



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (NUCTA)

ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DA FARINHA DE SEMENTES DE
MANGABA (*Hancornia speciosa* Gomes) ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO.

Kyzzes Barreto Araújo

São Cristóvão- SE

Fevereiro/2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (NUCTA)

ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DA FARINHA DE SEMENTES DE
MANGABA (*Hancornia speciosa* Gomes) ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO.

Kyzzes Barreto Araújo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal de Sergipe – UFS.

Orientador (a): Prof (a) Dr(a) Luciana Cristina Lins de Aquino.

Agência Financiadora: CAPES/SE

São Cristovão-SE

Fevereiro/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Araújo, Kyzzes Barreto
A663e Enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba
(*Hancornia speciosa* Gomes) através de fermentação em estado
sólido / Kyzzes Barreto Araújo. – São Cristóvão, 2011.
ix, 81 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2011.

Orientador: Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Resíduos agrícolas. 3.
Microbiologia industrial. 4. Mangaba. I. Título.

CDU 664-405:582.923.5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (NUCTA)

ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DA FARINHA DE SEMENTES DE
MANGABA (*HANCORNIA SPECIOSA* GOMES) ATRAVÉS DE
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.

Autor: Kyzzes Barreto Araújo

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino
Departamento de Tecnologia de Alimentos- UFS

Prof^a Dr^a Renata Maria Rosas Garcia Almeida
Departamento de Engenharia Química – UFAL
(Membro externo)

Prof^a Dr^a Maria Lúcia Nunes
Departamento de Tecnologia de Alimentos- UFS
(Membro interno)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais que me dão incentivo, amizade, paciência, compreensão e amor para realizar os sonhos da minha vida.

Vitae do Candidato

Kyzzes Barreto Araújo, filha de Helvécio de Araújo Filho e Maria Virgínia Barreto Santos Araújo, nascida em Aracaju/Se em 21/09/1980.

Iniciou o curso de graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Sergipe em 2003, concluindo em 2009.

Foi bolsista de iniciação científica do CNPq, no período de 01/08/2007 a 31/07/2008, no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS) no projeto de pesquisa

Estudo do efeito de processos de secagem da pimenta malagueta (*Capsicum Frutescens*) para obtenção de um produto na forma de pó com alto valor nutricional sob a orientação da professora Dr (a) Alessandra Almeida Castro.

Em março de 2009, iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em nível de mestrado na Universidade Federal de Sergipe.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas oportunidades que são dadas na vida, que me dá força para superar as dificuldades e por está sempre presente em minha vida. “Tudo posso Naquele que me fortalece”.

Aos meus pais **Helvécio** e **Virgínia**, que se doam por inteiro e com muito carinho, amor e dedicação, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À minha cunhada **Luciana**, que vibra com minha vitória, e ao meu irmão **Hyllo**, com quem aprendi a tornar as coisas difíceis muito mais simples com coragem e tranquilidade. “No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim”.

Ao **Alain Gaujac**, pela colaboração que foi transmitida através dos seus conhecimentos com carinho.

À minha orientadora **Prof (a) Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino** pela atenção na sua orientação, muito importante para o amadurecimento dos meus conhecimentos e que levaram a conclusão deste trabalho.

As minhas queridas colaboradoras, **Luíza** e **Rafaela**, especialmente **Fernanda Martins** que me deu um valoroso auxílio na realização dos experimentos, demonstrando grande interesse e dedicação, contribuindo de forma decisiva no desenvolvimento deste trabalho.

À minha grande amiga e companheira de mestrado **Rafaela Andrade** que sempre foi bastante prestativa comigo, que sempre esteve presente quando necessitei. Sua amizade é um exemplo de companheirismo, lealdade e gentileza.

A minha turma de mestrado, **Jennifer, Josenice, Valdenice, Fernanda, Yure, Janaína, Thaís, Mônica, Ana Tereza, Sheila, Marianne, Geanderson (GeGé)** que tornaram nossa convivência no DTA cada dia mais prazerosa.

À **Comissão de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior (CAPES)** pelo suporte financeiro deste trabalho.

A todos que fizeram parte dessa minha inesquecível fase e na finalização dessa etapa com sorrisos e amizade, enfim são pessoas que quero levar pra sempre na minha memória para serem lembradas com carinho e admiração.

Enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) através de fermentação em estado sólido.

RESUMO

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado para a minimização, recuperação e aproveitamento de resíduos. Além de apresentar um impacto negativo ao meio ambiente a geração de resíduos representa perda de matéria-prima e energia além de exigir grandes investimentos financeiros em tratamentos para controlar a poluição. O desenvolvimento de bioprocessos surge como uma alternativa viável para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos microrganismos *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* para o enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba através de fermentação em estado sólido. As fermentações foram realizadas em placas de petri, variando a umidade inicial do substrato entre 24% e 66% e a temperatura de fermentação entre 28°C e 42°C, utilizando-se o delineamento composto central rotacional. Maior enriquecimento protéico foi obtido nas fermentações com ambos microrganismos quando utilizado umidade inicial do substrato de 60% e temperatura de fermentação de 40 °C. Na fermentação com *Aspergillus oryzae* obteve-se aumento protéico de 7,5 vezes de proteína solúvel, 2,5 vezes de proteína bruta e aumento no teor de metionina de 1,6 vezes e com o *Rhizopus oryzae* o aumento protéico foi de 5,0 vezes em proteínas solúveis, 3,2 em proteína bruta e aumento no teor de metionina de 2,0 vezes. Ambos os microrganismos demonstraram potencial para o enriquecimento da farinha de sementes de mangaba com a vantagem de não terem apresentado toxicidade em relação à presença de aflatoxinas.

Palavras-chave: resíduos agroindustriais, microrganismos, proteína unicelular

Protein enrichment of mangaba seeds flour (*Hancornia speciosa* Gomes) through solid state fermentation.

ABSTRACT

The increase concern with the environment is mobilizing various segments of the market for the minimization, recovery and waste of recycling. Over there produce a negative impact on the environment the generation of waste represents a loss of raw material and energy in addition to requiring large investments in treatments to control pollution. The development of bioprocesses emerges as a viable alternative to the use of agro-industrial residues. In this work evaluated the potential of microorganisms *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* for the protein enrichment of mangaba seeds flour by solid state fermentation. The fermentations were performed in petri dishes varying the initial substrate moisture between 24% and 66% and the fermentation temperature between 28°C and 42°C using DCCR. Increase protein enrichment was obtained with both microorganisms when used initial substrate moisture the 60% and fermentation temperature of 40 ° C. In the fermentation with *Aspergillus oryzae* was obtained protein increase 7.5 fold of soluble protein, 2.5 fold increase in crude protein and methionine content of 1,6 fold and with *Rhizopus oryzae* increase protein was 5,0 fold in soluble proteins, 3.2 on crude protein and increased the content of methionine of 2.0 fold. Both microorganisms showed potential for the enrichment of mangaba seeds flour with the advantage of not having had any toxicity for the presence of aflatoxins.

Keywords: agro-industrial wastes, microorganisms, single cell protein

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
1.0- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	10
2.0- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 - Resíduos Agroindustriais	13
2.2 – Mangaba.....	15
2.3- Características Nutricionais da Mangaba	17
2.4 - Fermentação em Estado Sólido (FES)	18
2.5 – Fatores que afetam a Fermentação em Estado Sólido	21
2.6 – Aplicações da Fermentação em Estado Sólido	24
2.7 - Enriquecimento Protéico de Resíduos Agroindustriais.....	27
2.7.1 – Enriquecimento protéico de resíduos utilizando <i>Aspergillus oryzae</i>	32
2.7.2 - Enriquecimento protéico de resíduos utilizando <i>Rhizopus oryzae</i>	33
3.0- MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1- Materiais	35
3.1.1- Meio de Cultura e Reagentes	35
3.2- Metodologia.....	36
3.2.1 – Obtenção da farinha de sementes de mangaba.....	36
3.2.2 – Caracterização físico-química da farinha de sementes de mangaba.....	36
3.2.3 - Experimentos Fermentativos	37
3.2.4- Produtividade dos processos fermentativos	39
3.2.5- Extração e quantificação das proteínas totais solúveis.....	39
3.2.6- Determinação do teor de metionina	40
3.2.7 – Crescimento Microbiano.....	40
3.2.8- Análise Toxicológica.....	41
4.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1- Caracterização Físico-Química da Farinha de Sementes de Mangaba Processadas Termicamente.	42
4.2 – Enriquecimento Protéico da Farinha de Sementes de Mangaba Esterilizada utilizando o Microrganismo <i>Aspergillus Oryzae</i>	44
4.2.1. - Cinética de produção de proteínas totais solúveis.....	44
4.2.2. Cinética do Crescimento Microbiano	49
4.2.3 – Determinação do teor de metionina na farinha de sementes de mangaba fermentada com <i>Aspergillus oryzae</i>	50
4.2.4- Análise toxicológica da farinha de sementes de mangaba fermentada com <i>Aspergillus oryzae</i>	50
4.2.5 - Influência de parâmetros no enriquecimento protéico - Análise de superfície de resposta.	51

4.3 – Enriquecimento Protéico da Farinha de Sementes de Mangaba Seca e Esterilizada utilizando o Microrganismo <i>Rhizopus Oryzae</i>	55
4.3.1. - Cinética de produção de proteínas totais solúveis e proteína bruta.....	55
4.3.2. Cinética do Crescimento Microbiano	61
4.3.3 – Determinação do teor de metionina na farinha de sementes de mangaba fermentada com <i>Rhizopus oryzae</i>	62
4.3.4- Análise toxicológica da farinha de sementes de mangaba fermentada com <i>Rhizopus oryzae</i>	62
4.3.5- Influência de parâmetros no enriquecimento protéico - Análise de superfície de resposta	63
5.0- CONCLUSÕES	69
6.0- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	70
7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXO.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Produção Nacional Extrativa de mangaba por região e por estado, no período dos anos de 2001 a 2005 (toneladas).....	17
Tabela 2: Quantidade de mangaba produzida na extração vegetal em toneladas, no estado de Sergipe, no ano de 2005.....	17
Tabela 3: Aplicações de Fermentação em Estado Sólido.....	25
Tabela 4: Percentual de alguns componentes constituintes de fungos e bactérias...28	
Tabela 5: Enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais.....	30
Tabela 6: Principais reagentes utilizados.....	35
Tabela 7: Planejamento experimental para o enriquecimento protéico da farinha de semente de mangaba.....	39
Tabela 8: Caracterização da farinha de sementes de mangaba seca e esterelizada..42	
Tabela 9: Cinética de produção de proteínas totais solúveis no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com <i>Aspergillus oryzae</i>	45
Tabela 10: Produtividade em proteínas totais solúveis nos experimentos 1 a 11....47	
Tabela 11: Valores máximos de produção de proteínas totais solúveis obtidos nas fermentações da farinha de semente de mangaba.....	51
Tabela 12: Estimativa dos efeitos para a produção de proteínas solúveis no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com <i>Aspergillus oryzae</i>	52
Tabela 13: Análise de variância para proteínas totais solúveis.....	54
Tabela 14: Cinética de produção de proteínas totais solúveis (P.S) e proteína bruta (P.B) no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com <i>Rhizopus oryzae</i>	56
Tabela 15: Produtividade em proteínas totais solúveis e proteína bruta nos experimentos 1 a 11.....	60
Tabela 16: Valores máximos de produção de proteínas totais solúveis e proteína bruta obtidos nas fermentações da farinha de semente de mangaba.....	63
Tabela 17: Estimativa dos efeitos para a produção de proteínas totais solúveis no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com <i>Rhizopus oryzae</i>	64

Tabela 18: Estimativa dos efeitos para a produção de proteína bruta no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com <i>Rhizopus oryzae</i>	64
Tabela 19: Análise de variância para proteínas totais solúveis.....	67
Tabela 20: Análise de variância para proteína bruta.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mangabeira.....	15
Figura 2: O fruto Mangaba (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	16
Figura 3: Fermentação em estado sólido do <i>Aspergillus</i> Níger CNPAT 001 em casca de maracujá.....	20
Figura 4: Farinha da semente de mangaba.....	36
Figura 5: Farinha da semente de mangaba com <i>Aspergillus oryzae</i>	44
Figura 6: Cinética de produção de proteínas totais solúveis da FES da farinha de sementes de mangaba com <i>Aspergillus oryzae</i> (Experimento 1 a 5).....	46
Figura 7: Cinética de produção de proteínas solúveis da FES da farinha de sementes de mangaba com <i>Aspergillus oryzae</i> (Experimento 6 ao PC).....	46
Figura 8: Cinética de produção de proteínas totais solúveis utilizando 60% de umidade de substrato e temperatura de fermentação de 40°C (experimento 4 realizado em triplicata).....	48
Figura 9: Cinética de produção de proteína bruta utilizando 60% de umidade de substrato e temperatura de fermentação de 40°C (experimento 4 realizado em triplicata).....	48
Figura 10: Cinética do crescimento microbiano no enriquecimento protéica de farinha de sementes de mangaba <i>Aspergillus oryzae</i>	49
Figura 11: Diagrama de Pareto para as proteínas solúveis através da FES da farinha de sementes de mangaba com <i>Aspergillus oryzae</i>	53
Figura 12: Superfície de resposta para o enriquecimento protéico em termos de proteínas totais solúveis da farinha de sementes de mangaba com <i>Aspergillus oryzae</i>	54
Figura 13: Farinha de sementes de mangaba fermentada com <i>Rhizopus oryzae</i>	55
Figura 14: Cinética de produção de proteínas totais solúveis (A) e de proteína bruta (B) da FES da farinha de sementes de mangaba com <i>Rhizopus oryzae</i> (Experimento 1 a 5).....	58
Figura 15: Cinética de produção de proteínas totais solúveis (A) e de proteína bruta (B) da FES da farinha de sementes de mangaba com <i>Rhizopus oryzae</i> (Experimento 6 a PC).....	59
Figura 16: Validação para o teor de proteína bruta.....	61

Figura 17: Cinética do crescimento microbiano no enriquecimento protéica de farinha de sementes de mangaba <i>Rhizopus oryzae</i>	61
Figura 18: Diagrama de Pareto para as proteínas solúveis através da FES da farinha de sementes de mangaba com <i>Rhizopus oryzae</i>	65
Figura 19: Diagrama de Pareto para a proteína bruta através da FES da farinha de sementes de mangaba com <i>Rhizopus oryzae</i>	66
Figura 20: Superfície de resposta para o enriquecimento protéico em termos de proteínas totais solúveis da farinha de sementes de mangaba com <i>Rhizopus oryzae</i>	68

1.0- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), nativa do Brasil, é encontrada vegetando espontaneamente em várias regiões do país, desde tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do nordeste, onde é mais abundante, até as áreas sob cerrado da região norte e sudeste. É um fruto consumido por brasileiros sob diferentes formas: *in natura*, doces, compotas, conservas, vinho, vinagre, licor, refresco e principalmente suco e sorvete que apresenta ótimo aroma e sabor (VIEIRA NETO *et al.*, 2002).

O mercado para esta fruta encontra-se principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Em Sergipe, a mangaba é uma das frutas mais abundantes e procuradas nas feiras livres, atingindo preço superior ao da uva e de outras frutas nobres (VIEIRA NETO, 1994). Mesmo a produção sendo destinada somente ao mercado local, Sergipe é considerada o maior produtor de mangada do Brasil, com produção girando em torno de 4,5 mil toneladas ao ano (EMDAGRO, 2009). Os resíduos derivados (sementes) deste produto são ricos em nutrientes tais como proteínas, fibras, sais minerais, ácidos graxos e excelentes níveis de vitamina C que são de 155,54 mg/100g, sendo superior a média do teor encontrados na laranja que é de 55mg/100g por fruto (GUILHERME *et al.*, 2007), podendo ser utilizados em diferentes alimentos como componentes enriquecedores minimizando a poluição ambiental (BORGES *et al.*, 2006).

A economia brasileira está profundamente baseada na produção da agricultura, sendo os principais produtos soja, milho, cana-de-açúcar, café, mandioca e diversas frutas. E os resíduos desses produtos são conseqüentemente, produzidos em larga escala causando problema de acúmulo no volume de lixo depositado no meio ambiente (GRAMINHA *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, vários pesquisadores brasileiros vêm estudando o aproveitamento de resíduos de frutas gerados pelas agroindústrias para a produção de alimentos, tais como as frutas refugadas, cascas e centros das frutas, as sementes, os caroços e o bagaço (BORGES *et al.*, 2006).

Uma alternativa é a transformação destes resíduos em pó alimentício ou farinhas, que além de possuírem diversos componentes, tais como, fibra, vitaminas, proteínas, minerais, substâncias fenólicas e flavonóides que apresentam efeitos benéficos à saúde (SOUSA *et al.*, 2009). Estes materiais podem também ser utilizados como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais

como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol e enzimas (ALEXANDRINO *et al.*, 2007). Dessa forma pode contribuir de forma significativa para a economia do país e a diminuição dos impactos ambientais e que pode ser utilizados como enriquecedor de alimentos ou como ingrediente na produção de diferentes produtos. (SOUSA *et al.*, 2009).

Uma das formas promissoras para o aproveitamento de resíduos é através do desenvolvimento de processos biotecnológicos. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, os quais podem ser obtidos a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil, contribuindo assim, para a redução de problemas ambientais (MACIEL; 2006).

A bioconversão de resíduos por fermentação em estado sólido está estreitamente relacionada à escolha do microrganismo e do substrato a ser utilizado no processo, mas também o tipo de fermentação a ser empregada (MACIEL; 2006). É um processo biotecnológico que pode ser definido como o crescimento de microrganismo numa matriz sólida e umedecido, mas na ausência de água livre, pois este processo permite que o cultivo de microrganismo, principalmente fungos, seja de modo semelhante ao crescimento no seu habitat natural (VENDRUSCOLO; 2005).

A fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais tem gerado vários produtos dentre eles, a chamada proteína unicelular ou “*single cell protein*” (SCP) a qual tem sido alvo de estudo mundial devido à possibilidade de aplicação na dieta alimentar (PANDEY *et al.*, 2000b; PESSOA Jr. *et al.*, 1996). A SCP ou biomassa fúngica é produzida a partir de microrganismos tais como: algas, fungos e bactérias, cuja biomassa produzida tem contribuído para o teor protéico do substrato ou para agregar valores a rejeitos agroindustriais (SILVEIRA *et al.*, 2007). 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 agroindustriais (ALBUQUERQUE, 2003).

Os fungos filamentosos em destaque algumas espécies dos gêneros *Rhizopus* e *Aspergillus* são considerados como os mais promissores na produção de biomassa, uma vez que além de elevarem o teor protéico, produzem proteínas com atividade catalítica específica (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Vários pesquisadores utilizaram a técnica de fermentação em estado sólido para o enriquecimento protéico dos resíduos agroindustriais tais como bagaço do pendúculo de caju (CAMPOS *et al.*, 2005), bagaço de maçã (KOCH *et al.*, 2007), casca de batata (GÉLINAS *et al.*, 2006), resíduo de cana de açúcar (PELIZER *et al.*, 2007, BRAVO *et al.*, 1994), resíduo de batata doce (YANG *et al.*, 1993), entre outros.

Visando a valorização biotecnológica da farinha de sementes de mangaba (*Harconia speciosa* Gomes), este trabalho teve como objetivo principal o enriquecimento protéico do resíduo através da fermentação em estado sólido utilizando os microrganismos *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae*.

Dentre os objetivos específicos estão:

- Avaliar o potencial do microrganismo *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* para o enriquecimento protéico da farinha de semente de mangaba;
- Avaliar a influência dos parâmetros temperatura de fermentação e umidade inicial da farinha na fermentação em estado sólido através do planejamento experimento utilizando análise de superfície de resposta;
- Selecionar dentre os microrganismos testados aquele que proporcionou maior enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba;

2.0- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Resíduos Agroindustriais

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (PINTO *et al.*, 2005).

Milhões de toneladas de resíduos agroindustriais são produzidos anualmente no mundo com o aumento da população mundial e esses resíduos são gerados a partir do beneficiamento de produtos vegetais e do processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar e álcool e outros, sendo sua produção, geralmente, sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima. O destino desses rejeitos é comumente eliminado no meio ambiente gerando um acúmulo excessivo de matéria orgânica na natureza. Apesar desses resíduos serem totalmente biodegradáveis é necessário um longo período para que estes venham a ser reciclados de forma natural pois sua produção se dá em grandes quantidades, de forma intensiva (ALBUQUERQUE, 2003 ; MATOS, 2005).

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. Os órgãos fiscalizadores têm se mobilizado e constantes revisões têm ocorrido em resoluções ligadas a resíduos, tais como a RDC 306/04, resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004) e a RESOLUÇÃO 388/05 do CONAMA (BRASIL, 2005) as quais classificam e propõem tratamentos, forma de manipulação e descarte dos resíduos de serviço da saúde. Atualmente a Gestão Ambiental e certificação ISO 14000 vem atuando de forma exigente tendo como visão o desenvolvimento de atividades em qualquer área sem transgredir as leis ambientais vigentes (PELIZER *et al.*, 2007).

Com a finalidade de evitar o desperdício, os resíduos de frutas e hortaliças, poderiam ser utilizados como fontes alternativas de nutrientes, aumentando o valor nutritivo da dieta de populações carente, assim a biotecnologia oferece inúmeras

alternativas para o uso racional desses resíduos buscando tecnologias que utilizem os subprodutos industriais para a obtenção de produtos de maior valor agregado. (MEDEIROS *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2001). Uma alternativa seria a utilização do substrato em fermentação em estado sólido, que devido à presença de nutrientes naturais permitem o crescimento de microrganismos e podem ser utilizados para a formulação de dietas, principalmente para bovinos. Devido a isto estes resíduos estão recebendo atenção em termos de controle de qualidade e têm sido classificados como subprodutos agroindustriais (GRAMINHA *et al.*, 2007 apud GALATI *et al.*, 2004; EUN *et al.*, 2006; SARROUH *et al.*, 2006).

Vários pesquisadores estão aproveitando a disponibilidade de resíduos agroindustriais para a obtenção de produtos de alto valor agregado através de processos biotecnológicos. Como exemplos podem ser citados: bagaço de mandioca para a produção de aroma (PANDEY *et al.*, 2000), farelo de arroz, bagaço de maçã e bagaço do pedúnculo do caju para a produção de proteína unicelular (ANUPAMA.; RAVINDRA, 2001, CAMPUS *et al.*, 2007; KOCH *et al.*, 2007), bagaço de mandioca para a produção de ácido cítrico (VANDENBERG *et al.*, 2000), resíduo de coco verde para a produção das enzimas protease, pectinases, celulases, xilanases (COELHO *et al.*, 2001), casca de banana e bagaço de cana de açúcar, casca de manga e banana, farelo de trigo além da polpa de maçã e do tegumento do grão de milho para a produção de pectinase (RIZZATO *et al.*, 2003), resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas (ALEXANDRINO *et al.*, 2007), resíduo ou bagaço de cevada, bagaço de cana, casca de amendoim, resíduo fibroso da mandioca, germe de trigo, bagaço de milho verde e casca de laranja para a produção de xilanase (KRONBAUER *et al.*, 2007), cana de açúcar e farelo de soja para a produção de xilanase (MACIEL; 2006), entre outros.

2.2 – Mangaba

A mangabeira, (*Hancornia speciosa* Gomes), é uma planta frutífera e também produtora de látex, pertencente à classe *Dicotyledoneae*, ordem *Gentianales*, família *Apocynaceae*, gênero *Hancornia* e à espécie *Hancornia speciosa*. É uma planta de clima tropical que vegeta em áreas que apresentam alta insolação, é tolerante a períodos de déficit hídrico, e nas épocas de temperaturas mais elevadas e de menor umidade relativa do ar, apresenta melhor desenvolvimento vegetativo (VIEIRA NETO *et al.*, 2002).

A planta possui porte médio de 2 a 10 m de altura com seus galhos separados e bem formados. Troncos geralmente tortuosos, inclinados ou ligeiramente retos até 30 cm de diâmetro. Os ramos jovens são de coloração violácea, lisos até um ano de idade, meio angulosos, curtos, com poucas folhas, floríferos no ápice. Caule rugoso, áspero e folhas opostas e simples (Figura 1) (LEDERMAN *et al.*, 2000).



Figura 1: Mangabeira

O fruto, denominado “mangaba” é o seu principal produto; este nome tem origem na língua tupi-guarani (mã gawa), e significa “coisa boa de comer”. É classificado como do tipo baga, tem a forma elipsóide ou arredondada, atingindo até 6,5 cm de comprimento, mas em diferentes formas; a casaca apresenta uma coloração que varia de verde-clara a amarelada, com estrias amareladas ou avermelhadas e a polpa é de cor branca, de gosto acidulada a doce, suave, carnosa e viscosa, de aroma perfumado

e muito saboroso (Figura 2) (VIEIRA NETO *et al.*, 2002). As sementes são achatadas, discóides, rugosas, cor castanho-clara, com hilo no centro (VIEIRA, 2007).



Figura 2: O fruto Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes).

A cultura da mangaba vegeta de forma espontânea nas regiões tropicais da América do Sul como na Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai e na região do Chaco da Argentina. No Brasil, ocorre no Centro-Oeste, Sudeste, Norte e no Nordeste a mangabeira faz parte da vegetação de Cerrado ou de Tabuleiro; é encontrada desde a faixa litorânea até o Agreste, vegetando em solos profundos, pobres e arenosos (VIEIRA NETO *et al.*, 2002).

De acordo com dados da produção nacional de mangaba, por região e por Estado, no período de 2001 a 2005 (IBGE, 2007), os maiores produtores da fruta são os estados do Rio Grande do Norte, Bahia e Sergipe (Tabela 1). Já os dados de produção extrativa de mangaba fornecida pelo IBGE (2007), mostram que em Sergipe estão os três municípios maiores produtores de mangaba do Brasil, Estância, Pirambu e Itaporanga D'Ajuda (Tabela 2).

Tabela 1: Produção nacional extrativa de mangaba, por região e por Estado, no período dos anos de 2001 a 2005 (toneladas).

Ano	2001	2002	2003	2004	2005
Brasil	1181	1147	999	790	811
Nordeste	690	701	764	785	806
Sudeste	490	445	235	5	5
Centro	1	1	-	-	-
Oeste					
RN	28	31	63	76	79
AL	-	32	37	31	19
SE	492	475	500	509	497
BA	170	163	164	169	163
MG	490	445	235	5	5
MT	1	1	-	-	-
PB	-	-	-	-	48

Fonte: IBGE, 2007

Tabela 2: Quantidade de mangaba produzida na extração vegetal em toneladas, no Estado de Sergipe, no ano de 2005.

Região Produtora	Municípios
	Estância (315), Pirambu (82), Itaporanga D Ajuda (43),
Leste Sergipano	Indiaroba (24), Barra dos Coqueiros (14), Santa Luzia do Itanhí (7), Japarutuba (5), São Cristóvão (5), Pacatuba (2)

Fonte: IBGE, 2007

A industrialização da mangaba, no entanto é muito restrita e pouco desenvolvida quando comparada a outras frutas, principalmente nos estados nordestinos, o que tem levado a grandes perdas de produção pelo não aproveitamento da fruta madura. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos para utilização da mangaba em novos produtos, a fim de agregar valor ao fruto e intensificar sua comercialização.

2.3- Características Nutricionais da Mangaba

A composição média do fruto da mangaba é 77% de polpa, 12% de sementes e 11% de casca. A polpa contém de 9 a 14% de carboidratos, 0,3% de lipídeos, 1,3% e

3,0% de proteínas, 0,42 a 0,85% de acidez, 49 a 60 unidades de kcal, 33 mg de vitamina C além de conter as vitaminas A, B1, B2, fósforo e cálcio (DONADIO, 2007).

A semente da mangaba apresenta um alto teor de goma (3,1% na base seca) que pode ser aproveitado para elaboração de sorvetes e produtos com fins dietéticos. Algumas partes da planta têm aplicação na medicina popular, como a casca, com propriedades adstringentes, e o látex, a qual é empregada em hematomas, inflamações, diarreia, tuberculose, úlceras e herpes. O chá da folha é usado para cólica menstrual. (SILVA JUNIOR, 2004). Além da sua aplicabilidade na farmacologia, ainda, pode-se extrair o látex para borracha, demonstrando seu potencial de aproveitamento na agroindústria. Segundo Ferreira (1997), sua utilização agroindustrial está sendo rapidamente difundida devido a sua grande aceitação e o alto rendimento de polpa.

As sementes de mangaba têm demonstrado potencial para utilização na elaboração de novos produtos, segundo Vieira (2007), apresentam a seguinte composição média: teor de proteínas de 11,4%, teor de lipídeos de 24,7%, teor de carboidratos de 25,7% e porcentagem de fibras de 33%. Devido ao elevado teor de fibras superior ao da farinha de milho (4,0% de fibra), os autores utilizaram o resíduo para obtenção de barra de cereal.

2.4 - Fermentação em Estado Sólido (FES)

Os resíduos provenientes da indústria de alimentos além de fonte de matéria orgânica servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento (COELHO *et al.*, 2001). Uma das formas de aproveitamento destes resíduos seria através de fermentação em estado sólido.

A fermentação sólida ou em estado sólido (FES) também chamada de fermentação semi-sólida (FSS) pode ser definida como o crescimento de microrganismos em materiais sólidos (um substrato natural ou inerte) na ausência de água livre, com ou sem nutrientes solúveis, no entanto, o substrato deve conter umidade suficiente, existente na forma adsorvida na matriz sólida. (PANDEY, 1992; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). A fermentação em substrato sólido deve ser utilizada apenas para definir os processos em que o próprio substrato age como fonte de energia (carbono) e ocorre na ausência de água livre. (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

Na FES existem 2 tipos de processos em função da utilização do substrato:

- O sólido serve tanto como suporte e fonte de nutrientes. Estes substratos são materiais heterogêneos insolúveis em água provenientes da agricultura ou subprodutos da indústria alimentar que são de natureza amiláceas ou de natureza ligno-celulósicos (grãos e subprodutos de grãos, mandioca, batata, feijão, polpa de beterraba). Por esta última característica, estes resíduos devem ser pré-tratados para converter o substrato bruto em uma forma adequada de aumentar a sua utilização pelos microrganismos, as modificações mais comuns são: redução do tamanho por peneiração, moagem, raspagem ou corte, química ou hidrólise enzimática de polímeros, a suplementação com nutrientes (fósforo, nitrogênio, sais), ajuste do pH e umidade, tratamento térmico para a pré-eliminação e degradação das estrutura macromolecular dos principais contaminantes (PASTRANA *et al.*, 2003).
- O sólido serve apenas como suporte inerte. Exemplos destes substratos são: bagaço de cana, fibras inertes, resinas, espuma de poliuretano e vermiculita ou vermiculite, sendo necessário a adição de um líquido que contém todos os nutrientes (açúcares, lipídeos, ácidos orgânicos e outros). Essa estratégia é menos usado, mas relata algumas vantagens. O uso de um líquido definido e um suporte inerte com estrutura homogênea melhora o controle e monitoramento do processo e da reprodutibilidade nas fermentações. Em qualquer caso, o uso de suportes inertes apresenta desvantagens econômicas (PASTRANA *et al.*, 2003).

Em ambos os casos, o sucesso da FES está diretamente relacionada às características físicas do suporte, o que irá favorecer tanto na difusão de gases e nutrientes e na fixação dos microrganismos. Geralmente, os substratos de partículas menores proporcionam uma maior área de superfície para o crescimento microbiano, entretanto, partículas muito pequenas podem resultar em aglomeração de substrato e conseqüentemente um crescimento deficiente. Em contraste, as partículas maiores proporcionam uma melhor aeração, mas limita a superfície para o crescimento microbiano. Portanto, o tamanho da partícula deve ser selecionado para cada processo particular (PANDEY *et al.*, 1999).

Do ponto de vista prático, é importante valorizar as características físicas da matriz sólida devido a sua influência no sucesso da FES como o tamanho e forma das partículas, porosidade e consistência do material. (PASTRANA *et al.*, 2003).

Um exemplo de fermentação em estado sólido está demonstrado na Figura 3.



Figura 3: Fermentação em estado sólido do *A. niger* CNPAT 001 em casca de maracujá (PINTO *et al.*, 2005).

A fermentação em estado sólido apresenta uma série de vantagens, tais como: obtenção de produtos concentrados, necessitando de menor quantidade de solvente para extração, possibilidade da exclusão das etapas de concentração e/ou extração, redução dos problemas de contaminação, substratos simples e de baixo custo, a esterilização do meio é muitas vezes desnecessária, ausência de espuma, eliminação da necessidade de solubilização do substrato, eliminação da necessidade de rigoroso controle sobre diversos parâmetros durante a fermentação (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Além da escolha do substrato, outro parâmetro importante que auxilia no desenvolvimento da FES é a seleção do microrganismo. Os fungos filamentosos são os microrganismos mais adaptados na FES devido a seus aspectos fisiológicos, propriedades enzimológicas e bioquímicos. A capacidade dos microrganismos adaptar em substrato sólido é devido as hifas desses fungos que dá o poder de penetrar nos substratos sólidos e isto também lhes dá uma grande vantagem sobre os microorganismos unicelulares na colonização do substrato e na utilização de nutrientes. (PASTRANA *et al.*, 2003). Além disso, possuem capacidade de assimilar misturas de diferentes polissacarídeo devido a natureza, geralmente complexa, dos substratos utilizados e de crescer em baixa atividade de água (a_w) e condições de alta pressão osmótica (alta concentração de nutrientes) que os tornam mais eficientes e competitivo na bioconversão do substrato sólidos (PASTRANA *et al.*, 2003). Esse microrganismos encontram-se entre os mais promissores na produção de biomassa, uma vez que além de

elevarem o teor protéico, produzem proteínas com atividade catalítica específica (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Os fungos filamentosos que se destacam na produção de biomassa em fermentação em estado sólido são: *Phycomycetes* (*Mucor* e *Rhizopus*), *Ascomycetes* (*Aspergillus* e *Penicillium*) e *Basidiomycetes* (fungos de podridão-branca). (PANDEY *et al.*, 2000; AZEVEDO *et al.*, 2001). O gênero *Rhizopus* é especialmente importante, pela produção de proteínas com elevada digestibilidade e ausência de substâncias tóxicas (SILVEIRA *et al.*, 2007).

A aplicação da tecnologia de FES vem sendo utilizada desde a antiguidade. O uso do molho de soja é referência na China desde 3000 a.C e no Japão e sudoeste da Ásia desde 1000 a.C. (FLORENTINO, 2007). A história relata que em 1940 os países ocidentais direcionavam seus interesses ao desenvolvimento dos processos de fermentação submersa, dando pouca importância a fermentação em estado sólido. É provável que o desinteresse pela FES foi devido o desenvolvimento da penicilina que ocorreu em fermentação submersa e estava tendo uma enorme importância na época. Todavia, as pesquisas relacionadas a FES sempre continuaram isoladamente. Durante 1950-1960, alguns trabalhos foram realizados utilizando a FES visando a transformação de esteróides usando cultura de fungo e em 1960-1970 surgiram estudos empregando a FES na produção de micotoxinas permitindo a fermentação em estado sólido atingir outro marco. No entanto a motivação ocorreu a partir do enriquecimento protéico de rações animais utilizando resíduos oferecendo uma alternativa para o aproveitamento de resíduos agroindustriais (SINGHANIA *et al.*, 2009).

2.5 – Fatores que afetam a Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido pode ser influenciada por diversos fatores tais como: atividade de água, umidade, temperatura, pH, níveis de oxigênio, aeração e a agitação, os quais podem afetar significativamente o crescimento microbiano e a formação do produto de interesse (PASTRANA *et al.*, 2003).

O teor de umidade é um fator crítico no processo FES devido a esta variável ter influência sobre crescimento e biossíntese de diferentes metabólitos. Do ponto de vista microbiológico a a_w indica que a água está disponível ou acessível para o crescimento do microorganismo. É um parâmetro fundamental para a transferência de massa da água

e solutos nas células microbianas. A quantidade de água no substrato tem uma influência determinante sobre a atividade microbiana pois as necessidades de água do microrganismo deve ser mais bem definida em termos de atividade de água (a_w) ao invés do teor de água do substrato sólido (PASTRANA *et al.*, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009). A redução da atividade de água normalmente alonga a fase lag, diminui a velocidade específica de crescimento, resultando em baixa produção de biomassa (PANDEY *et al.*, 2000).

De acordo com Maciel (2006) a umidade elevada do substrato provoca uma diminuição da porosidade da matriz sólida, uma fraca difusão de oxigênio e aumenta o risco de contaminações bacterianas. Segundo Pastrana *et al.* (2003) além de reduzir a porosidade da matriz sólida impedindo a transferência de oxigênio, os níveis mais elevados pode causar uma redução no rendimento da enzima devido o impedimento do crescimento das cepas produtoras. Por outro lado a baixa umidade faz com que ocorra uma redução na solubilidade de nutrientes do substrato; significam que a fermentação somente pode ser realizada por um número limitado de microrganismos, principalmente, leveduras e fungos, apesar de algumas bactérias serem utilizadas (COUTO *et al.*, 2005).

O valor ótimo de umidade dependerá tanto do microrganismo quanto da matriz sólida utilizada para a produção econômica, portanto os microrganismos devem ser cultivados em níveis de umidade ideal para maximizar o crescimento ou produção de metabólitos (PASTRANA *et al.*, 2003). Geralmente, o conteúdo de água do substrato para FES deve oscilar entre 30 e 85% (PASTRANA *et al.*, 2003; VENDRUSCOLO, 2005; SINGHANIA *et al.*, 2009).

O aumento da temperatura durante os processos fermentativos é uma consequência da liberação de calor pelos microrganismos durante as atividades metabólicas (PANDEY *et al.*, 2001). Isso afeta diretamente os esporos de germinação, crescimento dos microrganismos e a formação do produto. O nível de temperatura alcançada é devido o tipo de microrganismos e porosidade do substrato (PASTRANA *et al.*, 2003).

O controle de temperatura é uma das maiores dificuldades encontradas nos processos de FES do que na fermentação submersa. Isso se dá pelo fato do substrato não ser homogêneo, formam-se gradientes de temperatura dentro do reator, o que dificulta a remoção de calor (PASTRANA *et al.*, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

O monitoramento e o controle é fundamental no contexto industrial, mas convencionalmente aeração é o principal método utilizado para controlar a temperatura do substrato. Isso porque as taxas de alta aeração pode reduzir a atividade de água do substrato por evaporação. A agitação da massa de fermentação também pode ajudar a controlar a temperatura (PASTRANA *et al.*, 2003).

Para o controle do pH na FES são adicionadas soluções tampão durante a etapa de umidificação do substrato ou adição de uma mistura de fontes de nitrogênio, como sais de amônio em combinação com sais de uréia ou de nitrato (PASTRANA *et al.*, 2003; DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

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 (ALBUQUERQUE, 2003 apud DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

A aeração possui importantes funções na FES como o fornecimento de oxigênio para condições aeróbicas, a remoção de CO₂, calor, vapor de água e voláteis produzidos durante o metabolismo, manutenção da temperatura e do nível de umidade do substrato (RAIMBAULT, 1998; PASTRANA *et al.*, 2003).

A quantidade de ar pode influenciar significativamente na produção de biomassa e de enzimas, 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).

A agitação (em reatores de mistura apropriados para substratos sólidos) 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 fator importante que geralmente é considerado um problema na FES é a concentração de microrganismo devido o fato dos micélios está ligado à matriz sólida e não poder ser quantificado separadamente. Acompanhar o crescimento do microrganismo na FES pode ser realizado por diferentes métodos: 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 ou ergosterol (ALBUQUERQUE, 2003).

2.6 – Aplicações da Fermentação em Estado Sólido

Nos últimos anos, a fermentação em estado sólido tem sido alvo de interesse de muitos pesquisadores, tanto na produção de enzima quanto na obtenção de substâncias de interesse para a indústria de alimentos, pois tem resultados em produtos com melhores características além de ofertar maior produtividade. Além disso, há a possibilidade de utilização de substratos de baixo valor resultando numa produção de baixo custo (NIGAM *et al.*, 2003).

Vários pesquisadores têm utilizado a FES para a produção de compostos diversos como será apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Aplicações da Fermentação em Estado Sólido

Produtos	Substrato	Microrganismos	Referência
Enzimas lignocelulolíticas	Resíduo de laranja	<i>Pleurotus ostreatu</i>	Alexandrino <i>et al.</i> , 2007
Lípase	Subprodutos do processo de refino do óleo de milho ou óleo de oliva	<i>Aspergillus niger</i> 11T53A14	Damaso <i>et al.</i> , 2008
Proteases, celulasas, pectinases	Casca do coco verde	<i>Aspergillus niger.</i>	Coelho <i>et al.</i> , 2001
Enzimas poligalacturonases e pectina-liases	Cascas de manga, cana e banana, farelo de trigo, polpa de maçã, tegumento do grão de milho	<i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	Rizzatto <i>et al.</i> , 2003
Enriquecimento protéico	Resíduos de batata doce	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e o <i>Rhizopus sp</i>	Yang <i>et al.</i> , 1993
Enriquecimento protéico	Bagaço de maçã	<i>Gongronella butleri</i>	Vendruscolo <i>et al.</i> , 2009
α -amilase	Pedúnculo de banana	<i>Bacillus subtili</i>	Couto <i>et al.</i> , 2005
Transferase fructosil	Farelo de arroz, farelo de trigo, gérmen de milho, resto de café e chá	<i>Aspergillus oryzae</i>	Sangeetha <i>et al.</i> , 2004
Xilanase	Bagaço de cevada, casca de amendoim	<i>Aspergillus casielus</i>	Kronbauer <i>et al.</i> , 2007
Lípase	Farelo de trigo	<i>Rhizopus sp</i>	Pastore <i>et al.</i> , 2003
Lipase, protease, amilase	Resíduo industrial da produção de óleo de babaçu	<i>Penicillium restrictum</i>	Palma, <i>et al.</i> , 2000
Pectinase	Pedúnculo de caju seco	<i>Aspergillus níger</i> CCT 0916	Florentino (2007)
Aroma de abacaxi	Casca de café	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Soares <i>et al.</i> , 2000

Fonte: Pelizer *et al.*, 2007

Tabela 3 (continuação): Aplicações da fermentação no estado sólido

Produtos	Substrato	Microrganismos	Referência
Aroma frutificado	Fibras de arroz geleificado Miso Fibras de celulose	<i>Neurospora sp</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Aspergillus SP</i>	Pastore <i>et al.</i> , 1994 Sugawara <i>et al.</i> , 1994 Ito <i>et al.</i> , 1990
Aroma frutificado (abacaxi)	Bagaço de mandioca, bagaço de maçã, soja. Amaranato	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Bramorski <i>et al.</i> , 1998
Aroma frutificado (banana)	Bagaço de cana e glicose, farelo de trigo, bagaço de mandioca e bagaço de cana (com leucina ou valina)	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Christen <i>et al.</i> , 1997
Aromas frutificados	Bagaço de mandioca e farelo de palma gigante	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Medeiros <i>et al.</i> , 2001
Aromas frutificados	Casca e borra de café	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Medeiros <i>et al.</i> , 2003
Pigmentos	Bagaço de mandioca	<i>Monascus sp</i>	Carvalho <i>et al.</i> , 2004
Ácido lático	Bagaço da cana de açúcar	<i>Rhizopus oryzae</i>	Soccol <i>et al.</i> , 1994
Ácido cítrico	Bagaço de mandioca	<i>Aspergillus Níger</i>	Vandenberghe <i>et al.</i> , 2000

Fonte: Pelizer *et al.*, 2007

2.7 - Enriquecimento Protéico de Resíduos Agroindustriais

O uso de microrganismos no enriquecimento protéico de resíduos tem se mostrado atrativo, pois algas, bactérias e fungos são capazes de crescer em diferentes tipos de subprodutos industriais, produzindo grandes quantidades de células, ricas em proteína, denominadas *single cell protein* (proteína unicelular) (KOCH *et al.*, 2007).

Single Cell Protein (SCP) é a produção de massa celular utilizando microrganismos cultivados em grande escala sobre resíduos e utilizados como fonte de proteína na alimentação humana e em ração animal (PARASKEVOPOULOU *et al.*, 2003). O termo *Single Cell Protein* surgiu em 1968 no encontro realizado no Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT) para substituir o nome, menos estético, proteína microbiana (ANUPAMA *et al.*, 2000).

Os primeiros registros escritos sobre a utilização de microrganismos como fonte de alimento foi em 2600 aC na Babilônia, com vestígios de pão. A descoberta do pão fermentado é geralmente atribuída aos egípcios. Os primeiros microrganismos a serem cultivados em grande escala foram às leveduras. A técnica foi empregada na Alemanha durante a Primeira Guerra Mundial, quando o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* foi explorado para o consumo humano. Outros microrganismos também foram usados como *Candida utilis* e *Candida arborea* (HAIDER *et al.*, 2005; ANUPAMA *et al.*, 2000).

Atualmente SCP é produzido a partir de muitas espécies de microrganismos. O uso dos fungos e bactérias são mais convenientes para a produção de SCP, quando cultivados em resíduos de baixo custo devido o seu rápido crescimento e elevado teor de proteínas. 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*, *Rizophus*, *Penicillium*, entre outros, são alguns dos fungos cultivados para a obtenção de SCP. Os principais microrganismos utilizados para serem consumidos por humanos são *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Spirulina* e *Chlorella*. Essas espécies são consideradas seguras e aceitas pela FAO para o consumo humano (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; ANUPAMA *et al.*, 2000).

O valor nutritivo dos alimentos e a utilidade da proteína unicelular de qualquer fonte são baseados na composição dos microrganismos. O produto final, além de ser nutritivo, deve estar livre de qualquer substância tóxica. Os nutrientes, as vitaminas, o

teor de nitrogênio, de carboidratos, gorduras, componentes da parede celular, ácidos nucleicos, concentração de proteínas e perfil de aminoácidos dos microrganismos, devem ser analisados antes que o produto seja utilizado para alimento ou como suplemento alimentar. (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

Na Tabela 4 estão representados os componentes nutricionais constituintes de fungos e bactérias.

Tabela 4: Percentual de alguns componentes constituintes de fungos e bactérias.

Componentes	Percentual da composição	
	Fungos	Bactérias
Proteínas	30-70	50-83
Nitrogênio Total	35-50	60-80
Lisina	6,5 - 7,8	4,3-5,8
Metionina	1,5-1,8	2,2-3,0
Lipídeos	5-13	8-10
Ácidos nucleicos	9,70	15-16
Sais Minerais	6,6	8,6
Aminoácidos	54	65

Fonte: Ravindra, 2000

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. A fim de atender os requisitos da dieta protéica humana por meio de SCP o limite permitido para a concentração de ácidos nucleicos é de 2% (w/w) (base seca em estufa) (FAO/WHO/UNICEF, 1970; PARAJÓ *et al.*, 1995).

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 nucléicos. As algas são ricas em lipídios e ácidos graxos essenciais (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

O uso de substratos naturais baratos e de resíduos de produtos industriais para o cultivo de microrganismos parece ser uma tendência nas pesquisas. O microrganismo como fonte de alimento pode parecer inaceitável, mas a idéia de consumo de desses microrganismos como alimento para o homem e animais é certamente inovadora para solucionar o problema alimentar mundial. (ANUPAMA *et al.*, 2000; HAIDER *et al.*, 2005).

Vários pesquisadores têm estudado o enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais como apresentado na Tabela 05.

Tabela 05: Enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais (dados da literatura)

Referência	Meio de cultivo	Microrganismo	Valor Protéico (%)
Pelizer <i>et al.</i> ; 2007	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Spirulina. Platensis</i>	(de 2,3 % para 7,2 %)
Bravo <i>et al.</i> , 1994	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Clostridium. Cellulolyticum</i>	(de 2,0 % para 8,7 %)
Monteiro <i>et al.</i> , 1991	Bagaço de cana-de-açúcar (cultivo submerso)	<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Rhizopus</i> (cultura mista)	(de 1,6 % para 7,7%)
Dueñas <i>et al.</i> , 1995	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Trichoderma reesei</i> e <i>A. phoenics</i> (cultura mista)	(de 3,0 % para 12,0 %)
Koch <i>et al.</i> , 2007	Bagaço de maçã	<i>Gongronella butleri</i> CCT4274 <i>Rhizopus oligosporus</i> <i>S.cerevisiae</i>	(de 5,93 % para 19,24 %) (de 5,93 % para 30,75 %) (de 5,8 % para 6,8%)
Joshi e Sandhu, 1996	Polpa de maçã	<i>C. utilis</i> <i>T. utilis</i>	(de 5,8 % para 18,5%) (de 5,8 % para 15,6%)
Duran e Chereau, 1988	Polpa de beterraba	<i>T. viride</i>	(de 10,8% para 26,6%)
Shojaosadati <i>et al.</i> , 1999	Polpa de beterraba Farelo de trigo Resíduos de citros	<i>N. sitophila</i>	(de 15,0 % para 30,0 %) (de 13,0 % para 30,0 %) (de 7,0 % para 18,2 %)
Campos <i>et al.</i> , 2005	Bagaço do pedúnculo do caju	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(de 10,74 % para 20,25%)
Vandenbergh <i>et al.</i> , 2000	Bagaço de mandioca	<i>A. Níger</i>	(de 13,1% para 23,1%)
Adbullah <i>et al.</i> , 1985	Palha de trigo	<i>C. cellulolyticum</i>	(de 2,9 % para 16,4%)
Yang <i>et al.</i> , 1993	Resíduos de batata doce	<i>Saccharomyces</i> <i>Rhizopus</i>	(de 3,2% para 8,4%) (de 3,2 % para 18,5%)
Gélinas <i>et al.</i> , 2006	Fécula de batata	<i>Candida utilis</i> ATCC 9256	(de 3,7 % para 12%)

Fonte: Pelizer *et al.*, 2007

Após a fermentação geralmente o resíduo enriquecido (proteína unicelular) passa por um processamento químico para a redução de ácidos nucléicos, os quais podem resultar em alterações do seu perfil de aminoácidos (com geração de compostos tóxicos ou sem valor biológico) ou reduzir a digestibilidade. Esses procedimentos químicos são baseados na utilização de ácidos, sais e álcalis para remoção dos ácidos (PARAJÓ *et al.*, 1995). Entre eles, a tecnologia baseada em NH_4OH apresenta várias vantagens, tais como a seletividade do ácido nucléico, degradação e acessibilidade do agente químico na proteína citoplasmática sem romper a parede celular (PARAJÓ *et al.*, 1995).

A toxicidade do produto deve ser avaliada antes de sua comercialização. As toxinas, se presentes, atuam como contaminantes por serem metabólitos secundários produzidos por certos fungos e bactérias durante o crescimento. As algas geralmente não produzem toxinas nocivas. (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000 apud BLANCOU *et al.*, 1978). Quando utilizado como ração animal, os níveis de toxicidade toleráveis são geralmente maiores do que quando consumidos por seres humanos. Alguns testes de toxicidade só podem ser feitos em animais vivos, assim todos esses testes e análises são realizados principalmente para avaliar a adequação do produto final, seja para alimentação humana ou para alimentação animal ou suplementos (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

Os fungos são comuns no campo e nas porções superficiais de vegetais cultivados, armazenados e processados em diferentes regiões. As espécies toxigênicas de fungos produzem micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de fungos, especialmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, a sua ocorrência em matérias-primas, subprodutos e alimentos é difícil de ser prevenida. As micotoxinas aflatoxina B1, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol e fumonisinas são freqüentemente detectadas em cereais, especialmente em farelos (FURLONG *et al.*, 2007).

A presença de micotoxinas em certas espécies de fungos, especialmente *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*, produtora da aflatoxina, é um grande obstáculo na sua utilização (RAVINDRA *et al.*, 2000). O consumo destas toxinas na alimentação pode ocasionar danos agudos, tais como: diarreias, vômito e dor de cabeça, bem como danos crônicos como: alteração no sistema digestivo, neurológico e imunológico, atraso de crescimento, efeito estrogênico e câncer (MURPHY *et al.*, 2006; FURLONG *et al.*, 2007 apud YOSHIZAWA, 2001).

Dáí faz-se necessário a descontaminação e purificação do produto final para que seja usada como fonte de alimento. A proteína bacteriana parece ser segura, pois não tem efeitos sobre o sistema imunológico de ratos, quando testado tanto *in vitro* como *in vivo* (RAVINDRA *et al.*, 2000).

Os resíduos agroindustriais enriquecidos nutricionalmente por FES podem ser aplicados para alimentação animal. Na literatura ainda não consta trabalhos da utilização de resíduos enriquecidos na alimentação humana, entretanto existe essa possibilidade desde que seja comprovada ausência de efeitos toxicológicos, elevado valor nutritivo comparado às fontes convencionais de proteína, ser economicamente viável e com rendimento elevado.

2.7.1 – Enriquecimento protéico de resíduos utilizando *Aspergillus oryzae*

O gênero *Aspergillus* (pertencente a ordem Eurotiales e família Trichocomaceae) inclui aproximadamente 150 espécies reconhecida e foi dividido em seis subgêneros, *Aspergillus*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes* e *Circumdati* (MACHIDA *et al.*, 2005). O *Aspergillus oryzae* pertence ao subgênero *Circumdati*, seção *Flavi* (¼ do grupo *A. flavus*). *A. oryzae* e *A. flavus* são comumente relacionados, uma vez que foi proposto redefinir *A. oryzae* como uma variação do *A. flavus*, que provavelmente tinha alterado a sua morfologia e fisiologia (BLUMENTHAL, 2003). Entretanto, o *Aspergillus oryzae*, ao contrário do *Aspergillus flavus*, não produz aflatoxinas, o que prova a sua segurança e longa história de uso na indústria de alimentos (MACHIDA *et al.*, 2005).

Aspergillus oryzae, é um fungo filamentosos bastante utilizado na culinária para a produção de alimentos fermentados tradicionais e bebidas no Japão (MACHIDA *et al.*, 2005). São fungos empregados na produção de “saquê”, “miso” (pasta de soja), “shoyu” (molho de soja) e tem sido usado com segurança em mais de 1000 anos (BLUMENTHAL, 2004).

A segurança do *A. oryzae* como organismos produtores de alimentos há muito tempo foi reconhecido e se afirmado como GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (American Food and Drug Administration). Um certo número de alimentos fermentados tradicionais são produzidos por *A. Oryzae* e ainda estão sendo consumidos, principalmente na Ásia (BLUMENTHAL, 2004 apud BEUCHAT, 2001).

Além de produzirem vários alimentos fermentados, o *Aspergillus oryzae* tem sido bastante usado na produção de metabólitos de interesse, pois ele fragmenta o amido e as proteínas respectivamente em açúcares e peptídios, produzindo grandes quantidades de enzimas sob fermentação, por exemplo, amilase, protease, B-galactosidase, lipase e celulase, e compostos orgânicos como o ácido glutâmico. Recentes desenvolvimentos têm facilitado o seu uso para a produção de diversas proteínas para aplicações industriais (TSCA, 1997).

Vários pesquisadores têm usado o *Aspergillus oryzae* para o enriquecimento protéico de resíduos. Silveira *et al* (2007) fermentaram farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo com *Aspergillus oryzae* e aumentou o nível de proteína em até 17% e diminuiu os níveis de aflatoxina B1(AFA B1) para 20%. Duru *et al* (2003) utilizaram *Aspergillus oryzae* para fermentar um substrato enriquecido a partir de raiz de tanhoba e aumentou o nível de proteína em 26,23% em relação a uma produção de proteína. Ravinder *et al* (2006) realizaram o enriquecimento protéico de farelo de arroz com o fungo *Aspergillus oryzae* e apresentou uma produção máxima de proteína de 24,30 %. Feng *et al* (2006) avaliaram a digestibilidade, desempenho e atividade das enzimas intestinais de leitões utilizando *Aspergillus oryzae* em farelo de soja fermentado e não fermentado. Os resultados mostraram que os leitões alimentados com o farelo fermentado tiveram melhor digestibilidade aparente, aumento de peso, proteína bruta e energia em comparação com leitões alimentados com farelo não-fermentado.

2.7.2 - Enriquecimento protéico de resíduos utilizando *Rhizopus oryzae*

O gênero *Rhizopus* pertence a família dos Mucoraceae, ordem Mucorales e filo Zygomycota. Seu habitat natural é constituído de solos úmidos e suas hifas são caracterizadas pelo crescimento rápido, desenvolve-se em substratos contendo açúcares solúveis e amido (http://www1.univap.br/drauzio/index_arquivos/mico008.pdf).

É o gênero causador mais comum da zigomicose que patologicamente é caracterizada pela invasão vascular das hifas, necrose do tecido e infecções agudas. Das muitas formas de manifestação clínica, a forma mais comum causada por espécies de *Rhizopus* é a zigomicose rinocerebral e craniofacial (http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/R_oryzae.htm).

A espécie *Rhizopus oryzae* é definido como um fungo filamentosos usado freqüentemente na produção de alimentos fermentados e bebidas alcoólicas, na Indonésia, China e Japão, e considerado como GRAS.

O gênero *Rhizopus* é especialmente importante, pela produção de proteínas com elevada digestibilidade e tem sido usado como agente do cultivo de fermentação sólida para a bioconversão de resíduos obtendo metabólitos (SILVEIRA *et al.*, 2007). Sturza *et al* 1997 estudaram o enriquecimento protéico do bagaço de maçã utilizando *Rhizopus oryzae* e obteve um aumento 3,33% para 8,2% no teor de proteína bruta. Silveira *et al* 2007 fermentaram farelo de arroz com *Rhizopus* sp. e obtiveram aumento no teor protéico 69 % em termos de proteína bruta. Albuquerque *et al* 2003 fermentaram bagaço de cana de açúcar com o fungo *Rhizopus oligosporus* e obtiveram aumento protéico de 5 vezes no teor de proteína solúveis.

3.0- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Materiais

3.1.1- Meio de Cultura e Reagentes

As sementes de mangaba (*Harconia speciosa* Gomes) foram cedidas pela empresa Pomar, processadora de Polpa de Frutas, localizada na cidade de Aracaju- SE.

Os microrganismos *Aspergillus oryzae* 5638C2 e *Rhizopus oryzae* IOC 4274 foram adquiridos da coleção de culturas do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), e foi mantida a 4°C em meio completo (YPD- yeast peptone dextrose – 1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose), contendo nutrientes essenciais; e estocadas em geladeira contendo 70% de glicerol no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Os reagentes utilizados para análise de crescimento microbiano e o teor de metionina estão listados na Tabela 6.

Tabela 6: Principais reagentes utilizados.

Lista de reagentes	
Metionina	Crescimento Microbiano
Nitroprussiato de sódio VETEC	HCl 6 M
Pepsina VETEC	Fenolftaleína (0,5%)
HCl 0,1N	NaOH 3N
Pancreatina VETEC	KHSO ₄ 1%
Solução tampão pH 8	Acetil Acetona ¹ MERCK
NaOH 5N SYNTH	Na ₂ CO ₃ 0,5 N
HCl 8N	Reagente de Erlich ² MERCK

^{1,2} Detalhe sobre o preparo desta solução ver em Anexo A.

3.2- Metodologia

3.2.1 – Obtenção da farinha de sementes de mangaba

As sementes de mangaba foram inicialmente lavadas e secas ao sol para a retirada da goma, em seguida, foram secadas à temperatura de 60°C, durante 8 horas (secador elétrico Pardal PE 100 Semi Industrial), trituradas em diâmetro médio de 1,06 mm (moinho tipo Wiley) e esterilizadas à 121 °C durante 15min (em autoclave). A farinha obtida está demonstrada na Figura 4.



Figura 4: Farinha de semente de mangaba

3.2.2 – Caracterização físico-química da farinha de sementes de mangaba

A farinha de sementes de mangaba foi caracterizada quanto aos teores de umidade, pH acidez, lipídeos, cinzas, fibras e proteína bruta segundo metodologia proposta pela AOAC (1995).

Umidade

A umidade foi determinada pelo método dessecação, por secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 105°C, por 2 horas até peso constante.

pH

O pH foi determinado pelo potenciômetro digital com eletrodo de vidro da marca Alfa Kit – AT 300.

Acidez

A acidez total foi determinada por meio de titulação com NaOH 0,1N, utilizando-se indicador 1% de fenolftaleína para verificação do ponto de viragem, a partir de 5 g da amostra e diluída em 100 mL de água destilada. Os resultados foram expressos em g/100g de solução normal.

Lipídeos

O teor de lipídios foi realizado por extração direta em Soxhlet com éter de petróleo.

Cinzas

O teor de cinzas foi obtido pelo processo gravimétrico, descrito pelo através da carbonização das amostras, seguida de incineração em mufla a 550°C até massa constante e resfriamento em dessecador.

Fibras

As determinações das fibras dietéticas foram realizadas da seguinte forma: pesa-se 1 g da amostra previamente desengordurada e levou-se ao refluxo com 50 mL de ácido sulfúrico 1,25% por 30 minutos. Em seguida, filtrou-se o material com 100 mL de água quente, em papel de filtro quantitativo e o resíduo foi fervido com 50 mL de NaOH 1,25% por mais 30 minutos e filtrado em cadinho de fundo poroso. Em seguida foi posto para secar em estufa até obter peso constante. O cálculo de percentual de fibra foi determinado relacionando-se a diferença entre a massa do resíduo do papel seco e a tara do papel, com a massa da amostra.

Proteína bruta

A determinação do teor de proteínas foi realizada pela técnica de micro-Kjeldahl, sendo o teor protéico calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

3.2.3 - Experimentos Fermentativos

As fermentações foram realizadas variando-se o teor de umidade inicial da farinha de sementes de mangaba (entre 30 e 60%) e a temperatura (entre 30 e 40 °C).

Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, tendo como variável resposta a quantidade (%) de proteínas totais solúveis, quando utilizado o fungo *Aspergillus oryzae* e a quantidade de proteínas totais solúveis e proteína bruta quando utilizado o fungo *Rhizopus oryzae*, conforme matriz apresentada na Tabela 7.

Os experimentos foram realizados em placas de petri contendo 10 g de farinha de sementes de mangaba (variando a umidade inicial entre 30-60%) e suspensões de esporos de *Aspergillus oryzae* e *Rhizophus oryzae* contendo aproximadamente 10^6 células/mL. O volume de suspensão de esporos a ser adicionado na farinha foi calculado de acordo com a Equação (1):

$$(U - U_f)/100 = V/(V + m) \quad (\text{Eq 1})$$

onde: U é a umidade desejada na farinha (%); U_f é a umidade inicial da farinha (%); V é o volume de suspensão de esporos de microrganismo a ser adicionado na farinha; m é a massa da farinha.

As amostras foram incubadas em estufa e a cada 24 horas retirou-se uma placa de petri para a determinação de proteínas totais solúveis e de proteína bruta. Os dados foram analisados estatisticamente através do Software STATISTIC 6.0.

A condição de fermentação onde ocorreu maior produção de proteínas foi validada através da realização dos experimentos em triplicata e determinou-se o teor de metionina e a cinética do crescimento microbiano.

Tabela 7: Planejamento experimental para o enriquecimento protéico da farinha de semente de mangaba.

Experimentos	Umidade	Temperatura
1	-1 (30)	-1(30)
2	-1 (30)	+1(40)
3	+1 (60)	-1(30)
4	+1(60)	+1(40)
5	0 (45)	-1,41 (28)
6	0 (45)	+1,41 (42)
7	-1,41 (24)	0 (35)
8	1,41 (66)	0 (35)
9	0 (45)	0 (35)
10	0 (45)	0 (35)
11	0 (45)	0 (35)

3.2.4- Produtividade dos processos fermentativos

A produtividade em proteínas obtida nos processos fermentativos foi calculada segundo a Equação (2) (AQUARONE *et al.*, 2001).

$$\text{Produtividade (mg/mL.h)} = \frac{\text{Máxima produção de proteínas (mg/mL)}}{\text{Tempo de fermentação (h)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

3.2.5- Extração e quantificação das proteínas totais solúveis

A extração das proteínas totais solúveis do fermentado foi realizada adicionando-se água destilada, na proporção 1:9 (fermentado: água), mantendo-se à temperatura de 60 °C, 150rpm durante 2 horas. A seguir, o material foi centrifugado à 3500 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo, obtendo-se o extrato protéico (STREIT, 2004).

As proteínas totais solúveis presentes no extrato foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando a albumina do soro bovino como proteína referência.

3.2.6- Determinação do teor de metionina

O conteúdo de metionina disponível nos fermentados foi determinado segundo metodologia descrita por Silveira & Furlong, 2007. Inicialmente realizou-se a hidrólise dos aminoácidos presentes com as enzimas pepsina e pancreatina. O hidrolisado obtido (2 mL) foi complexado com 1 mL de nitroprussiato de sódio 2,5%, em meio ácido, em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro (510 nm) do complexo formado, tendo como padrão uma curva de metionina na faixa de linearidade entre 0,02 e 0,9 mg.mL⁻¹.

3.2.7 – Crescimento Microbiano

O crescimento microbiano foi determinado indiretamente através da dosagem de glicosamina, obtida devido à presença de quitina contida na parede celular de fungos (AIDOO *et al.*, 1981). Foi adicionado à 0,5 g de fermentado 5 mL de HCl 6N colocando-se a mistura em banho de água fervente por 2 horas. Em seguida, a amostra foi resfriada e filtrada a vácuo. 1 mL do sobrenadante foi transferido para um balão de 25 mL, adicionou-se 1 gota de solução alcóolica de fenolftaleína 0,5% (p/v) e titulou-se com solução de NaOH 3 N, até que a coloração atingisse tonalidade rosa. Em seguida, procedeu-se à titulação reversa com solução 1% de KHSO₄, até que a coloração rosa desaparecesse. Após este procedimento, o volume do balão foi completado com água destilada.

Da solução preparada acima colocou-se 1 mL em tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de solução de acetil acetona em Na₂CO₃ 0,5 N (ANEXO A), mantendo-se em banho de água fervente por 20 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 6 mL de etanol e, em seguida, 1 mL de p-DAB (reagente de Erlich) (ANEXO A). Os tubos foram incubados a 65 °C por 10 minutos e a absorbância foi lida a 530 nm. O branco foi realizado repetindo o procedimento acima substituindo a amostra por água destilada. A curva padrão foi obtida utilizando concentrações de 0,01 a 0,2 g/L de glicosamina em água.

3.2.8- Análise Toxicológica

A farinha de sementes de mangaba enriquecida com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* foi analisada quanto à presença ou ausência das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 através de cromatografia em camada delgada (CCD) segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2006). Estas análises foram realizadas no Laboratório de avaliação de alimentos, aditivos e contaminantes do Departamento de Análises Bromatológicas da Universidade Federal da Bahia.

4.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Caracterização Físico-Química da Farinha de Sementes de Mangaba Processadas Termicamente.

A farinha das sementes de mangaba passaram por 2 tratamentos térmicos: secagem e esterilização. Com o intuito de verificar o efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas, determinou-se os teores de umidade, proteína bruta, proteína total solúvel, lipídios, cinzas, acidez, pH e metionina da farinha seca e da farinha seca e esterilizada . As médias dos resultados em triplicata estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8- Caracterização da farinha de sementes de mangaba seca e esterilizada.

Componente	Farinha seca	Farinha seca e Esterilizada
Umidade (%)	4,30 ± 0,05	19,02 ± 1,19
Lipídeos (%)	23,50 ± 0,74	12,82 ± 0,04
Cinzas (%)	2,13 ± 0,02	1,01 ± 0,06
pH	5,23 ± 0,05	4,00 ± 0,02
Acidez total(%)	28,40 ± 0,55	18,35 ± 0,35
Proteína Bruta (%)	11,42 ± 0,32	5,68 ± 0,14
Proteína Solúvel (%)	4,59 ± 1,11	1,87 ± 0,05
Metionina (mg/g)	3,80 ± 0,05	1,68 ± 0,02

Devido ao tratamento térmico de secagem à temperatura de 60 °C seguido de autoclavagem, a farinha apresentou menores teores de lipídeos, proteínas solúveis e bruta, metionina, pH e cinzas do que os obtidos pela farinha apenas submetida à secagem.

A farinha seca apresentou teor de lipídeos (23,50%), próximo ao obtido por Vieira (2007), cujo valor foi de 24,68 % de lipídeos. Entretanto após a esterilização o teor de lipídeos da farinha diminuiu para 12,82%, provavelmente isto ocorreu devido ao tratamento térmico.

O teor de proteína bruta das farinhas somente seca foi similar ao obtido por Vieira (2007), a qual obteve teor médio de 11,37 % de proteínas. A quantidade de

proteínas no resíduo servirá de fonte de nitrogênio para o crescimento de microrganismos.

O teor de proteínas solúveis obtido para a farinha seca (4,59 %) foi próximo ao obtido por Vendruscolo (2005) em farinha de bagaço de maçã (4,97%). A farinha seca e esterilizada apresentou menor teor de proteínas solúveis (1,87%) do que a farinha seca, provavelmente isto ocorreu devido à desnaturação das proteínas ocasionada pelo processo de autoclavagem (SGARBIERI, 1996).

O teor de proteínas solúveis é a concentração de proteína contida no extrato da farinha e pode ser sofrer alterações devido a fatores tais como: pH, força iônica, constante dielétrica do solvente e principalmente temperatura (SGARBIERI, 1996).

A metionina é um aminoácido sulfurado importante na alimentação humana e animal. As proteínas vegetais são freqüentemente deficientes em metionina e, conseqüentemente, uma dieta vegetal exclusiva poderá não cumprir as exigências nutricionais (KUMAR *et al.*, 2005). O teor de metionina da farinha de sementes de mangaba seca foi de 3,80 mg/g, maior que os valores encontrados na farinha de arroz (2,57 mg/g) e farelo de trigo (2,02 mg/g) (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Para os experimentos de enriquecimento proteico foi utilizada a farinha de sementes de mangaba seca e esterilizada.

4.2 – Enriquecimento Protéico da Farinha de Sementes de Mangaba Esterilizada utilizando o Microrganismo *Aspergillus Oryzae*

4.2.1 - Cinética de produção de proteínas totais solúveis

O enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com o fungo *Aspergillus oryzae* (Figura 5) foi realizado por FES através do planejamento experimental (Tabela 7), variando-se a umidade do resíduo e a temperatura de fermentação.

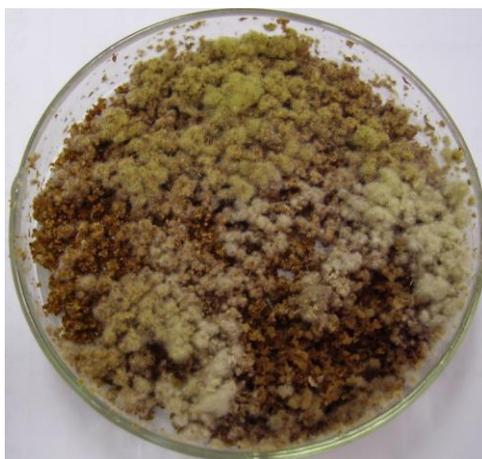


Figura 5: Farinha de sementes de mangaba fermentada com *Aspergillus oryzae*.

A produção de proteínas solúveis foi determinada ao longo do tempo de fermentação com o intuito de verificar em que tempo ocorreria a produção máxima. Os resultados da cinética estão apresentados na Tabela 9 e nos gráficos das Figuras 6 e 7.

Tabela 9: Cinética de produção de proteínas totais solúveis no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com *Aspergillus oryzae*.

Proteínas totais solúveis (%)																	
Tempo de Fermentação (h)																	
Ensaio	X1	X2	T°C	U%	1	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288
1	-1	-1	30	30	1,85	3,09	3,37	2,42	4,43	2,76	4,00	4,08	4,13	5,44	4,80	4,15	3,95
2	+1	-1	40	30	1,85	2,38	3,09	1,96	2,89	2,95	3,74	3,60	5,13	3,66	3,42	5,05	4,55
3	-1	+1	30	60	1,85	9,11	4,55	6,04	3,98	2,67	5,10	2,49	4,18	5,35	2,65	3,13	3,05
4	+1	+1	40	60	1,85	2,08	7,53	6,41	7,01	6,87	5,49	5,53	11,68	13,92	13,04	11,89	6,16
5	-1,41	0	28	45	1,85	2,68	10,04	9,64	12,31	6,51	4,76	3,92	3,32	3,45	3,25	3,49	3,32
6	+1,41	0	42	45	1,85	4,04	2,39	10,24	3,92	5,99	7,72	6,66	4,94	4,84	6,25	10,62	10,31
7	0	-1,41	35	24	1,85	3,77	3,09	2,59	2,67	1,95	2,88	1,69	2,61	2,02	1,48	2,08	2,44
8	0	+1,41	35	66	1,85	3,06	7,02	7,38	7,46	2,95	2,81	1,71	1,80	1,44	1,40	1,96	2,70
9	0	0	35	45	1,85	4,87	5,09	4,31	3,35	11,07	9,07	5,15	5,67	5,28	4,48	4,78	4,63
10	0	0	35	45	1,85	5,01	4,80	4,44	4,06	10,00	9,16	4,90	5,76	5,19	4,30	4,87	4,58
11	0	0	35	45	1,85	4,44	4,98	4,92	4,66	10,00	9,61	5,40	5,47	5,58	4,56	4,54	4,66

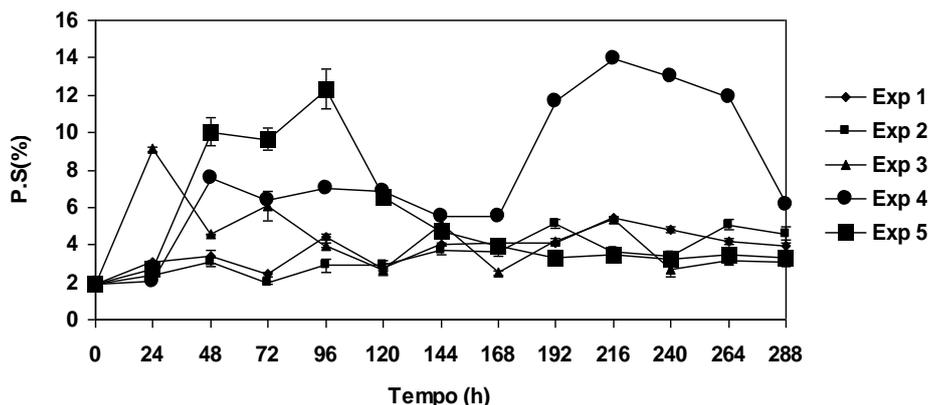


Figura 6: Cinética de produção de proteínas totais solúveis da FES da farinha de sementes de mangaba com *Aspergillus oryzae* (Experimentos 1 a 5).

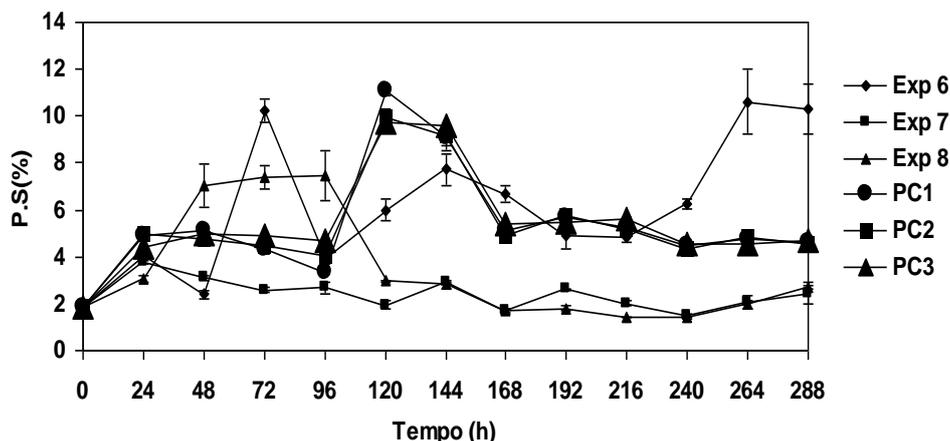


Figura 7: Cinética de produção de proteínas totais solúveis da FES da farinha de sementes de mangaba com *Aspergillus oryzae* (Experimentos 6 aos PC's).

Foi observado em todas as fermentações que a produção de proteínas solúveis aumentou ao longo do tempo de fermentação, atingindo um valor máximo seguido de estabilidade ou diminuição como foi demonstrado nos gráficos das Figuras 6 e 7. A máxima produção de proteínas solúveis obtida nos experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 foi de 5,44%, 5,13%, 9,11%, 13,92%, 12,31%, 10,62%, 3,77%, 7,46%, 11,07%, 9,97% e 9,77% em 216, 192, 24, 216, 96, 24, 96, 120, 120 e 120 horas de fermentação, respectivamente.

A máxima produção de proteínas solúveis (13,92%) foi obtida quando utilizado farinha contendo 60% de umidade inicial e temperatura de fermentação de 40°C

(experimento 4). O aumento protéico foi de aproximadamente 7,5 vezes em relação ao valor inicial (1,85%). A menor produção de proteínas solúveis (3,77%) foi obtida quando utilizado 24% de umidade de farinha e temperatura de fermentação de 35°C.

O resultado obtido neste trabalho foi maior que o obtido por Vendruscolo (2009), o qual fermentou bagaço de maçã com o fungo *Gongronella butleri* e obteve aumento protéico de proteínas solúveis de 3,2 vezes (de 5,94% para 19,63%), em relação ao bagaço não fermentado, e do que o obtido por Joshi & Sandhu (1996), os quais fermentaram bagaço de maçã com *Saccharomyces*, *Candida* e *Torula* e obtiveram aumento protéico com *Saccharomyces cerevisiae* em proteínas solúveis de 1,4 vezes (de 3,14% para 4,40%).

Na tabela 10 estão apresentados os valores de produtividade de proteínas solúveis obtidos nos experimentos de 1 a 11. Apesar da maior produção de proteínas solúveis ter sido obtida quando utilizado farinha contendo 60% de umidade inicial e temperatura de fermentação de 40°C (experimento 4), a maior produtividade (3,80 mg/mL.h em 24 h de fermentação) foi obtida no experimento 3 quando utilizado farinha contendo 60% de umidade inicial e temperatura de fermentação de 30°C.

Tabela 10: Produtividade nos experimentos 1 a 11.

Experimentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Produtividade (mg/mL.h)	0,25	0,26	3,80	0,64	1,28	0,40	1,57	0,77	0,92	0,83	0,83

Para efeito de validação a condição do experimento 4 foi realizada em triplicata para a determinação de proteínas solúveis e proteína bruta. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos como observado no gráfico da Figura 8.

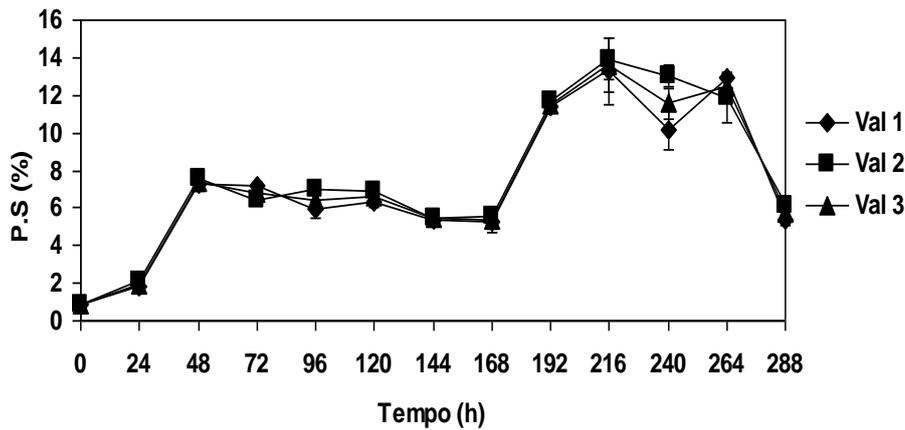


Figura 8: Cinética de produção de proteínas totais solúveis utilizando 60% de umidade de substrato e temperatura de fermentação de 40°C (experimento 4 realizado em triplicata).

Na condição do experimento 4 a máxima produção de proteína bruta (15%) foi obtida em 240 h de fermentação (Figura 9), mantendo-se em 264 h de fermentação, mesmo tempo onde obteve-se a máxima produção de proteínas solúveis. O aumento protéico em termos de proteína bruta foi de 2,5 vezes em relação ao valor inicial.

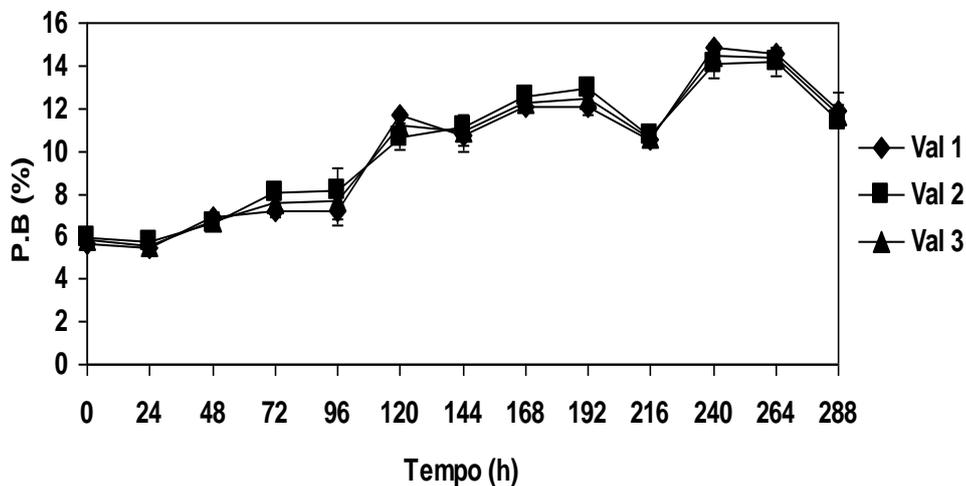


Figura 9: Cinética de produção de proteína bruta utilizando 60% de umidade inicial do substrato e temperatura de fermentação de 40°C. (experimento 4 realizado em triplicata).

Em relação ao teor de proteína bruta, o resultado obtido neste trabalho foi maior que o obtido por Silveira *et al.*,(2007), os quais fermentaram farelo de arroz

desengordurado e farelo de trigo com *Aspergillus oryzae* e obtiveram aumento protéico de 1,1 vezes em ambos substratos (aumento de proteínas de 19,2% para 20,6% no farelo desengordurado e de 13,8% para 15,8% no farelo de trigo) e do que o obtido por Duru et al.,(2003), os quais fermentaram raiz de tanhoba com *Aspergillus oryzae* e obtiveram aumento protéico de 1,5 vezes (de 17,41% para 26,23%) em relação ao valor inicial.

4.2.2- Cinética do Crescimento Microbiano

A quantificação do crescimento celular foi determinada de forma indireta através da concentração de glicosamina. As fermentações foram realizadas em triplicata apenas na condição do experimento 4 (60% de umidade de substrato e temperatura de fermentação de 40°C) onde obteve-se maior enriquecimento protéico. Os resultados estão apresentados no gráfico da Figura 10.

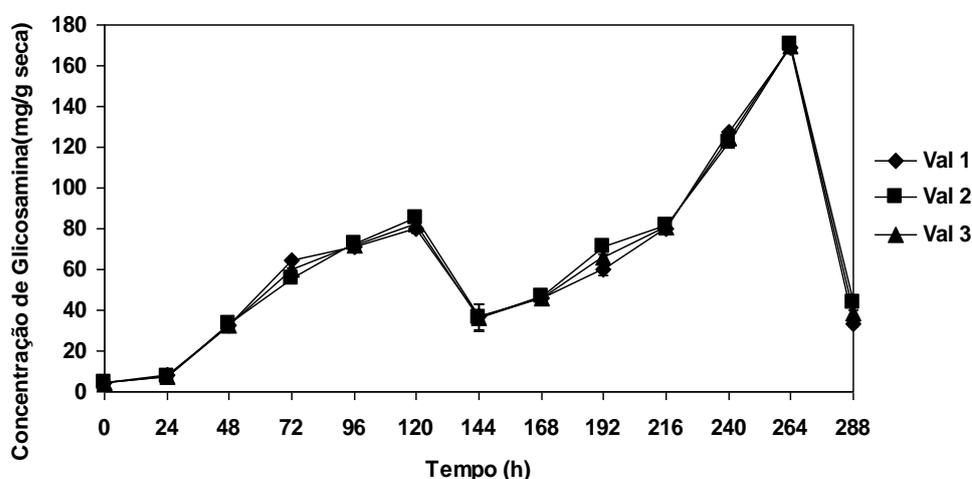


Figura 10: Cinética do crescimento microbiano no enriquecimento protéico de farinha de sementes de mangaba com *Aspergillus oryzae*.

O máximo crescimento microbiano foi de 169,48 mg/g seca obtido em 264 h de fermentação, tempo em que houve maior produção de proteína solúvel e proteína bruta.

Não há na literatura dados de enriquecimento protéico de farinha de sementes de mangaba, entretanto o valor obtido neste trabalho foi maior do que os obtidos por Chou & Rwan (1995) e Menezes *et al.*, (2006), cujo crescimento máximo de *Aspergillus*

oryzae em Koji e *Aspergillus niger* em resíduo de maracujá e farelo de trigo foi de 21,6 mg/g seca e 21,54 mg/g seca, respectivamente.

4.2.3 – Determinação do teor de metionina na farinha de sementes de mangaba fermentada com *Aspergillus oryzae*

A metionina, na forma de S-adenosilmetionina, é o mais importante doador do radical metil no organismo, sendo exigida para a biossíntese de muitas substâncias importantes envolvidas no crescimento, como creatina, carnitina, poliaminas, epinefrina, colina e melatonina (Baker, 1991). Geralmente, proteínas fúngicas apresentam uma composição rica em aminoácidos, exceto em aminoácidos sulfurados, sendo a metionina e a lisina os aminoácidos limitantes (SILVEIRA *et al* 2007).

O teor de metionina foi determinado para a farinha de sementes de mangaba fermentada com *Aspergillus oryzae* na condição do experimento 4 (60% de umidade de substrato e temperatura de fermentação de 40°C) onde obteve-se maior enriquecimento proteico.

A farinha fermentada apresentou teor de metionina de 6,04 mg/g seca, isto significou um aumento protéico 3,5 vezes em relação ao valor na farinha não fermentada (1,68 mg/g). Esse valor foi maior do que foi obtido por Silveira *et al* (2007), os quais conseguiram aumento de 1,6 e 2,0 vezes no teor de metionina de farelo de arroz desengordurado e de farelo de trigo fermentado com *Aspergillus oryzae*, respectivamente.

4.2.4- Análise toxicológica da farinha de sementes de mangaba fermentada com *Aspergillus oryzae*.

A amostra fermentada (na condição do experimento 4: 60% de umidade inicial de substrato e temperatura de fermentação de 40°C) com *Aspergillus oryzae* apresentou ausência das micotoxinas aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Furlong *et al* (2007) avaliaram a capacidade de fungos GRAS (Generally Regarded as Safe) para diminuir os níveis de contaminação por micotoxinas e percebeu que o *Aspergillus oryzae* diminuiu os níveis de aflatoxina B1.

4.2.5 - Influência de parâmetros no enriquecimento protéico - Análise de superfície de resposta.

A influência da temperatura e da umidade inicial do substrato no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba foi avaliada através do tratamento estatístico dos valores máximos de produção de proteínas solúveis obtidos nos experimentos de fermentação (Tabela 11).

Tabela 11: Valores máximos de produção de proteínas solúveis obtidos nas fermentações da farinha de sementes de mangaba.

Ensaio	X1	X2	T (°C)	U(%)	Proteína solúvel (%)
1	-1	-1	30	30	5,44
2	+1	-1	40	30	5,13
3	-1	+1	30	60	9,11
4	+1	+1	40	60	13,92
5	-1,41	0	28	45	12,31
6	+1,41	0	42	45	10,62
7	0	-1,41	35	24	3,77
8	0	+1,41	35	66	7,46
9	0	0	35	45	11,07
10	0	0	35	45	10,00
11	0	0	35	45	10,00

Na Tabela 12 estão demonstrados os valores da estimativa dos efeitos, ao nível de confiança de 90% ($p < 0,1$), dos fatores umidade do substrato e temperatura de fermentação no enriquecimento protéico do resíduo.

Tabela 12: Estimativa dos efeitos para a produção de proteínas totais solúveis no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com *Aspergillus oryzae*.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	p	-90% Limite de confiança	+90% Limite de confiança	Coefficiente de regressão
Média	10,35804	0,934174	11,08791	0,000104	7,95667	12,75941	10,35804
Temperatura °C (L)	0,53889	1,150045	0,46858	0,659087	-2,41740	3,49517	0,26944
Temperatura °C (Q)	1,07706	1,380528	0,78018	0,470585	-2,47170	4,62583	0,53853
Umidade % (L)	4,45101	1,150045	3,87029	0,011757	1,49473	7,40729	2,22551
Umidade % (Q)	-4,89232	1,380528	-3,54381	0,016496	-8,44108	-1,34356	-2,44616
T (L)x U(L)	2,56000	1,618257	1,58195	0,174506	-1,59986	6,71986	1,28000

Os parâmetros significativos ao nível de 90% de confiança para o enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com *Aspergillus oryzae* foram à média dos fatores e à umidade linear e quadrática. De acordo com gráfico de Pareto (Figura 11) o efeito será mais significativo na produção de proteínas solúveis quanto mais à direita da linha pontilhada ele estiver. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito da variável. Segundo o gráfico, a variável umidade (linear) foi a que mais interferiu na produção de proteínas e de forma positiva, ou seja, quanto maior a umidade maior a produção de proteínas. A umidade (quadrática) exerceu efeito negativo sobre a produção de proteínas.

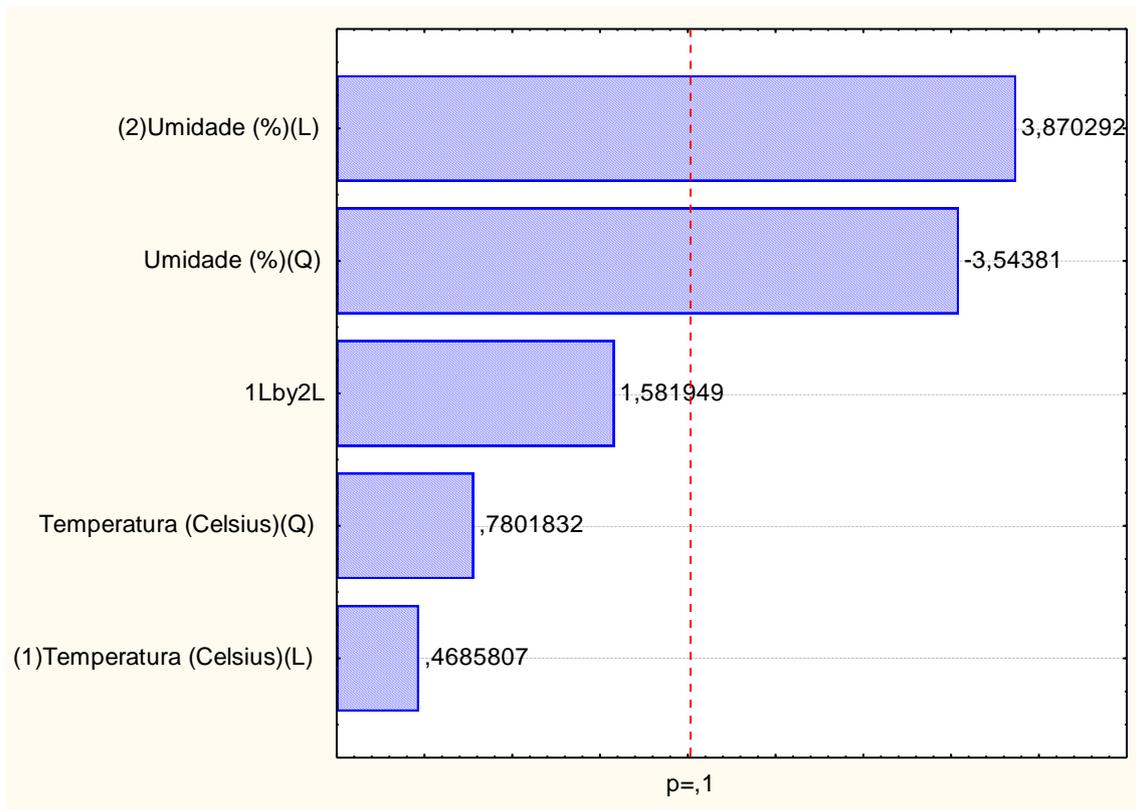


Figura 11: Diagrama de Pareto para as proteínas totais solúveis através da FES da farinha de sementes de mangaba com *Aspergillus oryzae*.

Na equação 3 será apresentado o modelo codificado de segunda ordem para a produção de proteínas solúveis em função da umidade do substrato, onde U é a umidade.

$$P.S (\%) = 10,35 + 2,22 U - 2,44 U^2 \text{ (Eq 3)}$$

A validação do modelo empírico foi realizada através da análise de variância que será apresentada na Tabela 13. O coeficiente de correlação $R^2 = 0,87094$ e o F calculado (6,74) maior que o F tabelado (3,45) validaram estatisticamente o modelo e permitiram a construção da superfície de resposta representada na Figura 12.

Tabela 13: Análise de variância para proteína solúvel.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	88,3625	5	17,6725	6,74
Resíduo	13,0938	5	2,61876	
Total SS	101,4563	10	-	

$$F_{5; 5; 0,1} = 3,45 \quad R^2 = 0,87094$$

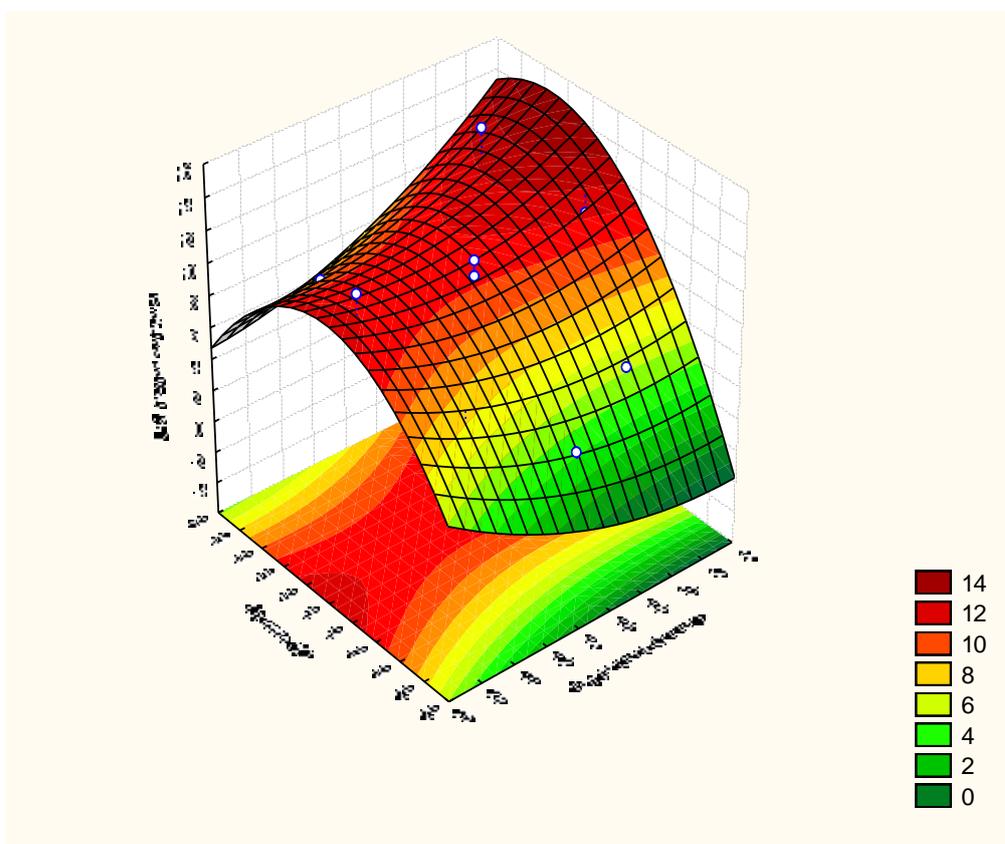


Figura 12: Superfície de resposta para a produção de proteínas totais solúveis na FES da farinha de sementes de mangaba com o fungo *Aspergillus oryzae*.

Através da Figura 12 pode-se verificar a existência de uma região ótima para um aumento da produção de proteínas totais solúveis na faixa de umidade inicial de farinha entre 38% e 52%. Esses resultados não indicam valores fixos, mas identificam faixas de operações que é mais interessante do que apenas um valor pontual, pois ele fornece informações sobre a robustez do processo.

Vendruscolo (2009) obteve uma faixa ótima de umidade entre (60 a 70 %) para um aumento da produção de proteína solúvel do bagaço de maçã utilizando *Gongronella butlerie* e adicionando nutriente como nitrato de sódio e uréia.

4.3 – Enriquecimento Protéico da Farinha de Sementes de Mangaba Seca e Esterilizada utilizando o Microrganismo *Rhizopus Oryzae*.

4.3.1. - Cinética de produção de proteínas totais solúveis e proteína bruta.

O enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com o fungo *Rhizopus oryzae* (Figura 13) foi realizado por FES através do planejamento experimental (Tabela 7), variando-se a umidade do resíduo e a temperatura de fermentação.

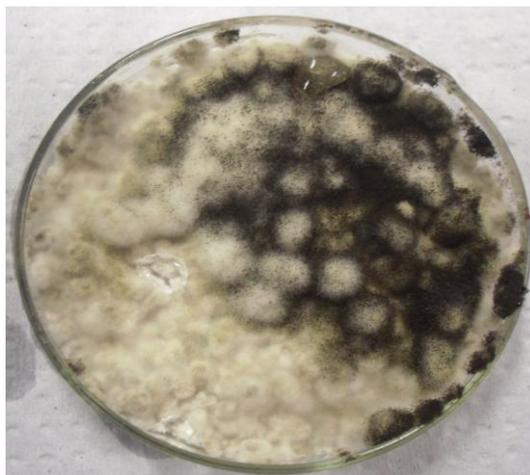


Figura 13: Farinha de sementes de mangaba fermentada com *Rhizopus oryzae*.

A produção de proteínas solúveis e de proteína bruta foi determinada ao longo do tempo de fermentação com o objetivo de verificar em que tempo ocorreria a produção máxima. Os resultados da cinética serão apresentados na Tabela 14 e nos gráficos das Figuras 14 e 15.

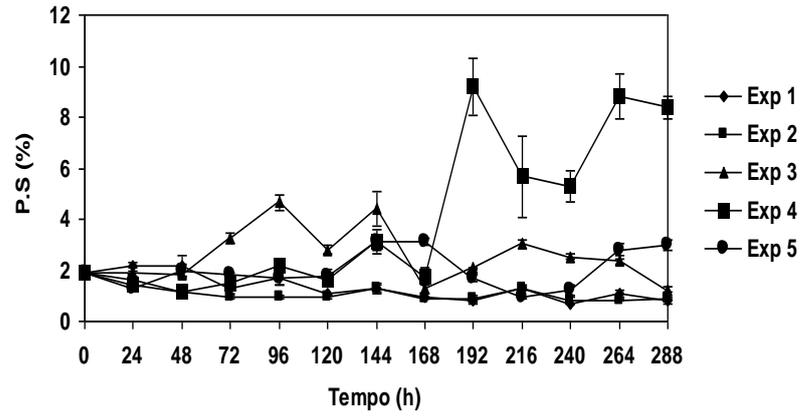
Tabela 14: Cinética de produção de proteínas solúveis (P.S) e proteína bruta (P.B) no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*.

Proteínas solúveis e proteína bruta (%)																		
Ensaio	X1	X2	T°C	U%		Tempo de Fermentação (h)												
						1	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288
1	-1	-1	30	30	P.S	1,87	2,15	2,17	1,30	1,70	1,06	1,26	0,92	0,79	1,32	0,68	1,10	0,78
					P.B	5,68	4,11	5,81	8,39	8,92	6,89	7,35	10,69	10,48	10,82	10,71	10,97	11,06
2	+1	-1	40	30	P.S	1,87	1,61	1,18	0,94	0,95	0,96	1,31	0,88	0,87	1,29	0,82	0,83	0,89
					P.B	5,68	7,25	8,87	9,19	9,23	9,22	10,47	10,69	10,73	10,48	11,31	10,54	10,54
3	-1	+1	30	60	P.S	1,87	1,88	1,83	3,27	4,66	2,81	4,42	1,26	2,08	3,03	2,53	2,35	1,25
					P.B	5,68	3,09	3,36	5,66	5,31	4,44	5,05	8,74	9,42	10,24	7,12	9,48	9,73
4	+1	+1	40	60	P.S	1,87	1,42	1,18	1,52	2,18	1,62	3,12	1,78	9,19	5,66	5,27	8,82	8,40
					P.B	5,68	5,17	5,87	6,51	7,37	9,40	9,55	9,40	10,50	14,30	18,47	17,52	17,65
5	-1,41	0	28	45	P.S	1,87	1,26	2,00	1,84	1,67	1,74	3,10	3,13	1,69	0,92	1,20	2,79	2,99
					P.B	5,68	3,74	4,27	6,90	8,52	4,54	7,93	8,51	9,27	10,79	7,91	9,82	10,74
6	+1,41	0	42	45	P.S	1,87	3,30	2,08	1,99	2,51	2,99	7,73	1,84	2,40	3,13	4,17	4,83	4,30
					P.B	5,68	7,66	9,77	7,96	9,41	11,79	11,14	9,06	8,83	10,95	11,20	11,07	11,06

Tabela 14 (continuação): Cinética de produção de proteínas solúveis (P.S.) e proteína bruta (P.B.) no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*

Proteínas solúveis e proteína bruta (%)																		
Tempo de Fermentação (h)																		
Ensaio	X1	X2	T°C	U%		1	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288
7	0	-1,41	35	24	P.S	1,87	4,15	3,24	2,44	2,02	3,15	2,67	1,61	2,83	2,67	3,45	3,18	3,97
					P.B	5,68	10,79	11,09	9,98	11,09	11,62	11,77	10,88	10,88	10,20	10,32	10,16	10,01
8	0	+1,41	35	66	P.S	1,87	8,72	5,14	2,00	3,17	1,54	2,64	1,34	2,18	2,00	1,74	1,46	2,54
					P.B	5,68	5,81	4,76	7,32	7,08	6,92	7,11	7,06	5,40	11,99	11,03	8,65	10,05
9	0	0	35	45	P.S	1,87	3,48	6,19	3,98	3,16	3,78	2,53	2,49	3,27	3,75	4,09	3,00	5,29
					P.B	5,68	7,43	7,89	8,41	9,99	10,45	11,98	13,33	15,27	10,49	10,58	11,28	11,96
10	0	0	35	45	P.S	1,87	3,45	6,25	3,80	3,14	3,38	2,80	2,66	2,94	4,13	4,01	3,64	4,75
					P.B	5,68	7,62	8,25	8,65	11,01	10,78	12,64	13,76	15,05	11,54	11,28	11,12	12,28
11	0	0	35	45	P.S	1,87	4,71	6,29	3,89	2,98	3,25	2,48	2,54	2,87	3,98	3,94	3,33	5,51
					P.B	5,68	7,53	8,12	8,30	10,64	14,74	12,89	13,21	15,05	11,68	11,16	10,88	11,59

A



B

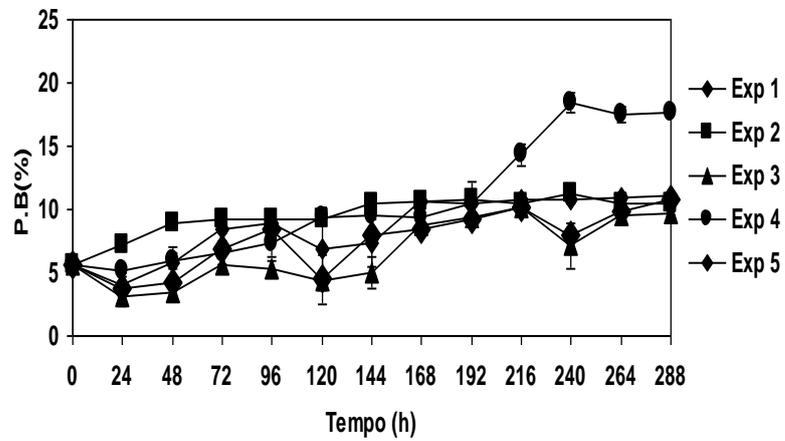
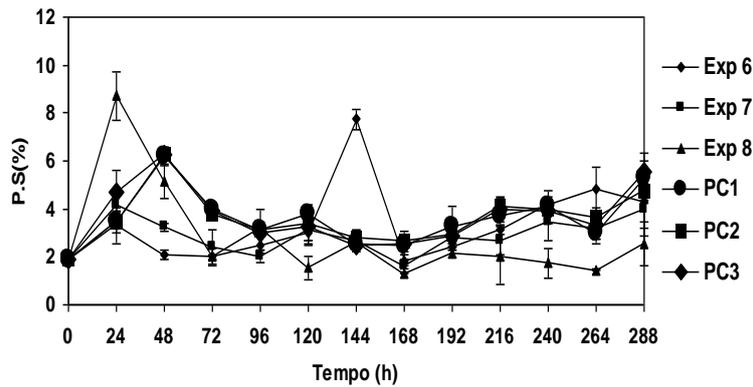


Figura 14: Cinética de produção de proteínas totais solúveis (A) e de proteína bruta (B) da FES da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae* (Experimentos 1 a 5).

A



B

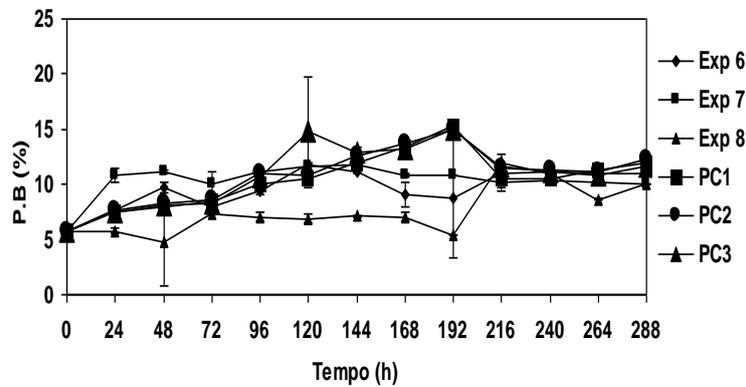


Figura 15: Cinética de produção de proteínas solúveis (A) e de proteína bruta (B) da FES da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae* (Experimentos 6 ao PC).

Em todas as fermentações a produção de proteínas solúveis e bruta aumentou ao longo do tempo de fermentação, atingindo um valor máximo seguido de estabilidade ou diminuição como foi demonstrado nos gráficos das Figuras 14 e 15.

A máxima produção de proteínas solúveis (9,19%) e de proteína bruta (18,47%) foi obtida quando utilizado farinha contendo 60% de umidade inicial e temperatura de 40°C (experimento 4), em 192 e 240 h de fermentação, respectivamente. O aumento protéico foi de aproximadamente 5,0 e 3,2 vezes em proteína solúveis e proteína bruta em relação ao valor inicial (PS=1,85%, PB = 5,68 %), respectivamente. Em comparação, quando utilizado o *Aspergillus oryzae* o enriquecimento protéico da farinha foi maior em termos de proteínas solúvel (aumento proteico de 7,5 vezes em

relação ao valor inicial) e menor em termos de proteína bruta (aumento protéico de 2,5 vezes em relação ao valor inicial) do que o obtido com o *Rhizopus oryzae*.

O enriquecimento da farinha em termos de proteínas totais solúveis obtido neste trabalho foi similar ao encontrado por Albuquerque *et al.*, (2003), os quais fermentaram bagaço de maçã com o fungo *Rhizopus oligosporus* e obtiveram aumento protéico de em torno de 5 vezes em proteínas solúveis. Já o enriquecimento em termos de proteína bruta (aumento de 3,2 vezes) foi maior que os obtidos por Sturza *et al.*, (1997), os quais obtiveram aumento protéico de 2,5 vezes em bagaço de maçã enriquecido com *Rhizopus oryzae*, Silveira *et al.*,(2007), os quais obtiveram aumento protéico de 1,6 e 1,5 vezes em farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo enriquecido com *Rhizopus sp*, respectivamente, Gregório *et al.*, (2002) os quais obtiveram aumento protéico de 2,2 vezes e 2,7 vezes em polpa de limão enriquecida com *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride*, respectivamente, Oliveira *et al.*,(2006) os quais obtiveram aumento protéico de 2 vezes em resíduos do abacaxi, casca e coroa, empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e Campos *et al*, 2005 que obtiveram aumento protéico de 2,0 vezes em bagaço do pedúnculo de caju enriquecido com *Saccharomyces cerevisiae*.

Na tabela 15 estão apresentados os valores de produtividade em proteínas solúveis e em proteína bruta obtidos nos experimentos de 1 a 11. A maior produtividade em proteínas solúveis (18,70 mg/mL.h) e proteína bruta (0,98 mg/g.h) foi obtida quando utilizado farinha contendo 30% de umidade inicial e temperatura de fermentação de 40°C (experimento 2) e farinha contendo 45% umidade de farinha e 42°C temperatura de fermentação (experimento 6), respectivamente.

Tabela 15: Produtividade em proteínas totais solúveis e em proteína bruta nos experimentos de 1 a 11.

Experimentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Produtividade em proteínas solúveis (mg/mL.h)	0,45	18,70	0,48	0,47	0,18	0,53	1,73	3,63	1,28	1,30	1,31
Produtividade em proteína bruta (mg/g.h)	0,38	0,47	0,47	0,76	0,50	0,98	0,81	0,55	0,79	0,78	0,78

Para efeito de validação a condição do experimento 4 foi realizada em triplicata para a determinação de proteína bruta. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos como serão observado no gráfico da Figura 16.

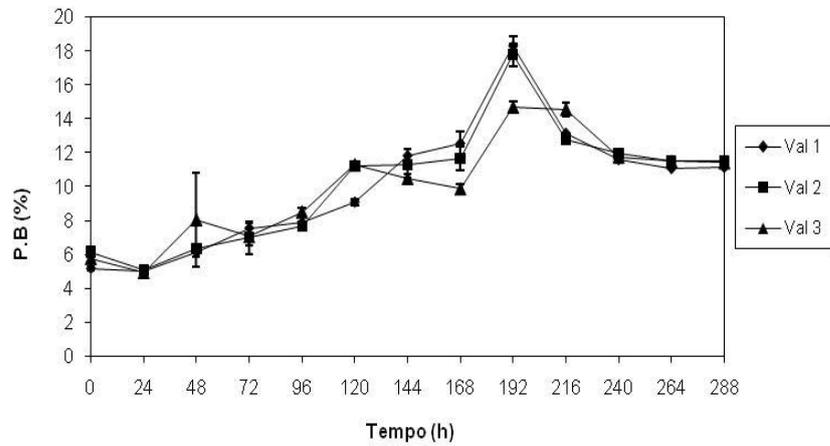


Figura 16: Validação para o teor de proteína bruta.

4.3.2- Cinética do Crescimento Microbiano

A cinética do crescimento microbiano foi realizada em triplicata na condição do experimento 4 (60% de umidade de substrato e temperatura de fermentação de 40°C) onde obteve maior enriquecimento protéico. Os resultados serão apresentados no gráfico da Figura 17.

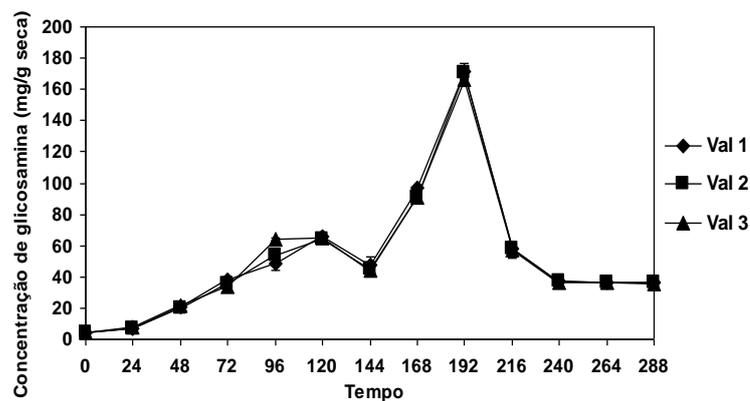


Figura 17: Cinética do crescimento microbiano no enriquecimento protéico de farinha de sementes de manga com *Rhizopus oryzae*.

O máximo crescimento microbiano foi de 169,23 mg/g seca obtido em 192 h de fermentação, tempo em que houve maior produção de proteínas totais solúveis. O crescimento do microrganismo *Rhizopus oryzae* no resíduo foi similar ao obtido pelo *Aspergillus oryzae* (169,48 mg/g seca obtido em 264 h de fermentação).

4.3.3 – Determinação do teor de metionina na farinha de sementes de mangaba fermentada com *Rhizopus oryzae*.

O teor de metionina foi determinado para a farinha de sementes de mangaba fermentada com *Rhizopus oryzae* na condição do experimento 4 (60% de umidade de substrato e temperatura de fermentação de 40°C) onde obteve-se maior enriquecimento protéico.

A farinha fermentada apresentou teor de metionina de 7,30 mg/g seca, houve um aumento de 4,3 vezes em relação ao valor inicial na farinha não fermentada (1,68 mg/g). Esse resultado foi maior do que o obtido quando a farinha foi enriquecida com o *Aspergillus oryzae* (6,04 mg/g) e ao obtido por Silveira et al (2007) no enriquecimento de farelo de arroz desengordurado (2,0 vezes) e de farelo de trigo (1,7 vezes) com *Rhizopus sp.*

4.3.4- Análise toxicológica da farinha de sementes de mangaba fermentada com *Rhizopus oryzae*.

A amostra fermentada (na condição do experimento 4: 60% de umidade inicial de substrato e temperatura de fermentação de 40°C) com *Rhizopus oryzae* apresentou ausência das micotoxinas aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Furlong et al (2007) verificaram que o fungo *Rhizopus sp.* tem a capacidade de diminuir os níveis de micotoxinas, como a ocratoxina A (OTA), em sistemas sólidos de fermentação, comprovando a potencialidade destes fungos para a produção de ingredientes alimentícios com menores níveis de contaminação.

4.3.5- Influência de parâmetros no enriquecimento protéico - Análise de superfície de resposta

A influência da temperatura e da umidade inicial do substrato no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae* foi avaliada através do tratamento estatístico dos valores máximos de produção de proteínas solúveis obtidos nos experimentos de fermentação (Tabela 16).

Tabela 16: Valores máximos de produção de proteínas totais solúveis e proteína bruta obtidos nas fermentações da farinha de sementes de mangaba.

Ensaio	X1	X2	T (°C)	U(%)	Proteína solúvel (%)	Proteína Bruta (%)
1	-1	-1	30	30	2,17	11,06
2	+1	-1	40	30	1,87	11,31
3	-1	+1	30	60	4,66	10,24
4	+1	+1	40	60	9,19	18,47
5	-1,41	0	28	45	3,13	10,79
6	+1,41	0	42	45	7,73	11,79
7	0	-1,41	35	24	4,15	11,77
8	0	+1,41	35	66	8,72	11,99
9	0	0	35	45	6,19	15,27
10	0	0	35	45	6,25	15,05
11	0	0	35	45	6,29	15,05

Nas Tabelas 17 e 18 estão demonstradas as estimativas dos efeitos dos fatores umidade do substrato e temperatura de fermentação na produção de proteínas solúveis e proteína bruta, respectivamente.

Tabela 17: Estimativa dos efeitos para a produção de proteínas totais solúveis no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	p	-90% Limite de confiança	+90% Limite de confiança	Coefficiente de regressão
Média	6,26271	0,640514	9,77763	0,000190	4,61621	7,909200	6,262706
Temperatura °C (L)	2,69444	0,788525	3,41707	0,018898	0,66748	4,721413	1,347222
Temperatura °C (Q)	-1,5910	0,946556	-1,68084	0,153625	-4,02421	0,842190	-0,795504
Umidade % (L)	4,09293	0,788525	5,19061	0,003494	2,06596	6,119898	2,046465
Umidade % (Q)	-0,5655	0,946556	-0,59743	0,576247	-2,99870	1,867700	-0,282749
T (L)x U(L)	2,41500	1,109553	2,17655	0,081467	-0,43720	5,267198	1,207500

Tabela 18: Estimativa dos efeitos para a produção de proteína bruta no enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	p	-90% Limite de Confiança	+90% Limite de Confiança	Coefficiente de regressão
Média	15,10638	0,953989	15,83497	0,000018	12,65407	17,55868	15,10638
Temperatura °C (L)	2,47980	1,174439	2,11148	0,088456	-0,53919	5,49879	1,23990
Temperatura °C (Q)	-3,24549	1,409811	-2,30207	0,069592	-6,86952	0,37855	-1,62274
Umidade % (L)	1,66364	1,174439	1,41654	0,215795	-1,35535	4,68263	0,83182
Umidade % (Q)	-2,64344	1,409811	-1,87504	0,119637	-6,26748	0,98059	-1,32172
T(L)x U(L)	4,02000	1,652582	2,43256	0,059194	-0,22810	8,26810	2,01000

Os parâmetros que apresentaram significância ao nível de 90% de confiança ($p < 0,1$) na fermentação da farinha de sementes de mangaba foram à umidade e temperatura linear para a produção de proteínas solúveis, e para a produção de proteína bruta, foram à temperatura linear e quadrática e a interação entre temperatura e umidade. De acordo com gráfico de Pareto (Figuras 18 e 19), a umidade (linear) foi a que mais interferiu e de forma positiva na produção de proteínas solúveis, e a interação entre a temperatura e umidade foi a que mais interferiu positivamente na produção de proteína bruta.

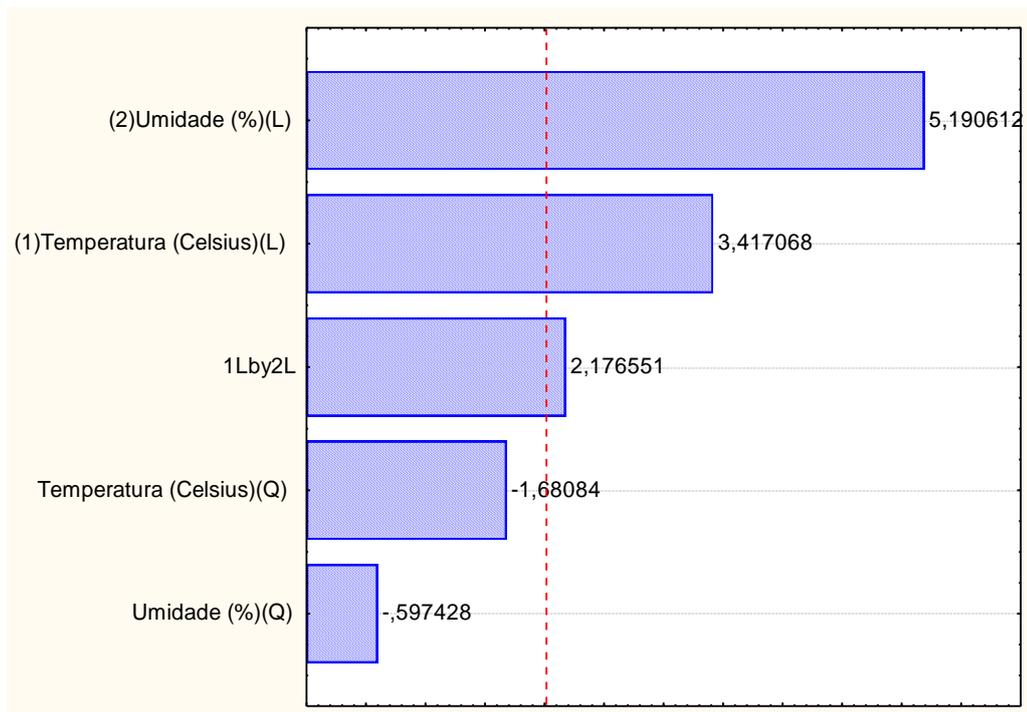


Figura 18: Diagrama de Pareto para as proteínas totais solúveis através da FES da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*.

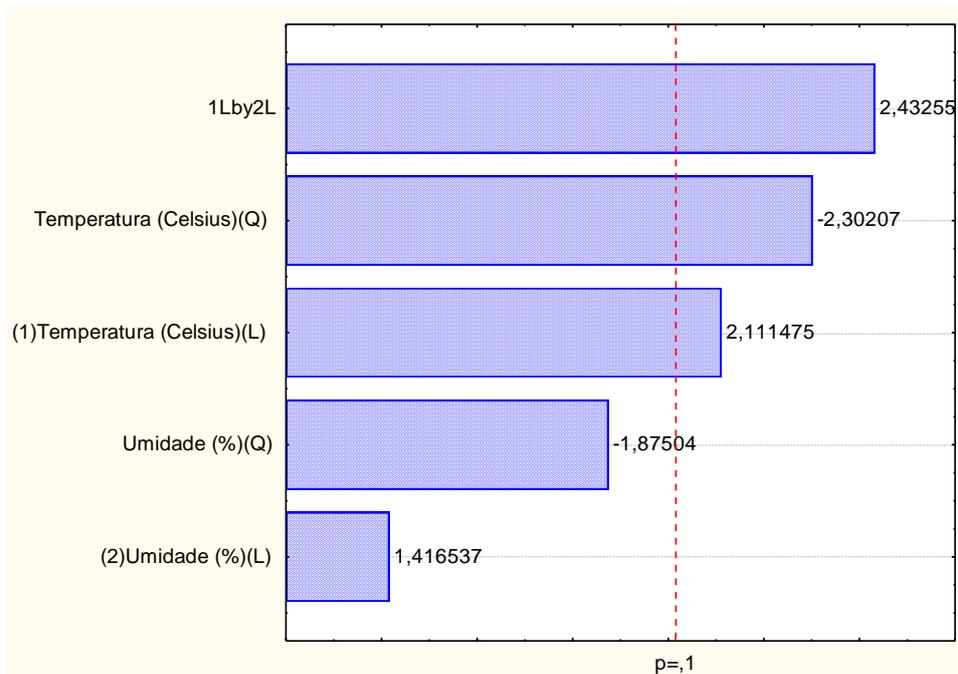


Figura 19: Diagrama de Pareto para a proteína bruta através da FES da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*.

Nas equações 4 e 5 estão apresentados os modelos codificados de primeira ordem para a produção de proteínas solúveis e de segunda ordem para a produção de proteína bruta, em função da temperatura de fermentação e umidade do substrato, onde T é a temperatura e U é a umidade.

$$P.S (\%) = 6,26 + 1,34 T + 2,04 U + 1,20 T.U \quad (\text{Eq 4})$$

$$P.B (\%) = 15,10 + 1,23 T - 1,62T^2 + 2,01T.U \quad (\text{Eq 5})$$

A validação do modelo empírico foi realizada através da análise de variância que estão apresentadas nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19: Análise de variância para proteínas totais solúvel.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	56,87331	5	11,374662	9,23
Resíduo	6,15554	5	1,231108	-
Total SS	63,02885	10	-	-

$$F_{5; 5; 0,1} = 3,45 \quad R^2 = 0,90234$$

Tabela 20: Análise de variância para proteína bruta.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	52,71092	5	10,542184	3,86
Resíduo	13,65513	5	2,731026	-
Total SS	66,36605	10	-	-

$$F_{5; 5; 0,1} = 3,45 \quad R^2 = 0,79425$$

O modelo apresentado na equação (4) para a produção de proteínas solúveis apresentou coeficiente de correlação $R^2 = 0,90234$ e o F calculado (9,23) foi maior que o F tabelado (3,45). Este resultado validou o modelo permitindo a obtenção da superfície de resposta representada na Figura 20.

O modelo apresentado na equação (5) para a produção de proteína bruta apresentou coeficiente de correlação $R^2 = 0,79425$ e o F calculado de 3,86 foram próximos que F tabelado (3,45). Isso significa que os dados experimentais não foram ajustados ao modelo devido ao valor do F calculado está próximo ao valor do F tabelado, não sendo possível a obtenção da superfície de resposta.

Com base nessas informações a superfície de resposta foi gerada apenas para a produção de proteínas solúveis conforme apresentado na Figura 20.

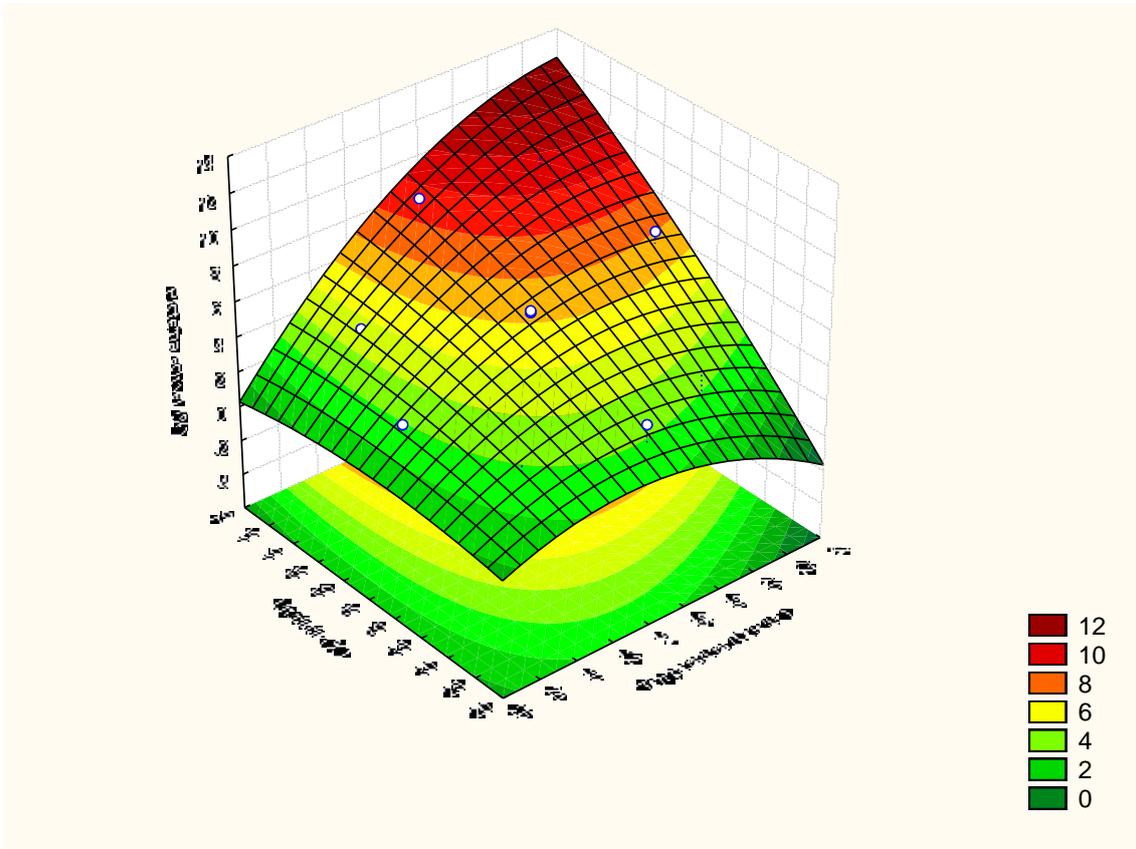


Figura 20: Superfície de resposta para o enriquecimento protéico em termos de proteínas totais solúveis da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*.

Através da superfície de resposta demonstrada na Figura 20 foi verificada a existência de uma região ótima para a produção de proteínas solúveis, em condições de umidade inicial de substrato entre 60 a 70% e temperatura entre 40 a 44 °C.

5.0- CONCLUSÕES

- O maior enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com o microrganismo *Aspergillus oryzae* foi obtido quando utilizado umidade inicial do substrato de 60% e temperatura de fermentação de 40 °C, entretanto a maior produtividade em proteínas solúveis foi obtida quando utilizado a farinha na mesma umidade inicial e temperatura de fermentação de 30°C
- O maior enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com o microrganismo *Rhizopus oryzae* foi obtido quando utilizado umidade inicial do substrato de 60% e temperatura de fermentação de 40 °C, entretanto a maior produtividade em proteínas solúveis e em proteína bruta foi obtida quando utilizado 30% de umidade inicial e temperatura de fermentação de 40°C e 45% umidade de farinha e 42°C temperatura de fermentação, respectivamente;
- A umidade foi o parâmetro que mais influenciou a produção de proteínas solúveis na FES com *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* e a interação entre a umidade e a temperatura foram o que mais influenciou a produção de proteína bruta durante a fermentação com *Rhizopus oryzae*;
- O enriquecimento proteico da farinha em termos de proteínas solúveis foi maior quando utilizado o *Aspergillus oryzae*;
- Ambos os microrganismos demonstraram potencial para o enriquecimento da farinha de sementes de mangaba em termos de proteínas solúveis, proteína bruta e teor de metionina e não apresentaram toxicidade em relação à presença de aflatoxinas.

6.0- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a cinética de produção de proteína bruta utilizando *Aspergillus oryzae* na semente da farinha de mangaba;
- Otimizar o enriquecimento protéico avaliando a influência de nutrientes adicionados à farinha;
- Estudar a influência de outros parâmetros como pH, granulometria do substrato no enriquecimento protéico da farinha;
- Realizar outras análises toxicológicas como a Ocratoxina;
- Determinar o perfil de aminoácidos presentes nas farinhas enriquecidas nutricionalmente;
- Testar as farinhas enriquecidas como suplementos para ração animal.

7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P.M. *Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã*. 2003. 103p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina.

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA; R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. *Ciência e Tecnologia Alimentos*. v.27 n.2 364-368, abr.-jun. 2007.

ANAPUMA.; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, v.18, p.459-479, 2000.

ANAPUMA.; 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, March, 2001.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Publicada no DOU de 10/12/2004.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15. ed. Arlington: AOAC, v.2. 1995.

AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U de A.; BORZANI, W. B. Biotecnologia industrial – Engenharia bioquímica. São Paulo: Blucher, 2001. v.2.

AZEVEDO, D. M. P.O.; LIMA, E. F. O Agronegócio da Mamona no Brasil. Embrapa Algodão, Campina Grande. 2001.

BAKER D.H. Partitioning of nutrients for growth and other metabolic functions. *Poultry Science*; 70: p.797-805. 1991.

BLUMENTHAL, C. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Justification of Mycotoxin Testing in Food Grade

Enzyme Preparations derived from the Three Fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. San Diego, v. 39, n. 1, p. 214-228, 2004.

BORGES, S. V.; BONILHA, C. do C.; MANCINI, M. C. Sementes de jaca (*artocapus integrifolia*) e de abóbora (*curcubita moschata*) desidratadas em diferentes temperaturas e utilizadas como ingredientes em biscoitos tipo cookie. *Alim. Nutr.*, v.17, n.3, p.317-321, jul./set., 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976

BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C. R.; CHRISTEN, P.; REVAH, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Rev. Microbiol.* [online]. ISSN 0001-3714. doi: 10.1590/S0001-37141998000300012. v.29, n.3, 1998

BRAVO, O.; FERRER, A.; AIELLO, C.; LEDESMA, A.; DÁVILA, M. Growth of *Chaetominum cellulolyticum* in solid-state fermentation of sugar cane bagasse treated with water alkali at several liquid/solid ratios. *Biotechnol. Lett.*, 16 (8), p. 865-870. 1994.

CAMPOS, A.R.N.; SANTANA, R.A.C.; DANTAS, J.P.; OLIVEIRA, L.S.C.; SILVA, F.L.H. Enriquecimento protéico do bagaço do pendúnculo de caju por cultivo semi-sólido. *Revista de Biologia e Ciência da Terra*. v. 5, n. 2 - 2º Semestre, 2005.

CARVALHO, J.C.; SOCCOL, S.R.; MIYAOKA, M.F. Produção de pigmentos de *Monascus* em meios à base de bagaço de mandioca, in: *Proceedings of the VII th Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, ABM2-15, Regional Paraná, SBCTA-PR, 2004.

CHRISTEN, P.; MEZA, J.C.; REVAH, S. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycol. Res.* 101 (8), p. 911-919, 1997.

COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F.; FURTADO, A.A.L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. B.CEPPA, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, jan /jun 2001.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *Journal of Food Engineering*, 2005.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M.A.; FREITAS, S.C; FREIRE, D.M.G; LAGO, R.C.A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* v.39, n.4, p. 676-681, ISSN 1517-8382, 2008.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coords.). *Biotechnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blücher. v. 2, p.541, 2001.

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M. E 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.

DONADIO, L.C. Dicionário das Frutas, Jaboticabal, 2007.

DURU, C.C.; UMA, N.U. Protein enrichment of solid waste from cocoyam cormel (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) processing using *Aspergillus oryzae* obtained from cormel flour. *African Journal of Biotechnology* v.2, n.8, p.228-232.2003.

EMDAGRO: <http://www.emdagro.se.gov.br/modules/news/article.php?storyid=150>

EUN, J.S., BEAUCHEMIN, K.A., HONG, S.H., BAUER, M.W. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on in vitro fermentation characteristics and degradability. *Animal Feed Science and Technology*. In Press, available in www.scienceirect.com, 2006.

FENG, J.; LIU, X.; XU, Z.R.; LU, Y.P.; LIU, Y.Y. The effect of *Aspergillus oryzae* fermented soybean meal on growth performance, digestibility of dietary components and activities of intestinal enzymes in weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*. v. 134, p.295–303, 2006.

FERREIRA, E.G. *Características biométricas, física de frutos e diagnose em folhas e ramos de mangabeira (Hancornia speciosa Gomes), proveniente de pomar nativo e cultivado*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Área: UFPB/CCA, 1997. 69 p. Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB.

FLORENTINO, S.M.S. *Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato*. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química). 2007. 131p. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

FURLONG, E. B; CACCIAMANI, J.L.M; BUFON, J.G. Fermentação fúngica: enriquecimento protéico e degradação de micotoxinas em farelo de cereal contaminado com Aflatoxina B1 e Ocratoxina A. *Braz. J. Food Technol.*, Campinas, v. 10, n. 4, p. 233-239, out./dez. 2007.

GÉLINAS, P.; BARRETE, J. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresource Technology*. 98, p. 1138–1143, 2006.

GRAMINHA; E.B.N, GONÇALVES; A.Z.L, PIROTA; R.D.P.B, BALSALOBRE; M.A.A, SILVA; R, GOMES;E. Enzyme Production by Solid-State Fermentation: Application to Animal Nutrition. *Animal Feed Science and Technology* (2007).

GUILHERME, D.O; SANTOS, A.M; ARAUJO, C.B; SANTOS,W.G. Ecogeografia e Etnobotânica da mangaba (*Hancornia speciosa*) no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 414-416, jul. 2007.

HAIDER, M. M.; El-Tajori, N.N.; Baiu, S. H. Single cell protein production from carob pod extract by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *3rd National Conference of Biotechnology*, Libya. 2005.

JOSHI, V.K.; SANDHU, D.K. Preparation and evaluation of an animal feed by product produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresource Technology*. 56, p. 251-255, 1996.

IBGE. Produção extrativa vegetal. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z>. Acesso em: 20/10/2007.

KOCH, F.; PITOL, L.O.; VENDRUSCOLO, F.; NINOW, J.L. Produção de proteína unicelular a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* v. 01, n. 01: p. 53-57, 2007.

KRONBAUER, E.A.W.; PERALTA, R.M.; OSAKU, C.A.; KADOWAKI, M.K. Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. *B.CEPPA*, Curitiba. v. 25, n. 2, p. 207-216 jul./dez. 2007.

KUMAR, D.; GOMES, J. Methionine production by fermentation. *Biotechnology Advances*. v.23, p. 41–61, 2005.

LEDERMAN, I. E.; SILVA JÚNIOR, J. F.; BEZERRA, J. E. F.; ESPÍNDOLA, A. C. M. Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Jaboticabal: São Paulo. 35p. (*Série frutas Nativas*) 2000.

MACIEL, G.M. *Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja*. Dissertação (MESTRADO em Processos Biotecnológicos) 2006. 133p. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná.

MACHIDA, M *et al* 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus Oryzae*. *Nature Publishing Group* .v. 438 p. 22/29 doi:10.1038/nature 04300. December 2005.

MATOS, A. T. Tratamento de resíduos agroindustriais. 2005. Departamento de Engenharia Agrícola e Ambiental. Universidade Federal de Viçosa.

MEDEIROS, A.B.P; CHRISTEN, P.; ROUSSOS, S.; GERN, J.C.; SOCCOL, C.R. Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* v.34, n.3, p. 245-248. ISSN 1517-8382. 2003.

MEDEIROS, P.V.D.; MELO, J.L.S.; CARVALHO, F.B.; ALVES.; J.K.P.; PEREIRA, P.M.S. Reaproveitamento de resíduos orgânicos da Ceasa/Rn para o desenvolvimento de um produto desidratado e avaliação do teor de sais minerais. *I Jornada Nacional da Agroindústria*. Bananeiras, 17 a 20 de outubro de 2006.

MICOLOGIA-ON-LINE.

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/R_oryzae.html

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food mycotoxins An update. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.

OLIVEIRA, M.M.; CAMPOS, A.RN.; SILVA, F.L.H. Enriquecimento nutricional dos resíduos do abacaxi (*Ananás comosus* L. Mer). X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2006.

PALMA, M.B.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINI, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M. “Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate”. *Appl-Biochem-Biotechnol.* 2000.

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. *Enzyme and Microbiology Technology.* v. 14. p. 486/ 488. 1992.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. Solid-state

fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech, *Bioresource Technology* .p. 221. 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and Products. *Process Biochemistry* 35. p. 1153–1169. 2000.

PARAJÓ, J.C.; SANTOS, V.; DOMINGUEZ, H.; VAZQUEZ, M. Protein concentrates from yeast hydrolysates cultured in wood. *Food Chemistry*. v. 53. p. 157-163. 1995.

PARASKEVOPOULOU, A.; ATHANASIADIS, I.; KANELLAKI, M.; BEKATOROU, A.; BLEKAS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Research International*. v. 36.p. 431–438. 2003.

PASTORE, G. M.; COSTA, V.S. R.; KOBLITZ, M. G. B. “Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp*”.*Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 23(2): p. 135/140 maio-ago. 2003.

PASTRANA, L.; GUERRA, N. P.; AGRASAR, A. T.; MACIAS, C. L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2 (3), 2003. p. 343-350. 2003.

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *J. Technol. Manag. Innov.* v. 2, Issue 1. 2007.

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.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S. de.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e

valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Embrapa-CE (2005).
www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_102.pdf

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.1, n.3, 1998.

RAVINDER, R.; LINGA, V.R.; CHANDEL, A.K.; POGAKU. Optimization of protein enrichment of deoiled rice bran by solid state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 1846. *Internacional Journal of Food Engineering*. vol.2. 2006.

RIZZATO, M.L.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Utilização de resíduos agro-industriais para produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3. Unicamp – Departamento de Engenharia de Alimentos. 2003.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13. p. 197–203. 2003.

SARROUH, B. F.; SANTOS, D.T.; SANTOS, J.C.; PEREZ, V.H.; SILVA, S.S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. *Janus*, v.4, p.165-183, 2006.

SINGHANIA, R. R.; PATEL.; A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44. p. 13–18. 2009.

SILVA JUNIOR, J.F. A cultura da mangaba. *Rev. Bras. Frutic.* [online]. v.26, n.1, pp. 0-0. ISSN 0100-2945. 2004.

SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(4): p. 805-811, out.-dez. 2007.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13: p. 205/ 218. 2003.

SOUSA, E.S.; CARDOSO, M. C da S.; UCHÔA, A.M.A.; SOUSA, E.C. Avaliação da aceitabilidade de alimentos formulados com resíduos de frutos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (2009).

STREIT, F. *Estudo do Aproveitamento do Bagaço de Maçã para Produção de Quitosana Fúngica*. 2004. 55p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina.

STURZA, R.C.M.C.; SOCCOL, C.R.; MARIN, B.; DE FREITAS, R.J.S.; KUBICKI, D.; MEDEIROS, E. Protein enrichment of apple pomace by solid state fermentation. *Upgradation of Agro-Industrial Products/ Wastes*. Chapter 21. p. 257-271. 1997.

(TSCA)- http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra007.htm

UNIVAP - (http://www1.univap.br/drauzio/index_arquivos/mico008.pdf).

VANDENBERGHE; L. P. S, SOCCOL; C. R, PANDEY ; A, LEBEAULT; J.M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 74. p. 175-178. 2000.

VENDRUSCOLO, F. *Cultivo em meio sólido e submerso do bagaço de maçã por *Gongronella butleri* e avaliação do seu potencial biotecnológico*. 2005. 85p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico. Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos Universidade Federal de Santa Catarina.

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C. S.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J. L. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. v.13, n.4, p.487–493, 2009.

VIEIRA NETO, R.D.; CINTRA, F.L.D.; SILVA, A.L. da; SILVA JÚNIOR, J.F., COSTA, J.L. da S.; SILVA, A.A.G. da; CUENCA, M.A.G. Sistema de produção de mangaba para os tabuleiros costeiros e baixada litorânea. Aracaju: Embrapa Tabuleiros

Costeiros, 2002. 22p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Sistemas de Produção, 02). Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br>

VIEIRA NETO, R. D. Cultura da mangabeira. Aracaju: Embrapa-CPATC. p.16. (Circular Técnica n.2). 1994.

VIEIRA, G.S. *Desenvolvimento e caracterização de barras de cereais com mangaba*. Trabalho de Conclusão de Curso, 2007. Orientador: Marcelo Augusto Gutierrez Carnelossi. Universidade Federal de Sergipe, UFS, Brasil.

YANG, S.S.; JANG, H. D.; LIEW, C. M.; DU PREEZ, J. C. Protein enrichment of sweet potato residue by solid-state cultivation with mono na co-cultures of amylolytic fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 9, p. 258-264. 1993.

ANEXO A

Procedimento para preparo de algumas soluções.

1- Solução de acetil acetona em Na₂CO₃ 0,5 N

Misturar 1 mL de acetil acetona em 50 mL de solução de Na₂CO₃ 0,5 N.

Obs: esta solução não pode ser estocada, devendo ser preparada na hora do ensaio.

2- Reagente de Erlich

Dissolver 2,67 g de DAB (p-dimetilaminobenzaldeído) em um volume pequeno (em torno de 30 mL) de etanol/ ácido clorídrico 1:1. Após a dissolução, completar o volume pra 100 mL com água destilada.