



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE
TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA**



THALYTA CHRISTIE BRAGA RABÊLO

ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DA ALGAROBA
(Prosopis juliflora) **UTILIZANDO** *Saccharomyces cerevisiae*.

MACEIÓ

2011

THALYTA CHRISTIE BRAGA RABÊLO

ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DA ALGAROBA (*Prosopis juliflora*) UTILIZANDO *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, na área de Processos Bioquímicos, da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Francisca Pessôa de França.

Co-Orientador: Prof. João Nunes de Vasconcelos.

MACEIÓ

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Dilma Maria dos Santos Cunha

- R114e Rabêlo, Thalyta Christie Braga.
Enriquecimento protéico da algaroba (*prosopis juliflora*) utilizando *saccharomyces cerevisiae* / Thalyta Christie Braga Rabêlo. – 2011.
100 f. ; tabs., grafs.
- Orientadora: Francisca Pessôa de França.
Co-orientador: João Nunes de Vasconcelos.
Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2011.
- Bibliografia: f. 90-100.
1. Fermentação semi-sólida. 2. Leveduras. 3. Proteínas. 4. Algaroba.
I. Título.

CDU: 66.09

DEDICATÓRIA

Ao Ser Supremo, sempre iluminando meu caminho...

Ao querido professor Evandir Gonçalves de Oliveira (in memoriam).

Ofereço este trabalho aos meus amores, fontes de minha força: Miguel Lino Spinelli Rabêlo (in memoriam), Mariá Braga Rabêlo Alves, Aleir de Aguiar Braga e Ranulfo Alves da Silva.

AGRADECIMENTOS

Ao Ser Supremo.

A minha filha, Mariá Braga Rabêlo Alves, pelo amor imensurável.

A minha família pela paciência, e contribuição na minha formação.

Ao meu marido Ranulfo Alves da Silva, pela contribuição nos feriados e finais de semanas durante os ensaios na Universidade; pela doação da Algaroba; pelo amor e paciência, acompanhando-me durante a noite na escrita da Dissertação, entre outras contribuições para que esse trabalho pudesse se realizado.

Ao grande e precioso amigo José Roberto da Silva Júnior, sou grata, pois com humildade compartilhar sabedoria, sutileza, compreensão, carinho, entre outros valiosos sentimentos.

Aos amigos: Fabiana Patrícia da Silva Rocha, Yariadner da Costa Brito, Bruno Ramos, Isya Félix e Tatiane Omena, sempre disponíveis; em especial nos momentos de necessidades. Sempre me auxiliando com carinho.

A minha prima Manuela Rabêlo, pelo amor, sempre me auxiliando, contribuindo na execução dos experimentos, fazendo parte das “dormidas” na universidade.

A todos pela compreensão momento de “estresse”.

A Universidade Federal de Alagoas- UFAL, pelo conhecimento adquirido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior - CAPES, pelo investimento dado a pesquisa.

Aos meus orientadores: Francisca Pessôa de França e João Nunes de Vasconcelos, por compartilhar conhecimento ao longo do projeto.

Ao professor Evandir Gonçalves de Oliveira (*in memoriam*), pela dedicação e amor ao longo da vida, onde sempre com sutileza transmitia sabedoria a todos. Meu eterno agradecimento pelo companheirismo e paciência durante o caminho trilhado.

Ao Laboratório de Derivados em Cana de Açúcar - LDCA, local de suporte onde pude executar os experimentos deste trabalho. Aos bolsistas, João Paulo, Amaury, Karlly e Daniel, pelo reforço e bom humor, contribuindo para desenvolvimento do projeto.

Ao Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada - LGMA, em especial ao Professor Eurípedes Alves da Silva Filho, que cedeu as Cepas para realização dos ensaios.

Ao Laboratório de Tecnologia em Bebidas e Alimentos - LTBA, em especial a Margarete; pelo auxílio nos experimentos, na utilização dos equipamentos, dando dessa forma suporte ao trabalho.

Ao Laboratório de Saneamento Ambiental- LSA, ao fornecer equipamentos para os ensaios, em especial a Florilda e bolsistas.

A secretaria do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, em especial ao Davi Fonseca.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento do processo de enriquecimento protéico da Algaroba utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, tendo como principal característica otimizar técnicas geradas ou adaptadas para as condições da região semi-árida, para a produção de fonte alimentar rica em proteínas. O produto obtido tem como objetivo produzir uma ração animal, contribuindo para minimizar a carência alimentar na época crítica do ano. Os experimentos foram desenvolvidos em bandejas de PVC medindo 10 x 17,5 cm e altura de 4,3 cm. Foram utilizadas 47, 94 e 141 g de matéria-prima, distribuídas no reator, apresentando diferentes espessuras do substrato. Na realização dos ensaios, foram inoculados a mesma concentração celular e diferentes valores de pH e extrato de levedura, como parâmetros comparativos experimentalmente. Foi realizado um Planejamento Experimental 3³, utilizando-se três variáveis (massa de algaroba, valor de pH e teor de extrato de lêvedo), a fim de otimizar os parâmetros. Adotou-se como resposta o teor seco de proteína bruta. Os resultados obtidos para o tempo de 48 e 96 horas foram avaliados estatisticamente pelo software *Design Expert 7.1.5*. O maior enriquecimento protéico da Algaroba foi obtido com 96 horas de fermentação quando utilizado 47g de matéria prima, pH 7,0 e 0,3% de extrato de lêvedo.

Palavras chave: Fermentação semi-sólida, Levedura, Proteína.

ABSTRACT

The present study was aimed to develop the protein enrichment process of mesquite using *Saccharomyces cerevisiae* by optimization of techniques generated or adapted to the condition of semi arid region, for the production of food sources rich in protein, vitamin, minerals and energy. The product obtained aims the animal feed, contributing to reduce food shortages in dry season of year. The experiments were conducted on PVC trays measuring 10 x 17,5 cm and height of 4,3 cm. We used 47, 94 and 141 g of raw material, distributed in the reactor, presented different thicknesses of the substrate. In conducting the tests were inoculated the same cell concentration and different pH and yeast extract as comparative parameters experimentally. It was made an experimental design 3³, using three variables (mass of mesquite, pH and concentration of yeast extract) to optimize the parameters. It was adopted like response to crude protein content dry. The results for the 96 hours were statistically analyzed by the software Design Expert 7.1.5. The best results for protein enrichment of mesquite were to the process time of 96 hours. The higher protein enrichment of Mesquite was obtained with 96 hours of fermentation when used 47g of raw material, pH 7.0, and 0.3% yeast extract.

Key words: Solid state fermentation, Yeast, Protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Algarobeira.....	16
Figura 02- Vagens da Algaroba.....	16
Figura 03 - Forma de Reprodução das Leveduras.....	20
Figura 04- Microscopia eletrônica de varredura de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - 3000x.....	20
Figura 05- Estrutura de uma Levedura típica, como as de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 06- Via Metabólica.....	23
Figura 07- Biossíntese protéica.....	23
Figura 08- Estrutura primária de proteínas.....	24
Figura 09- Níveis de organização das estruturas protéicas.....	25
Figura 10- Fermentação semi-sólida em bandeja.....	27
Figura 11- Câmara de Neubauer, evidenciando-se, em azul, os quadrados contados, assim como as células coradas (mortas) e não coradas (vivas) pelo azul de metileno.....	35
Figura 12- Crescimento do micro-organismo expresso em A_{480nm} em função do tempo.....	40
Figura 13- Quantificação das UFC durante o crescimento das diferentes linhagens.....	40
Figura 14- Consumo de substrato durante a fermentação.....	41
Figura 15- Relação entre peso seco e A_{480nm}	42
Figura 16- Curva de crescimento da linhagem UTRI.....	43
Figura 17- Parâmetros dos experimentos da série 1.....	45
Figura 18- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 1, 2 e 3.....	46
Figura 19- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 1, 2 e 3.....	47
Figura 20- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 1, 2 e 3.....	49

Figura 21- Parâmetros dos experimentos da série 2.....	50
Figura 22- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 4,5 e 6.....	51
Figura 23- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 4,5 e 6.....	51
Figura 24- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 4,5 e 6.....	52
Figura 25- Parâmetros dos experimentos da série 3.....	53
Figura 26- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 7,8 e 9.....	54
Figura 27- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 7,8 e 9.....	55
Figura 28- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 7,8 e 9.....	57
Figura 29- Parâmetros dos experimentos da série 4.....	57
Figura 30- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 10,11 e 12.....	58
Figura 31- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 10,11 e 12.....	59
Figura 32- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 10,11 e 12.....	60
Figura 33- Parâmetros dos experimentos da série 5.....	61
Figura 34- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 13,14 e 15.....	62
Figura 35- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 13,14 e 15.....	63
Figura 36- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 13,14 e 15.....	64
Figura 37- Parâmetros dos experimentos da série 6.....	65
Figura 38- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 16,17 e 18.....	66

Figura 39 -Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 16,17 e 18.....	67
Figura 40 -Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 16,17 e 18.....	69
Figura 41 -Parâmetros dos experimentos da série 7.....	69
Figura 42 -Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 19,20 e 21.....	70
Figura 43 -Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 19,20 e 21.....	71
Figura 44 -Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 19,20 e 21.....	72
Figura 45 -Parâmetros dos experimentos da série 8.....	73
Figura 46 -Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 22,23 e 24.....	74
Figura 47 -Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 22,23 e 24.....	75
Figura 48 -Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 22,23 e 24.....	77
Figura 49 -Parâmetros dos experimentos da série 9.....	77
Figura 50 -Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 25,26 e 27.....	78
Figura 51 -Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 25,26 e 27.....	79
Figura 52 -Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 25,26 e 27.....	80
Figura 53 -Gráfico de perturbação para a % de proteína bruta seca formada em 48 horas (%PBS)	83
Figura 54 -Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para % proteína bruta seca em 48 horas (%PBS)	84
Figura 55 -Gráfico de perturbação para a % de proteína bruta seca em 96 horas (%PBS 96 horas).....	85
Figura 56 -Gráfico de perturbação para a % de proteína bruta seca (%PBS)	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Comparação do conteúdo protéico das vagens e folhas da <i>Prosopis sp.</i> com outros alimentos comuns das regiões áridas do Brasil.....	18
Tabela 02. Composição físico-química da farinha de algaroba.....	18
Tabela 03. Minerais presentes na farinha de algaroba.....	19
Tabela 04. Composição química da célula de levedura.....	22
Tabela 05. Composição aminoacídica da célula de levedura.....	22
Tabela 06. Caracterização e quantificação do nitrogênio presente na célula de levedura.....	22
.	
Tabela 07. Efeito de parâmetros de processo no enriquecimento protéico.....	33
Tabela 08. Distribuição da algaroba no reator.....	34
Tabela 09. Crescimento dos microrganismos em meio sintético.....	38
Tabela 10. Valores de absorvância, contagem de células e consumo de ART durante 17 horas de fermentação com linhagens de leveduras.....	39
Tabela 11. Valores de peso seco de células e A_{480} para as 3 cepas estudadas.....	42
Tabela 12. Teor protéico (base seca) das 3 cepas de levedura.....	43
Tabela 13. Teores de proteína bruta em função de variáveis experimentais.....	50
Tabela 14. ANOVA completa para todos os termos na % de proteína bruta seca em 48 horas..	72
Tabela 15. ANOVA completa para todos os termos na % de proteína bruta seca em 96 horas (%PBS 96 horas)	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Algaroba.....	16
2.2 Leveduras.....	20
2.3 Proteínas.....	24
2.4 Fermentação semi-sólida.....	26
2.5 Concentrado protéico.....	28
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Matéria prima.....	31
4.2 Seleção de linhagens de leveduras com alto teor protéico.....	31
4.2.1 Preparo do inóculo.....	32
4.2.2 Determinação da cinética de crescimento das linhagens de leveduras.....	32
4.2.3 Determinação do teor protéico das cepas UTRI, UPMT e USCL.....	32
4.3 Padronização de parâmetros de processo através de planejamento experimental.....	33
4.4 Determinações Analíticas.....	34
4.4.1 Viabilidade celular.....	34
4.4.2 ART.....	35
4.4.3 Quantificação celular através de Absorvância.....	35
4.4.4 Umidade.....	36
4.4.5 Quantificação celular através da contagem de unidades formadoras de colônia (ufc).....	36

4.4.6	Determinação do pH.....	36
4.4.7	Determinação Nitrogênio Total – Proteína Bruta.....	37
4.4.8	Proteína Verdadeira.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Cultivo dos microrganismos em meio sintético.....	38
5.2	Cinética de crescimento das linhagens de microrganismos utilizadas.....	39
5.2.1	Parâmetros cinéticos da Linhagem UTRI.....	43
5.3	Enriquecimento protéico.....	45
5.3.1	Resultados experimentais da série 1.	45
5.3.1.1	Cinética do Crescimento Microbiano.....	47
5.3.1.2	Teor de Proteína.....	47
5.3.2	Resultados experimentais da série 2.	50
5.3.2.1	Cinética do Crescimento Microbiano.....	51
5.3.2.2	Teor de Proteína.....	51
5.3.3	Resultados experimentais da série 3.....	53
5.3.3.1	Cinética do Crescimento Microbiano.....	54
5.3.3.2	Teor de Proteína.....	54
5.3.4	Resultados experimentais da série 4.....	57
5.3.4.1	Cinética do Crescimento Microbiano.....	57
5.3.4.2	Teor de Proteína.....	58
5.3.5	Resultados experimentais da série	61
5.3.5.1	Cinética do Crescimento Microbiano.....	61
5.3.5.2	Teor de Proteína.....	62
5.3.6	Resultados experimentais da série 6.....	65
5.3.6.1	Cinética do Crescimento Microbiano.....	65
5.3.6.2	Teor de Proteína.....	67
5.3.7	Resultados experimentais da série 7.....	69
5.3.7.1	Cinética do Crescimento Microbiano.....	69
5.3.7.2	Teor de Proteína.....	70
5.3.8	Resultados experimentais da série 8.....	73
5.3.8.1	Cinética do Crescimento Microbiano.....	73

5.3.8.2 Teor de Proteína.....	75
5.3.9 Resultados experimentais da série 9.....	77
5.3.9.1 Cinética do Crescimento Microbiano.....	78
5.3.9.2 Teor de Proteína.....	78
6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	80
6.1 Proteína Bruta Seca com 48 horas.....	83
6.2 Proteína Bruta Seca com 96 horas.....	84
6.3 Conclusão da avaliação estatística.....	86
7 CONCLUSÕES.....	88
8 SUGESTÃO PARA TRABALHO FUTURO.....	89
REFERÊNCIAS	90
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional, há necessidade de suprir a demanda por alimentos, buscando-se novas alternativas viáveis, para produção destes e outros produtos de valor comercial reconhecido. Os recursos regionais disponíveis no semi-árido, propiciam o desenvolvimento de estudos para consolidação do aproveitamento integral destes.

A algarobeira é um vegetal adaptado às condições climáticas do semi-árido nordestino e possui grande potencial de produção de frutos que, se explorados adequadamente, poderão ser transformados em produtos de alto valor agregado. As suas vagens fazem parte dos alimentos usados pelo homem desde a pré-história, nas regiões onde a planta é nativa. São palatáveis, aromáticas, lembrando baunilha, e doces em função do elevado teor de sacarose. (www.ct.ufpb.br, 2009)

A alimentação racional dos ruminantes visa fornecer os nutrientes capazes de manter e assegurar as exigências de sua manutenção e o nível de produção pretendido. O sucesso da qualidade da carne e a exploração leiteira lucrativa se tornam possíveis, quando se trabalha com as condições alimentares adequadas, que permitem altas produções a custos mais econômicos. Isto se torna possível, principalmente, por intermédio de um manejo nutricional, reprodutivo e sanitário adequado (ARAÚJO et al., 2007).

Na região semi-árida, os animais estão sujeitos a graves problemas alimentares, determinados pelos longos períodos de estiagem, quando a principal fonte forrageira apresenta baixa produtividade e baixo valor nutritivo, com reflexos na produção de carne e leite. Conseqüentemente, nesta época, os criadores da região recorrem ao uso de concentrados comerciais para suplementação protéica na dieta dos animais, o que onera os custos de produção, tornando a atividade antieconômica (OLIVEIRA et al., 2005a).

O enriquecimento protéico de produtos naturais por bioprocessos em meio semi-sólido, permite obter ração animal com valor nutritivo adequado. A diversificação de substratos utilizáveis na fermentação semi-sólida, incluindo resíduos agrícolas e industriais, contribui também para minimizar os problemas de poluição no meio ambiente (CAMPOS, 2003).

A produção de alimentos de origem animal, rico em proteínas, vitaminas, e minerais, pode minimizar a carência alimentar em época crítica do ano (CAMPOS, 2005).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Algaroba

A algarobeira, *Prosopis juliflora* Sw. DC pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Mimosodae*, sendo popularmente conhecida pelos nomes: algaroba, algarobeira, algarobo. As árvores adultas podem apresentar de 10 a 20 metros de altura (Figura 1)



Figura 1- Algarobeira (Fonte: http://rubensmr-campos.blogspot.com/2009_11_01_archive.html)

Na Figura 2, são visualizados os frutos da algarobeira, que são vagens amarelas, onde as sementes estão contidas no seu interior. Suas sementes chegam a 2 centímetros e suas folhas são compostas, bipinadas.



Figura 2- Vagens da Algaroba.

Esta leguminosa, originária dos Andes no Peru, espalhou-se pelo México, sudoeste dos Estados Unidos, Índia, África do Sul, Austrália, Jamaica e Havaí (www.redetec.org.br, 2010). Foi introduzida no Brasil na década de 40. A algaroba (*Prosopis juliflora*) é uma leguminosa com alto teor de proteínas, fibras, sais minerais e açúcares; adaptou-se às condições climáticas do semi-árido nordestino e possui grande potencial de produção de vagens que, se exploradas adequadamente, através de processos de biotransformação, podem ser obtidos produtos de alto valor agregado.

Segundo Negreiros et al (1987), citados por Borges (2004), suas vagens são compridas, achatadas e em geral, levemente curvadas, apresentam elevado valor nutritivo e 77% de digestibilidade in vitro. Silva et al (2001) mencionam a excelente palatabilidade da algaroba, que apresenta de 25 a 28% de glicose, 11 a 17% de amido, 7 a 11% de proteínas, 14 a 20% de ácidos orgânicos, pectinas e demais substâncias. Segundo Borges (2004), possuem em média 219 mm de comprimento por 13,4 mm de largura e pesam, em média, 10,5 g. As sementes correspondem a cerca de 7 % do peso das vagens.

Dessa forma, a algarobeira concentra seu valor nutritivo nas vagens (frutos), constituindo uma rica fonte de carboidratos com valores de energia bruta comparáveis aos do milho (STEIN et al, 2005). Almeida et al. (2008) afirmam que o farelo da vagem de algaroba mostrou-se um alimento alternativo de destaque. A algarobeira também é utilizada em reflorestamento, produção de madeira, carvão vegetal, estacas e apicultura, além de alimentação animal (ALMEIDA et al, 2008).

No gênero *Prosopis*, algumas espécies já foram descritas como extremamente agressivas e outras são efetivamente invasoras (National Academy of Sciences, 1980). Segundo Pasiecznik (2001), quase todas as espécies de *Prosopis* podem sobreviver em áreas com baixa pluviosidade e períodos secos muito prolongados, o que facilita o estabelecimento em locais inóspitos.

É uma planta de crescimento rápido capaz de criar um microclima que reduz a evaporação do solo, altamente recomendável para o reflorestamento de regiões castigadas por longas estiagens. Além de possuir um vigoroso sistema radicular que impede as erosões, a algarobeira é um excelente adubo verde para os solos mais pobres.

Segundo Jardim (1976), as vagens são palatáveis, em função do elevado teor de açúcares, podendo ser utilizadas em misturas de concentrados, além de apresentar

elevado valor nutritivo. Salienta-se o valor forrageiro em suas ramas e frutos, sendo bastante apreciados pelos animais.

Nas regiões onde a planta é nativa, suas vagens fazem parte da alimentação do homem desde a pré-história, tendo como uma das suas principais características, a qualidade protéica, comparando-se a outros alimentos do semi-árido (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação do conteúdo protéico das vagens e folhas da *Prosopis sp.* com outros alimentos comuns das regiões áridas do Brasil.

Alimentos	Proteína (%)
Vagens de <i>Prosopis juliflora</i>	12,9
Folhas de <i>Prosopis juliflora</i>	13,6
Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	1,6
Milho (<i>Zea mays</i>)	6,0
Alfafa (<i>Medicago sativa</i>)	14,1
Capim da Guinéa (<i>Panicum maximum</i>)	2,6
Pineless cactus (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	0,4

Fonte: Adaptado por Borges (2004).

A composição química e o valor energético das vagens de Algaroba podem variar de acordo com o local onde é produzida, mas de forma geral apresenta elevados teores de carboidratos e lipídeos e menores teores de proteínas. Possibilita o amplo emprego na alimentação animal e humana, tendo em vista que seu valor nutritivo é similar ou superior ao de outras leguminosas comumente utilizadas como ingredientes nas dietas (SILVA e AZEVEDO, 1998).

Segundo Silva et al (2007) a concentração de açúcares totais na farinha é de algaroba de 56,5 g.100 g⁻¹, valor que somado à concentração de fibras, totaliza 63,7 g.100 g⁻¹ de carboidratos (Tabela 2). Fatores como condições de cultivo e solo, pode variar a composição da farinha de Algaroba.

Tabela 2. Composição físico-química da farinha de algaroba

Análises	g.100 g ⁻¹
Umidade	5,8±0,9
Açúcares totais	56,5± 0,4
Açúcares redutores	4,6±0,3
Fibra alimentar total	7,2±0,5
Proteína	9,0±1,5
Cinzas	3,6±0,1
Extrato estéreo	2,1±1,3
Tanino	0,3±0,0

Fonte: Adaptado Silva et al, 2007.

A partir do conteúdo em cinzas detectado (3,6 g 100 g⁻¹), Silva et al (2007) determinaram as concentrações de alguns dos minerais presentes na farinha de algaroba (Tabela 3).

Tabela 3. Minerais presentes na farinha de algaroba.

Minerais	mg.100 g⁻¹
Cálcio (Ca)	390,00
Fósforo (P)	749,00
Magnésio (Mg)	173,00
Ferro(Fe)	11,00
Zinco (Zn)	0,20
Sódio (Na)	1,20
Potássio (K)	0,66
Manganês (Mn)	0,19
Silício (Si)	0,52
Alumínio (Al)	330,00
Cobre (Cu)	32,50

Fonte: Adaptado Silva et al, 2007.

Pelas análises da farinha de algaroba apresentadas, observa-se que o teor de proteína é muito baixa (9,0%). Segundo Silva et al. (2002), toda a produção brasileira de vagem de algaroba se concentra na região nordeste, num montante superior a 1 milhão de toneladas, com rendimento bruto do produto *in natura* superior a 12 milhões de dólares, sendo pequena parte desta produção destinada para a produção da farinha integral de vagem de algaroba (FVA).

Devido aos problemas de deficiência protéica - calórico, de superpopulação e escassez de alimentos, as leguminosas comestíveis assumem, cada vez mais, importância significativa nas dietas, contribuindo para a redução da má nutrição protéica prevalente nos países subdesenvolvidos (BRAGA, 2003).

2.2 Leveduras

Leveduras são fungos unicelulares com reprodução vegetativa por brotamento ou fissão binária (Figura 3). São largamente encontradas na natureza: são comuns no solo, nas superfícies de órgãos dos vegetais, principalmente em flores e frutos, no trato intestinal de animais, em líquidos açucarados, e numa grande série de outros locais.

Podem apresentar células com formas arredondadas, ovais ou elípticas, porém variam consideravelmente no que se referem às suas dimensões, com limites desde 1 a 5 μm de largura e 5 a 12 μm de comprimento.(Figura 4).



Figura 3- Forma de Reprodução das Leveduras (Fonte: <http://essa.blogspot.com/2007>)

Contudo, essa distinção varia de acordo com cada espécie, pois mesmo em culturas puras, há consideráveis variações de tamanho e de forma das células individuais, dependendo da idade e do ambiente.

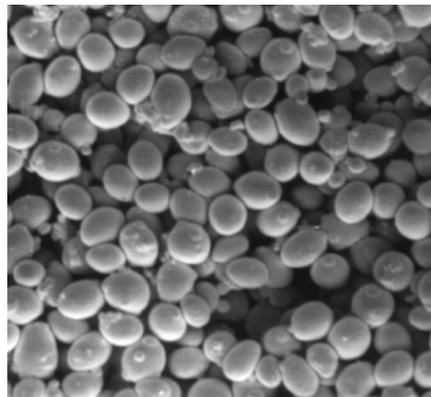


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de células de *Saccharomyces cerevisiae* - 3000x (Fonte: ALBERTINI, 2001).

Suas principais estruturas são compostas de parede celular, membrana citoplasmática, retículos endoplasmáticos, organelas relacionadas, mitocôndrias, núcleo e vacúolos (Figura 05).

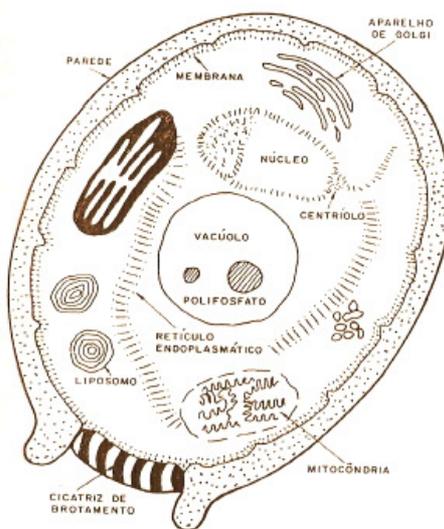


Figura 5- Estrutura de uma Levedura típica, como as de *Saccharomyces Cerevisiae*.

Quanto à composição química das leveduras, elas apresentam de 68% a 83% de água, além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais, entre outros. Como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos importantes, indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono e nitrogênio, oxigênio e minerais (TORTORA et al, 2002). A maioria das leveduras são organismos saprófitas, entretanto, existem espécies patogênicas.

A biomassa de leveduras pode ser utilizada tanto integralmente quanto apenas alguns de seus componentes. Para isso são empregadas diferentes técnicas com a finalidade de se obter o produto final desejado (VILELA et al, 2000). Destaca-se ainda, dentre os microrganismos, como produtores de proteínas, podendo ser utilizadas na nutrição humana, não apenas como fonte protéica como também devido a teores adequados de vitaminas do complexo B; apresenta em termos de digestibilidade e valor biológico, em torno de 87%, relativamente altos quando comparados aos totais do ovo de galinha, da ordem de 96% (PEPPLER, 1970).

Nas tabelas 4, 5 e 6 são apresentados, de modo geral, a composição de células de levedura, onde o autor compara resultados obtidos da composição do microrganismo encontrados na literatura.

Tabela 4. Composição química da célula de levedura.

Componente (%)	Leveduras em geral (KHILBERG, 1972)	Levedura de cervejaria (CABALLERO CORDOBA et al,1997)
Nitrogênio	7,5 – 9,0	-
Proteína Bruta	47,0 – 56,0	48,5
Ácido Nucléico	12,0	7,52 (ribonucléico)
Cinzas	5,0 – 9,5	8,33
Lipídios	2,0 – 6,0	3,44
Fibra Solúvel	-	9,59

Fonte: Adaptado Pepler, 1970

Tabela 5. Composição aminoacídica da célula de levedura.

Aminoácidos	g/16g N
Lisina	8,43
Valina	6,67
Leucina	8,13
Isoleucina	5,19
Treonina	5,20
Metionina	1,63
Cistina	1,60
Fenilalanina	4,50
Triptofano	1,10
Histidina	3,14
Tirosina	4,87
Arginina	5,34

Fonte: Adaptado Pepler, 1970

Tabela 6. Caracterização e quantificação do nitrogênio presente na célula de levedura.

Componentes que apresentam N	(%)
Aminoácidos	80
Ácidos Nucléicos	12
Amônia, vitaminas e enzimas	8

Fonte: Adaptado Pepler, 1970

A obtenção de proteína unicelular de leveduras ocorre pela conversão dos carboidratos presentes na matéria-prima em biomassa celular, através de um bioprocesso agitado e aerado. O metabolismo está resumido nas Figuras 6. Os carboidratos considerados substratos para fermentação tanto podem ser endógenos (constituintes de leveduras, como glicogênio e trealose); como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros) que fornece energia a levedura (LIMA et al, 2001). As unidades estruturais ativadas são unidas uma a outra para formar substâncias complexas que se tornam parte estrutural ou funcional da célula, como observa-se na Figura 7.

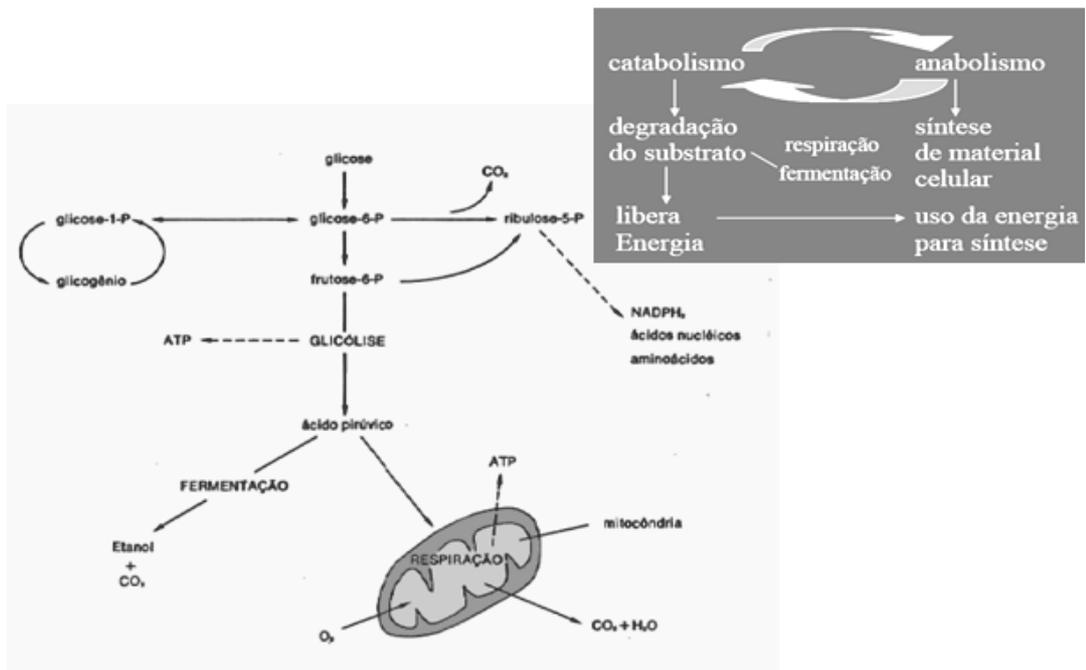


Figura 6- Via Metabólica (Fonte: Adaptado www.fcav.unesp.br/agentesdafermentacaoshow.pdf, 2009).

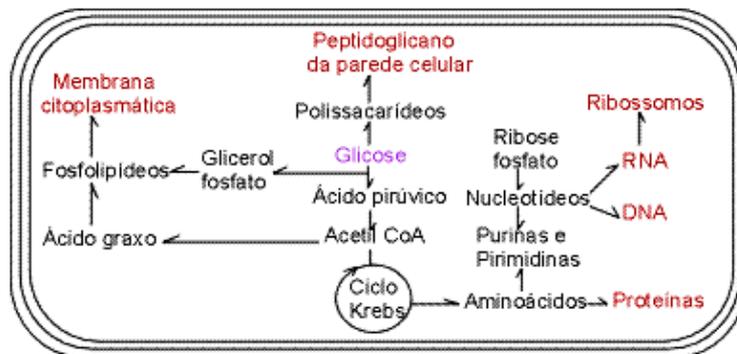


Figura 7- Biossíntese protéica (Fonte: Adaptado www.livronline.com/capitulos/cap8.html, 2009).

Os microrganismos, como os fungos, são considerados fonte unicelular de elevado teor protéico, além de apresentarem rápido crescimento e possibilidade de cultivo em vários tipos de substratos, podendo substituir os produtos protéicos existentes, sendo inserido dessa forma na indústria de alimentação animal. Os preços dos suplementos protéicos aumentam de forma abusiva freqüentemente, existindo um grande interesse pelo aproveitamento destes alimentos não convencionais no Brasil (BUTOLO, 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo atrativo de se trabalhar por ser não-patogênico; devido à sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o etanol e o pão, foi classificada como *microrganismo geralmente considerado seguro* (GRAS – generally regarded as safe) (OSTERGAARD et al, 2000), podendo dessa forma, ser aplicada para alimentação animal.

Pesquisas na área de nutrição de ruminantes têm evidenciado a importância da população microbiana tanto na digestão de carboidratos como na contribuição da proteína microbiana para suprir os requisitos da proteína animal. Cerca de 70 a 85% da matéria seca (MS) digestível da ração são digeridos pelos microrganismos ruminais, produzindo células microbianas, amônia, metano, dióxido de carbono e ácidos graxos voláteis (SILVA e LEÃO, 1979). Dessa forma, a digestibilidade do alimento irá refletir sobre seu aproveitamento pelos microrganismos do rúmen e expressar a capacidade do animal em utilizar, em maior ou menor escala, seus nutrientes.

2.3 Proteínas

São polímeros de alto peso molecular, cujas unidades básicas são aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (Figura 8). É possível encontrar proteína em praticamente todo maquinário celular, exercendo papel fundamental estrutural e funcional. Essas moléculas orgânicas são encontradas em abundância, podendo constituir em média 50% do peso seco de algumas células.

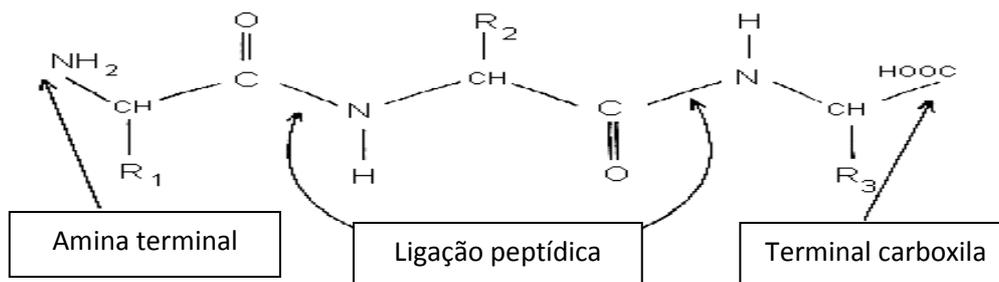


Figura 8- Estrutura primária de proteínas.

De maneira geral, as proteínas desempenham nos seres vivos as seguintes funções: estrutural, enzimática, hormonal, de defesa, nutritiva, coagulação sanguínea e transporte.

As funções do organismo estão diretamente relacionadas às proteínas, atuando como, por exemplo, na forma de enzima, catalisando todas as reações metabólicas e habilitando o organismo a construir outras moléculas necessárias à vida.

As proteínas desempenham papel na manutenção, no reparo e no crescimento dos tecidos corporais, podendo inclusive ser fonte de energia alimentar. Quando as reservas de glicogênio estão reduzidas, a produção de glicose começa a ser realizada a partir da proteína. Isto acontece muito no exercício prolongado e de resistência. Conseqüentemente há redução temporária nas "reservas" corporais de proteína muscular. Em condições extremas, pode causar redução significativa no tecido magro (perda de massa muscular) (PINHEIRO, 2005).

Os compostos nitrogenados que entram na formação das proteínas são conhecidos como aminoácidos (aas) (Figura 9), compostos orgânicos que contêm grupo ácido (carboxílico) e amínico.

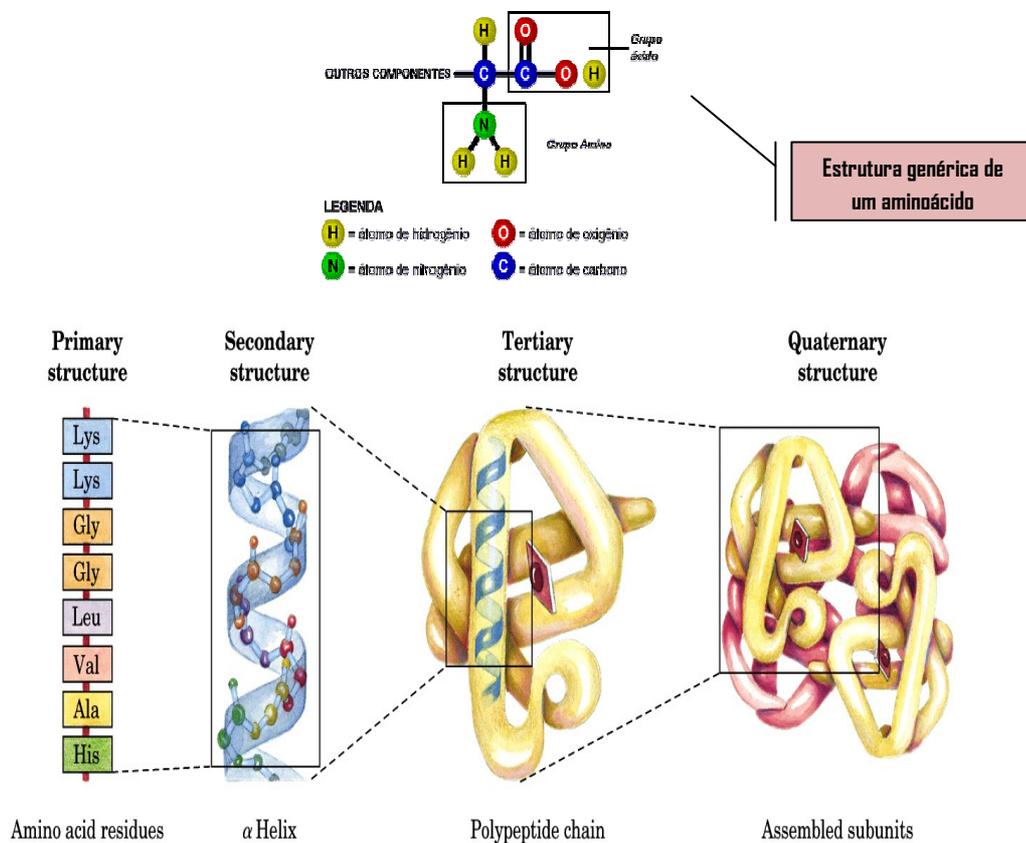


Figura 9- Níveis de organização das estruturas protéicas (Fonte: LEHINGER, 2004).

Segundo Aquarone et al. (2001), o valor nutricional de uma proteína é determinado através da análise dos aminoácidos presentes, destacando-se os teores de aminoácidos essenciais. A *Saccharomyces cerevisiae* possui em sua composição teor de proteínas pode superar 45% e sua concentração de aminoácidos essenciais, como lisina, triptofano e treonina é satisfatória. Porém, possuem menor quantidade de aminoácidos sulfurados, como a metionina e a cisteína (ROEPCKE, 2007).

A disponibilidade dos aminoácidos depende da digestibilidade das proteínas, ou seja, de sua capacidade de liberá-los. Numa forma geral a quantidade de proteínas animais ultrapassa a de proteínas vegetais. A proteína tem papel fundamental na nutrição de ruminantes, sendo sua essencialidade não apenas pelo fornecimento de aminoácidos para o animal, mas principalmente, como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana (OLIVEIRA JUNIOR et al, 2004).

A digestão é um processo de conversão de macromoléculas do alimento para compostos simples que podem ser absorvidos a partir do trato gastrointestinal. Medidas de digestibilidade têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de sistemas, a fim de descrever o valor nutritivo dos alimentos (VAN SOEST, 1994).

O valor nutricional dos concentrados protéicos decorre de sua composição centesimal, do balanceamento dos aminoácidos, da presença de vitaminas, de minerais e digestibilidade (AQUARONE et al., 2001).

2.4 Fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida (FSS) é também chamada de fermentação sólida ou em estado sólido. De um modo geral, a FSS é um processo microbiano que se desenvolve na superfície de materiais sólidos, que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Estes materiais sólidos podem ser biodegradáveis ou não. Para a FSS, é necessário que os microrganismos cresçam com nutrientes difusíveis sob ou sobre a interface líquido-sólido (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997 citado por MUNIZ, 2009).

Segundo Moraes (2001), citado por Campos (2003), a fermentação semi-sólida apresenta diversas vantagens, quando comparada ao processo de fermentação submersa, devido a seus aspectos físico-químicos, especialmente sua reduzida necessidade de água, tornando o processo mais produtivo e baixo investimento de capital e energia requerida.

A maioria dos processos fermentativos semi-sólidos tem como princípio que o suporte sólido atua também como alternativa nutritiva, já que nesse tipo de fermentação normalmente existem dois tipos de materiais insolúveis em água, onde os microorganismos crescerão.

Dentre os microrganismos utilizados em fermentação em meio semi-sólido têm-se destacado a *Saccharomyces cerevisiae* como excelente fonte de proteínas, não apresenta características patogênicas, podendo ser usada como alimento humano e animal (RODRIGUES, 2001).

A produção industrial em larga escala de biomassa fúngica apresenta inúmeras vantagens, quando comparada aos métodos tradicionais para a produção de proteínas. As vantagens mais características são: a alta velocidade de crescimento; alto conteúdo de proteína, que em peso seco pode atingir valores entre 50-55%; pode ser utilizada grande diversidade de fontes de carbono alternativas, entre elas os resíduos agroindustriais; as instalações para a produção de proteínas fúngicas ocupam pequenas áreas e resultam em alta produção; a produção microbiana independe das variações climáticas (SILVEIRA e FURLONG, 2007).

Em escala laboratorial, para a fermentação semi-sólida (FSS), normalmente utilizam-se bandejas (Figura 10), cuja localização deve ser apropriada para desenvolvimento da fermentação. A relação volume de substrato e dimensão do fermentador deve ser mantida de modo a favorecer a aeração.

Para dimensionar o reator, segundo Schmidell et al.(2001), verifica-se primeiro a escala laboratorial, mas atento a parâmetros que não são compatíveis em escala industrial, como efeitos de espessura da camada, compactação do substrato, taxa de aeração e da dissipação de calor.



Figura 10- Fermentação semi-sólida em bandeja (Fonte: MUNIZ, 2009).

Outras vantagens do enriquecimento protéico em meio semi-sólido, em relação à fermentação submersa:

- Obtenção de produtos concentrados (que facilitam a extração);
- Baixo teor de umidade dos substratos (que propicia o crescimento de fungos filamentosos e leveduras).

A diversificação de substratos utilizáveis na fermentação semi-sólida inclusive resíduos agrícolas e industriais, contribui também para minimizar os problemas de poluição no meio ambiente.

2.5 Concentrado protéico

Para aplicação na indústria alimentícia são desenvolvidas pesquisas de fontes protéicas não-convencionais. A necessidade de se empregar recursos naturais, retirando-os do próprio meio, com a finalidade de utilizar ou preservar a vegetação, vai de encontro ao desejo social de iniciativas que, simultaneamente, conservem estes recursos e forneçam produtos mais saudáveis sem comprometer os níveis tecnológicos, resultando em uma prática agrícola que não prejudique o meio ambiente e a saúde (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2000).

Durante os longos períodos de estiagens, escassez alimentícia para animais, na tentativa de superar tais problemas, os criadores recorrem ao uso de concentrados comerciais para suplementação protéica na dieta dos animais, o que onera substancialmente os custos de produção, tornando a atividade antieconômica (BUTOLO, 2001).

O maior problema da utilização de alimentos ricos em proteínas é o seu elevado custo. Uma vez que o produtor possa enriquecer com proteína as forragens que dispõem em sua propriedade, os custos da alimentação protéica diminuirão, pois não haverá despesas com transporte de ração e estará utilizando apenas material produzido em sua fazenda (PERAZZO NETO (1999) citado por ARAÚJO et al (2009)).

Segundo Madruga et al (2004), alimentos de origem vegetal tem importância também para populações mais carentes, podendo servir como suplemento alimentar. Sabe-se que as leguminosas, geralmente, apresentam considerável valor nutritivo e têm sido empregadas na nutrição humana e animal por serem uma boa fonte protéica (BRAGA, 2003).

Para tentar resolver problema no período seco, os produtores fornecem suplementação alimentar a base de grãos e cereais aos rebanhos (REBOUÇAS, 2007). Porém, a maioria das espécies que compõem a base da suplementação não são adaptadas às condições climáticas do nordeste brasileiro e acabam onerando os custos de produção. A alimentação racional dos ruminantes visa fornecer os nutrientes capazes de manter e assegurar as exigências de sua manutenção e o nível de produção pretendido.

A digestibilidade dos nutrientes da ração fornece, em outras palavras, uma idéia da capacidade do alimento em ser aproveitado pelo animal (LIMA JUNIOR, 2006) e pode ser influenciada por vários fatores, dentre os quais, a composição química da ração e a interação entre os alimentos que a compõe.

As vagens de algaroba utilizadas como uma das principais fontes alimentares animais; suas favas podem causar intoxicação, pois contêm alcalóides piperidínicos, mas é incerto se essas substâncias são responsáveis por distúrbios neurológicos, que é a lesão primária da intoxicação (TABOSA et al, 2002).

Os alcalóides são substâncias de caráter alcalino que ocorrem naturalmente, sobretudo nas angiospermas e são originados, geralmente, a partir de aminoácidos. Esses compostos podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, porém há locais onde ocorre acúmulo preferencial, como por exemplo, nos tecidos em crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (COSTA, 2008). As vagens, quando secas em estufa, eliminam esse alcalóide, desintoxicando material proveniente da mesma.

Uma forma de reduzir os custos de alimentação e contornar o problema da estacionalidade, seria fomentar a utilização de alimentos alternativos em substituição a ingredientes tradicionais dos concentrados (AGUIAR et al, 2010). Uma das alternativas que se apresenta é a utilização de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*), uma vez que essa pode substituir parcialmente o milho na formulação de concentrados, permitindo diminuição no custo de produção (REBOUÇAS, 2007).

3 OBJETIVOS

3.2 Objetivo geral

Obtenção de produto à base de algaroba, enriquecido via biotransformação, através da ação de *Saccharomyces cerevisiae*, com a finalidade de suprir as necessidades nutritivas dos animais.

3.3 Objetivos específicos

- Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com alto teor protéico;
- Avaliação do enriquecimento protéico de vagens algaroba pela linhagem selecionada;
- Efeito de parâmetros de processo no enriquecimento protéico (matéria prima, pH e extrato de levedura);
- Padronização de parâmetros de processo através de planejamento experimental.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Derivados da Cana-de-Açúcar (LDCA), localizado na Unidade Acadêmica Centro de Tecnologia (UACTEC), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4.1 Matéria prima

As vagens coletadas maduras ainda na planta ou após sua queda natural na região semi-árida da cidade de Delmiro Gouveia - AL foram levadas ao laboratório, para seleção, excluindo-se as que apresentaram infestações por pragas, danos mecânicos, mofo e atrofiamento, entre outros defeitos. Em seguida, foram colocadas durante 24hs em estufa a 80°C, com intuito de eliminar a toxina existente nas leguminosas e facilitar a trituração. Após o tempo estabelecido, as vagens foram trituradas em liquidificador industrial onde, mesmo após este procedimento, as sementes foram mantidas intactas. O material obtido foi utilizado para a fermentação.

Este procedimento foi descrito por Negreiros (1992), citado por Borges (2004), que estudando fontes alternativas de alimentos, obteve farinha e xarope a partir das vagens da algaroba. Com relação aos prováveis fatores antinutricionais existentes na vagem desta leguminosa, tais como inibidores de tripsina e quimiotripsina, o mesmo autor encontrou elevados teores nas sementes, baixos teores na vagem inteira não processada e ausência dos mesmos na farinha de algaroba. Mantendo as sementes intactas, reduz-se ainda mais a possibilidade de liberação de substâncias antinutricionais eventualmente presentes no interior das sementes.

4.2 Seleção de linhagens de leveduras com alto teor protéico

Foram utilizadas 3 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de destilarias da região Nordeste e designadas por USCL (Usina Santa Clodildes), UTRI (Usina Triunfo) e UPMT (Usina Pumaty). As linhagens foram cedidas pelo Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS/UFAL.

4.2.1 Preparo do inóculo.

Para o preparo dos inóculos os micro-organismos foram cultivados em Erlenmeyers contendo 100mL de meio de cultura YEPD (MARTINS, 1998), a temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ /24 horas sob agitação de 125 rpm em agitador Modelo TE-421 – Tecnal. Após crescimento as células dos micro-organismos foram quantificadas, após tratamento com azul de metileno, utilizando-se Microscópio Nikon, modelo Eclipse E-200. Estes ensaios objetivaram a obtenção de suspensão de células padronizadas a serem utilizadas como inóculo para a determinação da cinética do crescimento das leveduras.

4.2.2 Determinação da cinética de crescimento das linhagens de leveduras.

Os cultivos dos micro-organismos foram conduzidos em Erlenmeyers de 500mL contendo 100mL do meio de cultura YEPD (MARTINS, 1998) inoculados com um volume que correspondia a aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células de leveduras vivas/mL, padronizada para todos os ensaios. Após a inoculação os Erlenmeyers foram colocados em agitadores a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 125 rpm. Durante o crescimento, amostras de 15 mL foram coletadas em intervalos de 2 horas, até o final do processo. Foram realizadas quantificações das concentrações dos Açúcares Redutores Totais (ART), e contagens de células. O final do processo foi definido quando se obteve resultados consecutivos de absorbância próximos entre si durante as 3 últimas amostragens, indicando a exaustão do substrato e estabilização do crescimento das leveduras. Para cada linhagem foram conduzidos 3 experimentos.

Quando o crescimento atingiu a estabilidade, centrifugou-se o material restante nos reatores e, após lavagens, as células foram suspensas em 30 mL de água destilada, sendo então encaminhadas para análise de peso seco, obtido quando da determinação da umidade da amostra.

4.2.3 Determinação do teor protéico das amostras de UTRI, UPMT e USCL.

Após os experimentos para avaliação cinética de crescimento, foi feita avaliação protéica das mesmas, seguindo o seguinte procedimento.

Inicialmente as linhagens dos micro-organismos foram cultivadas em 100ml de meio de mosto, contidos em Erlenmeyer de 500 mL, por um período de 24hs. Após esse procedimento, o meio fermentado foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e, o sedimentado ressuspenso para determinação de proteína bruta e umidade.

4.3 Padronização de parâmetros de processo através de planejamento experimental

Foi realizado um Planejamento Experimental 3^3 , utilizando-se três variáveis (massa de algaroba, valor de pH e teor de extrato de lêvedo), a fim de verificar a influência destes parâmetros no enriquecimento da farinha da Algaroba, conforme Tabela 07. Adotou-se como resposta o teor seco de proteína bruta. Os resultados obtidos para o tempo de 48 e 96 horas foram avaliados estatisticamente pelo software *Design Expert 7.1.5*.

Tabela 7. Efeito de parâmetros de processo no enriquecimento protéico.

Experimentos	Massa de Matéria Prima (g/reator)	pH	Concentração de Extrato de Lêvedo (%)
1	47	4,5	0,10
2	94	4,5	0,10
3	141	4,5	0,10
4	47	5,5	0,10
5	94	5,5	0,10
6	141	5,5	0,10
7	47	7,0	0,10
8	94	7,0	0,10
9	141	7,0	0,10
10	47	4,5	0,20
11	94	4,5	0,20
12	141	4,5	0,20
13	47	5,5	0,20
14	94	5,5	0,20
15	141	5,5	0,20
16	47	7,0	0,20
17	94	7,0	0,20
18	141	7,0	0,20
19	47	4,5	0,30
20	94	4,5	0,30
21	141	4,5	0,30
22	47	5,5	0,30
23	94	5,5	0,30
24	141	5,5	0,30
25	47	7,0	0,30
26	94	7,0	0,30
27	141	7,0	0,30

Os experimentos foram conduzidos em bandejas de PVC medindo 10 x 17,5 cm e altura de 4,3 cm. A distribuição de matéria - prima no reator foi feita de acordo com a Tabela 8, onde para cada série utilizou-se 3 bandejas com espessuras diferentes e mesma concentração celular (10^6 UFC/mL).

Para preparação do inóculo, transferiu-se uma alçada de levedura conservada em meio de cultura sólido, para 100mL de meio YEPD (MARTINS, 1998) contido em Erlenmeyer de 500mL. Após inoculação, o Erlenmeyer foi colocado na Incubadora Refrigerada com Agitação Orbital (Shaker) – Modelo TE- 421 – Tecnal durante 24 hs. Após esse tempo, o meio apresentou aproximadamente 10^6 leveduras vivas/mL. Utilizou-se 100ml desse cultivo para inoculação de cada reator contendo o meio a base da mistura com a algaroba triturada.

Durante o processo fermentativo foram retiradas amostras com 0, 24, 48, 72 e 96 h, para as determinações analíticas. Verificou-se que, após 24 horas de fermentação, o meio apresentou-se com baixa umidade, sendo necessária a adição de cerca de 20 mL de água.

Tabela 8. Distribuição da Algaroba no reator

	Altura do substrato (cm)	Massa de substrato(g)
Bandeja 1	1,5	47
Bandeja 2	2,0	94
Bandeja 3	2,5	141

4.4 Determinações Analíticas

4.4.1 Viabilidade celular

O método consistiu em contagem celular direta em câmara de Neubauer, utilizando-se microscópio NIKON, modelo Eclipse E-200. Estimou-se a proporção de células viáveis, e em paralelo, pode-se observar a morfologia celular (ANTONINI, 2004). As células foram coradas com azul de metileno considerando-se mortas as células azuladas e vivas as com coloração normal, conforme se verifica na Figura 11.

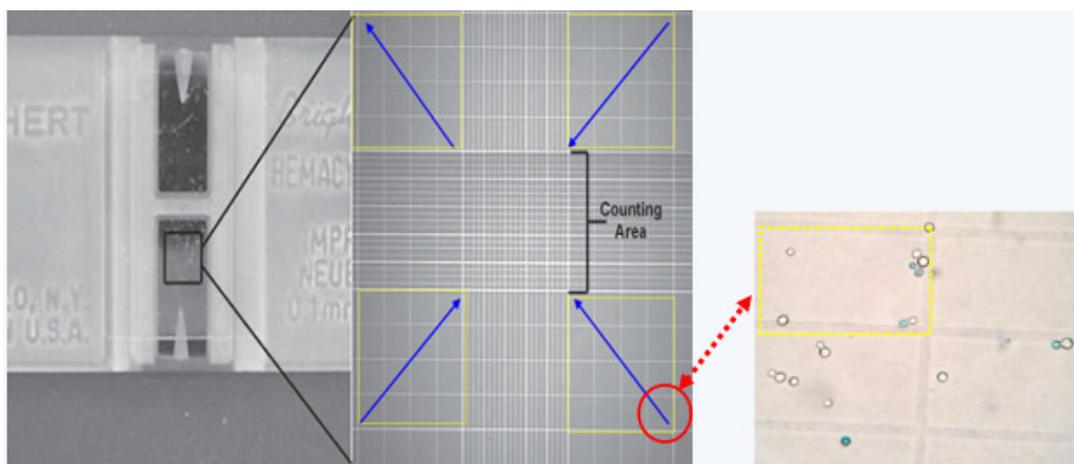


Figura 11- Câmara de Neubauer, evidenciando-se, em azul, os quadrados contados, assim como as células coradas (mortas) e não coradas (vivas) pelo azul de metileno

4.4.2 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART).

A determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART) foi feita pelo método volumétrico de Lane e Eynon (1950), que consiste na determinação dos Açúcares Redutores originalmente presentes na amostra a ser analisada mais os Açúcares Redutores provenientes da hidrólise da sacarose. A soma desses açúcares passa a ser denominada de Açúcares Redutores Totais.

4.4.3 Quantificação celular através de Absorbância

- Retirou-se uma alíquota de 15 mL do meio em fermentação, centrifugou-se em Centrífuga Excelsa II – Modelo 206 MP – FANEM, com rotação 3000 rpm, durante 10 minutos.
- Após a centrifugação, utilizou-se o sobrenadante para análise de ART; a biomassa sedimentada foi ressuspensa em água destilada, e, novamente, à centrifugada. Este procedimento foi repetido 3 vezes para garantir a lavagem das células. O material centrifugado foi diluído e quantificado por espectrofotometria à **480 nm**.

4.4.4 Umidade

A umidade representa a quantidade de água contida nos alimentos, que normalmente a contém em diversas proporções. O procedimento consistiu em aquecer diretamente a amostra a 105°C, fazendo com que a umidade da amostra seja retirada através de volatilização, causada pelo calor (AOAC, 1992). Após o período de secagem o que sobra é a matéria seca e a partir de seu peso final se tem a quantidade de umidade contida na amostra.

4.4.5 Quantificação celular através da contagem de unidades formadoras de colônia (ufc).

As contagens de ufc foram realizadas cultivando-se os micro-organismos em placas de Petri contendo o Meio YEPD (MARTINS, 1998). A incubação foi a 30±1°C por 48 horas.

Este método possibilita a detecção do número de células capazes de se multiplicarem e formarem colônias (ANTONINI, 2004).

4.4.6 Determinação do pH

Para determinação de potencial hidrogeniônico (pH), utilizou-se o método potenciométrico, realizado com pHmetro digital Digimed, modelo DM20. O método consiste em medir a quantidade de íons H⁺ já dissociados, sendo dessa forma a acidez ativa, real ou atual (OLIVEIRA, 2007).

4.4.7 Determinação Nitrogênio Total – Proteína Bruta

A proteína bruta refere-se ao grupo de substâncias com estruturas semelhantes, porém com funções fisiológicas muito diferentes. Com base no fato das proteínas terem

quase que constante a porcentagem de nitrogênio, que é em torno de 16%, calcula-se por meio de fator de conversão, a proteína bruta. (QUEIROZ E SILVA, 2006).

A proteína bruta foi determinada com base no conteúdo de nitrogênio total, pelo método de Kjeldhal (AOAC, 2005).

4.4.8 Proteína Verdadeira

Foi realizada através da determinação do nitrogênio protéico pelo método R/C/2e UNILEVER RESEARCH LABORATORY COLLOWORTH (1970), conforme foi descrito por Perazzo(1999). Através deste método é possível eliminar todo conteúdo de nitrogênio não protéico, permitindo dessa forma, a determinação da proteína verdadeira pelo método Kjeldahl.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo dos microrganismos em meio sintético.

Os resultados do crescimento microbiano após 24 horas de cultura, para as 3 linhagens utilizadas, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Crescimento dos microrganismos em meio sintético.

Parâmetros	Linhagens		
	UTRI ¹	UPMT ²	USCL ³
N ⁰ de células/mL	4,2E +07	1,1E+08	7,6E+07
Viabilidade (%)	93,4%	96,1%	95,0%
Brotamento (%)	8,2%	10,3%	21,7%

¹Usina Triunfo; ²Usina Pumaty; ³Usina Santa Clotilde.

Os resultados da Tabela 9 indicaram elevadas viabilidades celulares (e de brotamento) para as 3 linhagens de leveduras utilizadas nos ensaios, destacando-se as cepas UPMT com maior viabilidade celular e USCL com maior % brotamento do que as demais. Estes valores significaram que o meio de fermentação foi adequado. Ressalte-se a grande diferença do percentual de brotamento da cepa USCL em relação às demais, que favorece maior crescimento em relação às outras leveduras utilizadas.

As linhagens apresentaram concentrações celulares superiores a 10⁶ células/mL, valores considerados para o inóculo. Em vista disso, utilizou-se volumes dos respectivos cultivos contendo 10⁶ células/mL para a determinação das cinéticas de crescimento.

Na fermentação etanólica industrial, segundo Duarte et al (2006), inicia-se a fermentação com concentração celular inicial de 10⁶ a 10⁷ células vivas/mL e no final a concentração celular atinge valores de 10 a 100 vezes maiores que o inicial (10⁸ células vivas/mL).

5.2 Cinética de crescimento das linhagens de microrganismos utilizadas

A cinética de crescimento microbiano foi realizada através de medidas espectrofotométricas e contagem total em placas conforme os itens 4.4.3. e 4.4.5 da metodologia, os resultados estão apresentados na Tabela 10 e nas Figuras 12, 13 e 14.

Tabela 10. Valores de absorbância, contagem de células e consumo de ART durante 17 horas de fermentação com linhagens de leveduras.

Tempo (h)	Linhagem								
	UTRI			UPMT			USCL		
	A _{480nm}	UFC/mL	ART (g/100mL)	A _{480nm}	UFC/mL	ART (g/100mL)	A _{480nm}	UFC/mL	ART (g/100mL)
0	0,97	9,1 E+06	6,5	0,86	8,8 E+06	6,0	1,10	7,7 E+06	6,3
2	1,60	2,7 E+07	3,7	1,45	1,6 E+07	5,0	1,74	8,5x10 ⁶	4,6
4	4,86	9,7 E+08	2,5	3,62	5,0 E+07	4,3	3,78	1,2 E+07	3,3
6	5,17	9,8 E+09	0,6	4,26	4,2 E+09	0,9	4,86	4,5 E+09	0,8
9	9,86	5,0 E+10	0,4	8,72	5,0 E+10	0,6	10,02	5,5 E+10	0,5
12	9,88	5,0 E+11	<0,2	8,77	1,0 E+11	<0,2	10,15	5,5 E+11	<0,2
17	9,94	2,5 E+12	<0,2	8,80	2,5 E+11	<0,2	10,170	5,0 E+12	<0,2

Segundo Viegas (2003), o objetivo básico do estudo da cinética dos processos microbianos é o de quantificar a taxa de crescimento celular, de consumo de substrato e formação de produtos, entre outros.

A Figura 12 apresentou os dados da absorbância com o tempo de fermentação, onde observou-se que, a partir de 12 horas, os valores tenderam a estabilização, indicando o final do processo fermentativo.

No período de 4 à 9 horas, as células estão crescendo na fase exponencial. Após esse tempo, seguindo o mesmo raciocínio, começou-se a fase de desaceleração do crescimento celular. A partir de 12 horas de processo, a fermentação alcançou o início da fase estacionária de crescimento, acompanhada até 17 horas de fermentação, quando foi considerada encerrada. Quando se avalia a variação das unidades formadoras de colônias n decorrer do processo fermentativo, notou-se que semelhante aos valores de absorbância, com 12 horas de fermentação, os resultados tenderam a estabilização (Figura 13).

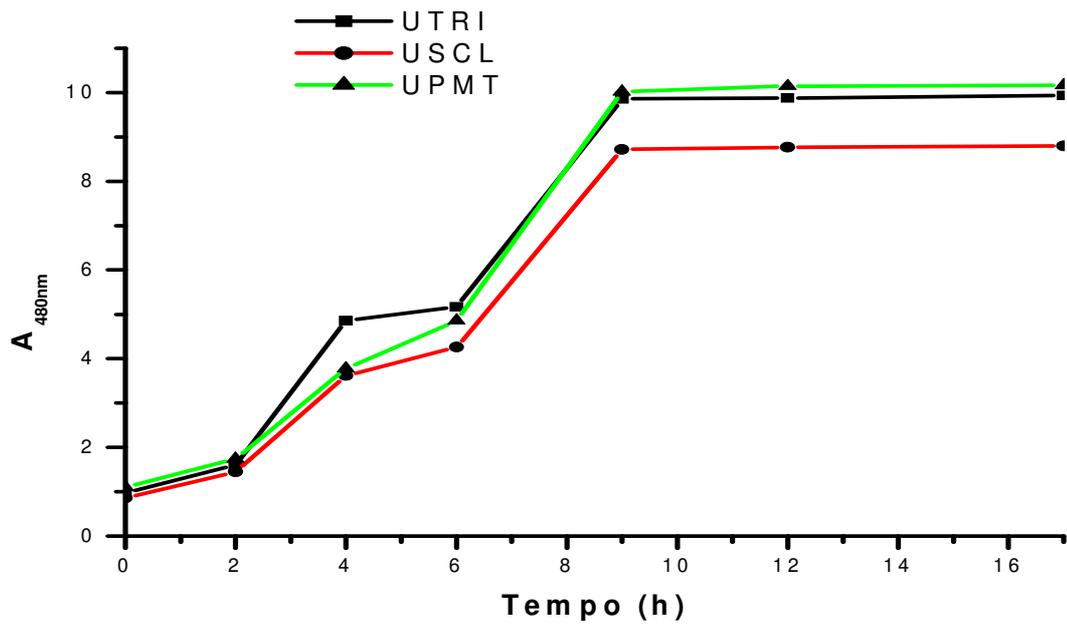


Figura 12- Crescimento do microrganismo expresso em A_{480nm} em função do tempo. Linhagens.

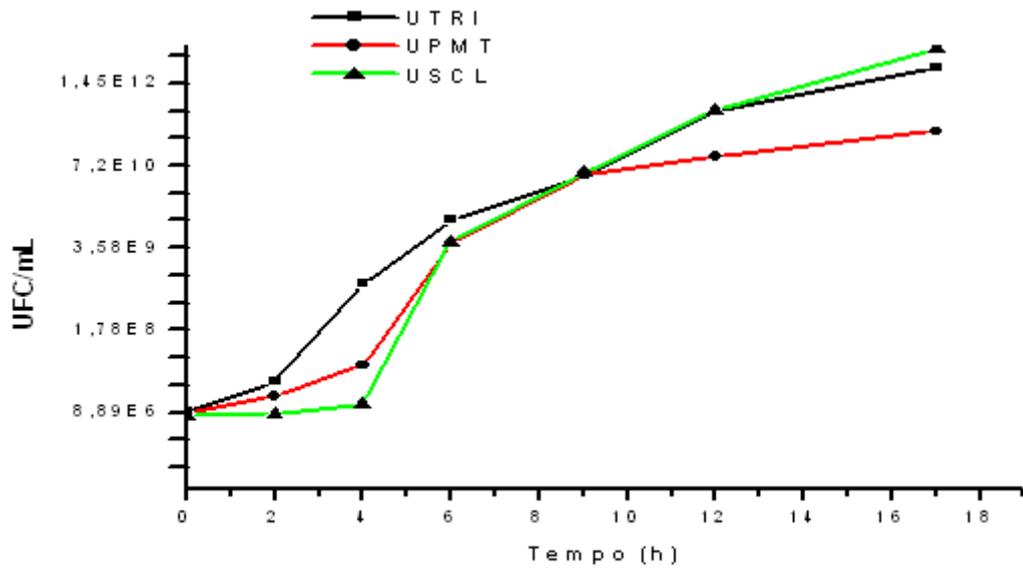


Figura 13- Quantificação das UFC durante o crescimento das diferentes linhagens.

Observando-se a Figura 14, verificou-se que o consumo de substrato foi muito elevado. Em todos os experimentos, os ART residuais foram menores que 0,2%. Guimarães (2005) realizou experimentos com 61 leveduras, onde 14 foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando como mosto suco de uva, e verificou que a glicose foi quase totalmente consumida, restando em torno de 0,5 %, em todos os processos. Ressalte-se que o consumo do substrato é acentuado nas primeiras 6 horas de fermentação. Após esse tempo, o consumo foi mais lento e, após 12 horas de fermentação, aproximou-se da estabilidade, com tendência ligeiramente decrescente constatando-se que, a fermentação se completou em aproximadamente 12 horas.

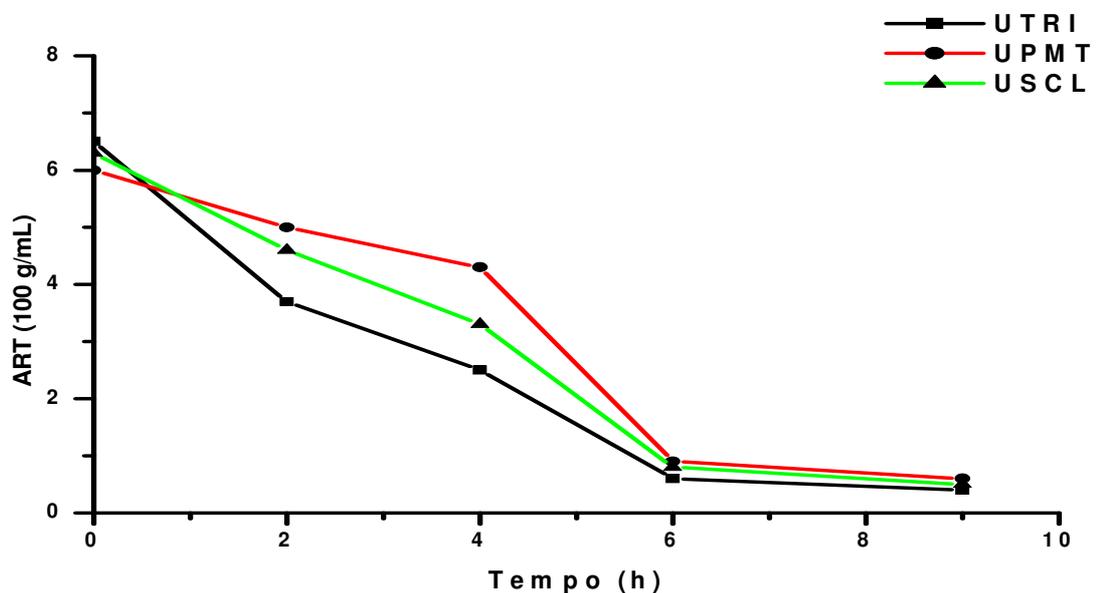


Figura 14- Consumo de substrato durante a fermentação.

Nas primeiras 6 horas, a velocidade de consumo de ART é decrescente na ordem UPMT:USCL:UTRI. Após esse tempo, o consumo praticamente se equivale nos 3 casos.

Pacheco (2010), estudando parâmetros cinéticos para fermentação alcoólica utilizando leveduras floculantes, constatou que com altas concentrações de sacarose (substrato), 200 g/L no início da fermentação ocorre uma inibição, obtendo menor rendimento ao término da fermentação, dessa forma utilizando 180 g/L se obtém melhores resultados. No presente trabalho acompanhou-se o consumo do substrato,

tendo baixa concentração inicial de açúcares no meio e, ao término do processo fermentativo, valor de açúcar residual insignificante.

A Figura 15 mostra a relação entre absorvância e peso seco para as 3 cepas estudadas. Foi elaborada para a quantificação do peso seco para as diversas absorvâncias. O comportamento é aproximadamente linear, conforme esperado.

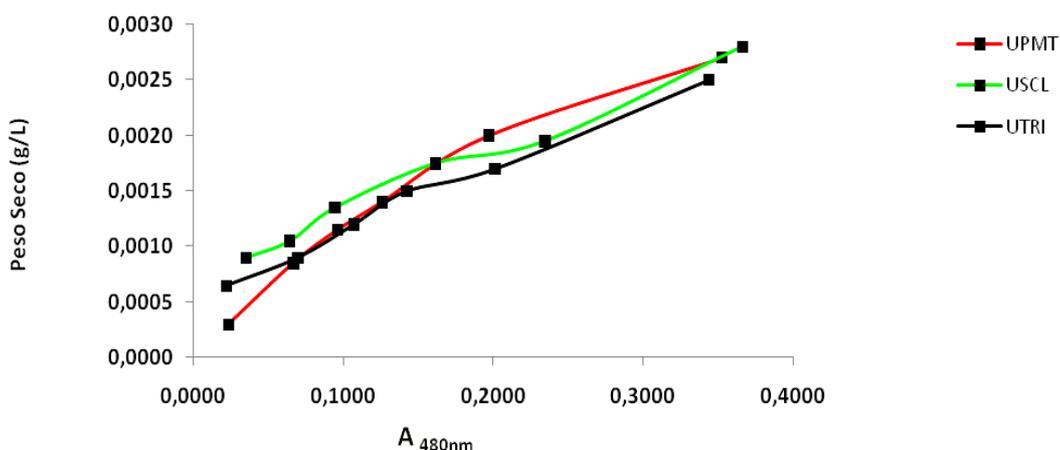


Figura 15- Relação entre peso seco e A_{480nm} .

Para a elaboração da curva do crescimento microbiano, foram feitas 6 diluições nas amostras das 3 cepas utilizadas, objetivando selecionar ampla faixa de valores das concentrações celulares em função da absorvância. Este gráfico é muito importante para o estudo cinético do processo de enriquecimento.

A partir da relação peso seco e absorvância, obtêm a curva, onde foram feitas as leituras de absorvância nas diversas amostras durante o processo de fermentação e, por interpolação, obtidos os respectivos valores do peso seco celular. Os valores de peso de células secas e A_{480} , para o final das fermentações são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de peso seco de células e A_{480} para as 3 cepas estudadas.

Linhagem	A_{480nm}
----------	-------------

	Peso seco mg/L	
UPMT	27	0,352
USCL	28	0,366
UTRI	25	0,343

Os teores protéicos das células dos micro-organismos testados estão mostrados na tabela 12. De acordo com os resultados experimentais obtidos, pode-se verificar que a cepa que apresentou maior concentração de proteína foi a UTRI.

Segundo a Tabela 9, o percentual de brotamento da cepa USCL foi cerca de 3 vezes maior que o da cepa UTRI. Porém, como esta apresentou teor protéico superior às demais, foi a selecionada para os experimentos de enriquecimento protéico da algaroba.

Tabela 12. Teor protéico (base seca) das 3 cepas de levedura.

Linhagem	Proteína bruta (%)
UPMT	17,88
UTRI	19,58
USCL	16,15

5.2.1 Parâmetros cinéticos da Linhagem UTRI.

A curva de crescimento da linhagem UTRI (Figura 16). Demonstrou que a fase exponencial de crescimento estava compreendida entre 2 e 9 horas. A velocidade específica de crescimento (μ_x), fator de rendimento células/substrato consumido ($\gamma_{x/s}$) e o tempo de geração (t_g), foram, respectivamente, $0,1569 \text{ h}^{-1}$, $0,103 \text{ g.g}^{-1}$ e 4,42 horas.

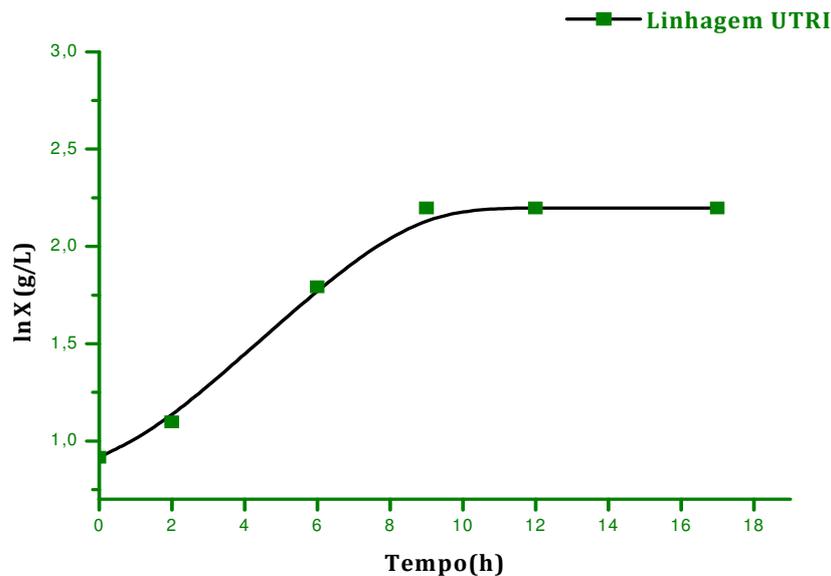


Figura 16- Curva de crescimento da linhagem UTRI.

Muniz (2009), quando utilizou *Saccharomyces cerevisiae* para elaborar fermentado alcoólico a partir de Algaroba obteve, no intervalo de 2 a 18 horas de fermentação, o rendimento em biomassa de $0,055 \text{ g.g}^{-1}$, valor igual ao obtido por Almeida et al. (2009), estudando a preparação de fermentado do mandacaru. Os resultados obtidos pelos autores citados foram inferiores ao do presente trabalho.

Muniz (2009) obteve velocidade específica que variou de $0,968$ a $0,598 \text{ h}^{-1}$, valores superiores ao encontrado no presente trabalho. O autor descreve em seu trabalho que Andrietta & Stuppiello (1990), estudando a avaliação da influência da velocidade de alimentação sobre o rendimento e a produtividade dos processos de produção de etanol em batelada alimentada, com a adição de 20% de cepa da levedura Y904, chegaram a um $\mu_{\text{máx}}$ de $0,45 \text{ h}^{-1}$. Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com os apresentados pelos autores citados, observa-se que a *Saccharomyces* utilizada por aqueles autores, para produção de etanol, se comportou de forma diferenciada, com velocidade específica de crescimento superior à obtida neste estudo.

Cangussu (2003) descreve que Furlan et. al.(1994), estudou a influência das condições de microaerobiose e aerobiose de cinco espécies de leveduras pertencentes aos gêneros, *Pichia*, *Pachysolen* e *Candida* no intuito de averiguar maior produção de etanol e xilitol. Observaram-se maiores fatores de rendimento celular em condições de

aerobiose. Nesta condição obtiveram-se maiores fatores de rendimentos com *Candida parapsilosis* ($\gamma_{x/s} = 0,16 \text{ g.g}^{-1}$) e menores para *Candida shehatae* ($\gamma_{x/s} = 0,10 \text{ g.g}^{-1}$). O cultivo de *Pichia stipitis* proporcionou fator de rendimento de $0,14 \text{ g.g}^{-1}$. Em microaerobiose verificou-se máximo coeficiente de rendimento em *Candida parapsilosis* e *Pachysolen tannophilus* com $0,10 \text{ g.g}^{-1}$. Com *Pichia stipitis* obtiveram fator de rendimento de $0,09 \text{ g.g}^{-1}$. As leveduras, de diferentes gêneros, utilizadas pelos autores citados, apresentaram resultados semelhantes à utilizada neste trabalho.

Castro et al (2009) estudaram parâmetros cinéticos de linhagens de *Saccharomyces* isoladas de alambiques mineiros, onde melhores resultados foram apresentados pelas linhagens RM01 e CV01, obtendo velocidade específica de crescimento de $0,24$ e $0,4 \text{ h}^{-1}$ e rendimento em biomassa ($\gamma_{x/s}$) de $0,179$ e $0,185 \text{ g.g}^{-1}$, respectivamente.

Verificou-se que o valor da velocidade específica de crescimento celular obtido neste trabalho é baixo, quando comparado com os valores obtidos na literatura. Porém, quando se comparou o fator de conversão de substrato em biomassa, verificou-se que este parâmetro se encontrou em valores semelhantes ou superiores aos apresentados nos diversos estudos consultados.

5.2 Enriquecimento protéico

Nas Figuras 16 a 52 são apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados objetivando o enriquecimento protéico de algaroba. O planejamento experimental foi o apresentado na Tabela 07. Em todos os ensaios, foi feito o acompanhamento das ufc/mL e do teor protéico (proteína verdadeira e proteína bruta) durante 96 horas de fermentação.

Para efeito de avaliação, os ensaios foram agrupados em 9 séries de 3 ensaios cada onde, para cada série, foram mantidos o pH e concentração de extrato de lêvedo constantes, variando-se as concentrações de substrato, conforme pode ser visualizado na Figura 17.

5.3.1 Resultados experimentais da série 1.

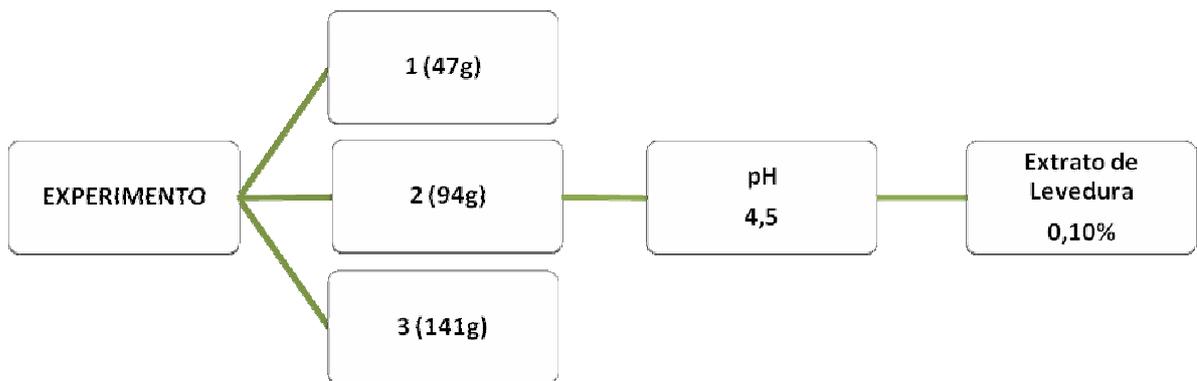


Figura 17 – Condições dos experimentos da série 1.

5.3.1.1 Cinética do Crescimento Microbiano.

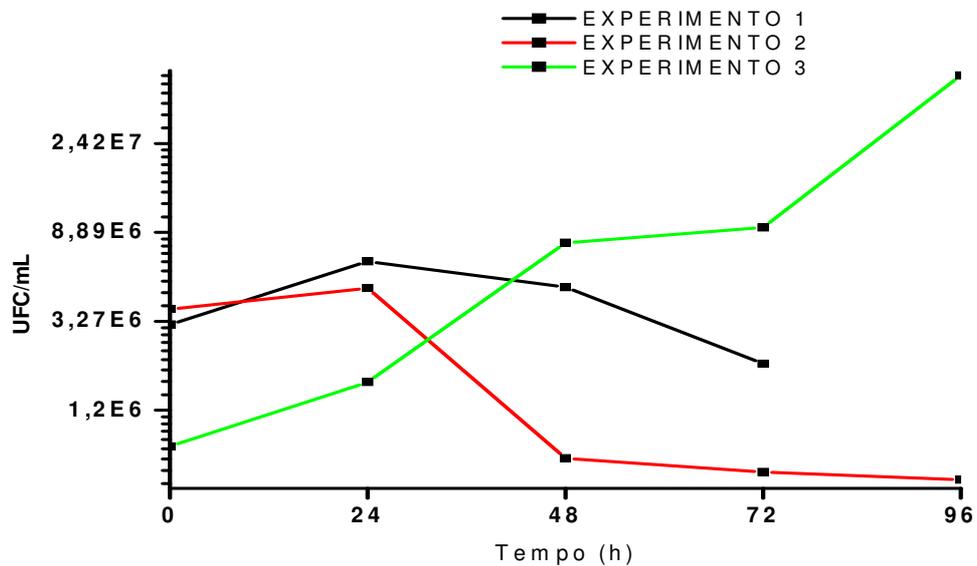


Figura 18- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 1, 2 e 3.

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2, vistos na Figura 18, pode-se observar que houve crescimento até 24 horas, onde as concentrações celulares iniciais foram de $3,15 \times 10^6$ e $3,75 \times 10^6$, obtendo-se valores de $6,42 \times 10^6$ e $4,75 \times 10^6$, respectivamente. Após esse tempo, os valores da UFC/mL foram decrescentes. Dependendo das condições do meio em fermentação, o ciclo da *Saccharomyces cerevisiae* é muito rápido, quando comparado com o de outros microrganismos, podendo alcançar a fase exponencial em 24 horas. Isso se deve ao alto teor de proteínas e elevada velocidade de crescimento, que estes microrganismos possuem, o que leva a uma rápida produção de biomassa, sendo que esta pode ser contínua e independente das condições do ambiente. (BEKATOROU et al., 2006; KURZMAN e FELL, 1998).

O rápido crescimento celular e a baixa concentração de substrato, aliado à melhor aeração do meio em fermentação, provavelmente foram os responsáveis pelo esgotamento de substrato e, conseqüentemente, menor crescimento a partir de 24 horas do início da fermentação, com posterior morte celular.

No experimento 1, houve decréscimo considerável após 24 horas, provavelmente pelo esgotamento do substrato. Por ser o menor nível de substrato, as condições de aeração foram melhores que os outros dois níveis de matéria-prima.

No experimento 3, o crescimento celular ocorreu gradualmente atingindo, em 96 horas, $7,20 \times 10^7$ UFC/mL (concentração inicial $8,00 \times 10^5$ UFC/mL), apresentando valores superiores quando comparado aos outros experimentos. Neste experimento utilizou-se concentração de substrato maior que os outros. Em função da maior disponibilidade de nutrientes e da menor taxa de aeração, o crescimento foi crescente ao longo do tempo, com resultados superiores aos dos experimentos 1 e 2.

Estes resultados estão coerentes pois, segundo Bezerra (2006), quando colocados em um meio de cultivo apropriado, os microrganismos começam a dividir-se ativamente, retirando do meio os nutrientes necessários para a produção de novos microrganismos. Este processo continua até que algum dos nutrientes se esgote (substrato limitante).

5.3.1.2 Teor de Proteína

Os resultados do teor de proteína Bruta para os ensaios da série 1, são apresentados na Figura 19.

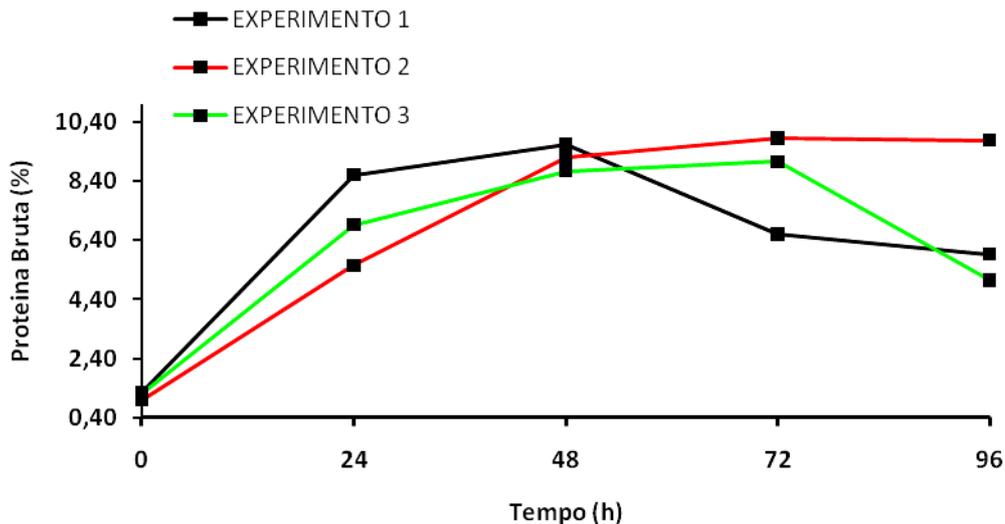


Figura 19 -Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 1, 2 e 3.

Através dos resultados obtidos nos experimentos 1, 2 e 3, comparados na Figura 19; pode-se verificar que o acréscimo do teor protéico é considerável até 48 h, para as 3 concentrações de substrato utilizadas. Os valores iniciais dos teores protéicos foram de 1,25%, 0,99% e 1,18%, respectivamente. Os teores protéicos máximos obtidos, foram de 9,64% (7,7 vezes o valor inicial), 9,85% (9,9 vezes o valor inicial) e 9,07% (5 vezes o inicial).

No caso do experimento 1, a partir de 48h, houve declínio acentuado, que pode ocorrer pelo esgotamento do substrato ou produção de proteases. Já o experimento 2 apresentou ligeiro crescimento entre 48 e 72h, mantendo-se constante até 96h. Este comportamento pode ser justificado pelas melhores condições de aeração e concentração de matéria-prima. Em outros processos, com intuito de melhoramento dos resíduos agroindustriais, a elevação protéica do bagaço do caju chega a 9% de proteína bruta, segundo Ferreira et al (2004) citado por Pontes (2009).

No experimento 3, houve ligeiro crescimento entre 48 e 72h, com declínio acentuado após esse período. Este comportamento ocorreu, provavelmente, ao aparecimento de contaminantes desagradáveis, como fungos filamentosos, com menores teores protéicos que as leveduras.

Em estudo com novilhos zebuínos alimentados com dietas contendo teores de proteína bruta variando de 7 a 14% na matéria seca, Valadares et al. (1997) verificaram que o nível de 7% de PB foi insuficiente para promover o adequado crescimento microbiano no rúmen, resultando em diminuição do consumo.

Albuquerque et al. (2003) desenvolveu trabalho para aumento protéico do bagaço de maçã, através da fermentação no estado sólido (FES), onde foi utilizado fungo *Rhizopus oligosporus*. Dessa forma, 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. Obtiveram enriquecimento protéico mais significativo, quando usou tampão fosfato (0,30 M), suplementado com uréia a 5%, que proporcionaram aumento de mais de 5 vezes no teor de proteína do bagaço, que inicialmente apresentava concentração de 5,93 % de proteína solúvel e, após o tratamento, chegou a 30,75 %. Os acréscimos citados foram inferiores aos obtidos nesta série de experimentos.

Mesmo trabalhando em ampla faixa de pH, as leveduras obtêm melhores resultados quando usada para fermentações, na faixa entre 4,0 e 4,5. O pH influencia as fermentações industriais de forma acentuada; pois interfere na contaminação bacteriana, no seu efeito sobre o crescimento das leveduras, sobre as taxas de fermentação e de formação de produtos (VASCONCELOS, 2010). De acordo com os parâmetros citados na Tabela 07, os experimentos foram conduzidos com pH inicial de 4,5, e mesma concentração de levedura; o ensaio que apresentou melhores resultados de acréscimo protéico foi o 2, com concentração de matéria prima igual a 94g (altura aproximadamente de 2,0 cm). Segundo Perazzo Neto (1999), a espessura da camada tem influência significativa na fermentação em estado sólido, tendo em visto as trocas gasosas e de calor, além da disponibilidade de nutrientes.

Os teores de proteína verdadeira dos experimentos 1, 2 e 3 são apresentados na Figura 20, onde pode ser constatado crescimento semelhante ao da proteína bruta até 48h. A partir deste tempo, houve decréscimo para as 3 concentrações de substrato.

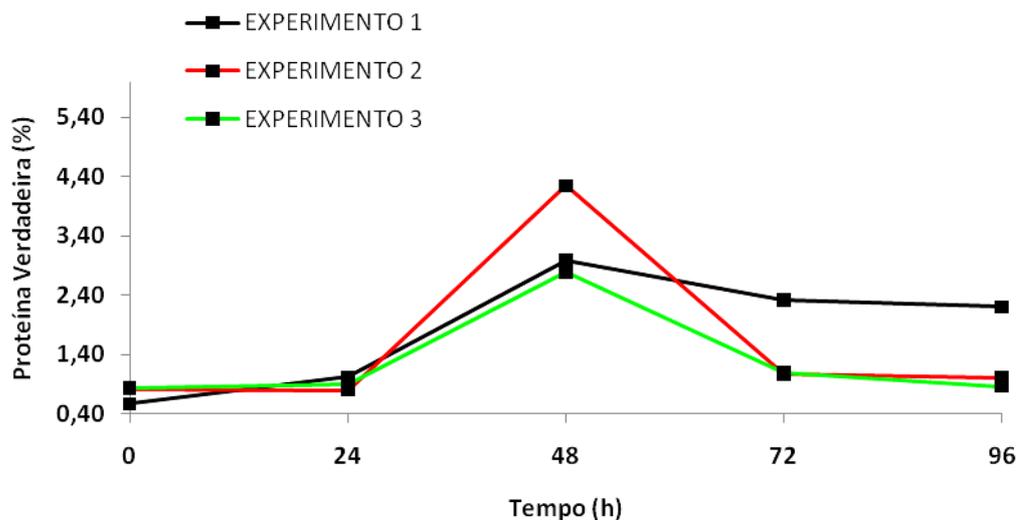


Figura 20- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 1, 2 e 3.

5.3.2 Resultados experimentais da série 2.

Os valores dos parâmetros para os ensaios 4, 5 e 6 são apresentados na Figura 21.

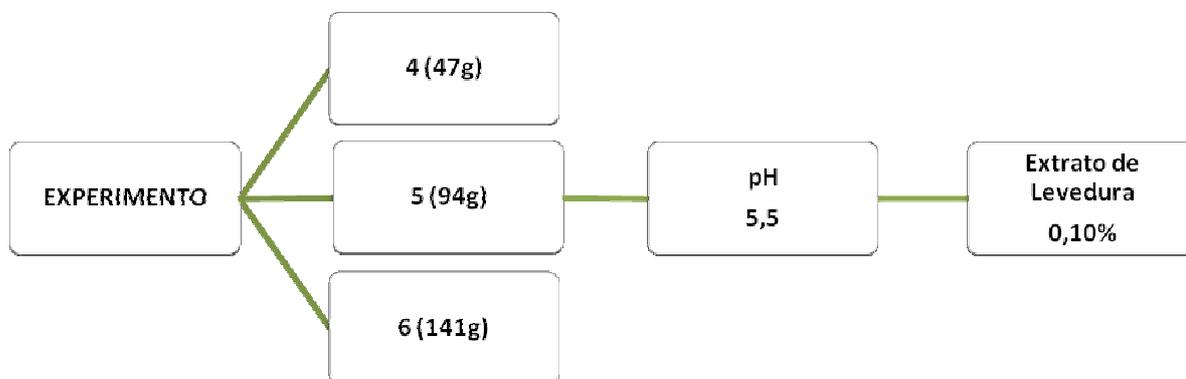


Figura 21–Condições dos experimentos da série 2.

5.3.2.1 Cinética do Crescimento Microbiano

Os valores obtidos para UFC/mL são mostrados na Figura 22, onde se destaca o experimento 4, com valores crescentes durante toda a fermentação, atingindo concentração final de 10^9 UFC/mL, partindo de concentração inicial de $6,50 \times 10^6$. Nos experimentos 5 e 6, houve ligeiro crescimento celular até 48 e 72 horas, respectivamente, com valores finais $3,76 \times 10^7$ e $4,60 \times 10^6$. Os valores iniciais foram $1,60 \times 10^7$ e $1,75 \times 10^6$ UFC/mL.

Nesta série, os melhores valores obtidos foram do experimento 4, que apresentou, durante a fermentação, umidade entre 60 e 67%. Albuquerque (2003) obteve o valor máximo de proteína bruta, quando o material em fermentação apresentou umidade de 59,42%. A umidade dos substratos utilizados em fermentação em estado sólido pode variar de 30 a 85 %, e esses valores interferem na cinética de crescimento microbiano. A concentração de matéria prima deste experimento foi de 47g (aproximadamente 1,5 cm de espessura), menor em relação aos outros experimentos, sendo assim o meio recebe maior oxigenação. O oxigênio dissolvido no meio estimula o consumo de açúcares e o crescimento celular de leveduras (ALBUQUERQUE, 2003).

Segundo Villas Bôas e Esposito (2000), a biomassa microbiana, considerada como um concentrado protéico natural, contém proteínas completas, com todos os aminoácidos essenciais.

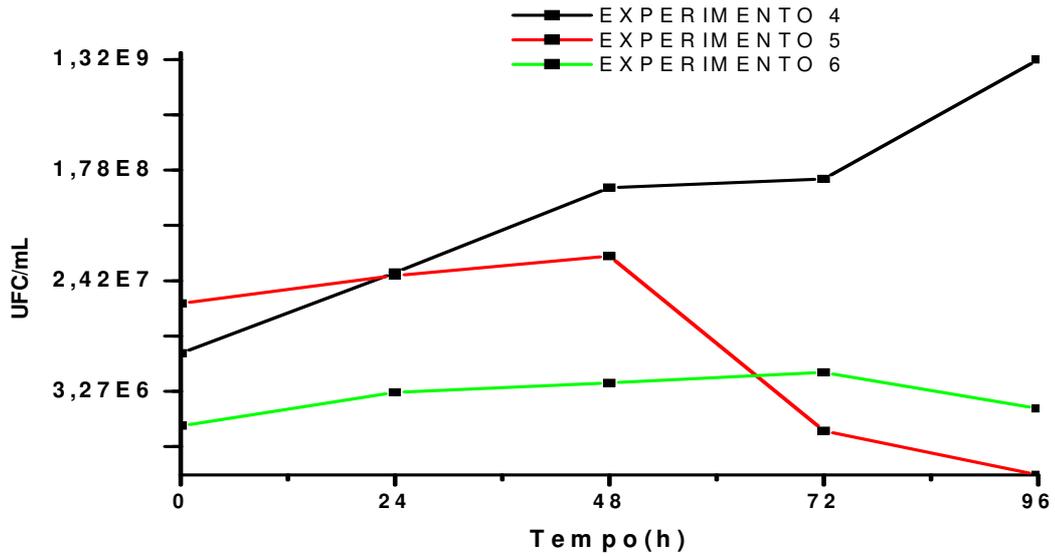


Figura 22- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 4,5 e 6.

5.3.2.2 Teor de Proteína

Os teores protéicos dos ensaios 4, 5 e 6 são mostrados na Figura 23, onde as 3 situações avaliadas apresentaram comportamento semelhante, ou seja, crescimento acentuado até 48 horas, com decréscimo também acentuado entre 48 e 72 h, quando então apresentam comportamento ligeiramente decrescente, tendendo à estabilização.

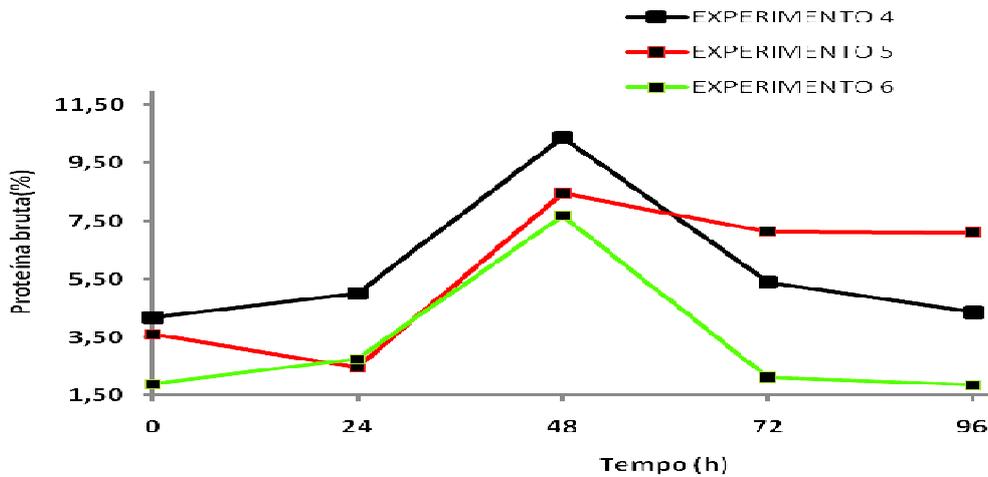


Figura 23- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 4,5 e 6.

Os valores máximos de Proteína Bruta até 48 horas foram, respectivamente, para os ensaios 4, 5 e 6, de 10,38% de proteína bruta (aumento protéico de 2,5 vezes), 8,45% (aumento protéico de 2,3 vezes) e 7,69% (aumento protéico de 4,1 vezes). O experimento 6 foi o que apresentou o maior percentual de crescimento, saindo de concentração inicial de 1,88 para 7,69% em 48 horas.

Estudos anteriores realizados por Shojaosadati *et al.* (1999), com a finalidade de avaliação do enriquecimento protéico de resíduos em fermentação em estado sólido, de polpa de beterraba, farelo de trigo e resíduo cítrico (proveniente do processamento de limão e laranja), utilizando pra bioconversão o fungo *Neurospora sitophila* obtiveram os seguintes resultados:

1. Para polpa de beterraba obtiveram enriquecimento protéico de 2,0 vezes;
2. Para farelo de trigo, aumento no teor de proteína de 2,5 vezes;
3. Para resíduo cítrico, acréscimo de 3,0 vezes.

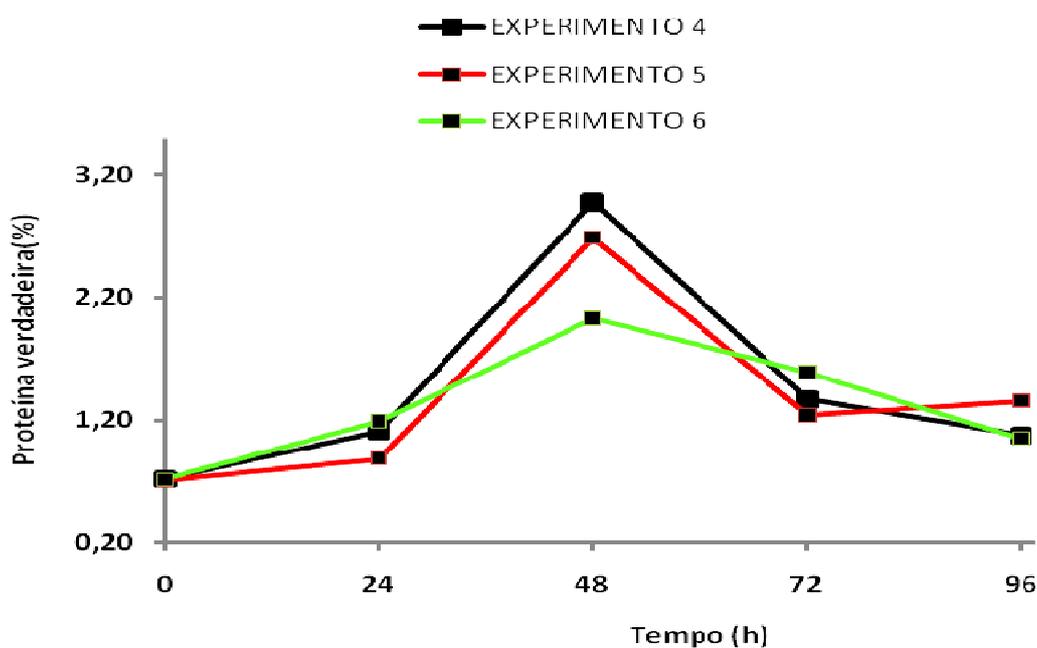


Figura 24- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 4,5 e 6.

Nesta Figura, observa-se comportamento semelhante ao da proteína bruta, exceto para os valores do crescimento em relação aos valores iniciais, que foram de 4,1 vezes, 3,8 vezes e 2,8 vezes, respectivamente, para os ensaios 4, 5 e 6.

O pH utilizado nos experimentos foi 5,5. Ao descrever o emprego de *Rhizopus oligosporus* na bioconversão do bagaço de maçã, Zheng e Shetty (1998) utilizaram CaCO_3 com a finalidade de aproximar o pH do meio da neutralidade, pois o mesmo apresentava valores de 3,1 a 3,8; dessa forma eleva-se o pH do bagaço para valores entre 5,8 e 7,0. Nagel et al (1999) estudaram o controle de pH em meio sintético com base em glicose, para crescimento deste fungo, encontrou-se faixa ótima de pH entre 4,0 e 6,5.

5.3.3 Resultados experimentais da série 3.

Os valores dos parâmetros para os ensaios 7, 8 e 9 são apresentados na Figura 25.

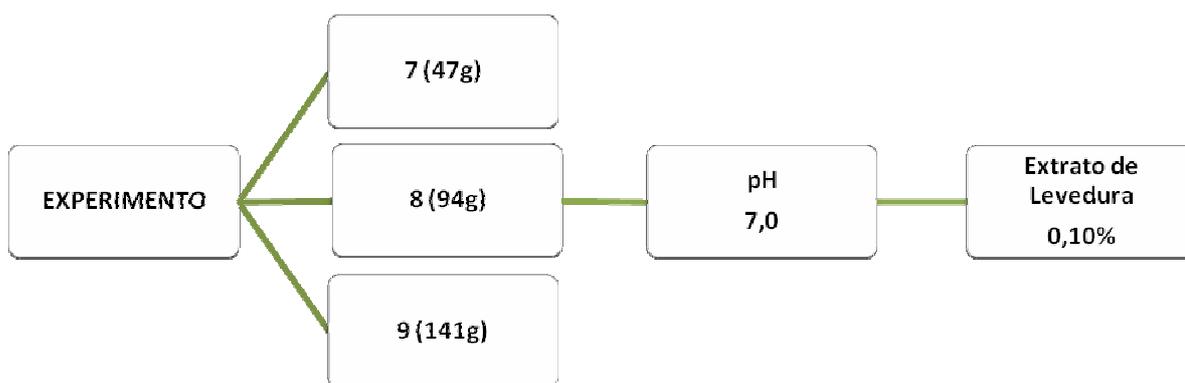


Figura 25 – Condições dos experimentos da série 3.

5.3.3.1 Cinética do Crescimento Microbiano.

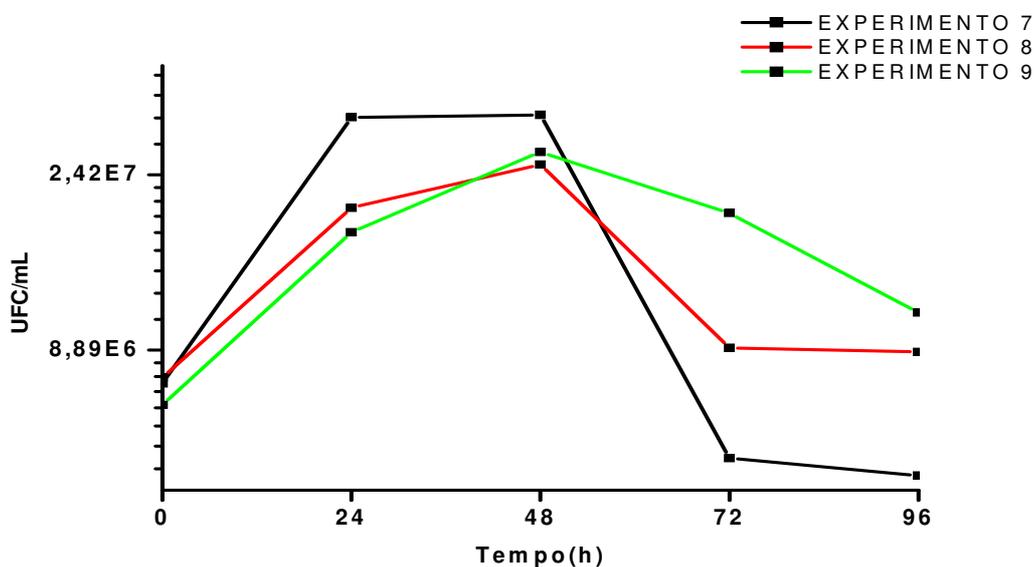


Figura 26- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 7,8 e 9.

Para esta série, todos os experimentos apresentaram crescimento significativo de 0 até 24 horas, obtendo-se maiores valores com 48 horas, para os ensaios 7, 8 e 9, respectivamente de $3,40 \times 10^7$, $2,56 \times 10^7$ e $2,75 \times 10^7$ ufc/mL (inicialmente as concentrações foram $7,35 \times 10^6$, $7,60 \times 10^6$ e $6,50 \times 10^6$ ufc/mL). Em todos os casos, houve queda significativa após 48 horas, tendendo à estabilização a partir de 72 horas de fermentação (Figura 26).

5.3.3.2 Teor de Proteína

Através da Figura 27 pode-se observar que houve crescimento acentuado do teor de proteína bruta até 48 horas de fermentação nos 3 casos, destacando-se o experimento 7, com crescimento mais vigoroso. Após 48 horas, houve decréscimo significativo nos 3 casos, até 72 horas, tendendo à estabilização a partir de então.

No caso do experimento 7, o decréscimo acentuado após 48 horas pode ser atribuído à saturação do substrato. A espessura reduzida do meio em fermentação no reator pode facilitar as trocas de calor e gasosas, em paralelo pode apresentar poucos nutrientes disponíveis para o desenvolvimento do microrganismo (PERAZZO NETO, 1999).

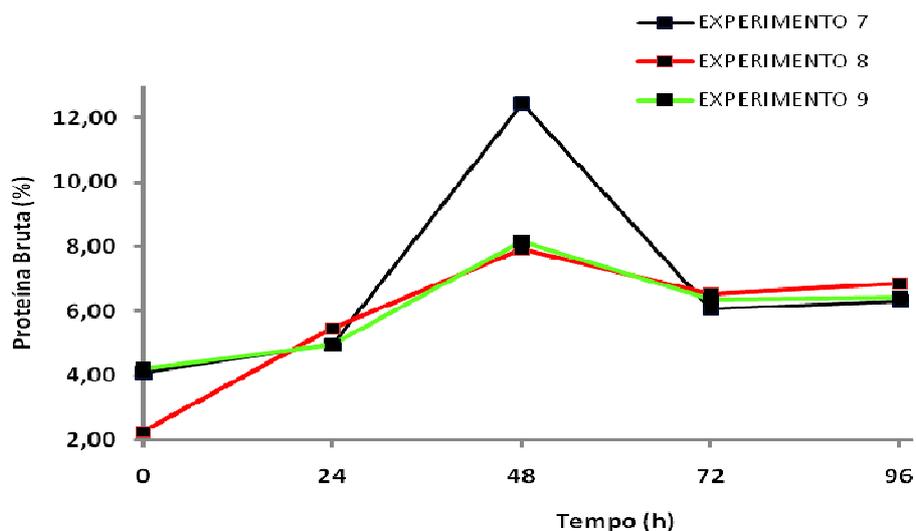


Figura 27-Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 7,8 e 9.

No experimento 7, o valor protéico inicial foi de 4,09%. Com 24 h de fermentação obteve-se valor de 4,96%, elevando esse valor significativamente para 12,45% (aumento de 3 vezes), valor máximo obtido. Ao utilizar bagaço da maçã como material de cultivo da levedura *Candida utilis*, Albuquerque (2003) adicionou fonte de nitrogênio (FN) a 5 % e solução tampão (ST) a 10 %, obtendo 11,84% de proteína (proteína inicial de 5,93%), obtendo valores inferiores aos obtidos neste experimento.

No experimento 8 o aumento protéico foi de 3,5 vezes; obtendo-se como valor máximo 7,92% de proteína bruta (inicial de 2,26%). Alves (2001) não registrou efeito sobre o consumo dos nutrientes quando utilizou concentrados que correspondiam 12 e 15% de proteína bruta. Utilizando dietas contendo os mesmos teores de PB de Alves (2001), Rennó (2003) também verificou que o consumo de nutrientes, com exceção da PB, não diferiu entre os tratamentos.

No experimento 9, o valor de proteína bruta apresentou acréscimo inferior (de 1,9 vezes o inicial, com proteína inicial de 4,23% e 8,17% após 48 horas) ao que foi relatado anteriormente. Franco et al, 2010, utilizando *Aspergillus niger* e resíduos de Seriguela, Jaca e Abacaxi, que no início da fermentação tinham 7,56%, 7,65% e 7,04% de Proteína Bruta, após 168 horas de fermentação obtiveram 11,43%, 11,28% e 10,31, respectivamente, obtendo um para todas os resíduos o mesmo acréscimo, de 1,5 vez.

Para proteína verdadeira, os resultados são mostrados na Figura 28, onde pode ser visualizado crescimento significativo, nos 3 casos, até 48h. Após esse tempo, houve decréscimo, também de forma considerável até 72 horas, mantendo decréscimo, porém forma branda, até 92 horas, tendendo à estabilização. A proteína verdadeira do experimento 7 aumentou 3,5 vezes, enquanto nos experimentos 8 e 9, o aumento 4,8 e 2,0 vezes, respectivamente, em relação aos valores iniciais.

Campos et al. (2005), utilizando bagaço do pedúnculo de caju e *Saccharomyces cerevisiae*, obteve um ganho protéico após 28 horas de fermentação de 3 vezes quando comparado ao valor inicial, utilizando 12% de concentração de levedura. Em estudos anteriores (CAMPOS et al., 2003), quando utilizaram maior concentração do inóculo (16%), obteve como melhor desempenho, sendo o ganho protéico de 2,5 vezes, valor este também obtido no experimento 8 após 24hs.

De acordo com resultados obtidos nos experimentos 1,2 e 3, onde o pH é 4,5, comparando-se com os resultados obtidos nesta série (experimentos 7 a 9), onde o pH escolhido para os ensaios foi de 7,0; resultados estes bem inferiores ao obtido anteriormente. Desta forma, comprova-se o que é encontrado na literatura em relação ao pH adequado para a levedura alcooleira, descrito por Vasconcelos (2010) e Nagel et al (1999).

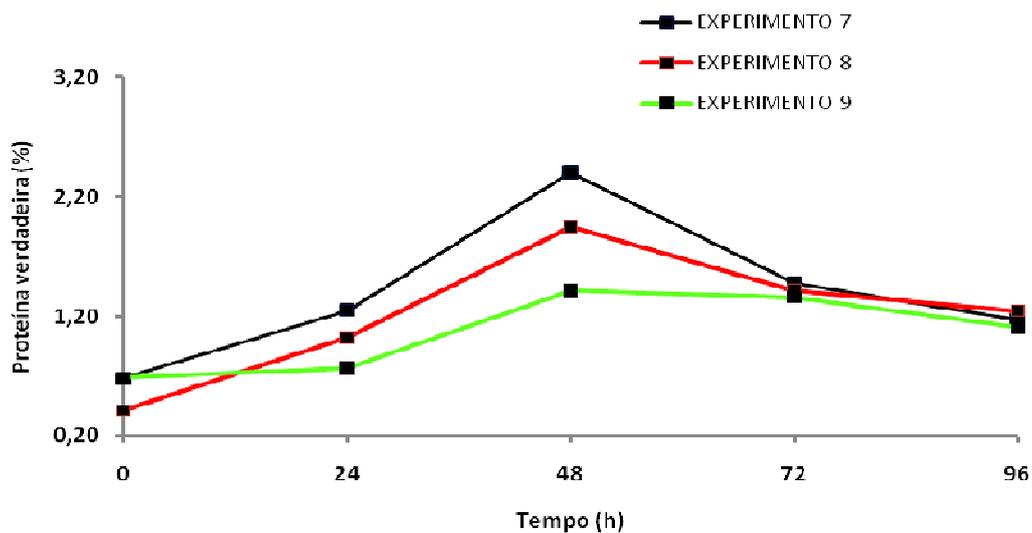


Figura 28- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 7,8 e 9.

5.3.4 Resultados experimentais da série 4.

Os valores dos parâmetros para os ensaios 10, 11 e 12 são apresentados na Figura 29.

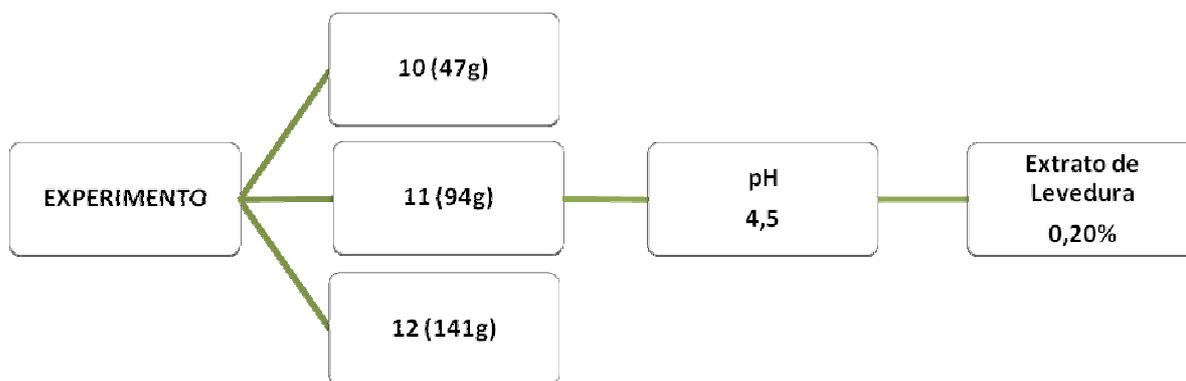


Figura 29 - Condições dos experimentos da série 4.

5.3.4.1 Cinética do Crescimento Microbiano

De acordo com a Figura 30, pode-se verificar velocidades de crescimento variáveis, comparando-se os resultados dos 3 ensaios. No experimento 10 houve crescimento gradativo até 72 horas, obtendo-se o maior valor de concentração celular, $4,00 \times 10^7$ (concentração inicial $1,44 \times 10^7$). A partir deste tempo, começou o declínio do crescimento celular. No ensaio 11, entre 0 e 48 horas houve aumento no crescimento de $6,20 \times 10^6$ ufc/mL para $6,40 \times 10^7$ ufc/mL, passando a decrescer de forma considerável a partir do tempo citado.

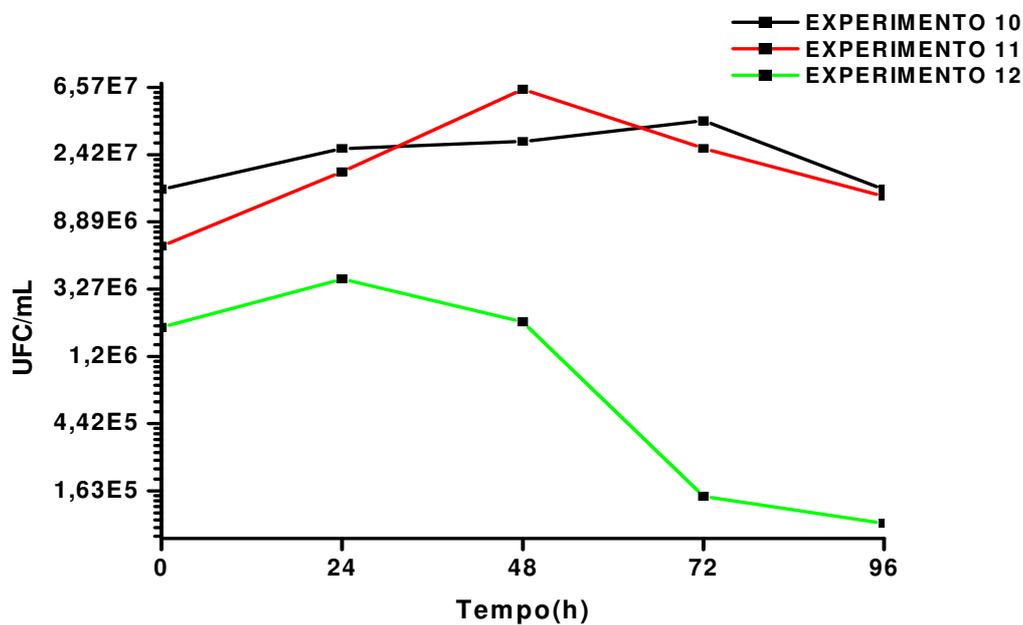


Figura 30- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 10,11 e 12.

O experimento 12 foi o que apresentou menor desempenho quanto ao crescimento celular. Houve pequeno aumento até 24 horas, decrescendo em seguida até 96 horas de fermentação.

5.3.4.2 Teor de Proteína

Através dos resultados da Figura 31 observou-se que a proteína bruta apresentou comportamento diferenciado nos 3 casos, com destaque para o ensaio 10. Os

experimentos 10 e 11 mostram crescimento até 48 horas, passando a decrescer em seguida, enquanto que o ensaio 12 apresentou este comportamento somente até 24 horas. Nos experimentos 10 e 11, foram obtidos aumentos protéico de 2,7 vezes em relação ao valor protéico inicial de 4,06% e 2,32% e, após 48 horas de fermentação, quando atingiu o máximo do enriquecimento para estes parâmetros, obtiveram 10,98% e 6,42%, respectivamente. De Gregorio et al.(2002), elevando o valor protéico da polpa de limão de 11,7%, utilizando *Trichoderma viride*, obteve um produto com 31,9% de proteína (aumento de 2,7 vezes). Em estudos para melhoramento da qualidade nutricional da silagem com resíduos agroindustriais, Teles (2006) citado por Pontes (2009) evidencia aumento protéico de 2 à 5% de proteína bruta no bagaço do caju.

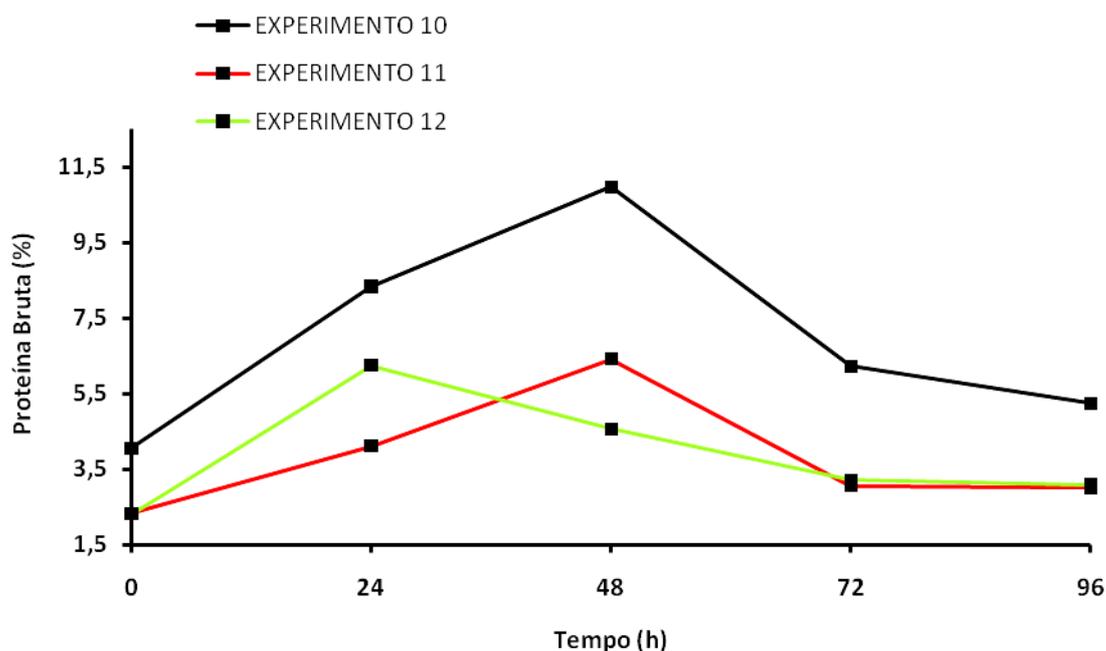


Figura 31- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 10,11 e 12.

Através dos resultados do experimento 12 (Figura 31) observou-se que a proteína bruta decresceu acentuadamente a partir de 24 hs, obtendo nesse tempo o valor máximo protéico (6,25%), representando um acréscimo de 2,0 vezes. Holanda et al, utilizando pedúnculo do caju e *Saccharomyces cerevisiae*, e com objetivo de avaliar a proporção de levedura/tempo de fermentação necessário para elevar o teor protéico,

concluiu que a proporção de 10,0% de inóculo de levedura na parte da massa proporciona um teor protéico acima de 20%, sendo necessário um tempo inferior a 24 horas para a conversão protéica dos carboidratos.

A proteína verdadeira, como pode ser visto na Figura 32, apresentou crescimento considerável nos 3 casos até 48 horas. A partir deste tempo, decresceu de forma amena, aproximando da estabilidade protéica a partir de 72 h até o término da fermentação. Foi obtido o maior valor de proteína verdadeira de 1,96% (aumento de 1,7 vezes) no experimento 10. No experimento 11, resultado próximo ao obtido de proteína bruta, com aumento de 2,9 vezes. Para o experimento 12 foi obtido um acréscimo de 4,5 vezes para proteína verdadeira.

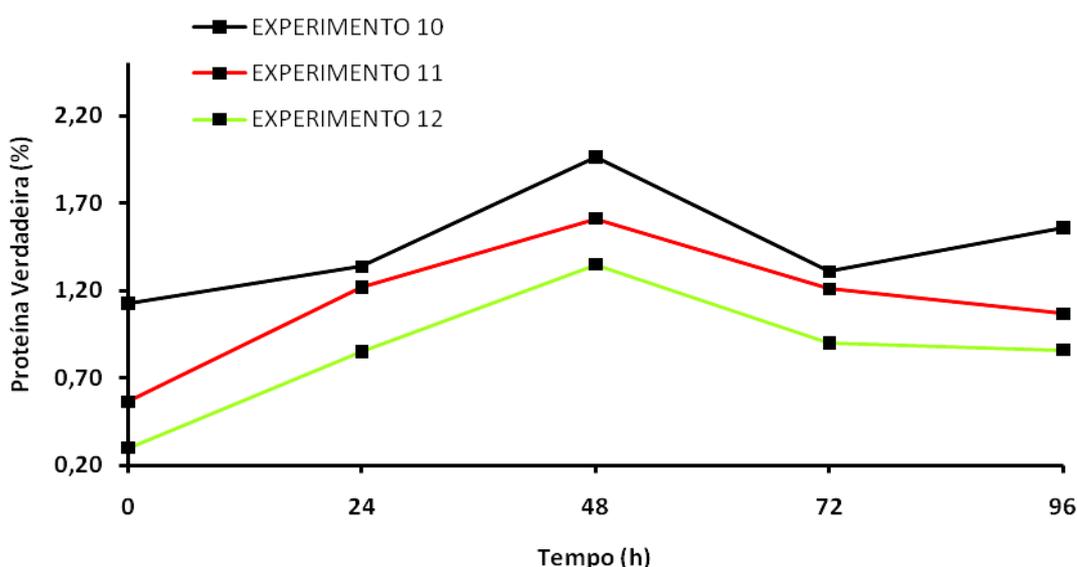


Figura 32- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 10,11 e 12.

5.3.5 Resultados experimentais da série 5.

Os valores dos parâmetros para os ensaios 13, 14 e 15 são apresentados na Figura 33.

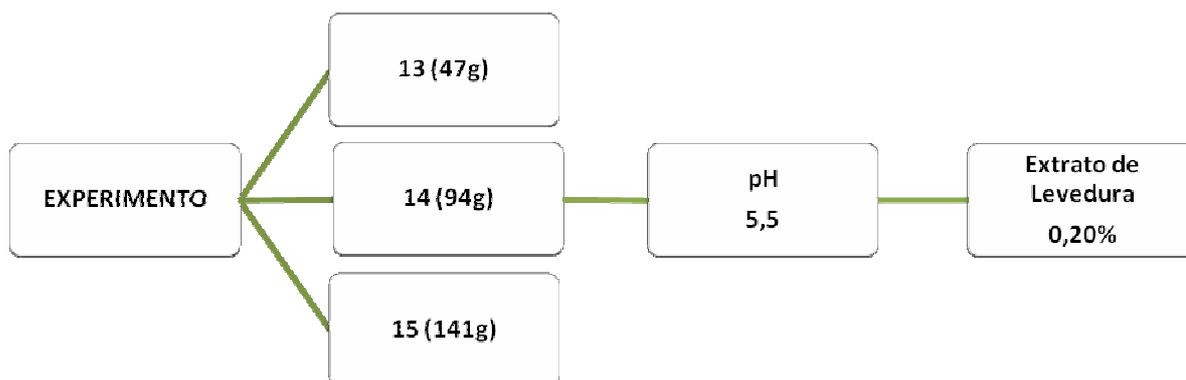


Figura 33 –Condições dos experimentos da série 5.

5.3.5.1 Cinética do Crescimento Microbiano.

Como pode ser visto na Figura 34, nos experimentos 13 e 14, houve crescimento celular até 96 horas, com tendência de crescimento, enquanto no experimento 15, o máximo obtido foi com 72 horas, onde as concentrações microbianas no término da avaliação protéica, foram de $1,14 \times 10^7$, $5,16 \times 10^7$ e $3,10 \times 10^6$ ufc/mL, nos experimentos 13, 14 e 15, respectivamente. No início dos experimentos, os valores foram $5,00 \times 10^4$, $7,30 \times 10^5$ e $3,25 \times 10^5$ ufc/mL. Dessa forma, pode-se visualizar o melhor crescimento para o experimento 13, onde o mesmo apresentava espessura menor, pelas razões apresentadas anteriormente.

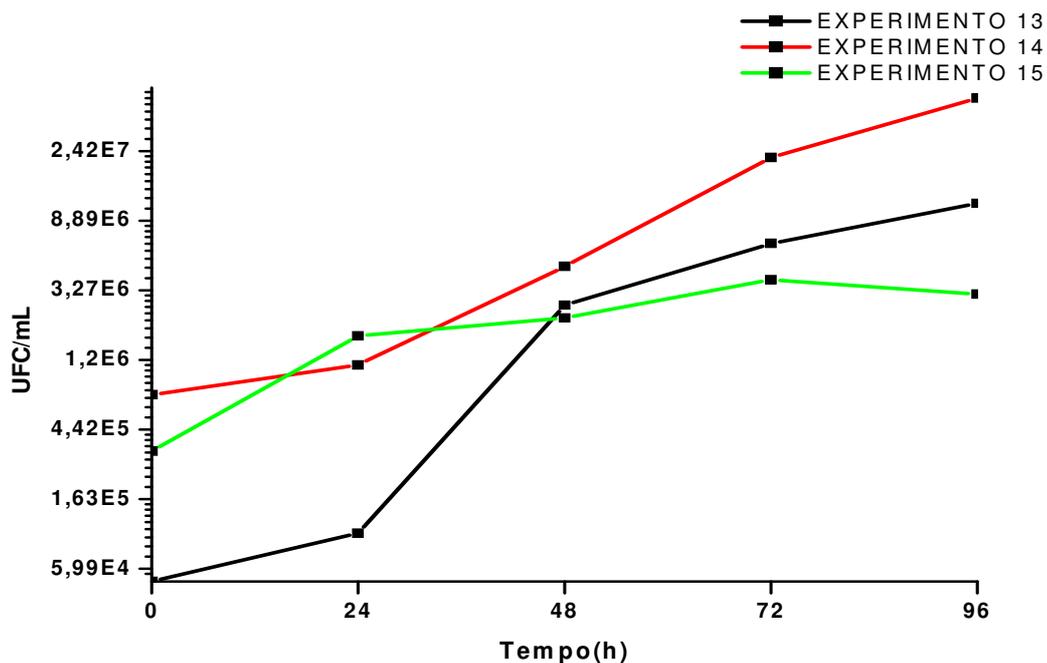


Figura 34- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 13,14 e 15.

5.3.5.2 Teor de Proteína.

O crescimento protéico foi considerável nos 3 casos até 72 horas. A partir deste tempo, os ensaios 13 e 14 continuaram com crescimento, porém de forma menos acentuada. O ensaio 15, porém, apresentou comportamento decrescente.

A quantidade de nutriente utilizado nesta série de experimentos é de 0,20%, quando comparado com a quantidade de nutrientes e o tempo fermentativo de experimentos anteriores, associando-se a esse crescimento contínuo. Enquanto o aumento acentuado, no experimento 15, aconteceu entre 24 e 48 horas, a obtenção de máxima concentração de proteína bruta foi com 72 horas de fermentação.

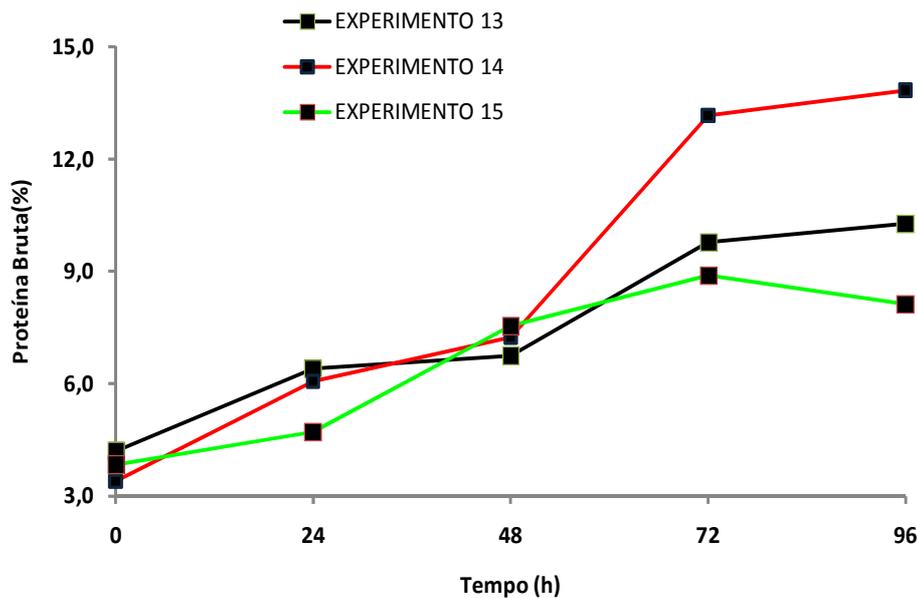


Figura 35- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 13,14 e 15.

Nos experimentos 13 e 14 (Figura 35), os valores de proteína bruta alcançado com 96 horas foram 10,28% e 13,84%, respectivamente, com valores iniciais de 4,20% e 3,39%. Nestas condições, os valores foram, respectivamente, 2,5 e 4,1 vezes maiores. Valor próximo do experimento 13 foi obtido no experimento 15 com 72 horas de fermentação. Muniz (2009) quando utilizou para enriquecimento protéico do resíduo da vagem de algaroba, a concentração de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) a 4% na temperatura de 35 °C; obteve resultado atingindo o maior crescimento protéico no tempo de 72 h, tendo como valores, 14,12, 14,32 e 15,74% respectivamente (aumentado aproximadamente em torno de 2,0 vezes). Franco et al, 2010, utilizando *Aspergillus niger* e resíduos de Seriguela que no início da fermentação tinham 7,56% de Proteína Bruta, após 168 horas de fermentação obtiveram 11,43% (aumento de 1,4 vezes).

Pontes (2009), trabalhando com bagaço de caju, com teor protéico inicial de 16% (corrigido em relação a 77,5% de umidade), utilizou 3g (linhagem 2270) e 5g (linhagem 332) de sulfato de amônia, ambas com pH 5,5. Os valores percentuais

máximos de proteína obtidos foram 51,21% e 40,92% (acréscimo de 3,2 e 3,6), respectivamente.

O pH de 5,5 utilizado nesta série de experimentos (série 5) foi igual ao de Pontes (2009), sendo obtido, no experimento 14, acréscimo superior ao obtido por aquele autor (4,1 vezes). A umidade neste experimento foi de 67,91%

De forma semelhante à proteína bruta, a verdadeira apresentou crescimento acentuado até 72 horas nos 3 casos. A partir deste ponto, o ensaio 13 apresentou comportamento com crescimento acentuado até 96 horas, enquanto o ensaio 14 se manteve aproximadamente constante e o 15 mostrou decréscimo considerável.

Nos ensaios 14 e 15, o teor protéico foi maior 4,3 e 4,8 vezes, respectivamente e para 96 horas, em relação ao inicial. No ensaio 15 este valor foi 4,5 vezes em 72 horas de fermentação (Figura 36).

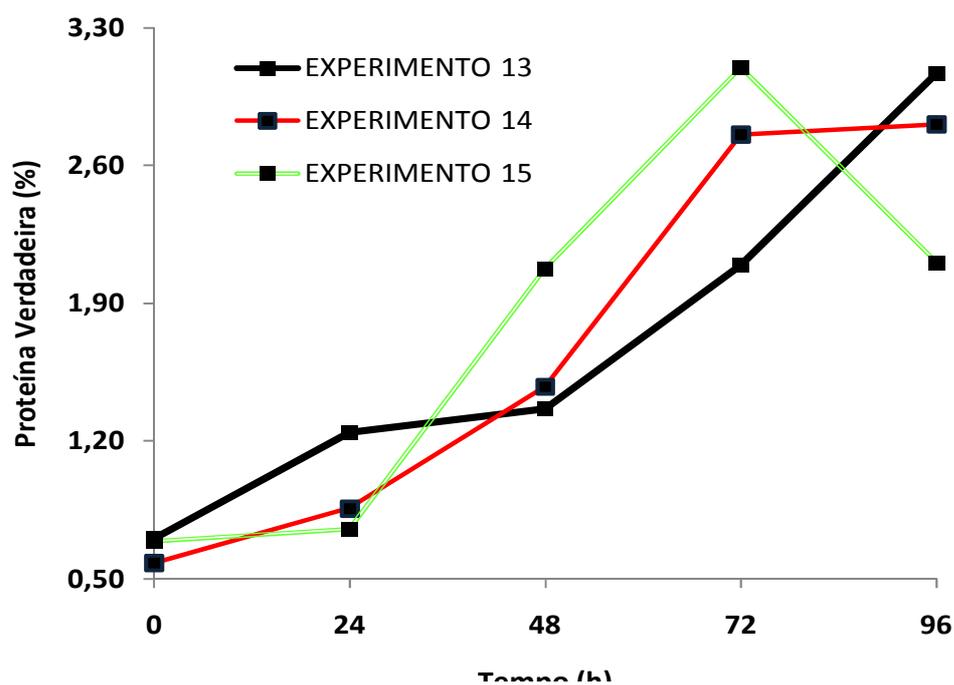


Figura 36- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 13,14 e 15.

5.3.6 Resultados experimentais da série 6.

Os valores dos parâmetros para os ensaios 16, 17 e 18 são apresentados na Figura 37.

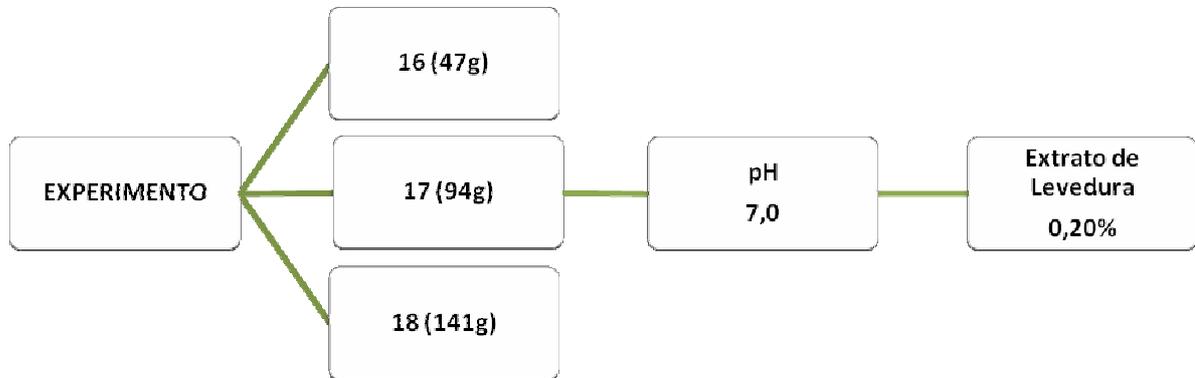


Figura 37-Condições dos experimentos da série 6.

5.3.6.1 Cinética do Crescimento Microbiano.

Através dos dados da Figura 38, pode-se considerar que houve crescimento celular até 96 horas, para todos os experimentos desta série. Partindo de concentrações celulares iniciais de $1,50 \times 10^5$, $7,3 \times 10^5$ e $5,70 \times 10^5$ ufc/mL, aumentaram para $2,80 \times 10^7$, $3,96 \times 10^7$ e $3,50 \times 10^6$ ufc/mL, respectivamente. Dos 3 ensaios realizados, o que apresentou comportamento em relação ao crescimento inferior foi o de número 18.

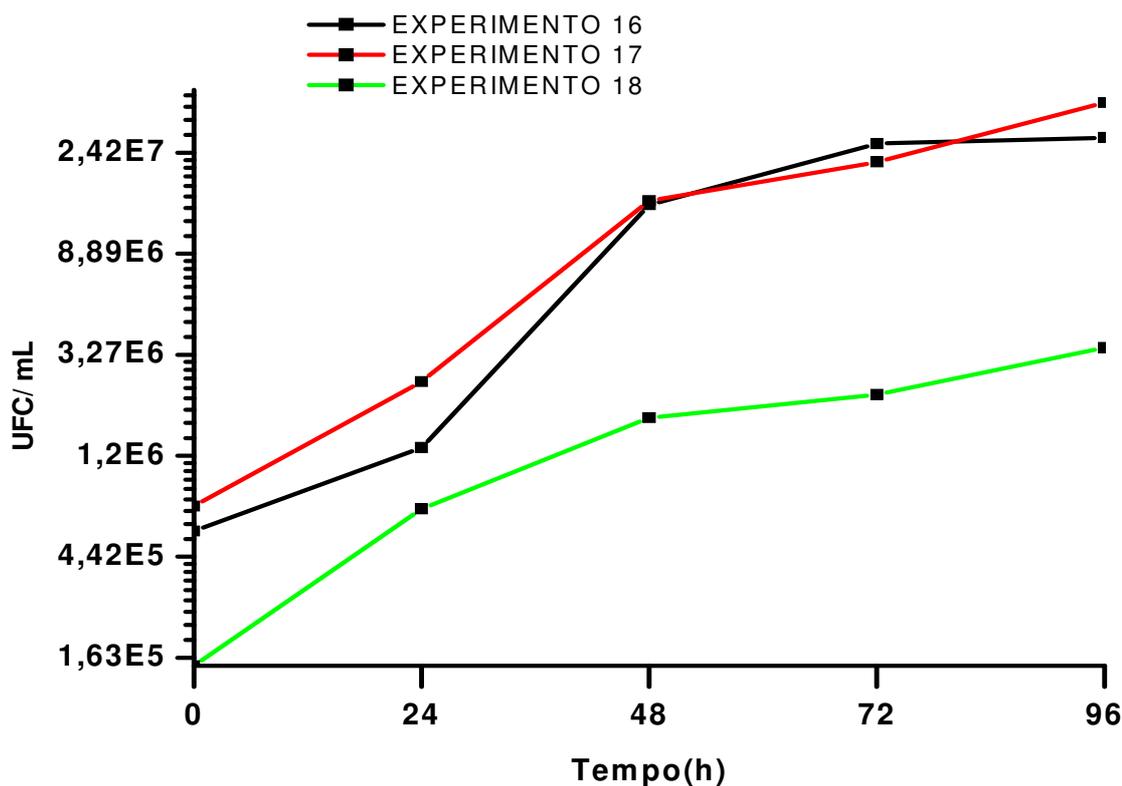


Figura 38- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 16,17 e 18

O melhor desempenho foi o do experimento 17, onde o mesmo possuía 94 g de substrato, pH 7,0 e concentração de nutriente de 0,20%. Em ensaios de série anterior, utilizando mesmo pH e concentração de nutriente de 0,10%, foram verificados resultados inferiores; desta forma, pode-se considerar que o microrganismo necessita, para o bom funcionamento de suas atividades vitais, da adição de fonte nutritiva e que apresente concentração de substrato (espessura) suficiente para trocas gasosas.

Os substratos têm de ser adequados ao desenvolvimento do microrganismo e à finalidade de sua atividade, que é produzir uma determinada substância. Além de composição capaz de suprir as exigências do microrganismo, para seu melhor desempenho, deve estar devidamente condicionado em termos de pH, temperatura, assepsia ou esterilidade (LIMA et al., 2001).

5.3.6.2 Teor de Proteína

Na Figura 39 pode-se observar que houve crescimento protéico no decorrer da fermentação, até 96 horas, para os 3 experimentos. Nos 3 casos, o crescimento foi considerável até 72 horas, com destaque para os ensaios 14 e 15. A partir deste tempo, houve crescimento, porém de forma menos acentuada. O ensaio 18 foi o que apresentou o menor desempenho entre os 3 considerados

A obtenção do máximo valor protéico ocorreu com 96 horas, para os experimentos 16, 17 e 18, obtendo-se valores de proteína bruta de 14,97%, 16,42% e 6,26%, respectivamente. O aumento protéico obtido foi de 7,6, 9,4 e 5,9 vezes, respectivamente. Araújo et al., 2003) estudou a Cactácea madacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P. DC) com a finalidade de conversão dos carboidratos pela ação da *Saccharomyces cerevisiae* através de fermentação semi-sólida, onde descreve que o teor de proteína bruta inicial de 7,24% elevou-se para 37,8% (5,22 vezes). Esse valor foi obtido quando não utilizou pré secagem do madacaru; ao utilizar pré secagem, o teor protéico alcançado foi inferior, de 24,78%.

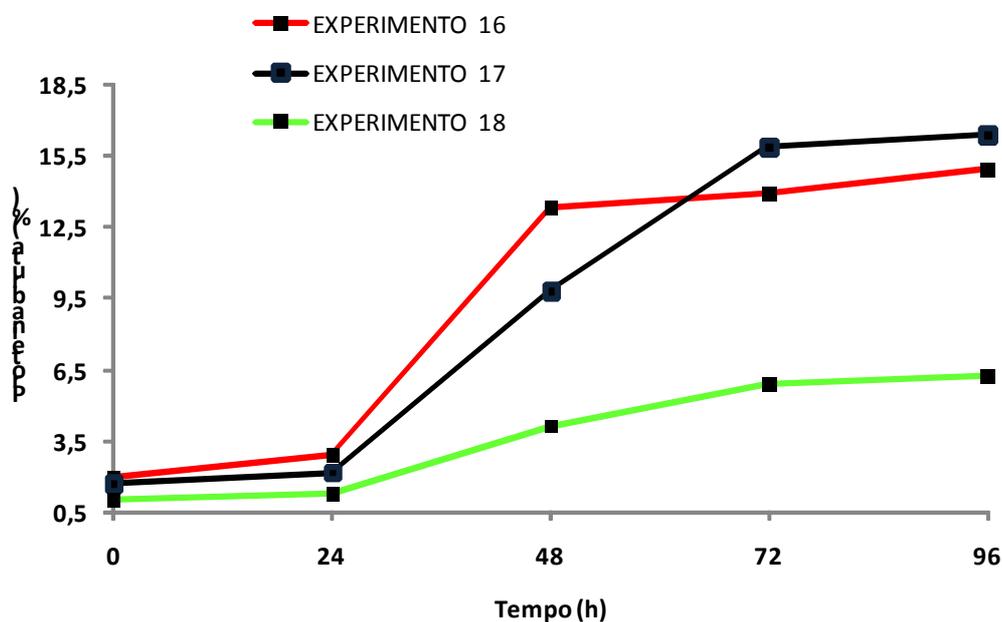


Figura 39- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 16,17 e 18.

O ganho protéico do bagaço do pedúnculo de caju fermentado utilizando duas linhagens de *Aspergillus niger* (2270 e 332) aumentou em média 13% em relação ao valor inicial protéico em fermentação semi-sólida (PONTES, 2009).

De acordo com valores obtidos nos experimentos 16 e 17, conclui-se que o enriquecido protéico da algaroba pode ser introduzido na alimentação animal, pois em experimentos anteriores de Silva et al. (2000), observou-se que ao fornecerem dietas com 14 e 17% de PB na MS, para novilhos Nelores, na fase de recria, observaram que o consumo de MS aumentou com o incremento de PB na dieta.

Muniz (2009) utilizando as vagens da algaroba para enriquecimento nutricional, encontrou valores dos teores de proteína bruta e constatou aumento protéico bastante expressivo em seu trabalho, principalmente nos tempos de 12, 48 e 72 h, que apresentaram uma média de 16,24%, 24,95% e 14,72% (acréscimo de 2,1, 3,8 e 1,9) respectivamente. Esses valores, comparados com o estudo de Pinheiro et.al (1998) para rações de frangos de corte, concluiu que a substituição do milho pelo resíduo de vagem de algaroba é viável até o nível de 14% em substituição ao farelo de milho.

O comportamento da proteína verdadeira foi crescente até 96 horas de fermentação, com destaque para os ensaios 16 e 17. No geral, o comportamento foi análogo ao da proteína bruta (Figura 40). Os aumentos das concentrações foram, respectivamente, de 7,6, 8,1 e 4,3 vezes, para os ensaios 16, 17 e 18.

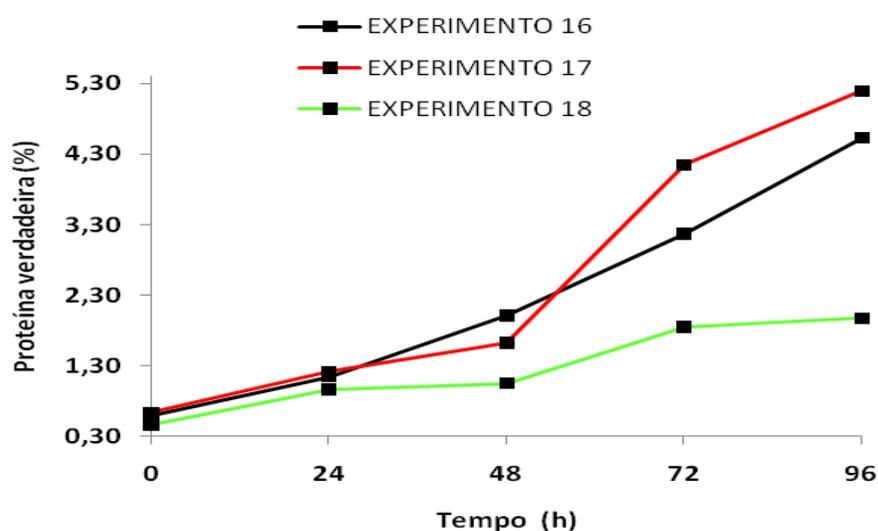


Figura 40- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 16,17 e 18.

5.3.7 Resultados experimentais da série 7.

Os valores dos parâmetros para os ensaios 19, 20 e 21 são apresentados na Figura 41.

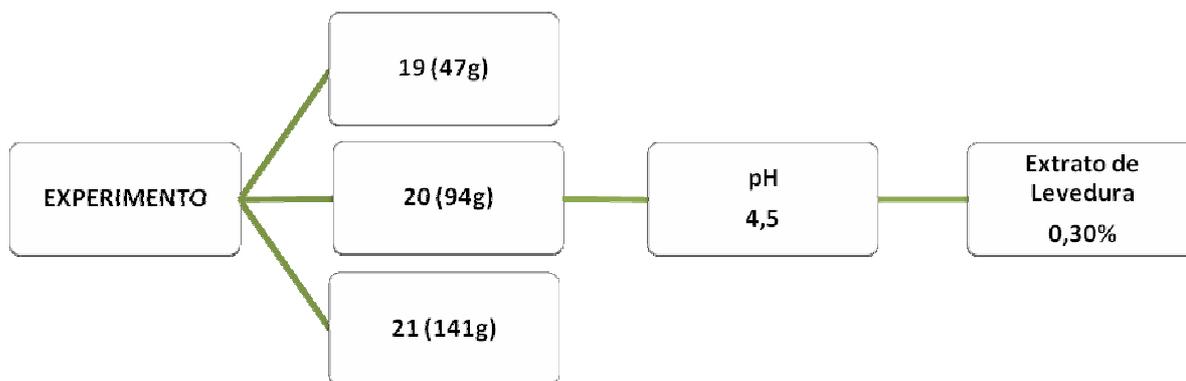


Figura 41 - Condições dos experimentos da série 7.

5.3.7.1 Cinética do Crescimento Microbiano.

Nesta série de ensaios, conforme pode ser visualizado na Figura 42, houve crescimento considerável até 48 horas de fermentação para os 3 ensaios, estabilizando-se em seguida para o ensaio 20. Para o ensaio 19, houve ligeiro crescimento até 96 horas. O ensaio 21 apresentou crescimento brando entre 48 e 72 horas, quando apresentou decréscimo considerável até 96 horas. A concentração celular máxima $6,91 \times 10^5$, $1,12 \times 10^7$ e $8,30 \times 10^6$ ufc/mL, respectivamente, para os experimentos 19, 20 e 21 (para concentrações iniciais de $1,00 \times 10^4$, $1,60 \times 10^5$ e $5,50 \times 10^5$ ufc/mL).

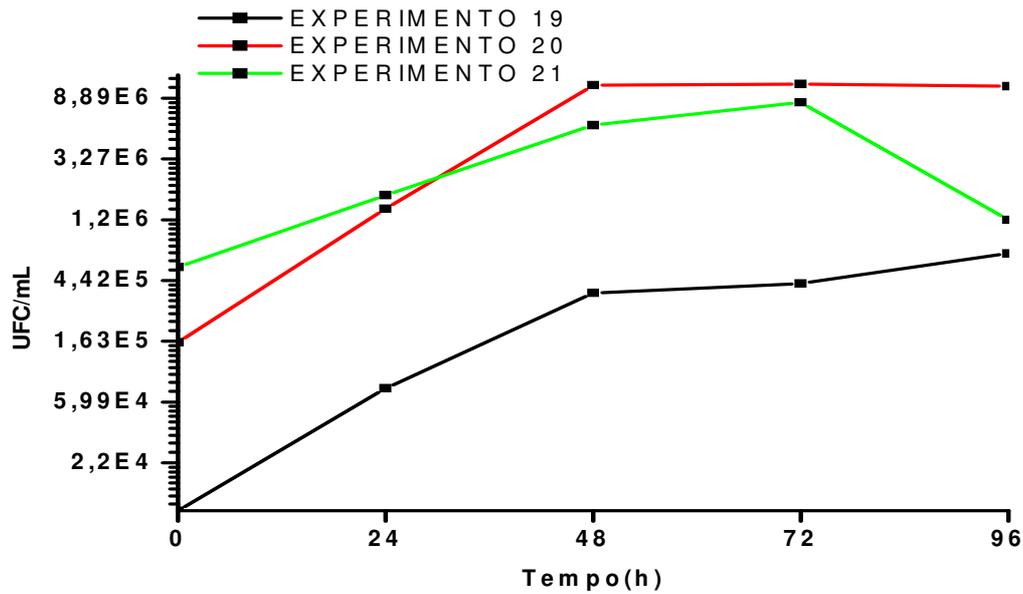


Figura 42-Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 19,20 e 21.

Segundo Cangassu (2003), a determinação das condições ótimas de temperatura, pH e oxigênio auxiliam no melhor entendimento da fisiologia microbiana e possibilita sua aplicação para otimização de sistemas de bioprocessos, gerando aumentos na produção de substâncias de interesse industrial como biomassa microbiana. Para a série 7, os melhores resultados foram para o experimento 20, que tinha como parâmetros: 94g de matéria prima, pH 4,5 e 0,30% de extrato de levedura.

5.3.7.2 Teor de Proteína

Como pode ser visto na Figura 43, o crescimento aconteceu de forma acentuada no período de 48 à 72 horas, nos experimentos 20 e 21. Após esse tempo, houve declínio até 96 horas. Para o experimento 19, o crescimento ocorreu de forma menos expressiva que os ensaios 20 e 21, porém de forma gradativa até 96 horas.

Nos experimentos 19, 20 e 21 não houve acréscimo que excedesse 2,5 vezes, valores inferiores quando comparado aos anteriores; obtendo-se no final da fermentação

6,91%, 9,43% e 10,33% de proteína bruta. Valores que de acordo com a NRC (1989) estão dentro da norma técnica exigida que é no mínimo de 8% para animais em termos de crias recém desmamadas.

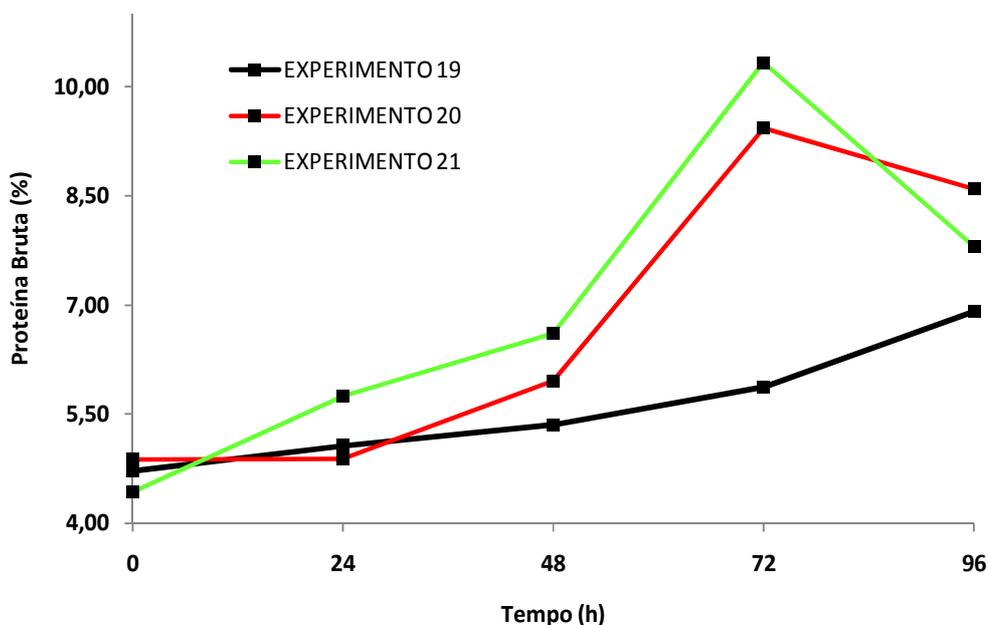


Figura 43- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 19,20 e 21

Trabalho realizado por Amorim et al (2005), utilizando o bagaço do fruto de palma e *Saccharomyces cerevisiae* evidenciou que houve crescimento microbiano tendo, dessa forma, elevação do teor protéico de 1,46 vezes quando comparado ao bagaço *in natura*. Em estudos utilizando *Aspergillus niger* para enriquecimento protéico da polpa de limão, obtiveram aumento protéico de 2,1 vezes, onde o valor de proteína bruta inicial foi de 11,7% de proteína, sendo possível obter um valor de 25,6% de proteína (DE GREGORIO et al., 2002).

Para proteína verdadeira, nos experimentos 20 e 21, o comportamento foi análogo ao da proteína bruta, sendo obtidos maiores valores com 72 horas de fermentação, com aumentos de 2,2 e 2,6 vezes, quando se compara ao valor inicial. No

experimento 19, houve aumento de 2,8 vezes em 96 horas de fermentação (Figura 44). Após 72 horas, a proteína verdadeira apresentou comportamento, nos experimentos 20 e 21, consideravelmente decrescente, enquanto o 19 foi ligeiramente crescente.

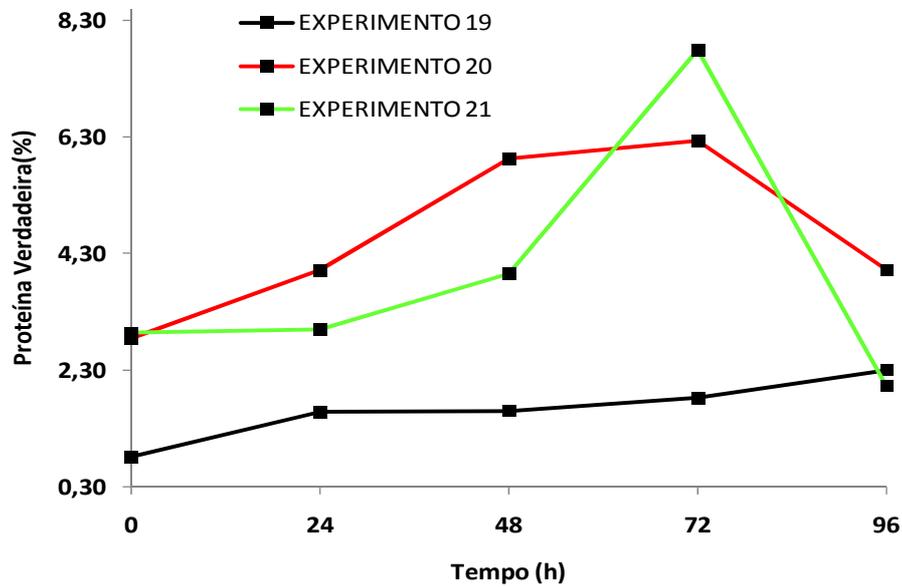


Figura 44- Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 19,20 e 21

5.3.8 Resultados experimentais da série 8

Os valores dos parâmetros para os ensaios 22, 23 e 24 são apresentados na Figura 45.

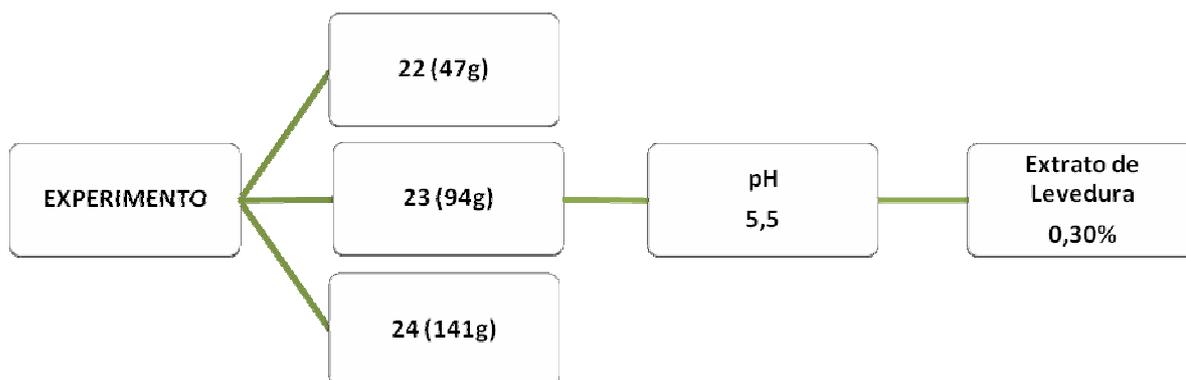


Figura 45 - Condições dos experimentos da série 8.

5.3.8.1 Cinética do Crescimento Microbiano.

De acordo com a Figura 46, nos experimentos 23 e 24 houve crescimento celular expressivo nas primeiras 24 horas e menos acentuado até 96 horas. No experimento 22, o crescimento foi considerável até 72 horas, passando em seguida a apresentar decréscimo também considerável até 96 horas.

Os experimentos 22, 23 e 24, no início da fermentação, apresentaram concentrações celulares de $7,20 \times 10^6$, $6,00 \times 10^5$ e $2,06 \times 10^6$ ufc/mL, onde as maiores concentrações obtidas foram $8,04 \times 10^7$, $2,76 \times 10^7$ e $2,44 \times 10^7$ ufc/mL, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos para o experimento 22 até 72 horas.

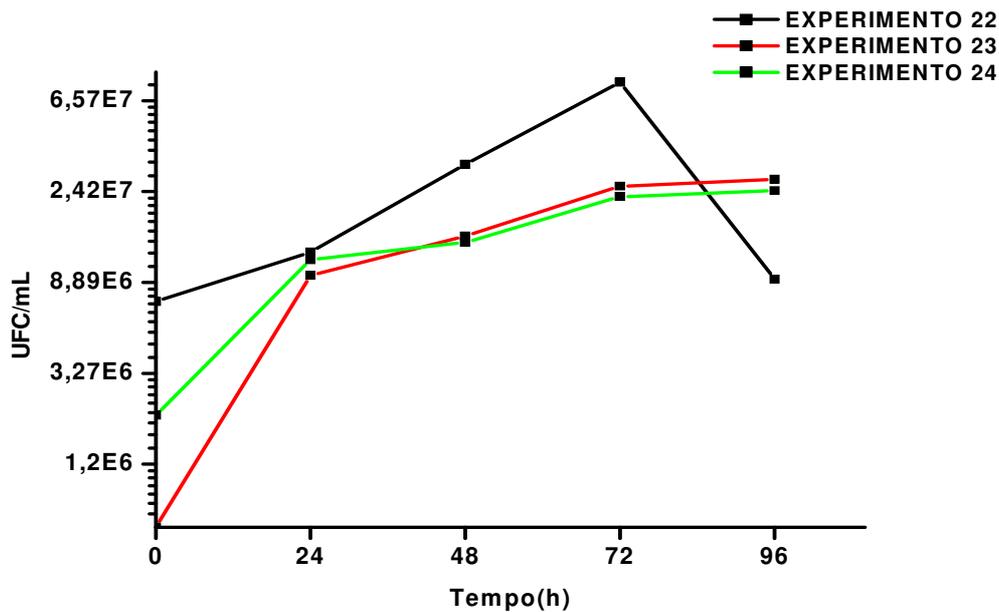


Figura 46- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 22,23 e 24.

No experimento 22, o declínio após 72 horas pode ser relacionado à saturação de substrato, já que a concentração de matéria prima é 47g, inferior aos demais ensaios desta série. Em contrapartida, maior concentração celular adquirida deve ser relacionada ao nível de oxigênio no reator.

Segundo Schmidell (2001), o processo continua até que algum substrato do meio de cultivo acabe e cesse o crescimento do microrganismo. Tendo em vista que há dois aspectos claramente diferenciados que descrevem o crescimento microbiano, um estequiométrico, no qual a concentração final do microrganismo obtido dependerá da concentração e composição do meio de cultivo e o outro, cinético, que indicará com que velocidade ocorre todo o processo. Para o estudo cinético, escolhe-se entre os produtos formados (caso o microrganismo produza mais de um) o de maior valor econômico, em relação aos substratos.

5.3.8.2 Teor de Proteína

De acordo com valores plotados na Figura 47, pode-se observar que no experimento 22 houve crescimento progressivo até 96 horas, sendo que, acentuadamente no tempo entre 72 e 96 horas. O mesmo ocorreu no experimento 23, porém com valores de crescimento significativamente menores. No experimento 24 houve crescimento menos expressivo entre 72 e 96 horas, tendendo à estabilização. O melhor resultado foi obtido no ensaio 22.

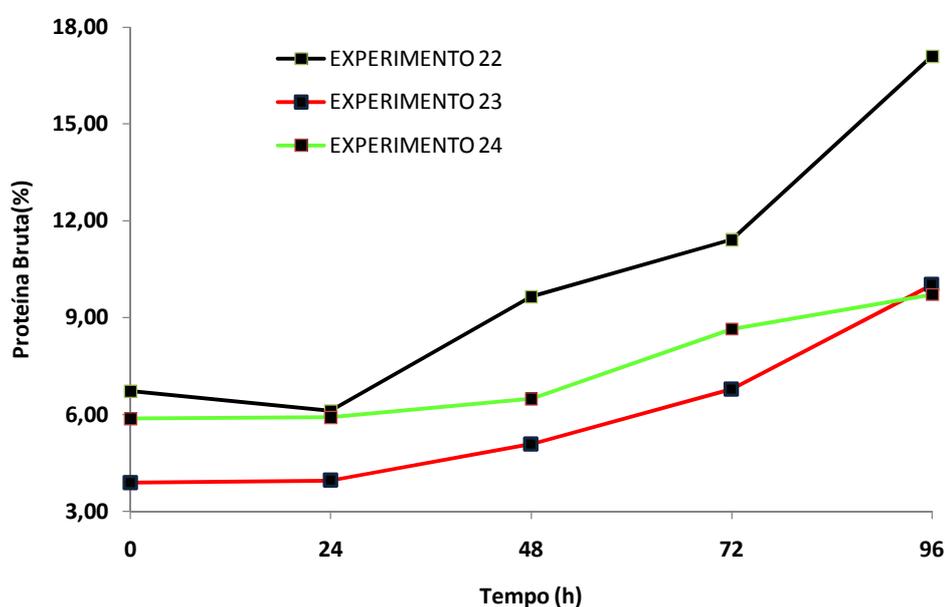


Figura 47-Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 22,23 e 24

Com 96 horas de fermentação a proteína bruta apresentou 17,11%, 10,01% e 9,72%, para os experimentos 22, 23 e 24, respectivamente, representando aumento de 2,8, 2,5 e 1,7 vezes. Bisaria *et al.* (1997), visando produzir ração com alto valor protéico, utilizou palha de arroz e palha de trigo, enriquecidas com fungo comestível *Pleurotus sajor-caju*. O teor protéico inicial da palha de arroz foi de 2,9% e da palha do trigo de 3,1%, alcançando valores de 6,3% e 7,5%, respectivamente, obtendo valores de crescimento, em relação aos números iniciais, de 2 vezes para palha de arroz e de 2,4 vezes para palha de trigo.

Em experimentos anteriores de Silva et al. (2000), observou-se que ao fornecerem dietas com 14 e 17% de PB na MS, para novilhos Nelore, na fase de recria, observaram que o consumo de MS aumentou com o incremento de PB na dieta.

Na bioconversão do mandacaru para produção de bioprodutos, verificou-se que, durante a fermentação semi-sólida do mandacaru, o fungo do *Aspergillus niger* apresentou aumento protéico de 76,9% no tempo de 72 h de fermentação, na temperatura de 30 °C e espessura da camada de 1 cm (Almeida et al., 2009 citado por Muniz, 2009). A espessura utilizada pelos autores citados aproxima-se da que foi utilizada no experimento 22, com espessura aproximada de 1,5 cm. Os parâmetros utilizados no experimento 22 foram os que apresentaram melhor resultado protéico (17,11% de proteína bruta).

Rudravaram et al (2006), obtiveram, através de testes com várias fontes de nitrogênio, o máximo de proteína de 24,30%, utilizando sulfato de amônio (0,6% p/p). Os autores realizaram estudo com enriquecimento protéico de farelo de arroz com o fungo *A. oryzae*, tendo como condições ótimas de processo 60% de umidade, temperatura de 28°C, pH 6,0 e concentração do inóculo de 10⁶ esporos/g de substrato.

Na Figura 48, verifica-se que houve crescimento considerável nos ensaios 22 e 24 até 72 horas de fermentação. A partir deste tempo, no ensaio 24 o crescimento continuou, só que de forma menos acelerada, até 96 horas, enquanto no 22, houve queda centuada no crescimento, no mesmo intervalo de tempo.

No experimento 23, o crescimento ocorreu, de forma menos acentuada que nos ensaios 22 e 24, até 48 horas, quando iniciou o decréscimo até 72 horas, estabilizando-se neste patamar até 96 horas de fermentação.

Para os experimentos 22 e 24, os valores máximos obtidos de proteína verdadeira foram 1,7 e 1,6 vezes maiores que os valores iniciais, com 72 e 96 horas de fermentação, respectivamente. Com 48 horas, no experimento 23, alcançou-se o valor máximo protéico, com aumento de 1,3 vezes (Figura 48).

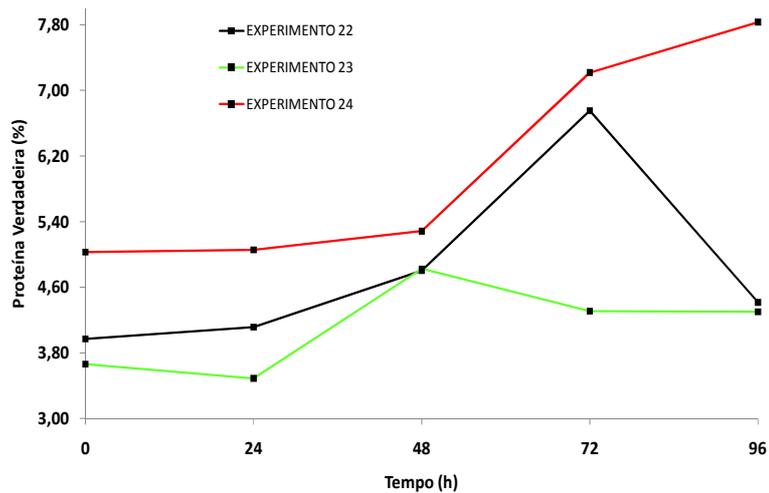


Figura 48-Variação do conteúdo de proteína verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 22,23 e 24.

5.3.9 Resultados experimentais da série 9.

Os valores dos parâmetros para os ensaios 25, 26 e 27 são apresentados na Figura 49.

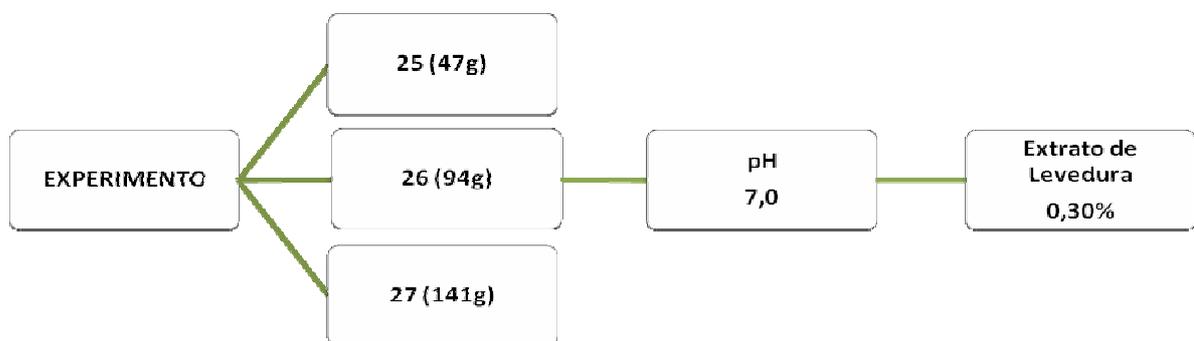


Figura 49- Condições dos experimentos da série 9.

5.3.9.1 Cinética do Crescimento Microbiano.

A Figura 50 evidencia que, no experimento 25, houve crescimento considerável de 0 a 48 horas, estabilizando-se nesse patamar até as 96 horas de fermentação, obtendo-se valor máximo de $1,84 \times 10^7$ ufc/mL (concentração celular inicial de $1,96 \times 10^6$). No experimento 26 houve crescimento gradativo até 96 horas, apresentando concentração microbiana máxima de $1,14 \times 10^7$ ufc/mL (concentração celular inicial de $1,60 \times 10^6$ ufc/mL). No experimento 27, a fermentação se iniciou com $3,55 \times 10^6$ ufc/mL e a maior concentração celular foi obtida com 72 horas ($1,38 \times 10^7$ ufc/mL); após esse tempo, houve declínio do crescimento.

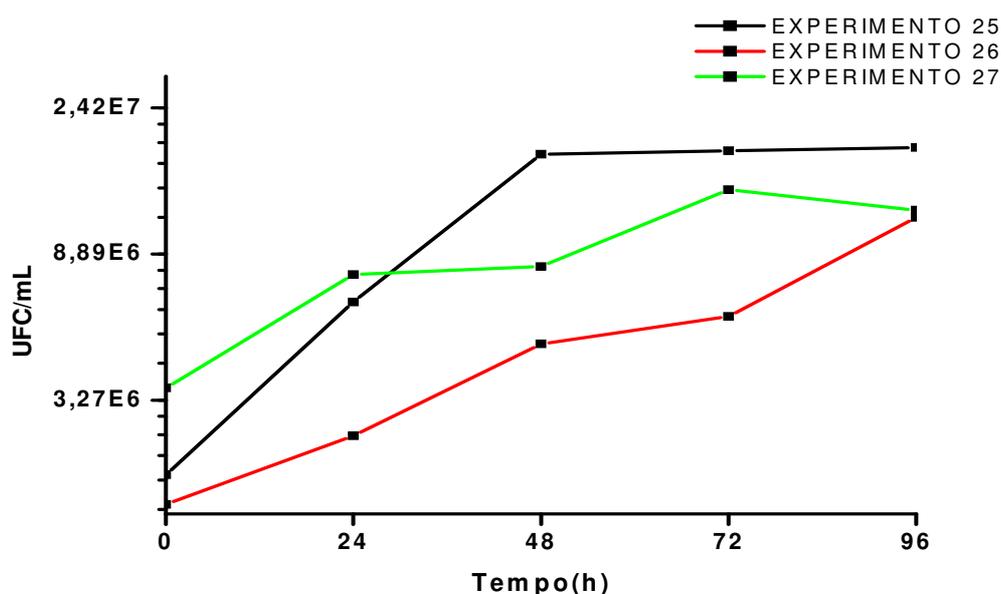


Figura 50- Unidades formadoras de colônias (ufc/mL), durante o processo fermentativo, para os experimentos 25,26 e 27.

5.3.9.2 Teor de Proteína

Como pode ser visto na Figura 51, em todos os experimentos houve aumento de proteína bruta, continuamente até 96 horas. Ocorreu, porém, acentuadamente nos experimentos 25 e 27, principalmente entre 48 horas e o final da fermentação (96 horas).

No experimento 26, esse crescimento significativo ocorreu até 72 horas, quando houve declínio, tendendo à estabilização.

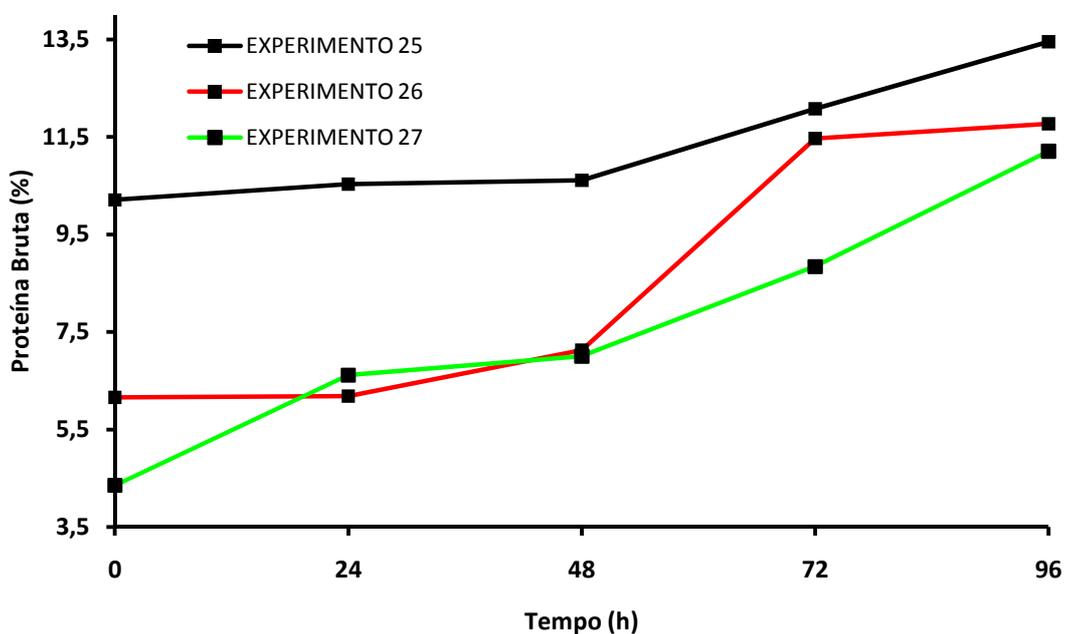


Figura 51- Variação do conteúdo de proteína bruta no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 25,26 e 27.

Observa-se que nos experimentos 25, 26 e 27 os valores máximos de proteína bruta são de 13,45%, 11,77% e 11,21%, respectivamente (aumentos de 1,3, 1,9 e 2,6 vezes em relação ao valor inicial, após 96 horas de fermentação).

Valores iniciais alto de proteína relacionam-se a quantidade de extrato de levedura que foi inserido ao meio (0,3%), quando se compara com os outros experimentos. Os valores de proteína bruta iniciais para os experimentos 25, 26 e 27, são de 10,21%, 6,16% e 4,36%, respectivamente. Também pode ser incorporada uma solução nutriente ao substrato sólido, visando adequá-lo às condições nutricionais do microrganismo. Para o enriquecimento protéico de resíduos sólidos, normalmente se introduz fonte de nitrogênio tais como amônia, uréia, triptona ou soluções sintéticas como sulfato de amônia (PANDEY *et al.*, 2001).

Franco et al (2010), utilizando *Aspergillus niger* e resíduos de goiaba que no início da fermentação tinham 6,43% de Proteína Bruta, após 168 horas de fermentação

obtiveram 11,38% (acr3scimo de 1,7 vez), valor pr3ximos ao que foi obtido pelos autores com outros res3duos. Estes valores s3o pr3ximos aos que foram obtidos no experimento 26.

Na Figura 52 observa-se que o teor de prote3na verdadeira foi crescente durante todo o tempo de fermenta3o, para os experimentos 25 e 26. No caso do experimento 27, o crescimento foi acentuado at3 24 horas, mantendo crescimento, de forma branda, at3 72 horas, quando come3ou decr3scimo acentuado at3 96 horas de fermenta3o.

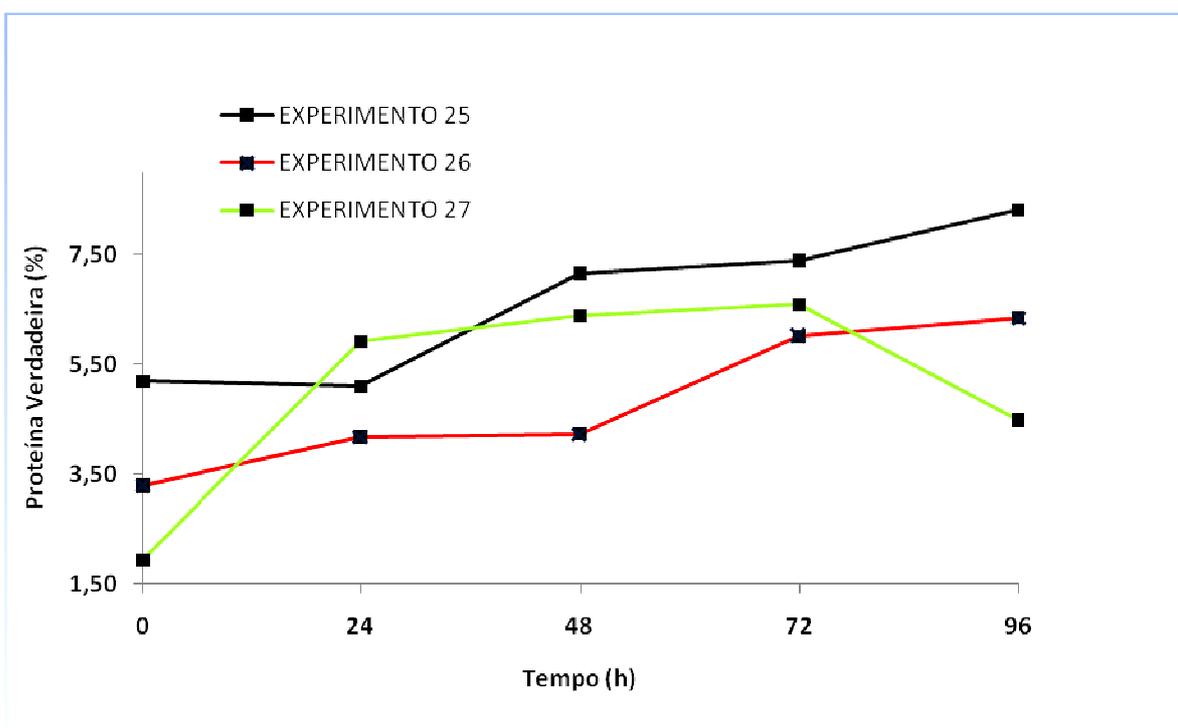


Figura 52- Varia3o do conte3do de prote3na verdadeira no decorrer do processo fermentativo, para os experimentos 25,26 e 27.

Os aumentos de Prote3na verdadeira foram de 1,6 e 1,9 vezes, nos experimentos 25 e 26; valores pr3ximos e iguais aos de prote3na bruta, respectivamente. Valores estes obtidos com 96 horas de fermenta3o. No experimento 27, o valor m3ximo de prote3na verdadeira foi alcan3ado com 72 horas de fermenta3o, que representou acr3scimo de 3,4 vezes.

6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A tabela 13 apresenta os resultados obtidos em relação aos teores de proteína bruta utilizando-se três variáveis (massa de algaroba, valor de pH e teor de extrato de lêvedo).

Tabela 13. Teores de proteína bruta em função de variáveis experimentais.

Experimentos	Matéria Prima (g/reator)	pH	Extrato de Levedura (%)	PBS %	
				48h	96h
1	47	4,5	0,10	9,6	5,9
2	94	4,5	0,10	3,7	9,8
3	141	4,5	0,10	3,1	5,0
4	47	5,5	0,10	10,4	4,3
5	94	5,5	0,10	8,4	7,1
6	141	5,5	0,10	7,7	1,8
7	47	7,0	0,10	12,4	6,3
8	94	7,0	0,10	7,9	6,9
9	141	7,0	0,10	8,2	6,4
10	47	4,5	0,20	11,0	5,2
11	94	4,5	0,20	6,4	3,0
12	141	4,5	0,20	4,6	3,1
13	47	5,5	0,20	6,7	10,3
14	94	5,5	0,20	7,2	13,8
15	141	5,5	0,20	7,5	8,1
16	47	7,0	0,20	13,3	15,0
17	94	7,0	0,20	9,8	16,4
18	141	7,0	0,20	4,2	6,3
19	47	4,5	0,30	5,3	6,9
20	94	4,5	0,30	6,0	8,6
21	141	4,5	0,30	6,6	7,8
22	47	5,5	0,30	9,6	17,1
23	94	5,5	0,30	5,1	10,0
24	141	5,5	0,30	6,5	9,7
25	47	5,5	0,30	10,6	13,4
26	94	7,0	0,30	7,1	11,8
27	141	7,0	0,30	7,0	11,2

A avaliação estatística foi feita para os resultados obtidos nos 27 experimentos, executados de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 13, utilizando-se o programa *Design Expert 7.1.5*. O resumo da análise estatística para Proteína Bruta, base seca - PBS 48 horas e PBS 96 horas, está apresentado nos parágrafos seguintes.

6.1 Proteína Bruta Seca com 48 horas

O programa *Design Expert 7.1.5* sugere que um modelo linear é o melhor ajuste para PBS 48 horas. O modelo é a equação que relaciona a resposta com as variáveis de entrada controladas e pode ser descrito conforme a equação 1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \varepsilon \quad (1)$$

Sendo Y a resposta, β_0 o efeito médio global; A (matéria prima), B (pH) e C (% de extrato de levedura) as variáveis de entrada controladas; β_1 , β_2 e β_3 os efeitos dos níveis e ε um componente de erro.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo foi significativo em nível de 95% de confiança. O modelo codificado proposto está descrito na equação 2:

$$\text{PBS 48 horas (\%)} = +7,63 - 1,86A + 1,34B - 0,42C \quad (2).$$

Tabela 14. ANOVA completa para todos os termos na % de proteína bruta seca em 48 horas.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p
Modelo	98,09	3	32,70	10,01	0,0002
A	62,35	1	62,35	19,09	0,0002
B	32,54	1	32,54	9,96	0,0044
C	3,21	1	3,21	0,98	0,3319
Resíduo	75,12	23	3,27		
Total	173,21	26			

A: Matéria prima; B: pH; C: % de Extrato de lêvedo; SQ: soma dos quadrados, GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática

A tabela 14 mostra a análise de variância para esta resposta. Os valores de F são comparados a valores tabelados a 95% de confiança. Se o valor de F é maior que o tabelado a hipótese de não haver influência (nula) é rejeitada, ou seja, o fator afeta significativamente a %PBS 48 horas. Os valores de p inferiores a 0,05 indicam que há

significância, mostrando que o modelo é válido e os termos A (matéria prima) e B (pH) influenciam na resposta.

O gráfico de perturbação (Figura 53) mostra o desvio do ponto de referência e o que acontece com a resposta. Quanto mais inclinadas forem as retas maior é a influência da variável independente. A partir disto, verifica-se que as variáveis mais influentes na resposta são A (matéria prima) e B (pH). A variável A tem uma influência negativa, ou seja, quando esta caminha do nível mais baixo (-1) para o mais alto (+1) a resposta é diminuída. Já a variável B tem uma influência positiva, ou seja, quando esta caminha do nível mais baixo (-1) para o mais alto (+1) a resposta é aumentada. A variável C tem uma leve influência negativa.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
PBS 48 horas

Actual Factors
A: M. Prima = 94.00
B: pH = 5.75
C: Extrato de levedura = 0.20

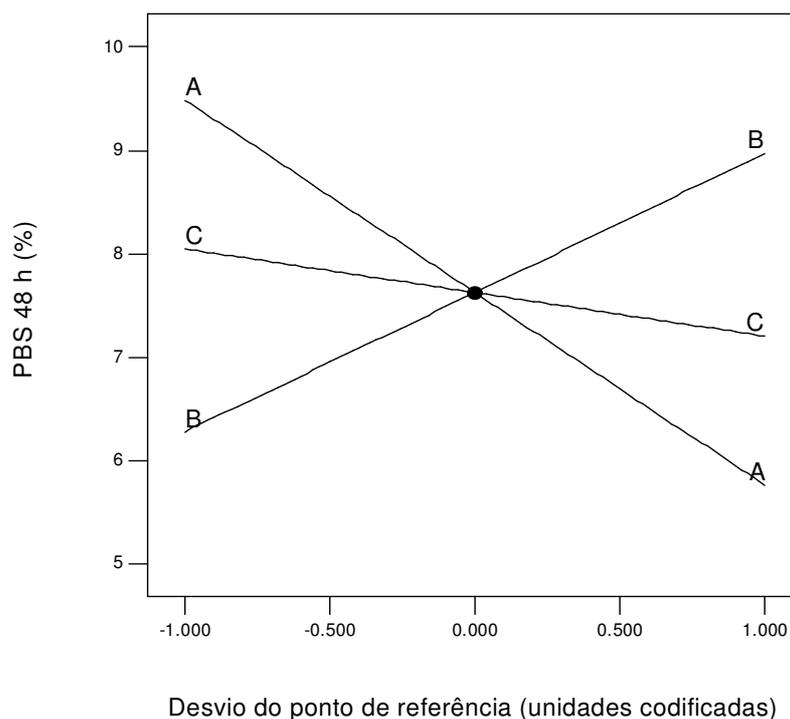


Figura 53- Gráfico de perturbação para a % de proteína bruta seca formada em 48 horas (%PBS).

O modelo adotado pode ser avaliado através do gráfico de probabilidade normal dos resíduos conforme mostrado na Figura 54, sendo que os valores próximos a reta indicam a validade do modelo proposto.

Design-Expert® Software
PBS 48 horas

Color points by value of
PBS 48 horas:

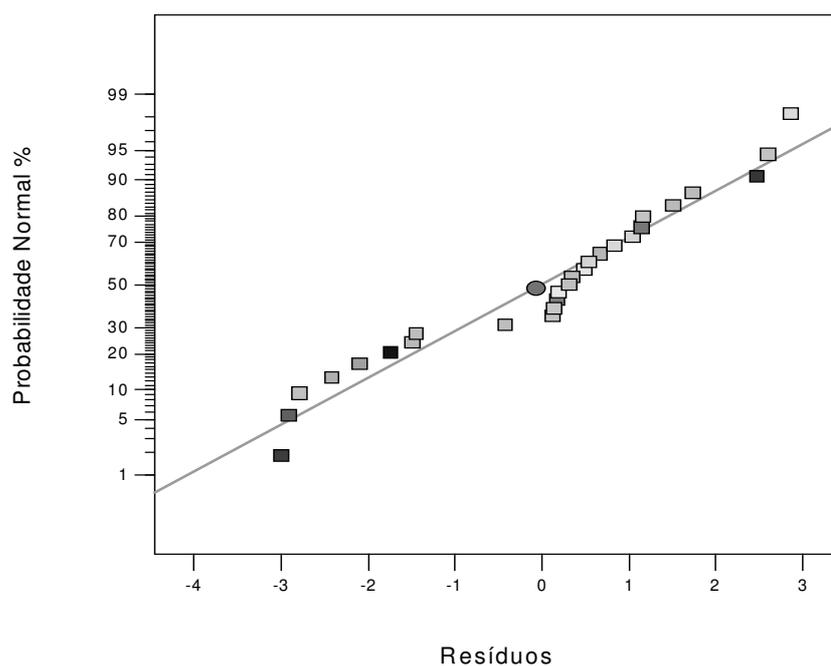


Figura 54- Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para % proteína bruta seca em 48 horas (%PBS).

6.2 Proteína Bruta Seca (PBS) com 96 horas

O modelo linear também é o melhor ajuste para PBS 96 horas.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo foi significativo em nível de 95% de confiança. O modelo codificado proposto está descrito na equação 3:

$$\text{PBS 96 horas (\%)} = +8,56 - 1,39A + 2,13B + 2,39C \quad (3)$$

Tabela 15. ANOVA completa para todos os termos na % de proteína bruta seca em 96 horas (%PBS 96 horas)

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p
Modelo	219,36	3	73,12	7,94	0,0008
A	34,92	1	34,72	3,77	0,0645
B	81,72	1	81,92	8,90	0,0066
C	102,72	1	102,72	11,16	0,0028
Resíduo	211,72	23	9,21		
Total	431,08	26			

A: Matéria prima; B: pH; C: % de Extrato de lêvedo; SQ: soma dos quadrados, GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática

A tabela 14 mostra a análise de variância para esta resposta. Os valores de p inferiores a 0,05 indicam que há significância, mostrando que o modelo é válido e os termos B e C influenciam na resposta.

Através do gráfico de perturbação (Figura 55) nota-se que a variável A (matéria prima) continua com uma influência negativa na resposta, porém menos expressiva que em 48 horas. O mesmo acontece com B (pH) que mantém a influência positiva. A variável C (%extrato de levedura) mostra uma influência positiva significativa, diferente daquela citada na resposta de 48 horas. Isto pode ser explicado pelo fato de que o extrato de levedura é um nutriente essencial para a produção da proteína após 48 horas de processo.

DESIGN-EXPERT Plot

PBS 96 horas

Actual Factors

A: M. Prima = 94.00

B: pH = 5.75

C: Extrato de levedura = 0.20

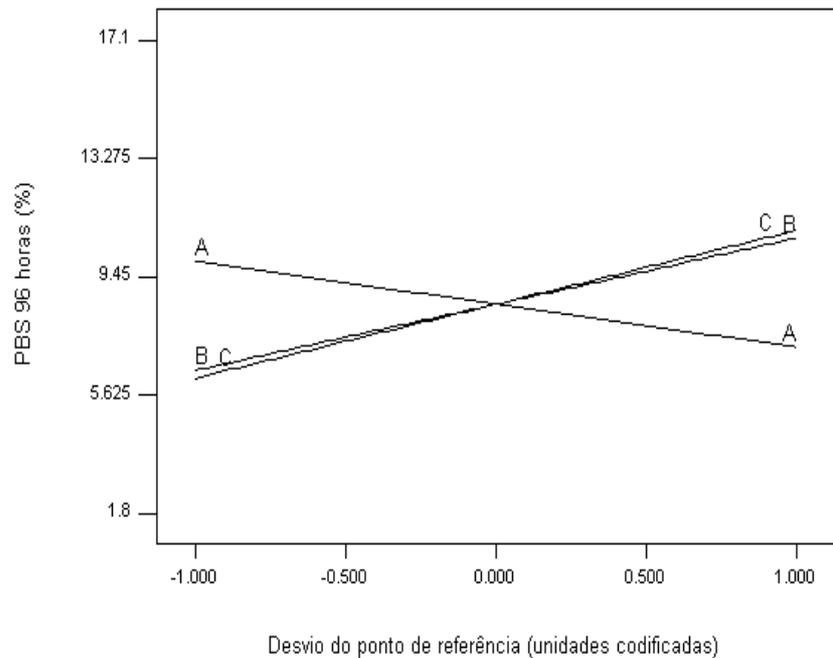


Figura 55- Gráfico de perturbação para a % de proteína bruta seca em 96 horas (%PBS 96 horas).

O modelo adotado pode ser avaliado através do gráfico de probabilidade normal dos resíduos conforme mostrado na Figura 56.

DESIGN-EXPERT Plot
PBS 96 horas

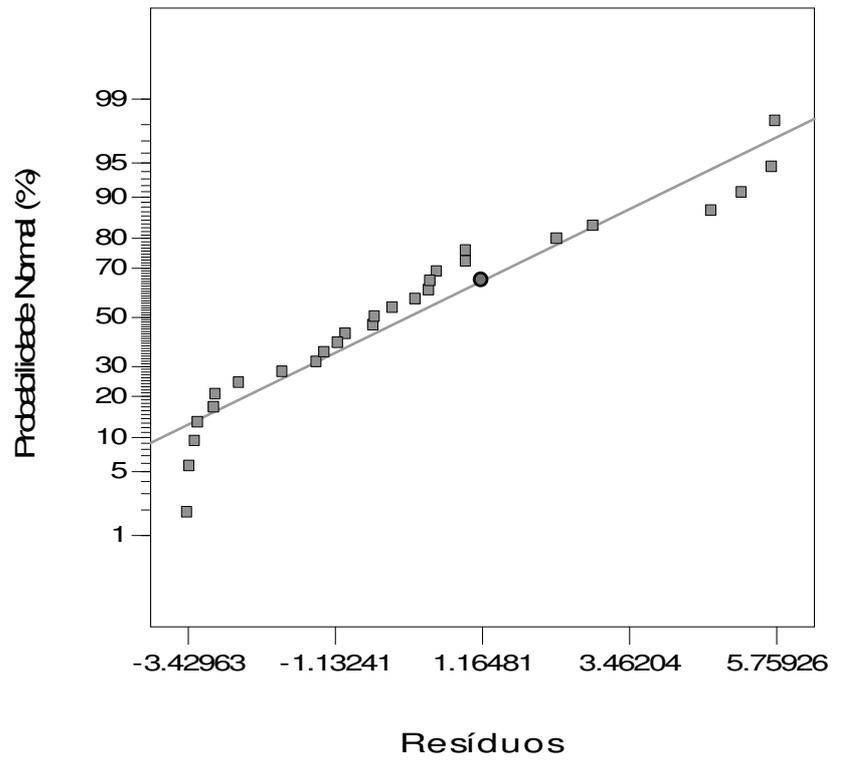


Figura 56- Gráfico de perturbação para a % de proteína bruta seca (%PBS).

6.3 Conclusão da avaliação estatística

Os melhores resultados para enriquecimento protéico da algaroba foram para o tempo de processo de 96 horas. Para isto é necessário que a variável independente A (matéria prima) esteja no nível inferior (47g/reator) e as variáveis B (pH) e C (%extrato de lêvedo) estejam nos níveis superiores (7,0 e 0,30%, respectivamente).

7 CONCLUSÕES.

- Conseguiu-se um produto com 17% de proteína.
- Os melhores resultados para enriquecimento protéico da algaroba foram para o tempo de processo de 96 horas, usando-se 47g de matéria prima/reator, 0,30% de extrato de lêvedo e pH de 7,0.

8 SUGESTÃO PARA TRABALHO FUTURO

- Há necessidade do prosseguimento da pesquisa visando a obtenção de um produto com um mínimo de 40% de proteína, através do estudo de parâmetros, tais como, tipo e teor de fontes de nitrogênio, aeração, utilização de outros microrganismos.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, M.E.; SILVA, O.T.; LIMA JUNIOR, D.M.; BARRETO, M.L.J.; OLIVEIRA, J.P.F; Algarobeira (*Prosopis juliflora*): Uma alternativa para alimentação de ovinos no nordeste brasileiro, *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)* v.5, n.2, p. 01 - 04 abril/junho de 2010.

ALBUQUERQUE, P.M.; Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã, Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2003.

ALMEIDA, M.M.; CONRADO, L. de S.; SILVA, F.L.H. da; FREIRE, R.M.M.; VALENÇA, A.R.; Caracterização de frutos do mandacaru provenientes de duas cidades paraibanas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.11, p.15-20, 2009.

ALMEIDA, F.A.C.; SILVA, J.E; ARAUJO, M.E.R. et al.;Componentes Químicos e Estudo da Umidade de Equilíbrio em Vagens de Algaroba. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.5, n.1, p.43-50, 2003.

ALVES, D.D.; Desempenho produtivo e características de carcaças de bovinos Zebu e cruzados Holandês-Zebu (F1), nas fases de recria e terminação. Viçosa: UFV, 2001. 77p. (Dissertação Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

AMORIM, H. V., Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. Piracicaba – SP, Fermentec, 448p, 2005.

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 fícus-indica Mill).* In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 6 p., Campinas-SP, 2005

ANTONINI, S.R.C.; Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria, Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias – Campus de Araras, Deptº. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural,2004

AOAC - Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos, Vol. 3. São Paulo: Editora Edgard, 2001.

ARAÚJO, L.F.; DIAS, M.V.C; BRITO, E.A.; OLIVEIRA JUNIOR, S.; Enriquecimento protéico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal, Tecnologia & Ciências Agropecuária, João Pessoa, v.3, n.3, p.47-53, set. 2009.

ARAÚJO, L. F; BRITO, E. A; NETO, M. B.; OLIVEIRA, S.; SANTOS, E. S; Bioconversão da Palma Forrageira, Tecnologia & Ciências Agropecuária, João Pessoa, v.1, n.1, p.59-61, set. 2007.

ARAÚJO, L. F.; MEDEIROS, A. N.; PERAZZO NETO, A.; CONRADO, L. S.; SILVA, F. L. H.; Estudo do enriquecimento protéico do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P. DC) utilizando leveduras por fermentação semi-sólida. In: Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis, 2003.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A.; Production of food grade yeasts. Food Technology Biotechnology, v. 44, n. 3, p. 407-415, 2006.

BEZERRA, M.S.; Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melaço como substrato; Dissertação (Mestrado em Eng. Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.

BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P.; Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion. Bioresource Technology, v.59, n.1, p.5-8, 1997.

BORGES, I.F.; Obtenção e caracterização do melado de algaroba (*prosopis juliflora* (sw) d.c.) e sua utilização em uma formulação alimentícia, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

BRAGA, S. P.; Caracterização física, química e presença de fatores antinutricionais em diferentes variedades de feijão-de-lima (*Phaseolus lunatus L.*) cultivadas no estado da Paraíba. 2003. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

BUTOLO, J.E.; Leveduras vivas e termolizadas na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES ALTERNATIVOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, p.191-198, Campinas, 2001.

CAMPOS,, A. R. N.; SANTANA, R. A. C.; DANTAS, J. P.; OLIVEIRA, S. C.; SILVA, F. L. H.; Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju por cultivo semi-sólido, Revista de Biologia e Ciências da Terra, v.5, n.2, p. 50-54, set 2005.

CAMPOS, A. R. N.; Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju (*Anarcadium occidentale L.*) por fermentação semi-sólida. Campina Grande, Paraíba, 87p. (Dissertação) - Universidade Federal de Campina Grande, 2003.

CAMPOS, A. R. N.; DANTAS, J. P.; SILVA, F. L. H.; Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju (*Anarcadium occidentale*) por fermentação semi-sólida, In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, SINAFERM, Florianópolis, 2003.

CANGUSSU, A.S.R.; Cinética de crescimento e metabolismo de levedura potencialmente probiótica; Dissertação(Mestrado); Universidade Federal de Viçosa, 2003.

CASTRO, C.C.; FIGUEIREDO, A.L.F.; ALVES, J.G.L.F, STROPPA, C.T.; Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros, Rev. Ciências agrotécnica., Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1978-1983, 2009.

COSTA, C.T.C.; Atividade anti-helmíntica e imunomoduladora de extratos de *Cocos nucifera L.*; Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza- CE, 2008.

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

DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B.; Continuous culture of flocculent yeast for ethanol production. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Biotechnology Department, Portugal, 2006.

FRANCO, M.; SANTOS, T.C.; GOMES, P.P.; ABREU FILHO, G.; Enriquecimento protéico dos resíduos sólidos do processamento de frutas; *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.6, N.11; 2010.

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.

FURLAN, S. A.; BOUILLOUD P.; CASTRO, H. F.; Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeast. *Proc. Biochem.*, v. 29, p. 657 - 662, 1994.

GUIMARÃES, T.M.; Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho, Dissertação Mestrado- Universidade Federal do Paraná, 2005.

HOLANDA, J. S.; OLIVEIRA, A. J. E.; 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.

JARDIM, W. R.; Alimentos e alimentação do gado bovino São Paulo: Agrônomo Ceres, p. 45-46, 1976.

KURZMAN, C. P.; FELL, J. W.; The yeasts: a taxonomic study. 4. ed. New York:Elsevier, 1074 p., 1998.

LEHNINGER, A.L.; Princípio da Bioquímica, 4^a ed, Edgard Blücher, São Paulo, 2002.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, Vol. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

LIMA JÚNIOR, V.; Caracterização da dieta e avaliação de métodos de estimativa de consumo em caprinos suplementados na caatinga. 20f. Dissertação (Mestrado Zootecnia) - Núcleo de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2006.

MADRUGA, M.S.; SANTOS, H.B.; ANTUNES, N.L.M.; Avaliação nutricional de uma dieta suplementada com multimistura: Estudo em Ratos. Ciências e Tecnologia de Alimentos (Campinas) 2004; 24(1); 129-133.

MARTINS, C. V. B.; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; Fusão de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por floculação e produção de H₂S. Sci. Agric. Vol. 55, Nº 1, Piracicaba, jan/apr 1998.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Agricultura sustentável. Brasília: Edições IBAMA, 2000.

MUNIZ, M.B.; Processamento das vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) para produção de bioprodutos; Tese (Doutorado em Engenharia de Processos); Universidade Federal de Campina Grande, 2009.

NAGEL, F. J.; OOSTRA, J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A.; Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. Process Biochemistry, v.35, n.1, p.69-75, 1999.

NEGREIROS, A. N. M. et al. Suplementação aminoacídica da farinha de algaroba *Prosopis juliflora* (Sw) D.C.). Revista da Associação Brasileira da algaroba, Mossoró - RN, v.1, n.3, p. 181-2, 1987.

OLIVEIRA, E. G.; Métodos físico-químicos; Apostila adotada em aula prática; Universidade Federal de Alagoas, 2007.

OLIVEIRA, L. S. C.; AMORIM, B. C.; MOTA, M. M. A.; SIMÕES V. S.; SILVA, F. L. H.; Estudo do enriquecimento protéico do bagaço da fruta da Palma forrageira (opuntia fícus-indica mill),VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica,UNICAMP,2005.

OLIVEIRA, M. M.; SANTOS, J. F.; BRITO , L. M. P.; CAMPOS , A. R. N.; SILVA ,F. L. H.; Enriquecimento Protéico da Casca do Abacaxi por Fermentação Semi-Sólida, XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2005.

OLIVEIRA, L. P.; MAEDA, R.; ANDRADE, J. S.; PEREIRA, N.; CARVALHO,S. M. S.; ASTOLFI, S.; Processo Fermentativo para Produção de Bebida Alcoólica de Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth); Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.

OLIVEIRA JR., R.C.; PIRES, A.V.; FERNANDES, J. J. R. et al. Avaliação de marcadores para estimar a digestibilidade dos nutrientes em novilhos nelore alimentados com dietas contendo alto teor de concentrado e fontes nitrogenadas. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.33, n.3, p.749-758, 2004.

OLIVEIRA, N.C., SILVA, J.H.V; JORDÃO FILHO, J.; SILVA, E.L., RIBEIRO, M.L.G, Uso da Farinha Integral da Vagem de Algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.) na Alimentação de Codornas Japonesas, Revista Brasileira de Zootecnia, vol.31 n°.4 Viçosa , 2002.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Rewiews, v. 64,p. 34-50, 2000.

PACHECO, T.F.; Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente, Tese (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P.; Solid-State Fermentation in Biotechnology: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech, 2001.

PASIECZNIK, N.M., Managing *Prosopis juliflora* for timber production in arid zones. In: Neelakantan KS et al., eds. Management and Utilisation of *Prosopis juliflora* – Training Manual, pp85-90. Forest College and Research Institute, Tamil Nadu Agricultural University, Mettupalayam, India, 2001.

PEPPLER, H.J.; Food yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Eds.). **The Yeasts:** Yeast technology. London: Academic Press, v.3, p.421-462,1970.

PERAZZO NETO, A.; Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus-indica*) e vagens de *algaroba* (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger*. Tese (Doutorado em Ciências); Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.

PINHEIRO, D.M.; PORTO, K.R.A.; MENEZES, M.E.S.; A Química dos Alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais, Maceió, EDUFAL, 2005.

PINHEIRO, F.M.L.; ESPINDOLA, G.B.; FUENTES, F.F.; PINHEIRO, M.J.P.; GUERREIRO, M.E.F.; FREITAS, E.D.; Farinha de varinha de vagem de algaroba como fonte de energia, em rações finais para frangos de corte. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, **Anais...** Botucatu, SBZ, p.180-182, 1998.

PONTES, C. R.; Enriquecimento protéico do bagaço de caju através de fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus Níger*, Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

QUEIROZ, A.C.; SILVA, D.J.; **ANÁLISE DE ALIMENTOS-** Métodos Químico e Biológicos, Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, Viçosa- MG, 2006.

REBOUÇAS, G. M. N.; Farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) na alimentação de ovinos Santa Inês. Itapetinga: UESB. 44p. (Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção de Ruminantes), 2007.

RENNÓ, L.N.; Consumo, digestibilidade total e parcial, produção microbiana, parâmetros ruminais e excreções de uréia e creatinina em novilhos alimentados com dietas contendo quatro níveis de uréia ou dois de proteína. Viçosa: UFV, 2003. 252p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

RODRIGUES, A. M.; Efeito do Cloreto de Sódio na Produção de Proteínas (*Shaccharomyces ceravisiea*) em Fermentação Semi-sólida. Ciência, Tecnologia., Campinas, v.21, n.1, p. 57-62, 2001.

ROEPCKE, C.B.S.; Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico; Tese Mestrado- UFPR, Curitiba- PR, 2007.

RUDRAVAM, 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, v. 2, 2006.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; Biotecnología Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, v. 3, São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

SHOJAOSADATI, S. A.; FARAIDOUNI, R.; MADADI-NOUEI, A.; MOHAMADPOUR, I.; Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*, Resources, Conservation and Recycling, v.27, n.1-2, p.73-87, 1999.

SILVA, C. G. M.; Processo Biotecnológico para conversão de algaroba (*Prosopis juliflora*(SW) D.C.) em etanol, Tese de Doutorado - Universidade Federal de Pernambuco.CCS. Nutrição, 2007.

SILVA, C.G.M., MELO FILHO, A.B.; PIRES, E.F., STAMFORD, T.L.M., Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC), Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(4): 733-736, out.-dez. 2007.

SILVA, C.G.; GOUVEIA, C.Q.; SOARES,S.E.R.; FIGUEIRÊDO,B.C.; Avaliação Nutricional do Resíduo da Vagem da Algaroba (*Prosopis juliflora* Sw. D.C.) após a Extração do Caldo para Fabricação de Aguardente.

SILVA, E.L.; SILVA, J.H.V.; JORDÃO FILHO, J. et al.; Valores energéticos e efeitos da inclusão do farelo de vagem de algarobeira (*P. juliflora* (Sw.) D.C.) em substituição ao milho em rações de poedeiras comerciais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 61, 2002.

SILVA, E.L.; SILVA, J.H.V.; JORDÃO FILHO, J. et al.; Uso do farelo de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.) processada a calor na alimentação de poedeiras comerciais. In: APINCO, 2001, Campinas. Anais...Campinas: FACTAp.21, 2001.

SILVA, J.H.V.; TOLEDO, R.S.; ALBINO, L.F.T.; Composição química e valores energéticos da semente de cunhã (*Clitorea ternatea* L.) feijão guandú (*Cajanus cajan*) e da vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.) para aves. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.891-892, 2001.

SILVA, F.F., ÍTAVO, L.C., VALADARES FILHO, S.C. et al.; Desempenho produtivo de novilhos nelore na recria e terminação com diferentes níveis de concentrado na dieta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000. Viçosa, 2000.

SILVA, S; AZEVEDO, A. R.; Algarobeira perguntas e respostas: BN/UFC. In: I CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO DE ANIMAL, 1998, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p. 103, 1998.

SILVA, J.F.C., LEÃO, M.I.; Fundamentos de nutrição dos ruminantes. Piracicaba: Livroceres. 380p., 1979.

SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B.; Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v.27, p.805-811, 2007.

STEIN, R. B. S.; TOLEDO, L. R. A.; ALMEIDA, F. Q. et al.; Uso do farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Swartz) D.C.) em dietas para eqüinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.4, p.1240-1247, 2005.

TABOSA, I.M.; MEDEIROS, V.T.; RIET-CORREA, F.; AZEVEDO, E.O.; Pitiose cutânea com metastasi pulmonar em ovinos em la región semi-árida del nordeste

brasileiro. X Congresso Latinoamericano de Buiatria, Paisandú – Uruguai, p.233-234, 2002.

TABOSA, I.M.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V.D.; MEDEIROS, R.M.T.; Intoxication by prosopis juliflora pods (Mesquite beans) in cattle and goats in northeaster Brazil. Toxic plants and other natural toxicants. CAB International. Glasgow, In Press. 2002.

TELES M. M.; 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.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiology. 6 ed. Califórnia: Art Méd,2002.

VALADARES, R.F.D., GONÇALVES, L.C., RODRIGUEZ, N.M. et al.; Níveis de proteína em dietas de bovinos. 1. Consumo e digestibilidades aparentes totais e parciais. Revista Brasileira de Zootecnia, v.26, n.6, p.1252-1258, 1997.

VAN SOEST, P.J.; Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: Cornell, 1994.

VASCONCELOS, J.N.; Fermentações Etanólicas, In: Cana-de-açúcar- Bioenergia, Açúcar e Álcool- Tecnologias e Perspectivas, 429 p., 2010.

VENDRUSCOLO, F.; KOCH, F.; PITOL, L. O.; NINOW, W. J. L.;

Produção de proteína unicelular a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v.1, n.1, p.53-57, 2007.

VIEGAS, M.C.; Otimização de sistema de fermentação alcoólica continua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características flocculantes, Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 150 p.2003.

VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. Revista de Nutrição, v.13, n.2, p.127-134, 2000.

VILLAS BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; Bioconversão do bagaço de maçã: enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, v.14, p.38-42, 2000.

ZHENG, Z.; SHETTY, K.; Solid-state production of beneficial fungi on apple processing wastes using glucosamine as the indicator of growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.783-787, 1998.