



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CAROLINNE REINALDO PONTES

**ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DO BAGAÇO DE CAJU ATRAVÉS DE
FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO *Aspergillus niger***

FORTALEZA

2009

CAROLINNE REINALDO PONTES

**ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DO BAGAÇO DE CAJU ATRAVÉS DE
FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO *Aspergillus niger***

**Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia dos
Alimentos da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Tecnologia de Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra
Carioca

Co- Orientadora: Prof^a. Dra. Sueli Rodrigues

FORTALEZA – CEARÁ

2009

P858e Pontes, Carolinne Reinaldo
Enriquecimento protéico do bagaço de caju através de fermentação
semi-sólida utilizando *Aspergillus niger* / Carolinne Reinaldo Pontes, 2009.
70 f. ; il. enc.

Orientador: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca
Co-orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues
Área de concentração: Biotecnologia
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências Agrárias. Depto. de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2009.

1. Bioconversão protéica. 2. *Aspergillus niger*. 3. Resíduos de frutas
(caju). I. Carioca, José Osvaldo Beserra (orient.). II. Rodrigues, Sueli (co-
orienta.) III. Universidade Federal do Ceará – Curso de Mestrado em
Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD 664

ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DO BAGAÇO DE CAJU ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO *Aspergillus niger*

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 11/05/2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca (Orientador)
Depto. de Tecnologia dos Alimentos - UFC

Profa. Dra. Sueli Rodrigues (Co-Orientadora)
Depto. de Tecnologia dos Alimentos - UFC

Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto
EMBRAPA/CNPAT - UFC

Prof. Dr. Marcos Rodrigues Amorim Afonso
Depto. de Tecnologia dos Alimentos - UFC

Prof. Dr. João José Hiluy Filho
Depto. Engenharia Química – UFC

*À **Deus**, que sempre me fortaleceu e me mostrou que “tudo posso” quando tenho fé e que nada e ninguém no mundo me fará desistir de um sonho, pois Ele estará sempre ao meu lado, mostrando que nada é impossível.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Osvaldo Beserra Carioca, o eterno agradecimento por ter me aceitado, incentivado e pela singular orientação deste trabalho.

À Professora Dra. Sueli Rodrigues, pelo grande exemplo de professora e ser humano, sempre demonstrando paciência e muito interesse em repassar seus ensinamentos, bem como pela valiosa orientação, dedicação e amizade durante todo o curso e realização deste trabalho de pesquisa, pois sem esta seria impossível a conclusão deste. Muito obrigada!

Aos amigos do LABIOTEC que desde o início me receberam com muito carinho, principalmente ao Mauro Teixeira, que me repassou e acompanhou meus experimentos com muito esforço.

As amigas do LABIOTEC, Cláudia Fontes e Mariana Santiago, que sempre me ajudaram desde o início, sendo impossível à conclusão das pesquisas sem suas ajudas e amizade.

À minha mãe Rita de Cascia, que sempre, sempre esteve ao meu lado e acreditou em meus sonhos; e dedico tudo o que sou, pelo seu amor e trabalho durante toda minha vida.

À minha tia, Ana Maria, pelo sincero carinho, apoio, oração, amor e incentivo em tudo que faço.

À minha irmã, Camila Reinaldo B. Mota, pelo seu amor e amizade.

À minha tia Eva e meu tio Jocelito que sempre torcem e incentivam meus planos.

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, que me indicou o Prof. Carioca como orientador e acreditou em meu potencial.

Ao meu marido, Danilo D. Rocha, pelo amor, incentivo, compreensão pelos momentos de ausência e “estresse”, enfim, obrigada por sempre estar ao meu lado. TE AMO SEMPRE! NEOQEAV!

A todos os amigos e amigas que sempre estiveram ao meu lado e torceram pelo meu sucesso, em especial a Adriana Diniz, que me ajudou muito nesta etapa da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPQ, pela bolsa de estudo concedida.

À Empresa Sucos Jandaia LTDA e a Embrapa Agroindústria Tropical, pelo fornecimento do bagaço de caju.

RESUMO

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. Resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais, pois muitas vezes são fontes de matéria orgânica, que servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento. O objetivo do trabalho foi realizar o enriquecimento protéico de um dos resíduos da atividade de fruticultura, bagaço do caju, através da fermentação semi-sólida deste substrato com 2 linhagens de *Aspergillus niger* (2270 e 332), microrganismo não patógeno e seguro do ponto de vista alimentar. O ensaio foi conduzido realizando fermentação semi-sólida, onde se utilizou 6g de bagaço de caju úmido, 3 mL de solução salina, 1 mL de inóculo com esporos de *Aspergillus niger*, contendo 10^6 UFC/mL, variando-se quantidades de sulfato de amônia em cada amostra (1 a 5g). Depois da inoculação os erlenmeyers foram colocados em estufa incubadora com temperatura controlada em 30°C, por 30 horas. O teor de proteína total e nitrogênio não protéico foram acompanhados durante todo o processo fermentativo. O maior enriquecimento protéico do bagaço foi obtido com o acréscimo de 4 e 5g de sulfato de amônio no meio, que proporcionou um aumento de 14 e 11 vezes no teor de proteína do bagaço para as linhagens 2270 e 332, respectivamente, obtendo no final do processo 55% de proteína.

Palavras chaves: bioconversão protéica, *Aspergillus niger*, resíduos de frutas (caju)

ABSTRACT

The agriculture and food industries produce great amounts of residues, both liquid and solid. Residues can present problems of final disposal and high pollution potential, representing, many times, loss of biomass and nutrients of high value. In recent years, special attention has been given to minimize or to re-use the solid residues generated in different industrial processes as they often are sources of organic matter, which serve as a source of proteins, enzymes and essential oils, capable of rehabilitation and recovery. The objective of this work was to carry out a protein enrichment of residues in the fruitculture activity, such as the bagasse of the cashew, through a semi-solid fermentation of this substrate with 2 strains (2270 and 332) of *Aspergillus niger*, a non-pathogen and safe microorganism from the alimentary point of view. The test was conducted performing a semi-solid fermentation, in which were used 6g of humid cashew bagasse, 3 mL of saline solution (50g/L (NH₄)₂SO₄ + 2g/L of KH₂PO₄ + 1g/L NaCl + 1g/L MgSO₄ · 7H₂O), 1 mL of inoculum with spores of *Aspergillus niger*, containing 10⁶ CFU / mL, varying quantities of ammonia sulphate in each sample (1 to 5 g). After inoculation, the Erlenmeyer flasks were placed in BOD incubator with temperature set at 30° C, where the fermentation occurred for 30 hours. The content of total protein was determined by the Micro-Kjeldahl method (AOAC) and non-protein nitrogen (ammonia) by Tedesco (1995). The higher protein enrichment of the bagasse was obtained with the addition of 4 and 5 g of (NH₄)₂SO₄ in the medium, which provided an increase of more than 14 and 11 times the protein content of the bagasse to the strains 2270 and 332, respectively, which initially showed an average concentration of 3.7% protein, and after the experiments, reached 55%.

Key words: protein bioconversion, *Aspergillus niger*, fruit waste (cashew)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Percentual de proteína produzida na fermentação obtido em função da variação de pH e quantidades de sulfato de amônia com o fungo *Aspergillus niger* (2270)..... 48
- Figura 2 – Percentual de proteína produzida na fermentação obtido em função da variação de pH e quantidades de sulfato de amônia com o fungo *Aspergillus niger* (332)..... 48
- Figura 3 – Percentual de proteína de cada linhagem *A. niger* 2270 e 332, de acordo com as diferentes quantidades de sulfato de amônia utilizadas..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução peptonada para meio sabugo de milho	32
Tabela 2 – Planejamento experimental para otimização do meio de cultura ...	34
Tabela 3 - Composição da solução salina padrão.....	34
Tabela 4 – Variação da quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na solução salina.....	35
Tabela 5 – Planejamento experimental para o enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido variando o pH e a quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Linhagem 2270).....	36
Tabela 6 - Planejamento experimental para o enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido variando o pH e a quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Linhagem 332).....	36
Tabela 7 - Ensaio de umidades do lote de bagaço de caju úmido	42
Tabela 8- Percentual de proteína do bagaço de caju úmido	42
Tabela 9 – Quantidades de proteína produzida na fermentação do bagaço de caju com umidade média de 77,5% utilizando <i>A. niger</i> 2270 e 332 em 30 horas....	43
Tabela 10 – Quantidades de proteína produzida na fermentação do bagaço de caju com umidade média de 77,5% utilizando <i>A. niger</i> 2270 em 30 horas, e amônia de acordo com a variação de sulfato de amônia.....	43
Tabela 11 – Resultados experimentais do enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido variando o pH e a quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (<i>A. niger</i> 2270)	44
Tabela 12 - Efeitos estimados para o percentual de nitrogênio orgânico.....	44
Tabela 13 - Análise de variância para o percentual de nitrogênio orgânico.....	45
Tabela 14 – Resultados experimentais do enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido variando o pH e a quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (<i>A. niger</i> 332)	46
Tabela 15 - Efeitos estimados para o percentual de nitrogênio orgânico.....	46
Tabela 16 - Análise de variância para o percentual de nitrogênio orgânico	47

Tabela 17 – Quantidades de proteína produzida na fermentação do bagaço de caju com umidade média de 77,5% utilizando a linhagem 2270 em 30 horas, e amônia de acordo com a variação de sulfato de amônia	50
Tabela 18 - Síntese de dados sobre enriquecimento protéico da literatura	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Agronegócio	16
2.2 Caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	17
2.3 Fermentação semi-sólida	19
2.4 Enriquecimento protéico.....	21
2.5 Fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	27
2.6 Ensilagem.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Estudos Preliminares	31
3.2 Obtenção dos Resíduos.....	31
3.3 Caracterização dos resíduos.....	31
3.4 Obtenção e manutenção dos microrganismos	31
3.5 Ativação da linhagem	32
3.6 Propagação dos esporos em sabugo de milho	32
3.7 Fermentação semi-sólida	33
3.8 Otimização do meio de cultura para o enriquecimento protéico.....	33
3.9 Planejamento Experimental.....	35
3.10 Contagem de esporos	37
3.11 Métodos Analíticos	37
3.11.1 pH.....	37
3.11.2 Atividade água.....	37
3.11.3 Determinação de proteínas	37
3.11.3.1 Nitrogênio total.....	37
3.11.3.2 Nitrogênio não protéico (NNP).....	39
3.12 Análise dos dados	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Estudos preliminares	41
4.2 Caracterização do lote do bagaço de caju	41
4.3 Resultados do percentual de proteína.....	42
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DESTA PESQUISA COM OS DADOS DA LITERATURA.....	52

6 CONCLUSÕES	55
7 SUGESTÕES	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICES.....	63
APÊNDICE A - Foto de fermentação do bagaço de caju em estufa tipo BOD a 30°C	64
APÊNDICE B - Foto 1 após 30 horas de fermentação do bagaço de caju com o fungo <i>Aspergillus niger</i>	64
APÊNDICE C - Foto 2 após 30 horas de fermentação do bagaço de caju com o fungo <i>Aspergillus niger</i>	65
APÊNDICE D - Destilador de nitrogênio	65
APÊNDICE E - Atividade água do meio com bagaço de caju úmido em diferentes quantidades de sulfato de amônia.....	66
APÊNDICE F - Percentual de proteína em relação à atividade água presente no meio, nos 2 tipos de linhagem de <i>Aspergillus niger</i>	66
APÊNDICE G - Percentual de proteína de acordo com as quantidades de atividade água dos meios, com as linhagens 2270 e 332	67
APÊNDICE H – Comparativo da quantidade de proteína das linhagens de <i>A. niger</i> 2270 e 332.....	68
ANEXO.....	69
Anexo A - Informativo sobre tratamento estatístico.....	70

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado, onde alguns órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza (PELIZER, PONTIERI e MORAES, 2007).

O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A simples disposição destes no meio ambiente pode gerar emissões para a atmosfera, para as águas ou para o solo. O descarte só deve ser efetuado após os resíduos sofrerem tratamento e serem enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental para não causarem poluição (BRANCO e HESS, 1975).

O aumento da população mundial, bem como da poluição ambiental tem criado a necessidade da utilização eficiente e do aproveitamento integral dos recursos agrícolas. O Brasil, país com intensa atividade no setor de produção primário, gera anualmente quantidades significativas de resíduos agroindustriais (VILLAS BÔAS, 2001 *apud* ALBUQUERQUE *et al.*, 2003).

Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, podem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento. Com isso, nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. Os resíduos provenientes da indústria de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros componentes (COELHO *et al.*, 2001).

A crescente preocupação com o meio ambiente incentiva à viabilização de projetos que levam à sustentabilidade do sistema de produção industrial. A indústria de alimentos produz uma série de resíduos com alta capacidade de reutilização. Com isso, minimiza-se o impacto ambiental destes tipos de indústrias na região onde estão situadas e ainda agrega-se valor aos produtos do mercado (PELIZER, PONTIERI e MORAES, 2007).

O aproveitamento de matérias-primas vegetais regionalmente adaptados é fundamental para a melhora da oferta de alimentos que possam substituir, parcial ou totalmente, alguns componentes básicos na composição das rações animais. Entretanto, no caso de frutos tropicais tem-se observado grande desperdício de subprodutos resultantes do beneficiamento com excelente potencial para utilização na alimentação animal, como é o caso do caju (RAMOS *et al.*, 2006).

Com o crescimento constante das agroindústrias da fruticultura no Nordeste brasileiro, a utilização de subprodutos do processamento destaca-se como uma alternativa na alimentação animal. Vale ressaltar que, apesar deste crescimento, os subprodutos agroindustriais ainda são pouco utilizados, podendo tornar-se poluentes ambientais (TELES, 2006).

Os resíduos agroindustriais, bagaços de frutas tropicais, por exemplo, representam um elevado potencial de uso para conversão protéica por microrganismos, pois, possuem baixo valor de proteínas (base seca), boa quantidade de carboidrato (açúcar e amido) que podem ser metabolizados como fonte de energia para reações de biossíntese (HOLANDA, OLIVEIRA e FERREIRA, 1997).

A conscientização da importância do uso de materiais biológicos como matérias-primas renováveis para a obtenção de energia, produtos químicos e alimentos, assim como a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais e florestais como matérias-primas de custo reduzido em fermentações semi-sólidas, reavivou o interesse por esta forma de cultivo (HESSELTINE, 1972). A fermentação semi-sólida (FSS) está, atualmente, sendo muito utilizada para reaproveitamento destes materiais, com objetivo produção de enzimas (CAMPOS *et al.*, 2005).

Diversos co-produtos têm sido usados com sucesso para o enriquecimento protéico por fermentação microbiana, entre eles: resíduos de batata doce, bagaço de laranja, resíduos de mandioca, beterraba forrageira, bagaço do pedúnculo do caju, bagaço de maçã etc. O enriquecimento protéico se destina muitas vezes para produção de ração animal (CAMPOS *et al.*, 2005).

A utilização desses subprodutos regionais visa o aproveitamento de matérias-primas regionais agrícolas. O cajueiro é uma planta, largamente cultivada no nordeste brasileiro, principalmente no Ceará, possui pedúnculo que é desperdiçado, pois o maior valor dessa cultura está associado a amêndoa. Considerando-se que o pseudofruto corresponde a 90% do peso do caju (LEITE, 1994). No entanto, segundo alguns estudos, em média somente 5 a 15% desse total são aproveitados industrialmente ou para consumo *in natura*, sendo grande parte perdida no campo, no momento do descastanhamento, feito para a indústria de beneficiamento de castanha (COSTA, 1999; CAMPOS *et al.*, 2005).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar o enriquecimento protéico do bagaço do caju, através da fermentação semi-sólida com linhagens de *Aspergillus niger*, microrganismo não patógeno e seguro do ponto de vista alimentar, visando o aumento do teor de proteína deste resíduo e melhorando seu valor nutricional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agronegócio

Moderno, eficiente e competitivo, o agronegócio brasileiro é uma atividade próspera, segura e rentável. Com um clima diversificado, chuvas regulares, energia solar abundante e quase 13% de toda a água doce disponível no planeta, o Brasil tem 388 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade, dos quais 90 milhões ainda não foram explorados. Esses fatores fazem do país um lugar de vocação natural para a agropecuária e todos os negócios relacionados às suas cadeias produtivas. O agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira e responde por um em cada três reais gerados no país (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO).

O sucesso do agronegócio brasileiro é considerado vital para o desenvolvimento sustentável do Brasil, sendo processamento de frutas um dos setores mais importantes dentro do agronegócio. O Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais de frutas especialmente as frutas tropicais, as quais vêm recebendo forte impulso com a instalação dos pólos de agricultura irrigada no nordeste brasileiro (CARIOCA, MARX E JONAS, 2006).

Agregar valor a um produto nem sempre está ligado ao processamento de produtos agrícolas. As frutas “in natura” do Brasil são exemplos disso. O Brasil é o terceiro produtor de frutas do mundo e só compartilha 1,5% do mercado internacional (CARIOCA, MARX E JONAS, 2006).

Para aumentar a participação brasileira no mercado internacional, as várias empresas privadas e órgãos públicos estão investindo em um sistema produtivo de maior qualidade e segurança alimentar. Neste sentido, os resíduos agrícolas constituem um importante componente da produção agroindustrial, com potencial de aproveitamento para fins de alimentação animal e humana (CARIOCA E ARORA, 2000).

Vale salientar que a composição química da maioria desses resíduos apresenta quantidades razoáveis de açúcares, proteínas e amidos, dentre outros componentes minoritários, os quais conferem a esses resíduos uma demanda

bioquímica. Este fato justifica plenamente a necessidade de processamento bioquímico desses resíduos com a finalidade de evitar poluição e até mesmo a geração de doenças (CARIOCA E ARORA, 2000).

2.2 Caju (*Anacardium occidentale*)

O caju é um fruto de especial interesse botânico, sendo conhecido pela sua castanha de alta qualidade. O fruto do cajueiro, a castanha, é definido como um aquênio reniforme pendente do pedúnculo floral, hipertrofiado, carnoso e suculento, denominado comumente de caju. A castanha é constituída basicamente de três partes: a casca, a película e a amêndoa (FARIA, 1994).

A amêndoa da castanha do caju constitui-se no principal produto de utilização do cajueiro. O líquido da casca da castanha (LCC) e o pedúnculo, entretanto, também são derivados de grande importância para o aproveitamento do cajueiro. O pedúnculo é consumido *in natura* ou industrializado sob a forma de sucos, sorvetes, doces diversos, licor, mel, geléias, cajuína, refrigerantes gaseificados, vinho e aguardente. O alto valor nutritivo do pedúnculo revela-se sob a forma de vitaminas e sais minerais, nele encontrando-se a vitamina C em níveis quase que cinco vezes maiores que na laranja, tendo ainda, entre outros a presença de cálcio, ferro e fósforo (CAVALCANTI, 2002; ARAÚJO e SILVA, 1995).

A agroindústria de caju do Nordeste tem relevante importância socioeconômica para o país, onde o Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de castanha "in natura" e, também, na oferta de amêndoa de castanha de caju (ACC). A produção de castanha é distribuída, principalmente, nos estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Maranhão e Bahia, com uma produção registrada, considerando a entrada da matéria-prima nas fábricas, de 325 mil toneladas (safra 2006/2007), oriunda de 700 mil hectares de área cultivada. As divisas geradas com as exportações representaram U\$187 milhões para a região, ano passado. Deste montante, o Ceará participou com U\$ 136 milhões (72%). A geração de emprego na cadeia produtiva é de 300 mil postos de trabalho, distribuídos na atividade agrícola, industrial e serviços, em toda região nordeste (TEXEIRA, 2009).

Segundo CAMPOS *et al.* (2005), o caju é uma fruta que possui o aproveitamento industrial realizado principalmente na região Nordeste do país, visando, basicamente, o beneficiamento da castanha e, em menor escala o aproveitamento do pedúnculo. Mesmo considerando a utilização do pedúnculo sob a forma de sucos, doces, geléias, néctares, farinhas e fermentados, apenas de 5 a 15% da produção do pedúnculo é utilizada. Uma das causas para esse baixo aproveitamento está relacionada ao tempo de deterioração do pedúnculo, que ocasiona excessivas perdas no campo e na indústria.

O rejeito das indústrias de aproveitamento do pedúnculo de caju, o bagaço, tem seu valor nutritivo limitado, pois é rico em fibras não digeríveis e carente em vitaminas e proteínas, sendo simplesmente utilizado como ração animal ou descartado no meio ambiente. Um aproveitamento racional e eficiente desse rejeito, através de seu enriquecimento protéico, poderá dar resultados satisfatórios na produção de rações (CAMPOS *et al.*, 2005).

O processamento do bagaço de caju através da fermentação semi-sólida com o acréscimo de microrganismos, pode aumentar seu valor nutricional em proteínas, vitaminas, fosfato e cálcio, importantes fatores de crescimento para os animais. Posteriormente pode ser utilizado como fonte alternativa de alto potencial protéico, em ração animal, tornando-se uma boa estratégia para solucionar alguns dos problemas relacionados às limitações e desperdícios de alimentos, principalmente na região Semi-árida do Nordeste (CAMPOS *et al.*, 2005).

Os microrganismos necessitam de carbono, nitrogênio, minerais, água, eventualmente fatores de crescimento. Os substratos ricos em carboidratos são os melhores e as mais baratas fontes de carbono, uma vez que podem ser adquiridos a baixo custo como resíduos da indústria alimentícia ou atividades agrícolas (SANTOS, 2007).

Normalmente os carboidratos são as principais fontes de carbono acessíveis aos fungos, são metabolizados proporcionando energia, atuando também como precursores na síntese do material celular (SANTOS, 2007).

2.3 Fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida é, geralmente, definida como um crescimento de microrganismos em material sólido (úmido), na ausência ou quase ausência de água (PANDEY, SOCCOL e LEON, 2001).

A fermentação semi-sólida (FSS), também chamada por alguns autores de fermentação em estado sólido (FES), é utilizada industrialmente por apresentar algumas vantagens, como menor geração de efluentes, diminuição do risco de contaminação do meio, menor exigência de água quando comparada à fermentação submersa e um possível baixo investimento (SANTOS, 2006).

A fermentação semi-sólida, associada a diferentes organismos sempre representou um importante instrumento para obtenção de produtos de interesse econômico. Este processo tem-se mostrado muito promissor no desenvolvimento de vários bioprocessos, como na biorremediação e biodegradação de compostos tóxicos, desintoxicação de resíduos e subprodutos agroindustriais, biotransformação de resíduos de colheitas para enriquecimento nutricional e na obtenção de produtos de alto valor agregado, como metabólitos secundários (antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento vegetal, etc), ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustíveis, compostos aromáticos e enzimas (MARTINS, 2006).

Na FSS, o meio de cultura é composto de substratos sólidos, com um determinado teor de umidade. Assim, a água torna-se um fator limitante, o que não ocorre na fermentação submersa, onde possui grande quantidade de fase aquosa (ANDRADE, 1999). O substrato pode variar seu teor umidade entre 12 a 80% de acordo com o material utilizado. Abaixo do limite mínimo, os microrganismos não se desenvolvem.

Na FES, o microrganismo é inoculado em um substrato onde o conteúdo líquido ligado a ele está em um nível de atividade água que assegure o crescimento e metabolismo celular, porém que não exceda a capacidade máxima de ligação de água com a matriz sólida (SANTOS, 2006).

Algumas diferenças podem ser citadas entre a fermentação semi-sólida (FSS), e fermentação submersa (FS) como (PANDEY, SOCCOL e LEON, 2001):

- na fermentação semi-sólida o uso de água é limitado, o volume da mistura de fermentação é menor, a necessidade de energia física é baixa, a quantidade de água desperdiçada não é significativa, o fornecimento de oxigênio é por difusão;
- na fermentação submersa, o uso de água é ilimitado, o fornecimento de oxigênio é por aeração, o volume da mistura de fermentação é maior, a energia física alta e o investimento elevado.

Para Rodrigues e Santana (2001), a principal diferença entre as fermentações semi-sólida e cultura submersa está no conteúdo de água do reator / meio de cultura. Enquanto na cultura em estado sólido, o conteúdo de água do meio varia entre 40% e 80%, na cultura submersa típica, o conteúdo de água é superior a 95%.

A escolha do processo fermentativo semi-sólido deve se basear nas considerações sobre as vantagens e desvantagens do método quando comparadas com a cultura submersa. Os maiores problemas da fermentação semi-sólida consistem no monitoramento e controle de pH, temperatura, conteúdo de água, agitação e homogeneização durante todo o processo de fermentação. Para eliminar estes problemas de monitoramento e controle do processo, foi proposto o crescimento microbiano em câmara fluidizada, onde o substrato é insuflado com ar esterilizado (RODRIGUES e SANTANA, 2001).

Não existem vantagens e desvantagens concretas de um método em relação a outro, pois cada microrganismo pode melhor se adequar a um ou outro processo fermentativo, bem como, obter produtos diferentes. Seguem abaixo características da FSS quando comparada à fermentação submersa (Santos, 2007):

- Menores riscos de contaminação, devido a baixa umidade do meio;
- Simplicidade no preparo do meio de fermentação, pois necessita-se normalmente apenas do ingrediente principal e de água para umedecer;
- Possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de custo reduzido como matéria-prima, especialmente em países como o Brasil;

- Menor necessidade de espaço;
- O crescimento celular ocorre em condições mais próximas dos *habitats* naturais;
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo;
- Maiores rendimentos e concentração mais alta do produto desejado.
- Baixo consumo de água.

Uma das diferenças conhecida entre a FSS e FS é esporulação de fungo. Na FSS é muito mais fácil a obtenção de esporos de fungo. A cultura de superfície sólida é o habitat natural dos fungos, o que torna mais fácil de conservar e controlar o ciclo morfológico deles por FSS, do que por FS. Uma das aplicações práticas deste fato é o uso de FSS como um procedimento apropriado de produzir esporos para vários tipos de aplicações industriais (SANTOS, 2007).

2.4 Enriquecimento protéico

A falta de alimento em determinadas populações, principalmente a carência protéica, desperta grande interesse de estudo buscando fontes não usuais de proteínas. Entre estes, destacam-se os que se referem ao desenvolvimento de microrganismos como fontes potenciais de proteína (FALANGHE, 1975).

O termo proteína microbiana, também conhecida como proteína unicelular, refere-se a células secas, não viáveis de microorganismos, tais como leveduras, bactérias, bolores e algas desenvolvidas em diferentes fontes de carbono. Durante a década de 60, a idéia de que a proteína microbiana poderia ser útil para países em desenvolvimento em futura escassez de alimentos, impulsionou o interesse de pesquisa em institutos, universidades e indústrias (MENEZES, 2001).

O rápido crescimento, com elevada eficiência de conversão em proteína do microrganismo, que pode ser geneticamente modificado, é uma das vantagens do emprego da proteína microbiana (MENEZES, 2001).

Os resíduos que contêm quantidades adequadas de carboidratos têm sido, com freqüência, utilizados para a produção de proteína microbiana. Os

resíduos sólidos como palha de de trigo e arroz, forragem, sabugo de milho, bagaço de cana-de açúcar e frutos tropicais são utilizados por fermentação em substratos sólidos (MENEZES, 2001). Atualmente, no Brasil, muitos resíduos da agroindústria estão sendo utilizados para enriquecimento protéico: casca de abacaxi (OLIVEIRA *et al.*, 2005); casca de maracujá (OLIVEIRA *et al.*, 2006), raquetes de palma forrageira (AMORIM *et al.*, 2005); bagaço do pedúnculo do caju (CAMPOS *et al.*, 2005); dentre outros.

No estudo de OLIVEIRA *et al.* (2005), o objetivo era favorecer o enriquecimento protéico em resíduo agroindustrial da casca de abacaxi. Segundo os autores, a utilização deste resíduo, em que cerca de 85% são desperdiçados e somente 15% são aproveitados para sucos e ração animal, é uma alternativa. Após passar pelo processo de industrialização em que a polpa é aproveitada, este resíduo passará a ser utilizado na ração animal como suplemento protéico. O importante é que seu teor de umidade na forma in natura é de 81% e, por isso, a água existente no resíduo é suficiente para se fazer o enriquecimento protéico no processo fermentativo.

Outra pesquisa, envolvendo alguns autores do estudo citado acima, foi realizada em 2006 com casca de maracujá, objetivando estudar as isotermas de dessorção da casca de maracujá nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C, testando três modelos matemáticos para definir qual deles melhor se ajusta os dados experimentais (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Sendo o Brasil o principal produtor mundial de maracujá (*Passiflora edulis Sims*), com produção de aproximadamente 172,3 mil toneladas ano⁻¹. Desse total, 90% da casca de maracujá é desperdiçada, sendo o restante aproveitado para diversos fins como, por exemplo, na preparação de ração animal e na fabricação de doce (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Um aproveitamento racional e eficiente desse resíduo como substrato para a produção de proteínas microbianas poderá dar resultados satisfatórios na produção de rações, contribuindo também para minimizar os problemas de perdas na industrialização das frutas tropicais (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) desenvolve pesquisas sobre o aproveitamento da Palma

Forageira para fins de alimentação humana e animal, utilizando as raquetes da palma forrageira para enriquecimento protéico e a polpa da fruta para a produção de vinho, vinagre e aguardente. Foi realizado um estudo sobre o enriquecimento protéico da mistura do bagaço do fruto com a raquete da cactácea para a utilização na alimentação animal, com o intuito de aproveitar o rejeito dessa produção (bagaço da fruta) e valorizar a cactácea como um todo (AMORIM *et al.*, 2005).

Rodrigues e Santana (2001) realizaram um estudo também com objetivo de produzir proteínas extracelulares totais a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, porém com a utilização de uma câmara fluidizada com alta vazão de ar, para eliminar problemas de monitoramento e controle do processo em substrato semi-sólido na presença e ausência de cloreto de sódio. Nesta pesquisa, verificou-se que o uso de reatores fluidizados para a produção de biomassa parece ser um avanço sobre as técnicas de fermentações em estado sólido convencionais, em função de suas inúmeras vantagens, especialmente sua alta produtividade na ausência de cloreto de sódio.

As vantagens da produção de proteínas microbianas a partir dos resíduos agroindustriais são de interesse, com base nas seguintes considerações: o tempo de geração dos microrganismos é bastante curto, o que propicia um aumento rápido de massa celular; o conteúdo de proteína dos microrganismos é geralmente mais elevado que a maioria dos vegetais; sua produção independente é mais acessível; exigem pequena disponibilidade de água e espaço e a diversificação de substratos utilizáveis, principalmente os resíduos agroindustriais, contribuindo para minimizar os problemas de perda na industrialização das frutas tropicais (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Duru e Uma (2003) utilizaram *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn para realizar fermentação em estado sólido para produção de proteínas. Foram utilizadas também fontes de nitrogênio como: NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl e uréia. A adição de fontes exógenas de nitrogênio aumentou consideravelmente a quantidade de biomassa e proteína, comprovando mais uma vez a necessidade do acréscimo de fonte exógena de nitrogênio.

Em estudo realizado com enriquecimento protéico de farelo de arroz com o fungo *A. oryzae*, as condições ótimas para o processo de enriquecimento demonstrou: 60% de umidade; temperatura 28°C; pH 6,0; concentração do inóculo 10^9 esporos/g de substrato e granulometria, de 0,3 mm. Entre as várias fonte de nitrogênio testadas, sulfato de amônio (0,6% p / p) apresentou máximo enriquecimento protéico (24,30%) (RUDRAVARAM *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos citados na literatura sobre enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju, utilizou para a fermentação semi-sólida a levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae*.

O trabalho desenvolvido por Coelho *et al.* (2001) teve por objetivo o estudo do processo de enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju com a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para a produção de uma ração animal alternativa, rica em proteínas, observando-se a cinética do processo, avaliando a concentração inicial de leveduras, temperatura de cultivo e tempo de armazenamento do produto final sobre o teor protéico. Nesse estudo houve um aumento protéico máximo alcançado de 3,0 vezes correspondendo a um teor de 20,3% de proteína bruta na matéria seca.

O referente trabalho de Campos *et al.* (2005), teve como conclusão: que o ganho protéico do bagaço do pedúnculo de caju fermentado foi de 3 vezes quando comparado ao bagaço de caju logo após a adição da levedura, onde esse ganho foi alcançado após 28 horas de cultivo, utilizando-se 12% de concentração de levedura e temperatura de 33 °C; o tempo ótimo de cultivo necessário para conversão protéica dos carboidratos do bagaço do pedúnculo de caju foi de 28 horas; não houve diminuição do teor protéico do produto final de cultivo durante o intervalo de um ano.

Outro estudo realizado por Campos, Dantas e Silva (2003), visando os mesmos objetivos citados, conclui que a fermentação semi-sólida do bagaço de pedúnculo de caju com inoculação de 16% de levedura, apresentou melhor desempenho e o maior ganho protéico da massa de bagaço foi de 2,5 vezes.

Holanda, Oliveira e Ferreira (1997), também realizaram um trabalho que teve como objetivos avaliar a proporção de inóculo de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e o tempo de fermentação necessários para elevar o teor protéico na pasta de pedúnculos de caju, a um nível equiparável ao da torta de algodão.

O estudo concluiu que a proporção de 10,0% de inóculo de levedura na parte da massa de pedúnculos de caju proporciona um teor protéico acima de 20% no material fermentado e o tempo de fermentação necessário para conversão protéica dos carboidratos do pedúnculo de caju é inferior a 24 horas (HOLANDA, OLIVEIRA e FERREIRA, 1997).

A fermentação semi-sólida com a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizando o bagaço do fruto da palma demonstrou que o microrganismo cresceu e aumentou em 1,46 vezes o teor de proteína do bagaço se comparado com o bagaço *in natura* (AMORIM *et al.*, 2005).

Outro trabalho realizado teve como objetivo estudar o enriquecimento protéico da cactácea mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P.DC) utilizando também a levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* por fermentação semi-sólida (ARAÚJO *et al.*, 2003).

Em relação aos resultados deste estudo, os teores de proteína bruta obtidos nas condições em que foram conduzidos os experimentos, pode-se concluir que o processo de enriquecimento protéico do mandacaru sem espinhos (ausência ou presença de pré-secagem), influenciou os elevados valores do teor protéico de 7,24% na forma "in natura" para valores correspondentes a valores entre 37,8% e 24,78%. Valores compatíveis e superiores aos encontrados nos concentrados protéicos convencionais (ARAÚJO *et al.*, 2003).

Um estudo de enriquecimento protéico utilizando bagaço de maçã através de fermentação em estado sólido, utilizando o fungo filamentosso *Gongronella butleri*, verificando a influência da adição de fontes de nitrogênio (nitrato de sódio e uréia), umidade inicial e granulometria sobre a produção de proteína solúvel, obteve um enriquecimento protéico de 2,5 vezes sobre o teor protéico inicial do resíduo. Foram

produzidos 19,24% de proteína solúvel, nas melhores condições de cultivo: uréia a 5% (p/p como fonte de nitrogênio), umidade inicial de 70% e a granulometria na faixa de 0,85 a 1,70mm (VENDRUSCOLO *et al.*, 2007).

Outro estudo visando a valorização biotecnológica do bagaço de maçã através da Fermentação no estado sólido (FES), verificou a melhor condição para o crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus*, promovendo um aumento do teor protéico do bagaço de maçã (ALBUQUERQUE, *et al.*, 2003).

Nesse trabalho avaliou-se a influência de fontes de nitrogênio (uréia e sulfato de amônio) e de soluções tampão (fosfato e ácido cítrico), assim como de suas concentrações, sobre a produção de biomassa. Ao final do experimento, o bagaço fermentado foi submetido a análises de proteína solúvel, nitrogênio total e açúcares redutores residuais. O enriquecimento protéico mais significativo foi obtido com o uso do tampão fosfato (0,30 M), suplementado com uréia a 5%, que proporcionaram um aumento de mais de 5 vezes no teor de proteína do bagaço, que inicialmente apresentava uma concentração de 5,93 % de proteína solúvel e, após o tratamento, chegou a 30,75 % (ALBUQUERQUE *et al.*, 2003).

De Gregorio *et al.* (2002), utilizaram polpa de limão, resíduo da indústria de suco, para o crescimento de *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* e conseqüente obtenção de SCP (single cell protein). Após 14 dias de cultivo sólido, *A. niger* produziu 25,6 % de proteína bruta e o fungo *T.viride*, após 25 dias, produziu 31,9 %.

2.5 Fungos do gênero *Aspergillus*

A seleção adequada do microrganismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de um processo fermentativo (PANDEY, 1992). Eles devem apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto e permitir sua rápida liberação para o meio. Não devem produzir substâncias incompatíveis com o produto; não apresentarem inconstância quanto ao comportamento fisiológico, não serem patogênicos; tampouco exigirem condições de processo muito complexas ou meios de cultura dispendiosos (SCHMIDELL, 2001).

Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos (AIDOO, HENRY e WOOD, 1982). Contudo, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (DURAND, 2003).

Ashokkumar, Kayalvizhi e Gunasekaran (2001) citam que muitos microrganismos apresentam capacidade de crescimento em substratos sólidos, sendo os fungos filamentosos os mais utilizados, devendo-se esta aplicação pela capacidade de crescimento na quase ausência de água livre, versatilidade de aplicação e manipulação. O uso destes microrganismos como suplemento ou substituto alimentar mostra-se vantajoso, já que se multiplicam rapidamente e possuem alta concentração de aminoácidos essenciais, além de enriquecerem o substrato onde são cultivados com enzimas e vitaminas (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

Segundo Pinto (2003), os fungos são capazes de crescer em baixos valores de atividade água e altas pressões osmóticas. A combinação de prolongamento da região apical e a geração de novas hifas permitem aos fungos uma rápida colonização dos substratos sólidos, além de uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis. Como exemplos, podem ser citados o uso de culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* ou *Aspergillus* para obtenção de enriquecimento protéico e produção de enzimas (DEL BIANCHI, MORAES e CABALDO, 2001).

Normalmente, nos cultivos e fermentação em estado sólido a temperatura para o crescimento dos fungos fica entre 0°C e 35°C , mas o ótimo para a maioria fica entre 20°C e 30°C. O pH em torno de 6,0 é considera do ótimo para a maioria das espécies e a *atividade água* ideal é próxima a 1,0 podendo chegar até 0,7 (PUTZKE e PUTZKE, 2004; LONSANE *et al.*, 1985).

Aspergillus é o gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem estudados. As espécies que compõem este gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em

organismos vegetais bem como em animais, além de estarem associados com a deterioração de materiais vegetais e alimentos. Muitas espécies de *Aspergillus* são utilizadas para obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem, para os animais e alguns podem produzir metabólitos tóxicos durante seu metabolismo (ROSA, CAMPOS e BARONI, 2002). Existem cerca de 200 espécies de fungo *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas em biotecnologia (WAINWRIGHT, 1995).

Aspergillus niger, como sugere seu nome, é um fungo filamentosamente comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). Suas colônias apresentam-se nas cores brancas e amarelo pálido, mas rapidamente formam milhares de esporos (PRADO, 2002).

O uso de *Aspergillus niger* em processos fermentativos apresenta algumas vantagens em relação a outros fungos, como facilidade de manipulação, habilidade em fermentar uma grande variedade de matérias primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (SPIER, 2005). *Aspergillus niger* é muito importante economicamente, podendo ser utilizado em fermentações industriais para produção de várias substâncias: ácidos cítricos, glucônico e gálico, beta-galactosidase, lipases, pectinases, endoglucanase, invertase, protease e enzimas amilolíticas (amilase e glucoamilase).

A variedade de fungo *Aspergillus* empregado neste estudo é *Aspergillus niger*, linhagens 2210 e 331, e apresenta como característica relevante o fato de ser de “grau alimentar”, ou seja, seguro do ponto de vista alimentar.

2.6 Ensilagem

Em algumas regiões, como no Nordeste brasileiro, a pecuária sofre grandes conseqüências dos prolongados períodos de estiagem e irregular distribuição de chuvas, e conseqüentemente, a produtividade das forragens diminui em quantidade e qualidade, interferindo diretamente na produção animal. Dessa

forma, torna-se necessária a suplementação alimentar nos períodos de seca. O emprego de forragens conservadas tem sido amplamente recomendado como forma de suprir deficiências nutricionais no período de escassez de alimento. A conservação de forragem na forma de silagem pode ser uma alternativa para se elevar a oferta de alimento, reduzindo os efeitos da estagnação da produção vegetal na produção animal (TELES, 2006).

Silagem é o termo utilizado para o produto formado de forragens verdes, que ficam em silos hermeticamente fechados, em nível ótimo de umidade, ocorrendo a fermentação anaeróbica (CARIOCA e ARORA, 2000). Ensilagem é uma técnica utilizada há vários séculos para produção de silagem, onde as principais reações ocorridas é a fermentação de açúcar simples para formar ácido e a quebra de algumas proteínas, incluindo a amônia (CARIOCA e ARORA, 2000).

Segundo Silva (2001) a técnica que consiste em preservar forragens por meio de fermentação anaeróbica, após o seu corte, picagem, compactação e vedação em silos. O produto final dessa fermentação, denominado silagem, é obtido pela ação de microrganismos sobre os açúcares presentes nas plantas com a produção de ácidos, resultando em queda do pH até valores próximos de 4.

São vantagens de utilização da ensilagem: produção de 30% a 50% mais de nutrientes em comparação à produção de grãos; manutenção do valor nutritivo, quando ensilado adequadamente; requer menos espaço de armazenagem, por unidade de matéria seca; alta aceitabilidade; processo totalmente mecanizado; tecnologia simples e de baixo custo; menor dependência das condições climáticas (SILVA, 2001; CARIOCA e ARORA, 2000).

Teles (2006) destaca também dentre as vantagens de utilização da silagem como alimento para ruminantes: a importância de fornecer alimento de boa qualidade durante todo ano, em geral, com menores custos. A ensilagem é uma técnica simples e acessível a pequenos produtores; e o excesso de forragens disponíveis no período das chuvas pode ser armazenada com o mínimo de perdas de seu valor nutricional.

No processo de ensilagem o princípio de conservação da forragem é a redução do pH (aumento da acidez) pela fermentação dos açúcares solúveis da

planta. Assim sendo, as melhores forrageiras para ensilagem são aquelas com elevado teor de açúcares solúveis (CARDOSO e SILVA, 1995).

Quanto ao valor nutritivo das silagens, alguns estudos relatam que plantas de milho e de sorgo, quando adequadamente ensiladas, são boas fontes de energia (60% a 70%); contudo, são deficientes em proteína (7% a 9% de Proteína bruta) (SILVA, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudos Preliminares

Foram realizados experimentos preliminares, a fim de definir quais as taxas que iriam ser testadas no planejamento experimental.

O volume de água e a solução salina foram avaliados numa faixa de 0 a 6 mL. Quanto ao tempo de fermentação, foi testado um intervalo de tempo de 24 a 72 horas. O pH foi trabalhado numa faixa de 4 a 7.

Foi utilizado para a fermentação tanto o bagaço de caju seco, quanto o úmido.

3.2 Obtenção dos Resíduos

O bagaço de caju foi obtido diretamente da primeira prensagem do caju, em um aparelho denominado “expeller”, de uma empresa processadora de suco de caju (Sucos Jandaia LTDA, Pacajus-CE), bem como, junto a Embrapa Agroindústria Tropical, sede em Fortaleza CE. Depois de coletado na própria empresa, o bagaço foi armazenado em sacos, e conservado sob congelamento.

3.3 Caracterização dos resíduos

Os resíduos foram caracterizados segundo seu teor de umidade, através da determinação de massa seca, e teor inicial de proteínas através do método de Micro-Kjeldahl, ambos segundo a metodologia descrita pela A.O.A.C. (1997).

3.4 Obtenção e manutenção dos microrganismos

Os microrganismos utilizados foram linhagens de *Aspergillus niger*, 2270 e 332, pertencentes à coleção da “ARS Culture Collection”, (Peoria, Il, USA). O microrganismo foi mantido na forma esporulada em solo estéril a -18 °C na Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA/CNPAT). Esta técnica de estocagem é

considerada adequada para fungos filamentosos e permite a utilização da mesma linhagem sem que haja alterações decorrentes de mutações e reprodução sexuada, que pode facilmente ocorrer com fungos. A técnica mantém a viabilidade do fungo por 10 anos.

3.5 Ativação da linhagem

A partir da cultura estoque em solo estéril foi realizado um primeiro repique em meio sintético Agar Sabouraud. Os tubos de cultura foram incubados por 5 a 6 dias em estufa BOD a 30 °C. Decorridos este tempo, um segundo repique foi realizado de forma idêntica ao primeiro repique. A composição do meio sintético e as condições de incubação do segundo repique foram idênticas às do primeiro repique (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

3.6 Propagação dos esporos em sabugo de milho

A partir do segundo repique em Agar Sabouraud foi realizado um crescimento em meio sabugo de milho para propagação dos esporos. O meio sabugo de milho é composto de 4,6 g sabugo de milho triturado, adicionados de 6 mL de solução peptonada (CAVALCANTE *et al.* 2008). A composição da água peptonada é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição da solução peptonada para meio sabugo de milho.

Componente	Concentração (g/L)
Peptona	56
KH ₂ PO ₄	7,6 x 10⁻⁴
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10⁻⁵
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,5 x 10⁻⁵

O meio sabugo de milho foi acondicionado em Erlenmeyers de 125 mL e esterilizado em autoclave a 121 °C por 1 hora. A inoculação foi feita transferindo-se os esporos estocados a partir do segundo repique em meio sintético com 1mL de solução de Tween 80 a 0,2 % (v/v). Os esporos foram então incubados por 5 dias

em BOD a 30 °C. O meio fermentado contendo os esporos pode ser estocado em geladeira por até 3 meses (CAVALCANTE *et al.* 2008).

3.7 Fermentação semi-sólida

Para inoculação do microrganismo foi realizada extração do meio sabugo de milho contendo esporos, sendo acrescentado um volume de aproximadamente 20 a 30 mL de solução Tween 80 a 0,2 % (v/v). Depois da agitação, foram preparadas sucessivas diluições e feita a contagem de esporos em câmara de Neubauer. Foi inoculada ao meio com bagaço de caju úmido 1 mL de inóculo com esporos de *Aspergillus niger*, contendo 10^6 UFC.mL⁻¹ (GUILHERME, PINTO e RODRIGUES, 2001).

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 6 g do meio de cultura. Para garantir a uniformidade das amostragens o meio foi misturado com bastão de vidro após adição da solução salina. Após a inoculação, os Erlenmeyer foram tampados com tampão de algodão envolvido com gases. A fermentação foi conduzida por 30 horas em estufa tipo BOD a 30°C. (Anexos A e B)

3.8 Otimização do meio de cultura para o enriquecimento protéico

Para o estudo da produção de proteínas a partir de *Aspergillus niger* utilizando como substrato bagaço de caju úmido, inicialmente foi realizado um planejamento experimental para verificar o melhor crescimento microbiano quanto ao pH e ao volume de solução salina, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Planejamento experimental para otimização do meio de cultura

Amostra	pH	Volume de Solução Salina	Volume de H ₂ O
1	4	0 mL	6 mL
2	4	6 mL	0 mL
3	7	0 mL	6 mL
4	7	6 mL	0 mL
5	4	3 mL	3 mL
6	7	3 mL	3 mL
7	5,5	0 mL	6 mL
8	5,5	6 mL	0 mL
9 (c)	5,5	3 mL	3 mL
10 (c)	5,5	3 mL	3 mL
11 (c)	5,5	3 mL	3 mL

A partir dos resultados obtidos no planejamento, o pH da solução salina foi ajustado para 4 e o volume de solução salina acrescentado aos meios foi de 3 mL. Estes valores foram utilizados nos próximos experimentos, devido ao seu melhor resultado.

A otimização do meio de cultura também foi verificado através de um estudo em duplicata do processo de enriquecimento protéico com o bagaço de caju úmido, acrescentando-se solução salina padrão (Tabela 3), com pH 4, variando a quantidade de sulfato de amônia adicionado (5, 10, 30, 40 e 50g/L), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 3 - Composição da solução salina padrão.

Componente	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	2
NaCl	1
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1

Tabela 4 – Variação da quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na solução salina

Amostra	Quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)
1	5
2	10
3	20
4	30
5	40
6	50

A otimização do meio de cultura para o enriquecimento protéico também foi verificada com a adição “direta” de quantidades variadas de sulfato de amônio ao meio (1, 2, 3, 4 e 5g).

3.9 Planejamento experimental

Foram realizados planejamentos experimentais fatorial com composto central com três replicatas no ponto central, com *A. niger* 2270 e 332, visando o enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido, variando os valores de pH da solução salina e as quantidades de sulfato de amônia acrescentadas ao meio (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 – Planejamento experimental para o enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido variando o pH e a quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Linhagem 2270).

Amostra	pH	Quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adicionado ao meio (g)
A	4	1
B	4	3
C	7	1
D	7	3
E	4	2
F	7	2
G	5,5	1
H	5,5	3
I (c)	5,5	2
J (c)	5,5	2
L(c)	5,5	2

Tabela 6 – Planejamento experimental para o enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido variando o pH e a quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Linhagem 332).

Amostra	pH	Quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adicionado ao meio (g)
A	4	1
B	4	5
C	7	1
D	7	5
E	4	3
F	7	3
G	5,5	1
H	5,5	5
I (c)	5,5	3
J (c)	5,5	3
L(c)	5,5	3

3.10 Contagem de esporos

Foi realizada contagem de esporos no meio após fermentação de 30 horas a 30°C. Acrescentou-se ao meio enriquecido com *A. niger* solução de Tween 0,2%, o meio foi agitado com “mix”, depois realizada a contagem de esporos em câmara de Neubauer.

3.11 Métodos Analíticos

3.11.1 pH

O pH da solução salina foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro de marca Marconi, modelo PA200, calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0. Este aparelho tem uma graduação de 0,1 unidade de pH.

3.11.2 Atividade água

A atividade água foi determinada através de leitura direta, em aparelho AQUA Lab.

3.11.3 Determinação de proteínas

3.11.3.1 Nitrogênio total

Para determinação da massa protéica total foi utilizado o método de Micro-Kjeldahl (A.O.A.C., 1997), que consiste na oxidação completa da amostra em ácido forte (ácido sulfúrico) até que o nitrogênio das proteínas seja reduzido para sulfato de amônio. A amônia é então liberada do sulfato mediante a adição de hidróxido de sódio, sendo destilada e recebida numa solução de ácido bórico. A quantidade de base é titulada com uma solução de ácido clorídrico padronizada.

A determinação de proteína pelo método de Micro-Kjeldahl (A.O.A.C. 1997), passou por três etapas: digestão, destilação e titulação.

Para a etapa de digestão foi adicionado num balão de micro Kjeldahl de 100 mL:

- 2,3 g da mistura catalisadora (Sulfato de Potássio e Sulfato de Cobre -10:1);
- 0,2 g de amostra envolvida em papel vegetal;
- 2,3 mL de H₂SO₄ concentrado.

No processo de pesagem das amostras utilizou-se uma balança analítica da marca Bel de precisão de 0,01.

Os frascos de 100 mL foram colocados na unidade de digestão, até a completa clarificação da amostra (verde claro).

Depois da digestão, a amostra foi destilada com uma solução receptora com 5mL de ácido bórico saturado e 5 gotas do indicador vermelho de metila/verde de bromocresol. Na amostra foram adicionados 10 mL de NaOH (50%).

Depois de coletado 15 a 20 mL do destilado, a solução foi titulada com HCl (0,02N).

Em todos os experimentos realizados utilizou-se uma bureta de 20 mL, com graduação de 0,1 mL.

Cálculos:

$$\% P = [(V_2 - V_1) \times N_{\text{HCl}}] \times 14,007 \times 100 \times 6,25 / A \times 1000$$

- %P = Percentual de proteína na amostra
- V₂ = Volume de HCl (mL) para titular a amostra
- V₁ = Volume de HCl (mL) para titular o branco
- N_{HCl} = normalidade do HCl
- A = peso (g) da amostra

3.11.3.2 Nitrogênio não protéico (NNP)

Amônio, nitrito e nitrato constituem a maior parte de nitrogênio mineral encontrado nas plantas. Como no meio com bagaço de caju é acrescentado sulfato de amônio, utilizou-se o método proposto por Tedesco (TEDESCO *et al.*, 1995).

Como procedimento, foi pesado 1 g de bagaço de caju depois de fermentado e foi colocado num frasco de destilação de 100 mL e adicionado 15 mL de KCl 1M. O frasco com a amostra foi agitado intermitentemente por 1 minuto. Após adição de 0,2 g de óxido de magnésio (MgO) a solução foi agitada novamente, passada pela peneira para separar os resíduos de bagaço, e destilado em solução receptora do indicador ácido-bórico. Depois de coletado 35-40 mL do destilado, o mesmo foi titulado com uma solução 0,05 M de H₂SO₄.

Cálculos:

- Cada mL de solução de H₂SO₄ com uma molaridade 0,0025, utilizado na titulação da amostra (descontado o valor da prova em branco), representa uma quantidade de 70µg de N.
- $\text{mg Kg}^{-1} \text{ de N} - (\text{NH}_4^+) = \frac{(\text{mL H}^+ \text{ am} - \text{mL H}^+ \text{ br}) \times 70}{\text{g tecido}}$

O método foi adaptado, pois ao invés da utilização do H₂SO₄ 0,0025M, foi utilizado H₂SO₄ 0,05M, pois a amostra continha uma quantidade expressiva de amônia, devido ao acréscimo do sulfato de amônia, e utilizaria para a titulação volumes muito grande do ácido.

Para os cálculos foi feita a seguinte adaptação:

- H₂SO₄ → 1N = 2M
 - M = 0,0025 – N = 0,005
- 1 mL H₂SO₄ (0,005N) ---- 70µg de NH₄⁺
- Volume Equivalente ao que seria utilizado para o ácido H₂SO₄ 0,005N:
 - $V_{\text{Tit}} \times V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ utilizado}} = V_{\text{eq}} \times V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 0,005N}}$
- $m \text{ 1 } (\mu\text{g}) = \frac{V_{\text{eq}} \times 70}{\text{Massa da Amostra}}$
- $m \text{ 2 } (\text{g}) = m \text{ 1 } \times 10^{-6}$
- $\% \text{ NH}_4^+ = \frac{m \text{ 2 } (\text{g})}{m \text{ Amostra } (\text{g})} \times 100$

3.12 Análise dos dados

Os ensaios fermentativos foram realizados em duplicata e as determinações analíticas em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 95% de confiança, utilizando o programa estatístico Statistical (Statsoft) versão 7.0. Os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos preliminares

De acordo com os resultados preliminares, foi verificado que o tempo de fermentação sem que houvesse esporulação ficou em torno de 30 horas. Como houve crescimento nos dois tipos de bagaço de caju, úmido e seco, trabalhou-se com o caju úmido tendo em vista uma etapa menos dispendiosa do processo, que é a desidratação do bagaço.

Em relação às quantidades adicionadas de sulfato de amônio na solução salina, foi determinada a composição da solução salina padrão para o meio com bagaço de caju, pois esta concentração apresentou melhor rendimento em relação às demais:

- 2g/L de KH_2PO_4
- 1g/L de NaCl ,
- 1g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 50g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

4.2 Caracterização do lote do bagaço de caju

Todos os ensaios realizados neste trabalho utilizaram amostras de um lote recebido da empresa Jandaia. A caracterização deste lote foi feita através dos testes de umidade e de proteínas indicados nas tabelas. As informações concedidas pela empresa indicam que este lote foi produzido num “expeller” industrial típico, com uma passagem do referido lote. Vale salientar que a reutilização do bagaço em outras passagens pelo “expeller” varia o teor de umidade.

A umidade do bagaço de caju úmido fornecido pela empresa Jandaia e medida neste trabalho esta representada na Tabela 7, o que apresentou umidade média de 77,5% ($\pm 0,59$). O bagaço ainda apresentou elevado teor de umidade,

provavelmente por ter sido adquirido após a primeira prensagem do pedúnculo de caju na empresa processadora.

Tabela 7 – Ensaio de umidades do lote de bagaço de caju úmido

Ensaio	Umidade (%)
1	78,2
2	77,4
3	77,0

Na Tabela 8 estão expostos os resultados da análise total de proteína do bagaço de caju úmido, realizados neste trabalho, o que resulta um valor médio de $3,7\% \pm 0,38$.

Tabela 8 - Percentual de proteína do bagaço de caju úmido

Ensaio	Proteína total (%)
1	3,2
2	3,8
3	3,9
4	4,0

Com base nesses resultados foi considerado para a umidade o valor médio de 77,5% e para a proteína o valor médio de 3,7%, como valores representativos deste lote. Estes valores serão utilizados no curso deste trabalho.

4.3 Resultados do percentual de proteína

Uma avaliação preliminar do enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido, através do processo de fermentação semi-sólida com as duas linhagens de *A. niger* (2270 e 332), e utilizando somente a solução salina referenciada nos estudos preliminares, demonstrou que após 30 horas, o aumento da concentração de proteína foi de aproximadamente 1%, conforme indica os resultados da Tabela 9.

Tabela 9 – Quantidades de proteína produzida na fermentação do bagaço de caju com umidade média de 77,5% utilizando *A. niger* 2270 e 332 em 30 horas.

Amostra	Linhagem de <i>Aspergillus niger</i>	% Proteína Total produzida na fermentação (30h)
A	2270	4,7 ± 0,82
B	332	4,6 ± 0,57

Tendo em conta o enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido através de linhagem *A. niger* 2270, foi avaliada a influência da utilização de fontes de nitrogênio (sulfato de amônio) diretamente no início da fermentação. Foi verificado um aumento significativo do teor de proteínas quando a adição deste insumo variou na faixa de 1 a 3g de sulfato de amônio por 6g de bagaço conforme indicado na Tabela 10. O valor do pH foi mantido em 4.

Tabela 10 – Quantidades de proteína produzida na fermentação do bagaço de caju com umidade média de 77,5% utilizando a *A. niger* 2270 em 30 horas, e amônia de acordo com a variação de sulfato de amônia.

Amostra	pH	Quantidade de (NH ₄) ₂ SO ₄ adicionado ao meio (g)	% Proteína Total produzida na fermentação (30h)	% NH ₄ ⁺	% Nitrogênio Orgânico (Fermentação)
A	4	1	22,2 ± 1,14	1,8 ± 0,05	21,3 ± 0,68
B	4	2	34,9 ± 0,58	2,8 ± 0,16	32,1 ± 0,46
C	4	3	46,5 ± 2,12	3,9 ± 0,79	42,6 ± 2,02

Observou-se que o maior percentual de nitrogênio orgânico ocorreu no meio contendo 3 gramas de sulfato de amônio utilizado no metabolismo do *Aspergillus niger*. O enriquecimento protéico do bagaço com acréscimo direto de sulfato de amônia foi bastante significativo em relação ao outro experimento, que foi adicionado somente solução salina, confirmando assim a necessidade de suplementação de nitrogênio para um maior metabolismo microbiano.

Visando conhecer as melhores condições de enriquecimento protéico do bagaço de caju com *A. niger* 2270 foi realizado um planejamento experimental

variando as quantidades de sulfato de amônio citadas acima e o pH, de acordo com o que esta descrito na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados experimentais do enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido variando o pH e a quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (*A. niger* 2270).

Amostra	pH	Quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adicionado ao meio (g)	% Proteína produzida na fermentação (30h)	% NH_4^+	% Nitrogênio Orgânico (Fermentação)
A	4	1	21,3 ± 0,74	1,8 ± 0,30	19,5 ± 1,01
B	4	3	42,4 ± 1,07	3,5 ± 1,67	38,4 ± 2,46
C	7	1	28,3 ± 1,13	1,6 ± 0,55	26,7 ± 1,22
D	7	3	52,7 ± 2,51	3,4 ± 0,71	49,4 ± 3,21
E	4	2	46,3 ± 1,81	2,6 ± 0,16	43,7 ± 1,93
F	7	2	42,9 ± 0,47	2,5 ± 0,60	40,4 ± 0,88
G	5,5	1	27,4 ± 0,19	1,0 ± 0,74	25,9 ± 0,93
H	5,5	3	54,3 ± 2,25	3,1 ± 0,34	51,2 ± 2,55
I (c)	5,5	2	42,6 ± 0,29	2,9 ± 0,48	39,7 ± 0,75
J (c)	5,5	2	42,3 ± 2,02	2,2 ± 0,29	40,1 ± 1,74
L(c)	5,5	2	39,7 ± 0,62	2,1 ± 0,42	37,6 ± 0,22

Tabela 12 - Efeitos estimados para o percentual de nitrogênio orgânico.

% de Nitrogênio Orgânico		
Fator	Efeito	S.E. ¹
Média	40,81*	2,31*
pH (L)	4,96	3,68
pH (Q)	-2,53	5,66
Sulfato de Amônio (L)	22,30*	3,68*
Sulfato de Amônio (Q)	-9,57	5,66
pH x Sulfato	1,87	4,50

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

¹ Erro padrão

Para a avaliação estatística dos resultados apresentados na tabela 11, foram escolhidos às médias quadráticas e a quantidade de sulfato de amônio, como variáveis de estudo pela sua significância.

Para a análise da variância (ANOVA) da concentração total de nitrogênio orgânico na fermentação com *A. niger* 2270 com base nos dados da tabela 12, foi utilizado o método da regressão linear o qual gerou a equação que se segue.

$$\% \text{ de PTN orgânica: } 4,08 \times 10 + 4,96a - 2,5 a^2 + 2,2 \times 10 b - 9,6 b^2 + 1,86 ab$$

Onde:

a = pH

b = Quantidade de sulfato de amônio (g)

PTN = Proteína total

Tabela 13 - Análise de variância para o percentual de nitrogênio orgânico.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	862,168	5	172,434	8,51
Residual	101,365	5	20,273	
Total	963,533	10		
Coeficiente de determinação	0,8948			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

De acordo com a tabela 13, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo (ANOVA), tendo em vista o valor de F (significância) calculado para o modelo foi 8,51, com 95% de confiança, foi ligeiramente maior que o valor de $F_{5,5}$ Tabelado (5,05).

A Tabela 14 apresenta as condições experimentais e os resultados onde foram avaliados o pH e a quantidade de sulfato de amônio para a fermentação semi-sólida do bagaço de caju com *Aspergillus niger* (Linhagem 332). Foi realizado o mesmo planejamento acima, porém modificando as quantidades de sulfato de amônia e a Linhagem de *Aspergillus niger*, que ao invés da linhagem 2270, foi realizado com *A. niger* 332.

Tabela 14 – Resultados experimentais do enriquecimento protéico do bagaço de caju úmido variando o pH e a quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (*A. niger* 332).

Amostra	pH	Quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adicionado ao meio (g)	% Proteína produzida na fermentação (30h)	% NH_4^+ (Fermentação)	% Nitrogênio Orgânico
A	4	1	17,6 ± 0,19	2,1 ± 0,12	15,6 ± 0,19
B	4	5	39,5 ± 0,69	5,4 ± 0,68	34,7 ± 0,29
C	7	1	16,2 ± 0,76	1,6 ± 0,10	15,1 ± 0,85
D	7	5	42,1 ± 1,58	4,9 ± 0,13	37,4 ± 1,52
E	4	3	32,5 ± 2,83	3,0 ± 0,06	29,6 ± 2,85
F	7	3	30,2 ± 2,43	2,7 ± 0,43	27,6 ± 2,10
G	5,5	1	15,4 ± 1,24	1,5 ± 0,08	14,6 ± 1,18
H	5,5	5	45,1 ± 0,60	4,2 ± 0,42	40,9 ± 0,22
I (c)	5,5	3	34,3 ± 0,63	3,2 ± 0,41	31,1 ± 0,95
J (c)	5,5	3	31,9 ± 0,51	3,2 ± 0,81	28,6 ± 1,13
L(c)	5,5	3	33,8 ± 0,31	3,0 ± 0,29	30,9 ± 0,61

Tabela 15 - Efeitos estimados para o percentual de nitrogênio orgânico.

% de Nitrogênio Orgânico		
Fator	Efeito	S.E. ¹
Média	30,30*	0,97*
pH (L)	0,05	1,55
pH (Q)	-3,65	2,39
Sulfato de Amônio (L)	22,58*	1,55*
Sulfato de Amônio (Q)	-5,40	2,39
pH x Sulfato	1,62	1,90

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

¹ Erro padrão

Para a avaliação estatística dos resultados apresentados na tabela 14, foram escolhidos às médias quadráticas e a quantidade de sulfato de amônio, como variáveis de estudo pela sua significância.

Para a análise da variância (ANOVA) da concentração total de nitrogênio orgânico na fermentação com *A. niger* 332 com base nos dados da tabela 15, foi utilizado o método da regressão linear o qual gerou a equação que se segue.

Percentual (%) de PTN orgânica: $3,03 \times 10 + 5 \times 10^{-2}a - 3,65 a^2 + 2,23 \times 10 b - 5,40b^2 + 1,62 ab$

Onde:

a = pH

b = Quantidade de sulfato de amônio (g)

PTN = proteína

Tabela 16 - Análise de variância para o percentual de nitrogênio orgânico.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	803,262	5	160,652	44,58
Residual	18,02	5	3,604	
Total	821,282	10		
Coeficiente de determinação	0,97806			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

De acordo com a tabela 16, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo (ANOVA), tendo em vista o valor de F (significância) calculado para o modelo foi 44,58, com 95% de confiança, foi maior que o valor de $F_{5,5}$ Tabelado (5,05).

Os resultados de pH, quantidade de sulfato de amônia e resultados percentual de proteína orgânica utilizando *Aspergillus niger* (Linhagem 2270) apresentados na Tabela 11, bem como os resultados com a Linhagem 332 apresentados na Tabela 14 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta que são apresentados nas Figuras 1 e 2.

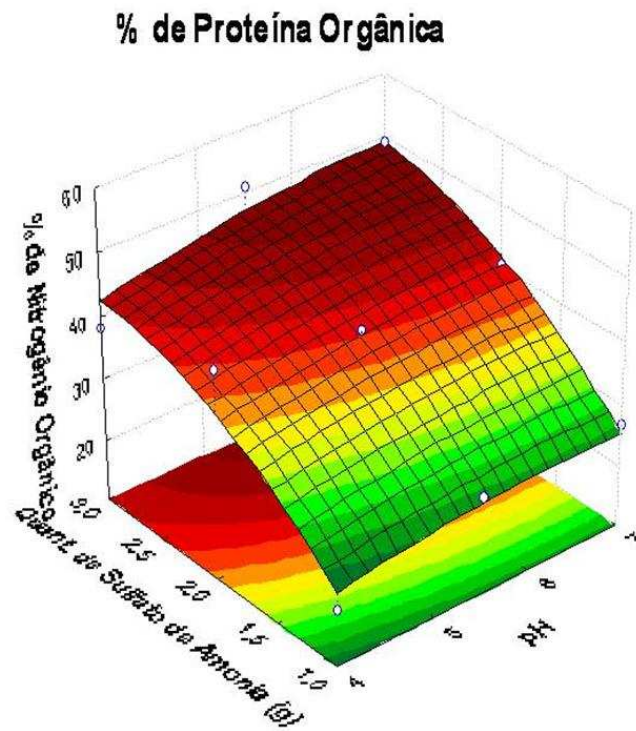


Figura 1 – Percentual de proteína produzida na fermentação obtido em função da variação de pH e quantidades de sulfato de amônia com o fungo *Aspergillus niger* (2270).

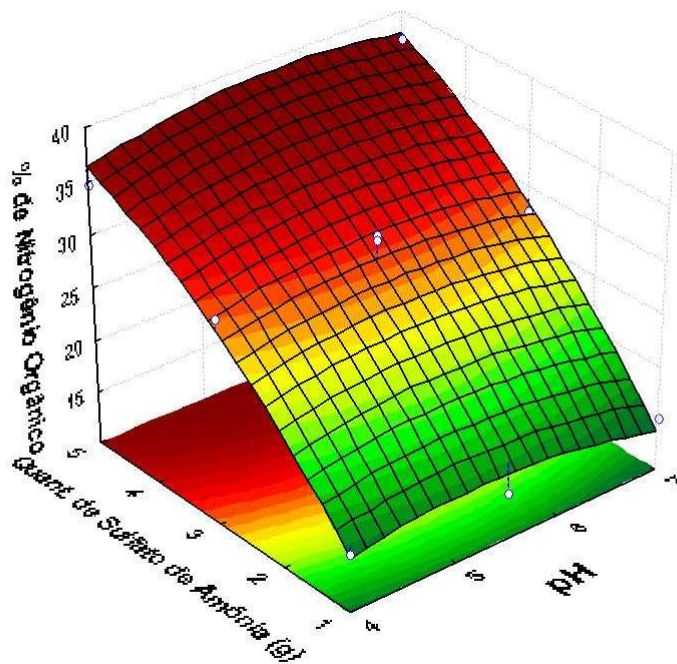


Figura 2 – Percentual de proteína produzida na fermentação obtido em função da variação de pH e quantidades de sulfato de amônia com o fungo *Aspergillus niger* (332).

A análise de superfície de resposta para o percentual de proteína orgânica, tanto da linhagem 2270 como da linhagem 332 (Figura 1 e 2), mostra que o aumento do pH não tem influência sobre o aumento de percentual de proteína, tendo em vista que o pH analisado é o da solução salina. Deve ser observado que o pH não influenciaria diretamente sobre os resultados do enriquecimento protéico.

Conforme os resultados obtidos, verifica-se que o aumento na concentração de proteínas foi diretamente favorecido pelo acréscimo da quantidade de sulfato de amônia adicionada ao meio, como fonte de nitrogênio. Os valores percentuais máximos de proteína de 51,21% e 40,92% foram obtidos quando se utilizou 3g (linhagem 2270) e 5g (linhagem 332) de sulfato de amônia. Ambos os resultados foram alcançados no valor de pH de 5,5.

Com base nestes resultados, verificou-se assim a importância da suplementação de nitrogênio no bagaço de caju, visando aumentar a eficiência do processo de enriquecimento protéico utilizando os fungos considerados, dentro das condições de cultivo testadas.

Os resultados desta pesquisa indicam que a linhagem de *A. niger* 2270 apresentou melhores rendimentos no teor de proteína após o processo de fermentação, para o valor de pH de 5,5 e uma relação de sulfato de amônia para gramas de bagaço (4g / 6g) conforme indica a tabela 17. Vale observar que a adição de quantidades de sulfato de amônia superior a 4g, decresce o teor de proteína.

Tabela 17 – Quantidades de proteína produzida na fermentação do bagaço de caju com umidade média de 77,5% utilizando a linhagem 2270 em 30 horas, e amônia de acordo com a variação de sulfato de amônia.

Amostra	pH	Quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adicionado ao meio (g)	% Proteína produzida na fermentação (30h)	% NH_4^+ (Fermentação)	% Nitrogênio Orgânico
A	5,5	3	51,9 ± 3,61	3,5 ± 0,34	48,6 ± 3,76
B	5,5	4	58,2 ± 2,39	3,1 ± 0,75	55,0 ± 2,49
C	5,5	5	40,8 ± 0,79	4,7 ± 0,37	36,1 ± 0,96

Este estudo foi realizado somente com a linhagem 2270, para verificar as condições através das quais o sulfato de amônia propiciaria o maior rendimento do processo de bioconversão protéica. Esta linhagem teve um melhor desempenho no aumento protéico com menores quantidades de sulfato de amônia que a outra linhagem 332, e provavelmente seu ponto máximo seria também menor, o que garantia um menor custo para o processo (Figura 3).

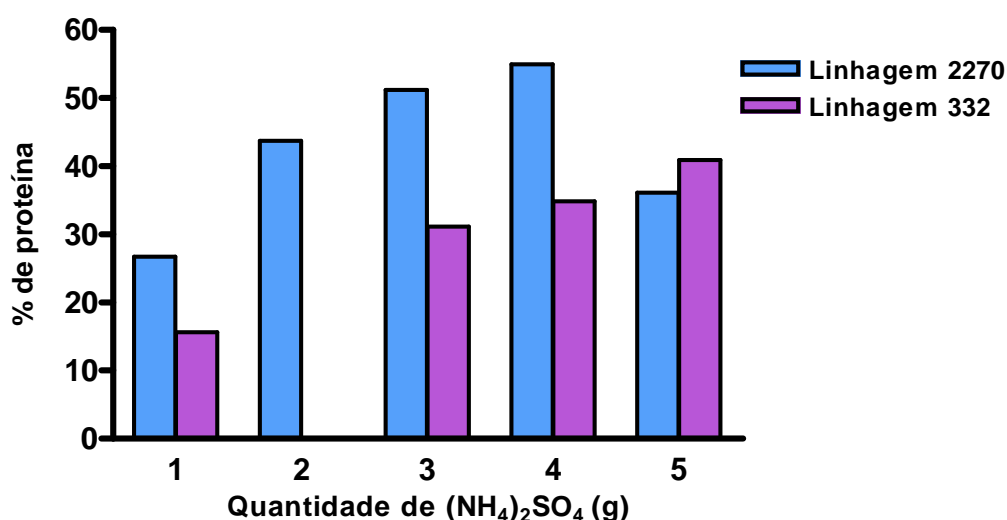


Figura 3 – Percentual de proteína de cada linhagem *A. niger* 2270 e 332, de acordo com as diferentes quantidades de sulfato de amônia utilizada.

É importante salientar que após 30 horas 30 horas de fermentação, foi realizado a contagem de esporos na câmara de Neubauer, não tendo sido detectado esporos.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DESTA PESQUISA COM OS DADOS DA LITERATURA

Para uma melhor compreensão e avaliação da importância dos resultados nesta pesquisa, foi preparada uma tabela comparativa contendo resultados do processo de enriquecimento protéico levantados na literatura, conforme referenciado na tabela 18. Conforme pode ser observado, não identificamos na literatura o uso dos fungos *Aspergillus niger* para o enriquecimento protéico do bagaço de caju. Entretanto foram encontrados dados relativos ao uso de *A. niger* para o enriquecimento protéico da polpa de limão e de outros fungos (*Gongronella butleri*, *Rhizopus oligosporus*) para o bagaço da maçã.

Tabela 18 – Síntese de dados sobre enriquecimento protéico da literatura.

Referência	Substrato	Microrganismo	Aumento de proteína / % de proteína
Coelho <i>et al.</i> (2001)	Bagaço do caju	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3x / 20,3%
Campos <i>et al.</i> (2005)	Bagaço do caju	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3x
Campos <i>et al.</i> (2003)	Bagaço do caju	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,5 x
Holanda, Oliveira e Ferreira (1997)	Bagaço do caju	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>20%
Amorim <i>et al.</i> (2005)	Palma	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,46x
Araújo <i>et al.</i> (2003)	Cactácea mandacaru	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37,8% e 24,78%.
Vendruscolo <i>et al.</i> (2007)	Maçã	<i>Gongronella butleri</i>	19,24% (2,5 x)
Albuquerque <i>et al.</i> (2003)	Maçã	<i>Rhizopus oligosporus</i>	30,75% (5 x)
De Gregorio <i>et al.</i> (2002)	Polpa de limão	<i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma viride</i>	25,6-31,9%

Comparando os resultados encontrados no presente trabalho com os descritos na revisão de literatura, demonstra que o enriquecimento protéico através da fermentação semi-sólida utilizando o fungo *Aspergillus niger* foi bem maior que os estudos relatados.

O ganho protéico do bagaço do pedúnculo de caju fermentado utilizando as duas linhagens de *Aspergillus niger* (2270 e 332) aumentou em média 13% vezes o valor inicial protéico sem fermentação semi-sólida. Até mesmo a linhagem 332 que obteve rendimento menor conseguiu aumentar o teor de proteína 11% do valor inicial, valores bem maiores que os apresentados na tabela 18, que é um resumo dos estudos encontrados na literatura sobre o referido assunto.

Comparando-se também com estudos realizados, utilizando-se outros tipos de resíduos como meio para fermentação, o aumento conseguido nesse trabalho ainda é maior que os citados.

Alguns estudos utilizaram para o enriquecimento protéico espécies de fungos, porém em outros substratos de resíduos agroindustriais diferente do bagaço de caju, obtendo ganho protéico superior aos citados nos estudos com levedura, mas ainda menores que os encontrados no presente trabalho.

Os estudos realizados com fungos para enriquecimento protéico utilizando fermentação semi-sólida obtiveram resultados mais satisfatórios que os que utilizaram levedura, corroborando com os resultados deste trabalho, onde o fungo *Aspergillus niger* contribui consideravelmente para o aumento protéico.

O aumento protéico (até 14%) utilizando *Aspergillus niger* no bagaço de caju por fermentação semi-sólida foi significativo como observado neste trabalho, ressaltando que muitos estudos são realizados com esse propósito de melhoramento da qualidade nutricional, principalmente em relação ao teor protéico.

Até mesmo em outros estudos envolvendo outros processos, como na ensilagem, que também objetiva o melhoramento da qualidade nutricional da silagem com resíduos agroindustriais, verifica-se, que o aumento protéico com bagaço de caju fica em torno de 2 a 5% de proteína bruta (TELES, 2006), chegando até a 9% de proteína bruta (FERREIRA *et al.*, 2004).

Campos *et al.* (2005) cita em seu estudo que o bagaço de caju apresentou 70,98% de umidade, menor que o encontrado nesse trabalho. Porém, nos artigos citados com caju não houve indicação de como foi originado o bagaço, se em prensa manual, ou “expeller”, podendo interferir sensivelmente nessa diferença de umidade.

O valor médio do percentual de proteína total no bagaço de caju úmido foi de 3,7 % \pm 0,4. Em comparação com outros estudos que citam o percentual de proteína em matéria seca, levando em consideração a umidade de 77% do bagaço de caju úmido, o percentual de proteína poderia ser expresso em 16% em base seca. Campos *et al.* (2005) encontrou 10,74% de proteína bruta na matéria seca do bagaço do pedúnculo de caju. Santos (2007) cita em seu trabalho que encontrou para o resíduo seco do bagaço do caju 12,94%.

O nitrogênio corresponde em média, 8-14% do peso seco da biomassa de bactérias e/ou fungos. Uma grande variedade de compostos nitrogenados orgânicos e inorgânicos são utilizadas para suprir as necessidades desse elemento durante a biossíntese. A amônia representa a forma inorgânica de nitrogênio mais assimilável pelos microrganismos (PANDEY *et al.*, 1994).

Santos (2007) em seu estudo utilizando fermentação semi-sólida com pedúnculo de caju para produção de pectinases, verificou que em geral a adição de fontes de nitrogênio (sulfato de amônia) foi favorável para o processo, onde o pico de atividade foi atingido com acréscimo de 1% de nitrogênio.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste trabalho conclui-se que as duas linhagens de *Aspergillus niger* (2270 e 332) proporcionaram enriquecimento protéico de acordo com a metodologia especificada neste trabalho. Entretanto, a linhagem 2270 mostrou um melhor desempenho, tendo-se obtido um valor médio do teor protéico de 55%.

Com relação às condições específicas do enriquecimento protéico com a linhagem *A. niger* 2270; conclui-se que para um valor do pH de 5,5, e para uma relação de 4g de sulfato de amônia para 6g de bagaço de caju com umidade média de 77,5%, encontrou-se um valor médio do teor de proteínas de 55%. Para a linhagem de *A. niger* 332, conclui-se que para um valor do pH de 5,5, encontrou-se uma relação de 5g sulfato de amônia para 6g de bagaço de caju com umidade média de 77,5%, encontrou-se um valor médio do teor de proteínas de 40,92%. Com base nestes resultados conclui-se que a linhagem de *A. niger* 2270, apresentou um melhor rendimento.

Os resultados encontrados neste trabalho permitem concluir que o enriquecimento protéico do bagaço de caju (lote fornecido pela empresa Jandaia) através das linhagens de *A. niger* (2270 e 332) mostra-se superiores aos valores indicados na literatura, conforme a tabela 18.

Os resultados desta pesquisa permitem se concluir que o processo de enriquecimento protéico desenvolvido neste trabalho poderá dar uma nova dimensão aos resíduos da agroindústria do caju como fonte de proteínas para alimentação animal.

7. SUGESTÕES

O bom desempenho do processo de enriquecimento protéico utilizando as linhagens de fungo *Aspergillus niger* (2270 e 332), recomenda que outras linhagens devam ser pesquisadas.

De igual forma, recomenda-se ampliar a faixa de variação das condições experimentais utilizadas no processo de enriquecimento protéico, tais como: temperatura, pH dentre outras.

Para uma melhor quantificação dos resultados recomenda-se levantar as curvas cinéticas do processo de crescimento protéico com as linhagens que apresentem os melhores rendimentos, utilizando como parâmetros, pH, temperatura e concentração de sulfato de amônia.

Recomenda-se ainda utilizar os resíduos de outras frutas (acerola, maracujá, manga, abacaxi etc.) tendo em vista a sua aplicação junto à indústria de produção de sucos.

Recomenda-se o desenvolvimento de um estudo sobre a toxicidade do produto enriquecido para fins de certificação.

Finalmente, se recomenda o desenvolvimento de uma dissertação para modelar e realizar uma avaliação econômica deste processo, tendo em vista o impacto do processo de enriquecimento protéico junto a industrial regional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOO, K.E.; HENRY, R.; WOOD, B.J.B. Solid state fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v.28, p.201-237, 1982.

ALBUQUERQUE, P. M.; KOCK, F.; TROSSINI, T. G.; ESPOSITO, E.; NINOW, J. L... Enriquecimento do bagaço de maçã com proteína fúngica através da fermentação em estado sólido. In: **XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES**, 2003, Florianópolis. Anais... XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003.

AMORIM, B. C.; MOTA, M. M. A.; SIMÕES V. S.; SILVA, F. L. H.; OLIVEIRA L. S. C. Estudo do enriquecimento protéico do bagaço da fruta da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill). In: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2005, Campinas. 6 p.

ANDRADE, A.T. **Estudo da atividade de água na produção de amiloglucosidase fúngica utilizando resíduo do beneficiamento de arroz**. 1999. Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Ambientais, Programa de pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos , Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

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

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16th ed. v. 2.Washington, 1997.

ARAÚJO, J. P. P.; SILVA, V. V. *Cajucultura: modernas técnicas de produção*, Embrapa-CNPAT: Fortaleza, 1995.

ARAÚJO, L. de F. ; MEDEIROS, A. N. de ; PERAZZO NETO, A. ; CONRADO, L. S. ; SILVA, F. L. H. da . Estudo do Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos (*Cerus jamaru* P.DC) utilizando Leveduras por Fermentação Semi-Sólida. In: **SINAFERM 2003, 2003, Florianópolis**. XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003.

ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 36, p. 1241-1247, 2001.

BRANCO, S. M.; HESS, M. L. Tratamento de resíduos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U.A.. **Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial**. v. 2. São Paulo: E. Blücher, 1975. cap. 3, p. 47-76.

CAMPOS, A. R. N.; DANTAS, J. P.; SILVA, F. L. H. da. Enriquecimento Protéico do Bagaço do Pedúnculo de Caju (*Anarcadium occidentale*) por Fermentação Semi-sólida. In: **XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, 2003, Florianópolis. SINAFERM 2003, 2003. p. 1-6.

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

CARDOSO, E. G.; SILVA, J. M. da. Silos, silagem e ensilagem. nº 02. *Campo Grande, MS, 14 fev. 1995. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD02.html>>* Acesso em: 05 Abr 2009.

CARIOCA, J. O. B.; ARORA, H. L. **Recycling Process for Human food and animal feed from residues and resources**. Fortaleza: Edições UFC / Banco do Nordeste, 2000. 428 p.

CARIOCA, J. O. B.; MARX, F.; JONAS, R. **Preceptions on food and Nutrition: a contribution from DAAD Alumniseminar held in Fortaleza**. Fortaleza: Expressão gráfica e Editora Ltda. 2006. 287p.

CAVALCANTE, R.S. LIMA, H.L.S., PINTO, G.A.S, RODRIGUES, S. Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. **Food and Bioprocess Technology**, Vol 1, p. 100-104, 2008.

CAVALCANTI, J. J. V. *O cajueiro: exploração, perspectivas e potencialidades no âmbito da Mata Atlântica*; Simões, L. L.; Lino, C. F., orgs.; Senac: São Paulo, 2002, 55 p.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S.G.F; ROSA, M. de 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.

COSTA, M. C. O. **Estudo da estabilidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) preservado pelos processos *hot fill* e asséptico**. 1999. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 2, p. 89-94, 2002.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Biotechnologia industrial** : Fermentação em estado Sólido. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. vol.2.

DURAND, A. Bioreactors desings for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p.113-125, 2003.

DURU, C. C.; UMA, N. U. Protein enrichment of solid waste from cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) cormel processing using *Aspergillus oryzae*

obtained from cormel flour. **African Journal of Biotechnology** v. 2, n.8,. p. 228-232. 2003

FALANGHE, H. Produção de microrganismos. In: *LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia: Tecnologia das fermentações*. São Paulo: E. Blücher, 1975. cap. 12 p. 246-285.

FARIA, F. S. E. D. V. **Influência de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de fermentados de caju (*Anacardium occidentale*, L.) em diferentes condições de fermentação**. 1994. 99f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FERREIRA, A.C.H.; NEIVA, J.N.M.; RODRIGUEZ, N.M. Valor nutritivo das silagens de capim-elefante com diferentes níveis de subprodutos da indústria do suco de caju. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1380-1385, 2004.

GUILHERME, A.A., PINTO, G.A.S. RODRIGUES, S. Optimization of Trace Metals Concentration on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL. **Food and Bioprocess Technology**, Vol 1, 246-256. 2001.

HESELTIME, C.W. Solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, 1972, vol. 14, p. 517-532.

HOLANDA, J.S.; OLIVEIRA, A. J.; FERREIRA, A. C. Enriquecimento protéico de pedúnculos de caju com emprego de leveduras, para alimentação animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.5, p.79-81, 1997.

LEITE, L.A. de S. **A agroindústria do caju no Brasil: políticas públicas e transformações econômicas**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1994. 195 p.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v.7, p. 258-265, 1985.

MARTINS, E. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalcturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. 2006. 108f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campos de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MENEZES, T. J. B de. Produção de Biomassa protéica a partir da Manipueira. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. v.4. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. Cap 8. p. 118-131.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Agronegócio Brasileiro: Uma Oportunidade de Investimentos. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,968707&_dad=portal&_schema=PORTAL > Acesso: 13/05/2009

- OLIVEIRA, L. F. de; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. do; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.3, p.259-262, 2002.
- OLIVEIRA, M. M. de, CAMPOS, A. R. N., DANTAS, J. P., GOMES, J. P., SILVA, F. L. H. Isotermas de sorção do resíduo agroindustrial de casca do abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.9, n.4, p.565-569, 2005.
- OLIVEIRA, M. M. de, CAMPOS, A. R. N., DANTAS, J. P., GOMES, J. P., SILVA, F. L. H. da. Isotermas de dessorção da casca do maracujá (*Passiflora edulis* Sims): determinação experimental e avaliação de modelos matemáticos. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1624-1629, set-out, 2006.
- PANDEY, A. ASHAKUMARY, L.; SELVAKUMAR, P. e VUAYLAKSHMI, K.S. Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glycomylase production solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 10, p. 485-486, 1994.
- PANDEY, A. Recent process development in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v.27, p. 109-117, 1992.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. **Solid-State fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, INC, 2001. 231p.
- PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. de O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology management & innovation**, v. 2 , março, 2007.
- PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger*. 2003. 180f. Tese (Doutorado em ciências)**. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação de Tecnologia de Processos. Rio de Janeiro.
- PRADO, F.C. **Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca**. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. 2ed., v.1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. 605p.
- RAMOS, L. DE S. N.; LOPES, J. B; FIGUEIREDO; A. V.; FREITAS, A. C. DE; FARIAS L. A.; SANTOS, L. DA S.; SILVA, H. O. Polpa de caju em rações para frangos de corte na fase final: desempenho e característica da carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.804-810, 2006.

RODRIGUES, A. M.; SANTANA, E. S.. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Revista Ciências Tecnologia Alimentar**, Campinas, v. 21, n.1, p. 57-62, jan.-abr, 2001.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A.; **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de veterinária. Departamento de micologia e imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

RUDRAVARAM, 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. **International Journal of Food Engineering**, Vol. 2. 2006.

SANTOS, G. dos. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori***. 2006. 81 f.. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

SANTOS, S. F. de M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 148 f. (Tese de Doutorado) – Engenharia Química Da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2007.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W.; BONZANI, W.B.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Coord). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1 ed., vol 2. São Paulo: Eddgard Blüsher, 2001. Cap 2. p.5-18.

SILVA, J. M. da. Silagem de forrageiras tropicais. nº 51 ISSN 1516-5558. Campo Grande, MS, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD51.html>> Acesso em: 01 Abr 2009.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157f. Dissertação (Mestrado em tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO,C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de solos, UFRGS, 1995. 174p.

TELES, M. M.. 2006. 130 f. **Características fermentativas e valor nutritivo de silagens de capim-elefante contendo subprodutos do urucum, caju e manga** – Tese (Doutorado em Zootecnia). Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

TEXEIRA, A. J.. Indústria de caju no Brasil. SINDICAJU. 2009. Disponível em: <<http://www.sindicaju.org.br/site/noticia.industria.html>> Acesso em: 13/05/2009

VENDRUSCOLO, F.; KOCH, F.; PITOL, L. de O.; 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.

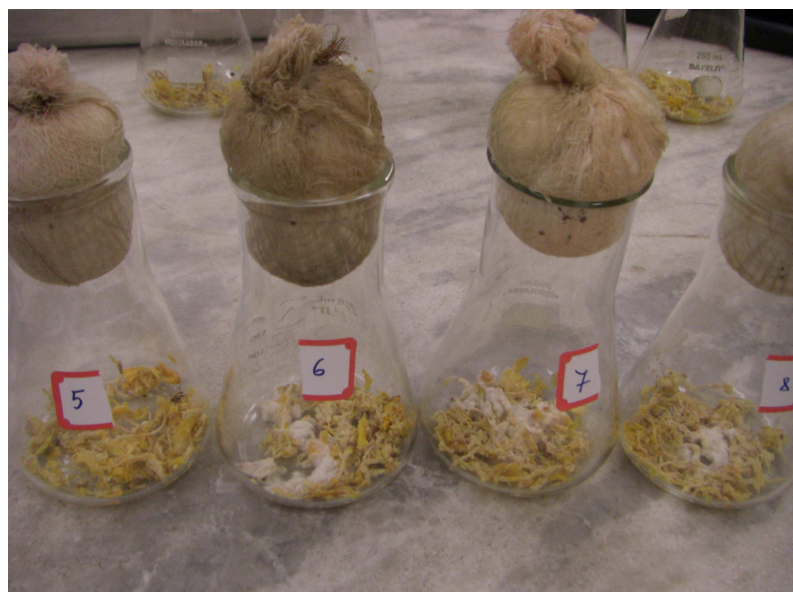
WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995. 228p.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Foto de fermentação do bagaço de caju em estufa tipo BOD a 30°C.



APÊNDICE B – Foto 1 após 30 horas de fermentação do bagaço de caju com o fungo *Aspergillus niger*.



APÊNDICE C – Foto 2 após 30 horas de fermentação do bagaço de caju com o fungo *Aspergillus niger*.



APÊNDICE D – Destilador de nitrogênio



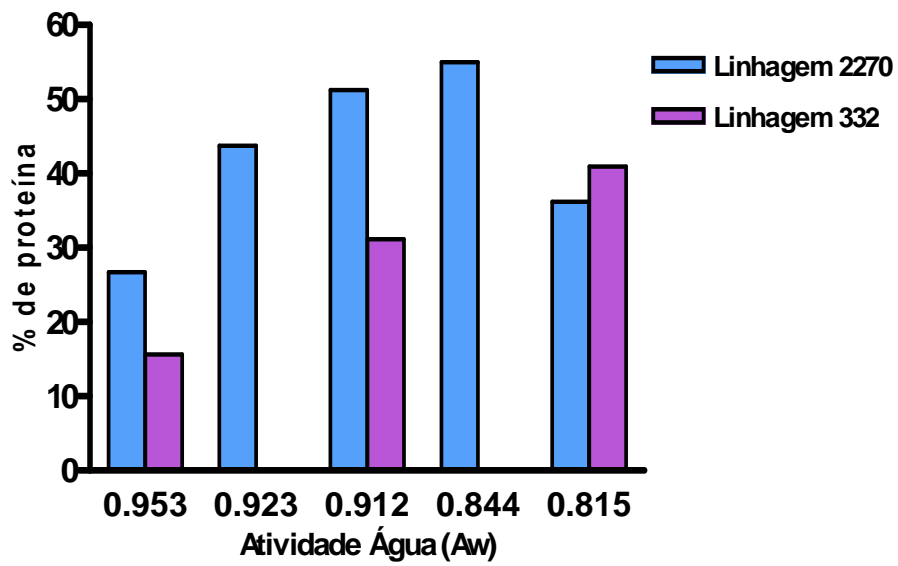
APÊNDICE E - Atividade água do meio com bagaço de caju úmido em diferentes quantidades de sulfato de amônia.

Amostra	Quantidade de (NH₄)₂SO₄g/L adicionado ao meio (g)	Aw
1	1	0,953 ± 0,002
2	2	0,923 ± 0,007
3	3	0,912 ± 0
4	4	0,844 ± 0,028
5	5	0,815 ± 0,028

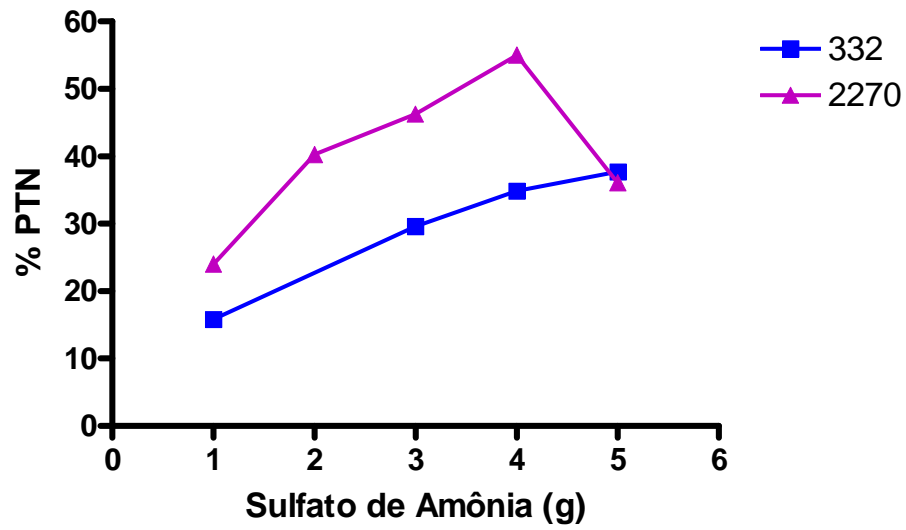
APÊNDICE F - Percentual de proteína em relação à atividade água presente no meio, nos 2 tipos de linhagem de *Aspergillus niger*.

Aw	% Proteína produzida na Fermentação	
	Linhagem 2270	Linhagem 332
0,953	26,70	15,63
0,923	43,70	
0,912	51,21	31,13
0,844	54,96	
0,815	36,16	40,92

APÊNDICE G - Percentual de Proteína de acordo com as quantidades de atividade água dos meios, com as linhagens 2270 e 332.



APÊNDICE H – Comparativo da quantidade de proteína das linhagens de *A. niger* 2270 e 332.



ANEXO

ANEXO A – Informativo sobre tratamento estatístico

O programa estatístico Statistica (Statsoft), foi utilizado para realizar o tratamento estatístico do trabalho. Segue abaixo, uma tabela de análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo matemático. n_i = número de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos da variável independente; $n = \sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de grau de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_i^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_i^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_i^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

$$F = \frac{MQ_R}{MQ_r}$$