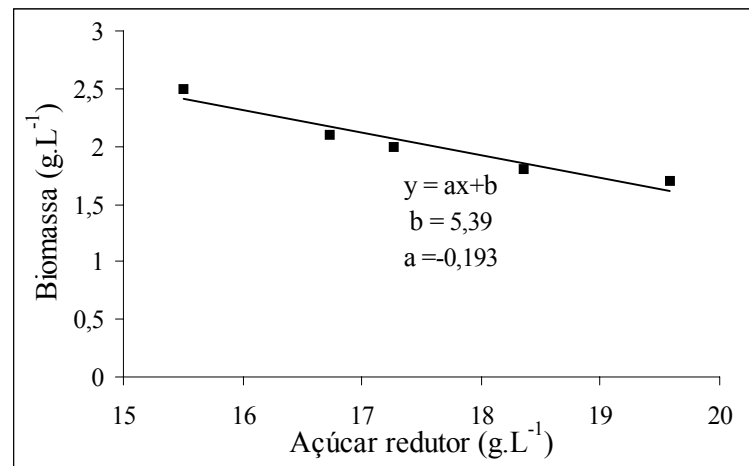


Figura 4.9 – Concentração celular de *Candida utilis* cultivada em extrato de bagaço de maçã com proporção C:N de 3:1 versus a concentração de açúcares redutores.

Avaliando os resultados obtidos a partir do cultivo de *Candida utilis* CCT 3469 em extrato de bagaço de maçã, observam-se parâmetros cinéticos discretos, com valores abaixo do esperado. A velocidade específica de crescimento da levedura no extrato preparado com proporção C:N de 3:1, de $0,084 \text{ h}^{-1}$, foi praticamente a mesma apresentada no ensaio com o extrato contendo a relação C:N de 6:1 (μ_m de $0,082 \text{ h}^{-1}$). Estes valores estão de acordo com os reportados na literatura para cultivos de leveduras do gênero *Candida* em hidrolisados de resíduos agro-industriais.

PESSOA JR. *et al.* (1996) cultivaram *Candida tropicalis* num hidrolisado de bagaço de cana de açúcar contendo $25,4 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares redutores. Após 6 horas de crescimento em batelada toda a glicose foi consumida, sem ocorrência de fase lag. O consumo total dos açúcares redutores ocorreu em 15 horas com parte do substrato convertido em etanol. Com vazão de ar de 1 vvm, *C. tropicalis* produziu $9,8 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, com velocidade específica de crescimento de $0,057 \text{ h}^{-1}$ e $Y_{X/S}$ de $0,30 \text{ g.g}^{-1}$. Com aeração de 2 vvm, a levedura apresentou μ_m de $0,137 \text{ h}^{-1}$ e $10,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa foram produzidas, evidenciando a forte influência da aeração sobre os parâmetros cinéticos do microrganismo, especialmente sobre a velocidade específica de crescimento.

O fator de conversão substrato em células obtido no cultivo de *Candida utilis* CCT 3469 no extrato de bagaço de maçã mais diluído ($0,193 \text{ g.g}^{-1}$) foi quase 2 vezes maior do que o obtido no cultivo com o extrato menos diluído ($Y_{X/S}$ de $0,109 \text{ g.g}^{-1}$). Este resultado confirma as observações de KONLANI *et al.* (1996) que cultivaram *Candida krusei* em meio sintético em batelada e em batelada alimentada e obtiveram $Y_{X/S}$ maiores quando baixas concentrações iniciais de glicose foram fornecidas. No cultivo em batelada, *Candida krusei* consumiu toda a glicose em 7 horas, com $4,86 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Em batelada alimentada, a glicose foi consumida em 11 horas e o açúcar residual diminuiu. Os autores observaram o maior fator de conversão substrato em células, de $0,33 \text{ g.g}^{-1}$, quando utilizaram a menor concentração inicial de glicose testada, de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$. LEE E KIM (2001) observaram comportamento semelhante no cultivo de *C. utilis* em melão onde a levedura apresentou $Y_{X/S}$ de $0,61 \text{ g.g}^{-1}$ quando a concentração inicial de glicose foi ajustada para $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ e de apenas $0,19 \text{ g.g}^{-1}$ quando a concentração inicial de glicose era de $50,0 \text{ g.L}^{-1}$.

A produtividade em biomassa de *Candida utilis* CCT 3469 no ensaio com o extrato de bagaço de maçã mais concentrado foi de $0,096 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto que no ensaio com o extrato menos concentrado a levedura alcançou o dobro deste valor (P_X de $0,192 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Estes resultados não estão de acordo com os reportados por LEE E KIM (2001) que observaram uma diminuição na produtividade em biomassa com o aumento da concentração inicial de açúcares. VILLAS BÔAS (2001) verificou que a adição $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio aumentou a produtividade em biomassa (de $0,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $0,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de *Candida utilis* cultivada em bagaço de maçã. KONLANI *et al.* (1996) conseguiram aumentar este parâmetro com o cultivo de *Candida krusei* em hidrolisado de sorgo em mais de 10 % quando o cultivo foi realizado em batelada-alimentada, conseguindo $0,57 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. LEE E KIM (2001) utilizaram melão no cultivo de *C. utilis* em batelada, batelada-alimentada e cultura contínua e verificaram a maior produtividade em biomassa no cultivo contínuo, com $2,15 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, seguida pelo cultivo em batelada-alimentada (P_X de $1,95 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e pelo cultivo em batelada (P_X de $0,24 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), o que leva a crer que em escala industrial o cultivo contínuo é o ideal.

A utilização do extrato de bagaço de maçã por *Candida utilis* CCT 3469 nas condições de cultivo testadas neste estudo foi considerada insatisfatória, pois elevadas concentrações de açúcares redutores foram observadas no final dos ensaios. No cultivo em extrato contendo proporção C:N de 6:1 apenas 34 % dos açúcares redutores foram consumidos. Já no cultivo em extrato contendo a relação C:N de 3:1 a utilização do substrato foi um pouco mais eficiente, com 56 % dos açúcares redutores consumidos. Estes resultados confirmam os dados encontrados por KONLANI *et al.* (1996). LEE E KIM (2001) reportaram este mesmo comportamento quando *Candida utilis* foi cultivada em melaço e observou-se que com o aumento da concentração inicial de glicose, maior a concentração de açúcares residuais e de etanol. Os autores alegam que no cultivo de leveduras em batelada, altas concentrações de açúcares no meio de cultura podem resultar na inibição das enzimas respiratórias, favorecendo processos fermentativos e a conseqüente produção de etanol, diminuindo a produção de biomassa. KONLANI *et al.* (1996) e CHRISTEN *et al.* (1999) afirmam que por ser uma levedura de efeito Crabtree negativo, *Candida utilis* não produz etanol quando condições aeróbicas estritas são fornecidas. O que pode ser observado, entretanto, é que em cultivo submerso o fornecimento de oxigênio é limitado pela sua solubilidade em água, sendo muito difícil suprir as exigências destes microrganismos na presença de elevados teores de açúcares. Segundo LEE E KIM (2001) estes problemas podem ser superados com o cultivo em batelada-alimentada, pois neste tipo de cultivo os nutrientes são fornecidos em concentrações mais baixas ao longo da cultura, evitando a ocorrência de inibição pelo excesso de substrato, fornecendo alta produtividade em biomassa.

4.1.4 Análise da biomassa de *Candida utilis*

A tabela 4.2 apresenta a composição da biomassa de *Candida utilis* CCT 3469 cultivada em extrato de bagaço de maçã.

Tabela 4.2 – Composição celular de *C. utilis* cultivada em extrato de bagaço de maçã.

Componente (% em peso seco)	Extrato diluído 2 vezes	Extrato diluído 4 vezes
Proteína Bruta	46,8	48,1
Lipídios	3,1	3,7
Cinzas	9,9	8,2

Observando os valores da tabela 4.2 pode-se verificar que a biomassa de *Candida utilis* produzida apresenta conteúdo protéico elevado, o que torna extremamente interessante sua produção. A presença de lipídios também é interessante na SCP, pois na aquicultura, especialmente na alimentação de moluscos, as células de microalgas têm sido preferidas em função do alto teor de ácidos graxos poliinsaturados em sua biomassa.

As células de *Candida utilis* CCT 3469 cultivadas no extrato obtido da prensagem do bagaço de maçã possuem composição semelhante à reportada na literatura. KURBANOGLU (2001) obteve células de *Candida utilis* cultivadas em hidrolisado de chifre de carneiro com 49,8 % de proteína bruta, 9,7 % de cinzas e 5,1 % de lipídios. PARAJÓ *et al.* (1995) cultivaram *Candida utilis* em hidrolisado de madeira e obtiveram uma biomassa com 53 % de proteína bruta. ARAUJO E D'SOUZA (1985) produziram células de *Candida utilis* em hidrolisado de palha de arroz que apresentaram 48 % de proteína bruta. KONLANI *et al.* (1996) cultivaram *Candida krusei* em hidrolisado de sorgo e a composição das células apresentou 9,08 % de cinzas 47,5 % de proteína bruta. A diferença existente na composição da biomassa de *Candida utilis* deve-se principalmente aos diferentes substratos utilizados para a produção de células, o que comprova o enorme potencial desta levedura para crescer em diferenciadas fontes de carbono e gerar biomassa com elevada quantidade de proteína.

4.2 Fermentação em Estado Sólido

4.2.1 Caracterização do bagaço de maçã

A tabela 4.3 apresenta as características físico-químicas do bagaço de maçã utilizado neste trabalho.

Tabela 4.3 – Caracterização físico-química do bagaço de maçã.

Componente	% (p/p)
Umidade	79,20
Cinzas totais	3,51
Nitrogênio total	0,56
Proteína solúvel	5,93
Carboidratos totais	59,80
Açúcares redutores totais	10,10
Pectina	7,66
Fibra em detergente ácido	38,20
Fibra em detergente neutro	24,30
Atividade de água	0,973
pH	4,0

Através da análise da composição do bagaço de maçã pode-se perceber que este resíduo constitui-se em um substrato rico para o desenvolvimento de microrganismos que sejam capazes de utilizar as fontes de carbono disponíveis. Segundo ANUPAMA E RAVINDRA (2000) são os fungos que possuem maior capacidade de explorar este tipo de substrato rico em carboidratos, principalmente fibras, açúcares redutores e pectina.

O bagaço de maçã apresentou composição semelhante à reportada por VILLAS BÔAS (2001), demonstrada na tabela 2.2. O resíduo mostra-se rico em fontes de carbono, mas seu conteúdo protéico é baixo. Na caracterização do bagaço de maçã utilizado por JOSHI E SANDHU (1996) em seus experimentos, a proteína solúvel apresentou concentração de 3,14 %, valor ainda mais baixo do que os 5,93 % de proteína solúvel presentes no bagaço utilizado neste trabalho. Com teor de umidade de

79,2 %, o bagaço apresentou atividade de água de 0,973, o que está de acordo com o valor encontrado por ZHENG E SHETTY (1998b), de 0,981 para um bagaço de maçã com 80,7 % de umidade. O substrato utilizado nos experimentos apresentou umidade de 85 % após a adição da solução tampão. O pH de 4,0 também está em conformidade com o reportado por JOSHI E SANDHU (1996) que utilizaram um bagaço com pH inicial de 4,2.

4.2.2 Primeira série de experimentos

Os resultados obtidos na primeira série de experimentos, onde adicionou-se ao bagaço de maçã fonte de nitrogênio (FN) a 5 % e solução tampão (ST) a 10 %, estão apresentados na tabela 4.4. As duas respostas avaliadas – proteína solúvel (PS) e variação entre o pH inicial e final (Δ pH) – assim como os valores obtidos para o cultivo controle (C) e para o bagaço de maçã não cultivado (B) também podem ser observados.

Tabela 4.4 – Resultados do planejamento fatorial 1.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis reais		Respostas	
	FN	ST	ST	FN	PS (%)	Δ pH
1	-1	-1	Fosfato	Uréia	15,73	1,01
2	+1	-1	Ácido cítrico	Uréia	13,23	0,85
3	-1	+1	Fosfato	(NH ₄) ₂ SO ₄	7,42	0,06
4	+1	+1	Ácido cítrico	(NH ₄) ₂ SO ₄	7,10	0,21
C	-	-	-	-	8,15	0,12
B	-	-	-	-	5,93	-

A estimativa dos efeitos para a primeira série de ensaios, calculada pelo software Statistica 5.11, com nível de confiança de 95 %, é mostrada na tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Estimativa dos efeitos para as respostas estudadas no planejamento 1.

	Proteína Solúvel (%)	ΔpH
Média	11,84	0,531
Solução Tampão	-1,22	-0,008
Fonte de Nitrogênio	-9,13	-0,798
ST x FN	1,55	0,153

Os efeitos calculados pelo Statistica indicam que a variável fonte de nitrogênio possui uma influência significativa sobre a produção de proteína solúvel, pois quando sulfato de amônio foi usado como fonte de nitrogênio ao invés de uréia, o teor de PS diminuiu em média 9,13 %. A variável solução tampão e a interação entre FN e ST não apresentaram significância estatística sobre a produção de proteína neste primeiro planejamento experimental.

Na figura 4.10 observa-se a produção de proteína, a concentração de açúcares redutores residuais e o teor de nitrogênio total do bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 1. Para facilitar a comparação, os valores obtidos para o controle e para o bagaço não cultivado também podem ser observados neste gráfico.

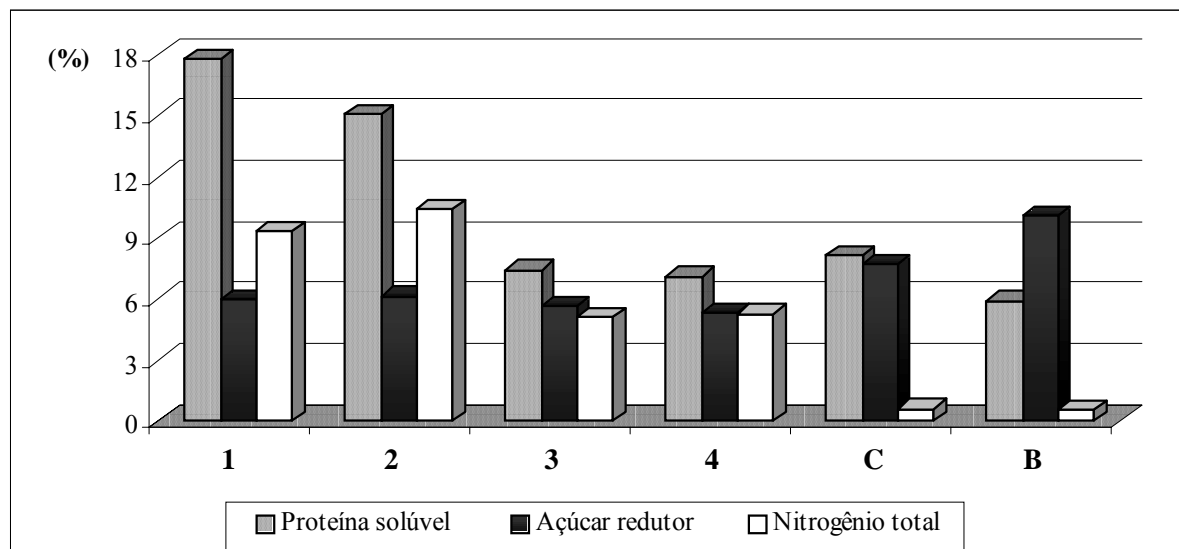


Figura 4.10 – Produção de proteína solúvel, concentração de açúcares redutores residuais e teor de nitrogênio total do bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 1.

Observa-se que a maior produção de proteína solúvel ocorreu no ensaio 1, onde o bagaço de maçã foi suplementado com uréia a 5 % e tampão fosfato 0,18 M. Os ensaios 3 e 4, ambos suplementados com sulfato de amônio, apresentaram um aumento no teor de proteína solúvel comparável ao do controle, ou seja, o fungo não foi capaz de converter eficientemente o sulfato de amônio em proteína. Este fato também pode ser concluído através da análise de nitrogênio total, pois nos ensaios 1 e 2 (ambos acrescidos de uréia) a quantidade de nitrogênio está bem acima daquela concentração adicionada (5 %), evidenciando um enriquecimento do teor de nitrogênio em função do crescimento do fungo.

Em todos os ensaios houve uma redução significativa do teor de açúcares redutores, chegando a 47,5 % de consumo no ensaio 4. O controle obteve a maior concentração residual de açúcares redutores, indicando que a suplementação com fonte de nitrogênio e a adição de solução tampão facilitou o consumo destes componentes. A degradação dos polímeros estruturais do bagaço de maçã como celulose, hemicelulose e pectina, leva a um aumento na concentração de açúcares redutores, o que explica o fato do ensaio que apresentou maior enriquecimento protéico (e maior crescimento do fungo) não ser aquele com a menor concentração de açúcares redutores residuais. O fungo apresentou um bom desempenho, enriquecendo o bagaço em quase 3 vezes o seu teor protéico e consumindo praticamente a metade dos açúcares redutores disponíveis.

As variáveis estudadas não apresentaram influência significativa na variação do pH ao longo do cultivo e, como pode ser visto na tabela 4.4, a variação do pH nas condições estudadas foi pequena. A maior diferença entre o pH inicial e final foi obtida no ensaio 1, que apresentou a melhor produção de proteína fúngica e conseqüentemente o melhor crescimento, o que levou a uma redução de pH mais pronunciada. Os valores de pH inicial e final dos ensaios do planejamento 1 estão apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Valores de pH inicial e final do planejamento 1.

Ensaio	pH inicial	pH final
1	7,11	6,10
2	7,42	6,57
3	3,78	3,72
4	3,89	3,68
C	3,78	3,66

Observa-se na tabela 4.6 que em nenhum ensaio a faixa de pH encontra-se dentro da faixa ótima para o fungo (entre 4,0 e 6,5). Nos ensaios suplementados com uréia (1 e 2) o pH do substrato ficou perto da neutralidade, enquanto que nos ensaios onde se adicionou sulfato de amônio, o pH inicial mostrou-se ácido, independente do tipo de solução tampão utilizada. Este fato leva a crer que a fonte de nitrogênio adicionada a 5 % determina o pH do meio, mascarando a ação da solução tampão nas concentrações utilizadas. A uréia, após a autoclavagem, aumentou consideravelmente o pH do bagaço. Já o sulfato de amônio não alterou significativamente o pH inicial do meio o que pode ser confirmado quando comparado ao cultivo controle que apresentou praticamente os mesmos valores de pH inicial e final.

4.2.3 Segunda série de experimentos

O segundo planejamento fatorial foi realizado para verificar os resultados obtidos no planejamento 1, já que os valores de pH foram visivelmente afetados pela concentração da fonte de nitrogênio. Para tanto, uréia e sulfato de amônio foram adicionados numa concentração mais baixa (1 %) e os tampões foram adicionados em concentrações mais altas (tampão fosfato 0,30 M e tampão ácido cítrico 0,50 M). Os resultados obtidos com o segundo planejamento são apresentados na tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Resultados do planejamento fatorial 2.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Respostas	
	FN	ST	ST	FN	PS (%)	Δ pH
1	-1	-1	Fosfato	Uréia	11,25	0,98
2	+1	-1	Ácido cítrico	Uréia	10,84	0,75
3	-1	+1	Fosfato	(NH ₄) ₂ SO ₄	7,52	0,90
4	+1	+1	Ácido cítrico	(NH ₄) ₂ SO ₄	10,48	0,45
C	-	-	-	-	8,15	0,12
B	-	-	-	-	5,93	-

A estimativa dos efeitos para o segundo planejamento fatorial calculada pelo software Statistica 5.11, com nível de confiança de 95 %, é mostrada na tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Estimativa dos efeitos para as respostas estudadas no planejamento 2.

	Proteína Solúvel (%)	Δ pH
Média	10,02	0,770
Solução Tampão	1,23	-0,34
Fonte de Nitrogênio	-2,05	-0,190
ST x FN	1,69	-0,110

A variável FN mostrou novamente uma influência significativa no aumento de proteína solúvel, mesmo adicionada em menor concentração. A utilização de sulfato de amônio ao invés de uréia diminuiu a produção de proteína solúvel em 2,05 % em média, neste planejamento fatorial. A variável ST não apresentou influência significativa sobre a resposta PS. Entretanto, a interação entre a fonte de nitrogênio e a solução tampão obteve significância estatística, ao contrário do planejamento 1. Estes resultados confirmam a suspeita de que as fontes de nitrogênio adicionadas a 5 % mascararam a ação das soluções tampão a baixas concentrações.

Na figura 4.11 observa-se a produção de proteína, a concentração de açúcares redutores residuais e o teor de nitrogênio total do bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 2.

Percebe-se, assim como no planejamento 1, que a maior produção de proteína foi alcançada com o bagaço adicionado de uréia e tampão fosfato (ensaio 1). A combinação entre sulfato de amônio e tampão ácido cítrico (ensaio 4) promoveu uma produção de PS comparável a dos ensaios suplementados com uréia. Entretanto, assim como ocorreu no planejamento 1, os ensaios 1 e 2 possuem teor de nitrogênio total maior, indicando um incremento no teor de nitrogênio como consequência do crescimento do fungo. Os açúcares redutores não foram consumidos tão eficientemente quanto no planejamento 1, indicando que maiores concentrações de fontes de nitrogênio facilitam o consumo de açúcares. Novamente o controle apresentou o menor consumo de açúcares, confirmando os resultados do planejamento 1. O ensaio que obteve a maior quantidade protéica não foi o que apresentou o menor conteúdo de açúcares redutores residuais, assim como ocorreu no planejamento 1.

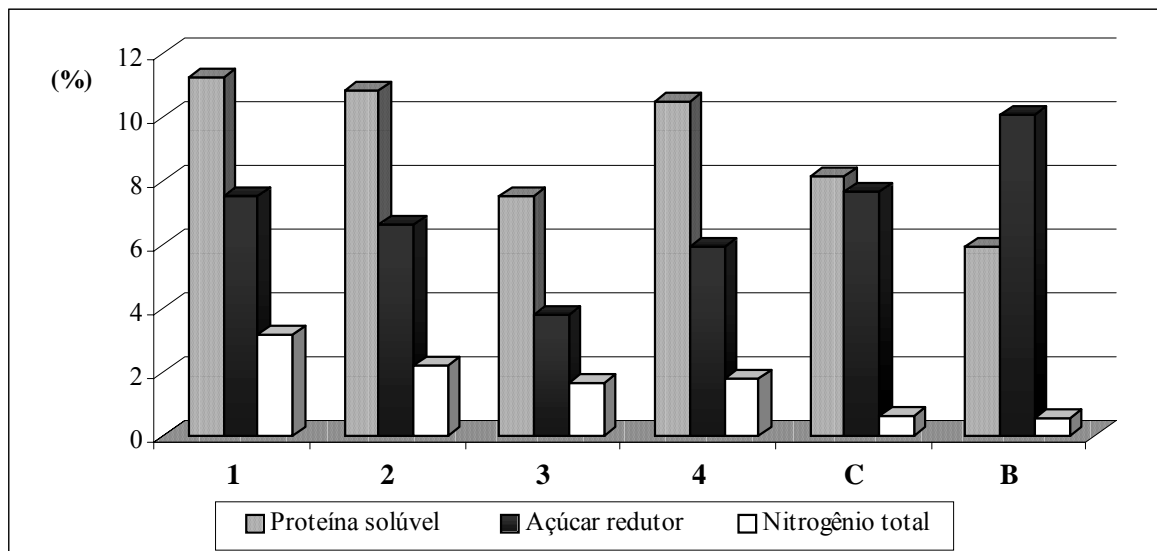


Figura 4.11 – Produção de proteína solúvel, concentração de açúcares redutores residuais e teor de nitrogênio total no bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 2.

No planejamento 2 a variação do pH também foi pequena e não foi afetada pelas variáveis estudadas. Novamente o ensaio com a maior produção de proteína

solúvel foi aquele com a maior variação de pH. Os valores de pH inicial e final de cada ensaio estão apresentados na tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Valores de pH inicial e final do planejamento 2.

Ensaio	pH inicial	PH final
1	5,88	4,90
2	5,76	5,01
3	4,23	3,33
4	3,81	3,36
C	3,78	3,66

Os ensaios suplementados com uréia, além de apresentarem os maiores teores de proteína, obtiveram valores de pH inicial e final dentro da faixa ótima de crescimento do fungo. Mais uma vez observa-se que quando suplementado com sulfato de amônio o meio torna-se mais ácido e quando adicionado de uréia o pH aparece mais elevado.

A partir dos resultados obtidos com os planejamentos 1 e 2, percebe-se que a combinação uréia e tampão fosfato foi aquela que forneceu o maior enriquecimento protéico do bagaço de maçã, atingindo 15,73 e 11,25 % de proteína solúvel nos planejamentos 1 e 2, respectivamente. Por esta razão, definiu-se a uréia como a melhor fonte de nitrogênio e o tampão fosfato como a melhor solução tampão para o crescimento de *Rhizopus oligosporus* nas condições experimentais utilizadas.

4.2.4 Terceira série de experimentos

Definidas as variáveis qualitativas, partiu-se para a determinação das concentrações de uréia e de tampão fosfato que fornecem os maiores teores protéicos, através do planejamento 3. Os resultados obtidos com o planejamento 3 são apresentados na tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Resultados do planejamento fatorial 3.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Respostas	
	T. Fosfato (M)	Uréia (%)	T. Fosfato (M)	Uréia (%)	PS (%)	Δ pH
1	-1	-1	0,18	1,0	13,05	0,87
2	+1	-1	0,30	1,0	11,24	0,98
3	-1	+1	0,18	5,0	17,79	1,01
4	+1	+1	0,30	5,0	30,75	0,80
C	-	-	-	-	8,15	0,12
B	-	-	-	-	5,93	-

A estimativa dos efeitos para o terceiro planejamento fatorial calculada pelo software Statistica 5.11, com nível de confiança de 95 %, é mostrada na tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Estimativa dos efeitos para as três respostas estudadas no planejamento 3.

	Proteína Solúvel (%)	Δ pH
Média	18,21	0,868
Tampão Fosfato	5,58	-0,139
Uréia	12,12	-0,119
T. fosfato x Uréia	7,39	-0,264

No planejamento 3 a variável tampão fosfato mostrou-se estatisticamente significativa, pois nos ensaios onde a concentração da solução tampão foi aumentada de 0,18 para 0,30 M, observou-se um aumento de proteína solúvel de 5,58 % em média. A adição de uréia também apresentou forte influência na produção protéica e, quando sua concentração passa de 1 para 5 % a quantidade de proteína solúvel aumenta 12,12 % em média. A interação entre as duas variáveis também apresentou significância estatística na produção de proteína. A melhor condição foi a do ensaio 4, com uréia a 5 % e tampão fosfato 0,30 M, proporcionando um aumento de mais de 5 vezes no teor de proteína do bagaço de maçã, apresentando 30,25 % de proteína solúvel após o cultivo.

Na figura 4.12 observa-se a produção de proteína, a concentração de açúcares redutores residuais e o teor de nitrogênio total do bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 3.

Observa-se que o aumento da concentração de uréia aumenta a quantidade de proteína solúvel e esse efeito é muito mais pronunciado quando a concentração de tampão fosfato também é aumentada. Percebe-se que o incremento no teor de nitrogênio total foi praticamente o mesmo nos ensaios 3 e 4, ambos suplementados com 5 % de uréia. Entretanto, a quantidade de proteína no ensaio 4 é quase o dobro da quantidade de proteína do ensaio 3, o que leva a crer que o uso de tampão fosfato mais concentrado aumenta a conversão de uréia em proteína fúngica. A redução dos teores de açúcares redutores foi semelhante em todos os ensaios. Cabe aqui ressaltar o fato de que os ensaios foram realizados em apenas três dias. O aumento do tempo de cultivo certamente levaria a uma redução ainda maior nos teores de açúcares redutores.

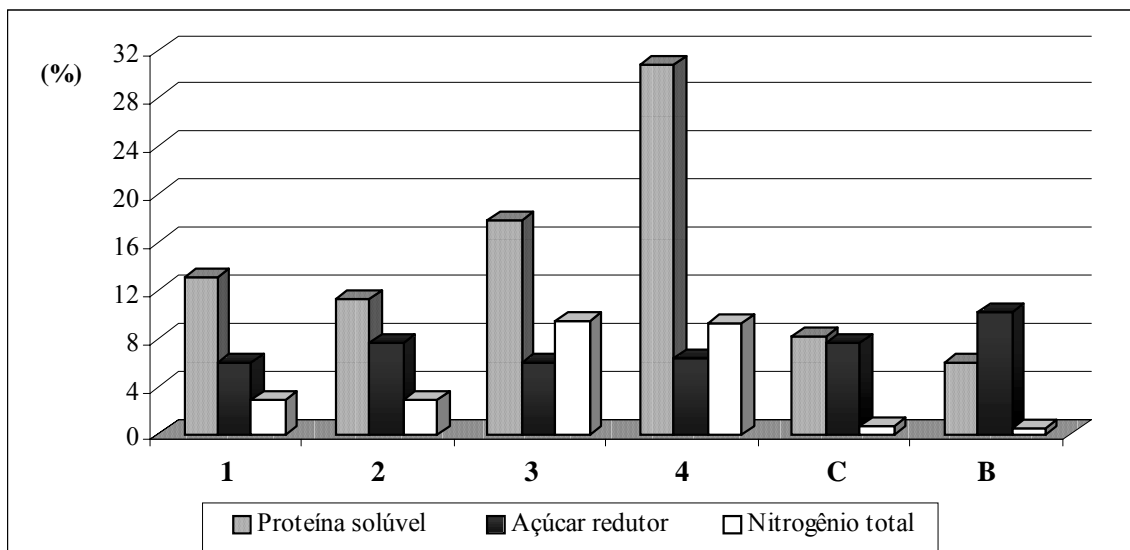


Figura 4.12 – Produção de proteína solúvel, concentração de açúcares redutores residuais e teor de nitrogênio total no bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 3.

Mais uma vez observou-se uma baixa variação de pH e esta variação não foi influenciada pelas variáveis estudadas. Os valores de pH inicial e final de cada ensaio estão apresentados na tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Valores de pH inicial e final do planejamento 3.

Ensaio	pH inicial	pH final
1	5,69	4,82
2	5,88	4,90
3	7,11	6,10
4	6,55	5,75
C	3,78	3,66

A partir da tabela 4.12 pode-se afirmar que as condições testadas no planejamento 3 mantiveram o pH próximo do valor inicial e que quanto maior a concentração de uréia utilizada, mais alta é a faixa de pH da fermentação. Observa-se que no ensaio 4 os valores de pH inicial e final estão dentro da faixa ótima do fungo, o que, aliado às outras condições, provavelmente contribuiu para a maior produção de proteína.

4.2.5 Quarta série de experimentos

A partir da condição de cultivo que forneceu a maior produção de proteína dentre os experimentos realizados, decidiu-se investigar a influência de uma terceira variável sobre a produção de proteína solúvel e sobre a variação de pH: o volume de inóculo adicionado às colunas. A concentração do inóculo desempenha um papel importante em processos de fermentação em estado sólido e, segundo MITCHELL *et al.* (2000), para microrganismos com crescimento rápido, como no caso do fungo *Rhizopus oligosporus*, elevadas concentrações de inóculo podem causar um rápido consumo do substrato, estagnando o processo fermentativo. Por outro lado, quando baixas concentrações de células são inoculadas, o cultivo fica susceptível à contaminações indesejáveis.

Dessa forma, a fim de avaliar a influência do volume da suspensão de esporos inoculada no bagaço de maçã sobre a produção de proteína e sobre a variação de pH, realizou-se um planejamento fatorial 2^3 (três variáveis e dois níveis) onde investigou-se, além da nova variável, concentrações de uréia e de tampão fosfato próximas às utilizadas na condição considerada “ótima”, obtida no ensaio 4 do planejamento 3. Além dos oito experimentos correspondentes ao planejamento fatorial completo, foram realizados três ensaios no ponto central, ou seja, na condição considerada ótima até então.

Os resultados obtidos com o quarto planejamento fatorial são apresentados na tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Resultados do planejamento fatorial 4.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais			Respostas	
	Uréia (%)	T. Fosfato (M)	Inóculo (mL)	Uréia (%)	T. Fosfato (M)	Inóculo (mL)	PS (%)	Δ pH
1	-1	-1	-1	3,0	0,24	0,25	17,42	0,72
2	+1	-1	-1	7,0	0,24	0,25	29,40	0,66
3	-1	+1	-1	3,0	0,36	0,25	18,87	0,90
4	+1	+1	-1	7,0	0,36	0,25	23,63	0,56
5	-1	-1	+1	3,0	0,24	0,75	17,65	0,04
6	+1	-1	+1	7,0	0,24	0,75	23,64	0,11
7	-1	+1	+1	3,0	0,36	0,75	19,18	0,56
8	+1	+1	+1	7,0	0,36	0,75	24,75	0,75
9	0	0	0	5,0	0,30	0,5	30,25	0,77
10	0	0	0	5,0	0,30	0,5	29,96	0,73
11	0	0	0	5,0	0,30	0,5	29,55	0,66

A estimativa dos efeitos para o quarto planejamento fatorial calculada pelo software Statistica 5.11, com nível de confiança de 95 %, é mostrada na tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Estimativa dos efeitos para as respostas estudadas no planejamento 4.

	Proteína Solúvel (%)	Δ pH
Média	24,03	0,589
Uréia	7,08	-0,035
T. Fosfato	-0,420	0,310
Inóculo	-1,03	-0,345
Uréia x T. Fosfato	-1,91	-0,040
Uréia x Inóculo	-1,29	0,165
T. fosfato x Inóculo	1,74	0,270

No quarto planejamento fatorial nenhuma das variáveis mostrou-se estatisticamente significativa sobre o aumento de proteína do fungo *Rhizopus oligosporus*. Isto ocorreu provavelmente devido à pequena diferença estabelecida entre os níveis (valores) das variáveis estudadas. Estes níveis foram escolhidos de modo a “cercar” a região de maior produção de proteína estabelecida no planejamento 3, verificando se pequenas alterações nas condições de cultivo levariam a produção de mais proteína, o que não foi verificado. Na figura 4.13 observa-se a produção de proteína e a concentração de açúcares redutores residuais do bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 4.

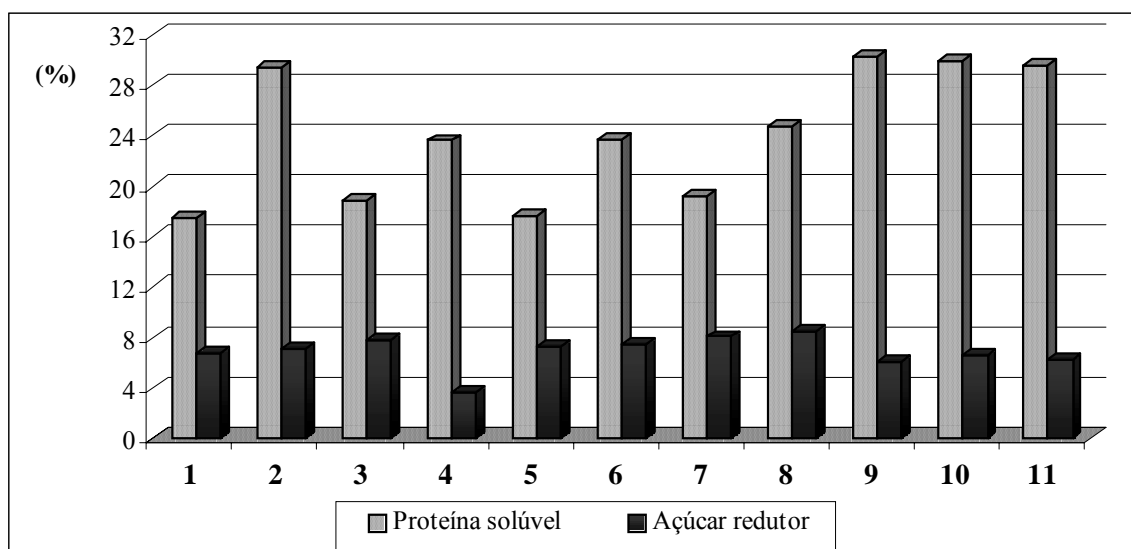


Figura 4.13 – Produção de proteína solúvel e concentração de açúcares redutores residuais no bagaço de maçã submetido aos ensaios do planejamento 4.

Percebe-se que no ensaio 2 (7 % de uréia, tampão fosfato 0,24 M e 0,25 mL de inóculo) o bagaço de maçã apresentou quantidade de proteína solúvel comparável à obtida nos ensaios 9, 10 e 11, os quais confirmaram a obtenção de altos teores de proteína na condição “ótima” determinada no planejamento 3, em torno de 30 %. Apesar de utilizar um tampão menos concentrado e um volume de inóculo menor, o aumento da concentração de uréia de 5 para 7 % não seria justificável já que não aumentou o teor protéico.

Quanto aos açúcares redutores residuais, observam-se valores próximos aos encontrados nos planejamentos anteriores. No ensaio 4 o menor teor de açúcares residuais de todos os planejamentos foi observado, restando apenas 3,56 % de açúcares redutores no bagaço fermentado. Esta condição, com 7 % de uréia, tampão fosfato 0,36 M e 25 mL de inóculo também apresentou boa quantidade de proteína (23,63 %).

O volume de inóculo adicionado ao bagaço de maçã foi a única variável estudada que afetou significativamente a variação de pH do meio de cultivo. Com o aumento do volume de inóculo de 0,25 para 0,75 mL, observou-se uma diminuição na variação do pH. Os valores de pH inicial e final de cada ensaio estão na tabela 4.15.

Tabela 4.15 – Valores de pH inicial e final do planejamento 4.

Ensaio	pH inicial	pH final
1	6,62	5,90
2	7,10	6,44
3	6,45	5,55
4	7,25	6,69
5	6,62	6,58
6	7,10	6,99
7	6,45	5,89
8	7,25	6,50
9	6,42	5,65
10	6,42	5,69
11	6,42	5,74

Na tabela 4.14 observa-se novamente que a faixa de pH dos ensaios 9, 10 e 11 (condição considerada ótima) encontra-se dentro da faixa de pH ótima para o crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus*. O ensaio 2 que também apresentou alto enriquecimento protéico obteve um pH inicial alto, atribuído à alta concentração de uréia adicionada ao bagaço, de 7 %. O mesmo pode ser afirmado a respeito do ensaio 4, que obteve a menor concentração de açúcares redutores residuais.

A partir da realização destes quatro planejamentos experimentais, importantes informações foram obtidas na determinação de uma condição ótima para o crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus* sobre o bagaço de maçã. A obtenção de cerca de 30 % de proteína solúvel no bagaço de maçã, aumentando em mais de 5 vezes o seu teor protéico inicial em apenas 3 dias de cultivo, mostra-se como um excelente resultado quando comparado a outros estudos.

DE GREGORIO *et al.* (2001) utilizaram polpa de limão, resíduo da indústria de suco, para o crescimento de *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* e conseqüente obtenção de SCP. Após 14 dias de cultivo sólido, *A. niger* produziu 25,6 % de proteína bruta e o fungo *T. viride*, após 25 dias, produziu 31,9 %. Ambos os valores são comparáveis ao teor protéico alcançado neste estudo, mas com um tempo de cultivo muito maior.

SHOJAOSADATI *et al.* (1999) utilizaram o fungo *Neurospora sitophila* no enriquecimento protéico de polpa de beterraba, farelo de trigo e resíduo cítrico (proveniente do processamento de limão e laranja). A polpa de beterraba obteve um enriquecimento protéico de 2,0 vezes, o farelo de trigo de 2,5 vezes e o resíduo cítrico de 3,0 vezes. Estes autores observaram que no cultivo em reator de coluna a produção de hifas pelo fungo formou uma estrutura sólida que impediu a passagem de ar através do leito empacotado, fato que não observado neste estudo ao longo dos três dias de cultivo. Estes pesquisadores também avaliaram a suplementação dos resíduos com nitrogênio e observaram o aumento na eficiência da bioconversão da polpa de beterraba e do resíduo cítrico, o que também foi observado neste trabalho.

Em outro estudo BISARIA *et al.* (1997) utilizaram *Pleurotus sajor-caju* na bioconversão de palha de arroz e de palha de trigo. O teor protéico foi aumentado de 2,87 para 6,3 % na palha de arroz e de 3,1 para 7,5 % na palha de trigo. Os autores observaram que a suplementação dos resíduos com fontes de nitrogênio complexas tornou a bioconversão mais eficiente do que quando os resíduos foram acrescidos de uréia ou nitrato de amônio (fontes contendo nitrogênio prontamente disponível), pois a facilidade na obtenção de nitrogênio fez com que a produção das enzimas oxidativas se tornasse mais lenta, diminuindo a degradação de lignina.

A partir do cultivo do bagaço de maçã com *Candida utilis* VILLAS BÔAS (2001) obteve um aumento de 4,1 para 8,3 % no teor de proteína bruta do resíduo sem adição de fonte de nitrogênio. O bagaço tornou-se muito mais interessante do ponto de vista nutricional, podendo ser usado como ração animal, visto que a partir do cultivo deste microrganismo o bagaço obteve sua digestibilidade aumentada, assim como teores de cálcio fósforo e potássio.

JOSHI E SANDHU (1996) também prepararam um subproduto para ração animal a partir da bioconversão do bagaço de maçã com o uso de *Candida utilis*. O bagaço foi seco, moído e, antes da fermentação, reidratado com solução de sulfato de amônio a 1,8 %. Após o cultivo, todos os açúcares foram consumidos e produção de etanol foi observada. O conteúdo de proteína bruta triplicou e o valor nutritivo do aumentou consideravelmente.

O produto obtido no ensaio 4 do planejamento fatorial 3 deste estudo foi considerado o melhor, graças ao maior conteúdo protéico, obtido dentro da faixa ótima de pH do fungo. O estudo de outras variáveis que, segundo PANDEY (2001), são fundamentais para a otimização de processos em cultivo sólido, como umidade inicial do bagaço, tamanho de partícula do substrato e taxa de aeração e que não foram avaliadas neste estudo, ainda devem ser investigadas, buscando “ajustar” o processo para que se consiga resultados ainda melhores.

5 CONCLUSÕES

Quanto ao cultivo submerso de *Candida utilis* CCT 3469 no extrato obtido da prensagem do bagaço de maçã, pode-se concluir que o substrato utilizado mostrou-se rico em açúcares redutores, com grande potencial para ser empregado como fonte de carbono na produção de proteína unicelular. Entretanto, a levedura obteve parâmetros cinéticos de valores discretos, abaixo do esperado, o que leva à necessidade da realização de outros estudos que busquem aumentar os rendimentos deste processo.

Verificou-se que o ensaio realizado com o extrato de bagaço de maçã diluído 4 vezes apresentou uma produtividade em biomassa bem maior, quando comparado ao cultivo no extrato mais concentrado. Por outro lado, a diluição em 10 vezes limitou o crescimento da levedura em algum nutriente essencial, presente no extrato em baixas concentrações.

O teor protéico médio de 47,5 %, bem como o conteúdo de lipídios e cinzas, encontrados nas células de *Candida utilis* CCT 3469, estão de acordo com o reportado na literatura para esse microrganismo. A partir dos resultados obtidos neste trabalho e, valendo-se do que foi reportado em diferentes estudos, pode-se afirmar que a levedura *Candida utilis* possui grande capacidade de utilizar diversos substratos e fontes de carbono de baixo custo, produzindo células com alto conteúdo protéico e perfil de aminoácidos satisfatório.

Quanto ao cultivo de *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 no bagaço de maçã através da fermentação em estado sólido, pode-se concluir que o substrato é uma excelente fonte de carbono para o cultivo deste fungo, com elevada quantidade de carboidratos.

A suplementação do resíduo com fonte de nitrogênio mostrou-se essencial para aumentar a eficiência da bioconversão do bagaço de maçã pelo fungo, nas condições de cultivo testadas. Quando o bagaço foi adicionado de uréia o fungo produziu maiores quantidades de proteína do que quando sulfato de amônio foi utilizado, o que traz uma vantagem econômica ao processo já que a uréia possui custo mais baixo do que o sulfato de amônio.

A adição de soluções tampão mais concentradas ao bagaço de maçã favoreceram a produção de proteína do fungo *Rhizopus oligosporus*. O tampão fosfato 0,30 M mostrou-se mais adequado do que o tampão ácido cítrico 0,50 M e a interação da solução tampão com a fonte de nitrogênio também se mostrou estatisticamente significativa no aumento de proteína solúvel. O maior enriquecimento protéico do bagaço de maçã foi obtido com o uso de uréia adicionada a 5 % e tampão fosfato 0,30 M, que proporcionaram um aumento de mais de 5 vezes no teor de proteína do bagaço, que inicialmente apresentava uma concentração de 5,93 % de proteína solúvel e, após o tratamento, chegou a 30,75 %.

A variação do pH no cultivo de *R. oligosporus* no bagaço de maçã mostrou-se influenciada apenas pelo volume de inóculo, que em maior quantidade promoveu uma menor variação do pH. A adição de altas concentrações de uréia ao bagaço levou o substrato a obter valores de pHs iniciais muito altos, fora da faixa ótima estabelecida para o fungo (entre 4,0 e 6,5). Já a adição de sulfato de amônio praticamente não influenciou o pH inicial do bagaço, deixando-o abaixo de 4,0. Na condição de maior produção de proteína, o pH do bagaço manteve-se entre 6,5 e 5,7, o que provavelmente contribuiu para o bom crescimento do fungo nestas condições.

6 SUGESTÕES

- Realizar um estudo aprofundado da composição química do extrato de bagaço de maçã para que a correta suplementação deste meio de cultura seja feita, visando o aumento dos parâmetros cinéticos de *Candida utilis*.

- Testar outros tipos de cultivo, como a batelada-alimentada e a cultura contínua, que segundo diversos autores, tendem a aumentar consideravelmente os fatores de conversão e a produtividade em biomassa no cultivo de leveduras.

- Analisar o perfil de aminoácidos, bem como a quantidade de ácidos nucléicos presentes na biomassa, a fim de avaliar o potencial destas células para o consumo humano e animal.

- Estudar a influência de variáveis como umidade inicial do bagaço, tamanho de partícula do substrato e taxa de aeração sobre o enriquecimento protéico do bagaço de maçã em FES.

- Determinar a curva de crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus* cultivado no bagaço de maçã em FES, bem como calcular seus parâmetros cinéticos.

- Analisar a composição do bagaço fermentado, no intuito de avaliar a viabilidade de sua utilização como ração animal ou até mesmo na alimentação humana.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ZEID, A.-Z. A.; KHAN, J. A.; ABULNAJA, K. O. On methods for reduction of nucleic acids content in a single-cell protein from gas oil. **Bioresource Technology**, v.52, n.1, p.21-24, 1995.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ – Disponível na internet. <http://www.abpm.org.br>. 11 dezembro 2002.
- ANUPAMA; RAVINDRA P. Value-added food: single-cell protein. **Biotechnology Advances**, v.18, n.6, p.459-479, 2000.
- ANUPAMA; RAVINDRA P. Studies on production of single cell protein by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of rice bran. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, n.1, p.79-88, 2001.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990. 2 v.
- ARAÚJO, A.; D'SOUZA, J. Enzymatic saccharification of pretreated rice straw and biomass production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, p.1503-1509, 1985.
- BARLETTA, M. V. L. **Importancia de la proteína en los peces** Disponível na internet. <http://www.portalveterinaria.com/sections>. 11 novembro 2001.
- BEROVIC, M.; OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v.53, n.1, p.47-53. 1997.
- BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v.59, n.1, p.5-8, 1997.
- BOCQUET, J. Generalidades sobre os microorganismos. In: SCRIBAN, R. (Coord). **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985. 489 p.

- BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C. R.; CHRISTEN, P.; REVAH, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.3, 1998.
- BROWN, M. R.; BARRET, S. M.; VOLKMAN, J. K.; NEARHOS, S. P.; NELL, J. A.; ALLAN, G. L. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve culture. **Aquaculture**, v.143, n.3-4, p.341-360, 1996.
- CARVALHO, J. C. M. de; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coords.). **Biotecnologia industrial**: volume 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v.71, n.1, p.45-50, 2000.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 446p.
- CHANDA, S.; CHAKRABATI, S. Plant origin liquid waste: a resource for single-cell protein production by yeast. **Bioresource Technology**, v.57, n.1, p.51-54, 1996.
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1989. 346p.
- CHIOU, P. W. S. Value of *Aspergillus niger* fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, n.3-4, p.171-182, 2001.
- CHRISTEN, P.; DOMENECH, F.; PÁÇA, J.; REVAH, S. Evaluation of four *Candida utilis* strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol. **Bioresource Technology**, v.68, n.2, p.193-195, 1999.
- CHRISTEN, P.; BRAMORSKI, A.; REVAH, S.; SOCCOL, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v.71, n.3, p.211-215, 2000.
- CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Growth of *Pichia guilliermondii* A9, an osmotolerant yeast, in waste brine generated from kimchi production. **Bioresource Technology**, v.70, n.3, p.231-236, 1999.
- DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v.83, n.2, p.89-94, 2002.

- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coords.). **Biotecnologia industrial**: volume 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p.
- DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe **Biotechnology Advances**, v.18, n.6, p.499-514, 2000.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.
- EL-SAYED, A.-F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, v.179, n.1, p.149-168, 1999.
- FELLOWS, P. **Food Processing Technology**: principles and practice. England: Ellis Horwood, 1988. 505 p.
- FERRER, J.; PAEZ, G.; MARMOL, Z.; RAMONES, E.; GARCIA, H.; FORSTER, C. F. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. **Bioresource Technology**, v.57, n.1, p.55-60, 1996.
- FOO, L. Y.; LU, Y. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. **Food Chemistry**, v.64, n.4, p.511-518, 1999.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1997. 307p.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis. In: DEPARTMENT OF AGRICULTURE - **Agricultural Handbook** n.379, Washington (USA), Agricultural Research Service, 1970. p.1-19.
- HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/FST**, v.27, n.2, p.194-196, 1994a.
- HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Apple pomace: a potential substrate for production of B-glucosidase by *Aspergillus foetidus*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/FST**, v.27, n.6, p.587-589, 1994b.
- HAWKSWORTH, D. L.; SUTTON, B. C.; AINSWORTH, G. C. **Dictionary of the fungi**. 7.ed. Surrey: Commonwealth Mycological Institute Kew, 1983. 445p.
- HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. Et al. (Coords.). **Biotecnologia industrial**: volume 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p.

- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo, S. P.). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: O Instituto, 1985. 533p.
- JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v.11, n.1, p.1-5, 2000.
- JIN, B. et al. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. **Process Biochemistry**, v.34, p.59-65, 1999.
- JIN, B. et al. A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. **Advances in Environmental Research**, v.6, p.179-189, 2002.
- JOSHI, V. K.; SANDHU, D. K. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. **Bioresource Technology**, v.56, n.2-3, p.251-255, 1996.
- KIM, J. K.; LEE, B.-K. Mass production of *Rhodospseudomonas palustris* as diet for aquaculture. **Aquacultural Engineering**, v.23, n.4, p.281-293, 2000.
- KONDO, K.; SAITO, T.; KAJIWARA, S.; TAKAGI, M.; MISAWA, N. A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.24, p.7171-7177, 1995.
- KONLANI, S.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; TRAORE, A.; DOH, A. Optimization of cell yield of *Candida krusei* SO1 and *Saccharomyces* sp. LK3G cultured in sorghum hydrolysate. **Bioresource Technology**, v.57, n.3, p.275-281, 1996.
- KURBANOGLU, E. B. Production of single-cell protein from ram horn hydrolysate. **Turkish Journal of Biology**, v.25, p.371-377, 2001.
- LANDROCK, A. H.; PROCTOR, B. E. A new graphical interpolation method for obtaining humidity equilibria data, with special reference to its role in food packaging studies. **Food Technology**, v.5, n.8, p.332-337, 1951.
- LEE, B.-K.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v.25, n.2, p.111-124, 2001.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. **Principles of Biochemistry**. 22 ed. New York: Worth Publishers, 1993.
- LITCHFIELD, J. H. Single-cell proteins. **Science**, v.219, p.740-746, 1983.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LU, Y.; FOO, L. Y. Constitution of some chemical components of apple seed. **Food Chemistry**, v.61, n.1-2, p.29-33, 1998.
- MAIORANO, A. E. **Produção de pectinase por fermentação em estão sólido**. São Paulo: USP, 1990. 262f. Tese (doutorado). Doutorado em Engenharia, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.
- MORAES, R. O. **Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação em substrato sólido em colunas de Raimbault**. Campinas: UNICAMP, 1999. 108f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- MUKERJEE, G.; MAJUMDAR, S. K. Utilisation of different food and agricultural wastes for the production of the yeast *Hansenula anomala* var. *schneegii*. **Journal of Food Science and Technology**, v.26, n.6, p.343-344, 1989.
- NAGEL, F.-J.; OOSTRA, J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. **Process Biochemistry**, v.35, n.1, p.69-75, 1999.
- NGADI, M. O.; CORREIA, L. R. Solid state ethanol fermentation of apple pomace as affected by moisture and bioreactor mixing speed. **Journal of Food Science**, v.57, n.3, p.667-670, 1992.
- NIGAM, J. N. Single cell protein from pineapple cannery effluent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, p.693-696, 1998.
- NIGAM, J. N. Continuous cultivation of the yeast *Candida utilis* at different dilution rates on pineapple cannery effluent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p.115-117, 1999.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, n.2, p.153-162, 2000a.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.69-80, 2000b.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.81-87, 2000c.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid-State Fermentation in Biotechnology**: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech, 2001. 221p.
- PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; DOMÍNGUEZ, H.; VÁZQUEZ, M. Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates. **Food Chemistry**, v.53, p.157-163, 1995.
- PESSOA JR., A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production **Journal of Biotechnology**, v.51, n.1, p.83-88, 1996.
- PHETTEPLACE, H.; JAROSZ, M.; UCTUK, R.; JOHNSON, D.; SPORLEDER, R. **Evaluation of single cell protein as a protein supplement for finishing cattle**. Disponível na internet. <http://www.ansci.colostate.edu> 11 novembro 2001.
- POPA, O. et al. Experimental studies on acetaldehyde production with *Candida utilis* strains. **Roumanian Biotechnology Letters**, v.6, n.2, p.167-173, 2001.
- PRINYAWIWATKUL, W.; BEUCHAT, L. R.; MCWATTERS, K. H.; PHILLIPS, R. D. Changes in fatty acid, simple sugar, and oligosaccharide content of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour as a result of soaking, boiling, and fermentation with *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. **Food Chemistry**, v.57, n.3, p.405-413, 1996.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998. Disponível na internet <http://www.ejb.org>. 22 novembro 2001
- RHISHIPAL, R.; PHILIP, R. Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. **Bioresource Technology**, v.65, n.3, p.255-256, 1998.
- RHIZOPUS. Disponível na internet. <http://pangloss.ucsfmedicalcenter.org>. 11 dezembro 2002.

- RODRÍGUEZ, L.; CHÁVEZ, F. P.; BASABE, L.; RIVERO, T.; DELGADO, J. M. Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida utilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.165, n.2, p.335-340, 1998.
- SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3.ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 380p.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 517p.
- SHOJAOSADATI, S. A.; FARAIDOUNI, R.; MADADI-NOUEI, A.; MOHAMADPOUR, I. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*. **Resources, Conservation and Recycling**, v.27, n.1-2, p.73-87, 1999.
- SHOJAOSADATI, S. A.; BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochemistry**, v.37, n.8, p.909-914, 2002.
- SPARRINGA, R. A.; OWENS, J. D. Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.153-157, 1999.
- STAINKRAUS, K. H. **Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques**. Disponível na internet. <http://www.sciencedirect.com>. 15 julho 2002.
- STRASKRABOVÁ, V.; PÁCA, J.; KRÁLÍCKOVÁ, E. Effect of aeration and carbon dioxide on cell morphology of *Candida utilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.40, n.5, p.855-861, 1980.
- STREDANSKI, M.; CONTI, E.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F. γ -LINOLENIC acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. **Bioresource Technology**, v.73, n.1, p.41-45, 2000.
- STREDANSKI, M.; CONTI, E. Xanthan production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.34, n.8, p.581-587, 2001.
- UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.37, p.637-641, 2002.
- VALENTAS, K. J.; ROTSTEIN, E.; SINGH, R. P. (Eds.). **Handbook of food engineering practice**. New York: CRC Press, 1957. 718p.

- VARZAKAS, T. *Rhizopus oligosporus* mycelial penetration and enzyme diffusion in soy bean tempe. **Process Biochemistry**, v.33, n.7, p.741-747, 1998.
- VIG, A. P.; WALIA, A. Beneficial effects of *Rhizopus oligosporus* fermentation on reduction of glucosinolates, fibre and phytic acid in rapeseed (*Brassica napus*) meal. **Bioresource Technology**, v.78, p.309-312, 2001.
- VILLAS BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã: enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p.38-42, 2000.
- VILLAS BÔAS, S. G. **Conversão do bagaço de maçã por *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus* visando a produção de suplemento para ração animal**. Florianópolis: UFSC, 2001. 125f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- VILLAS BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.98, p.1-12, 2002a.
- VILLAS BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; MENDONÇA, M. M. Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid-substrate cultivation on apple pomace. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.541-545, 2002b.
- WORRAL, J. J.; YANG, C. S. Shiitake and oyster mushroom production on apple pomace and sawdust. **HortScience**, v.27, n.10, p.1131-1133, 1992.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cramberry processing waste for solid state fungal inoculant production. **Process Biochemistry**, v.33, n.3, p.323-329, 1998a.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid-state production of beneficial fungi on apple processing wastes using glucosamine as the indicator of growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.783-787, 1998b.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of poligalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v.35, n.8, p.825-830, 2000.
- ZIINO, M.; LO CURTO, R. B.; SALVO, F.; SIGNORINO, D.; CHIOFALO, B.; GIUFFRIDA, D. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture. **Bioresource Technology**, v.67, n.1, p.7-11, 1999.