



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CAMPUS DE CUITÉ

**ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO FACHEIRO POR
FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA**

CUITÉ- PB

2014

JOSILANIA BATISTA DE OLIVEIRA

**ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO FACHEIRO POR
FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Campina Grande, como forma de obtenção do Grau de Licenciado em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Regina Nascimento Campos

CUITÉ - PB

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

O48e Oliveira, Josilania Batista de.

Enriquecimento protéico do facheiro por fermentação semi-sólida. / Josilania Batista de Oliveira – Cuité: CES, 2014.

68 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Química) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2014.

Orientadora: Ana Regina Nascimento Campos.

1. Enriquecimento protéico. 2. *Pilosocereus pachycladus*.
3. Levedura. I. Título.

CDU 577.122.5

JOSILANIA BATISTA DE OLIVEIRA

**ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO FACHEIRO POR
FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Campina Grande, como forma de obtenção do Grau de Licenciado em Química.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Regina Nascimento Campos

(Orientadora)

Prof. Dr. Renato Alexandre Costa de Santana

(Examinador)

Prof. Dr. Marciano Henrique de Lucena Neto

(Examinador)

Dedico,

“Aos meus pais, Cicero e Lucia que sempre me deram todo apoio.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo fim de mais essa etapa, pelos sonhos que se concretizam. Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas.

A meus pais **Cicero Silva de Oliveira** e **Lucia Batista de Oliveira**, meu abrigo seguro, de onde recebi apoio incondicional nessa empreitada. Os primeiros a sonhar tudo isso, agradeço por acreditarem sempre na minha capacidade.

A minha irmã **Josiele Batista de Oliveira**, agradeço o apoio e afeto.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a **Ana Regina Nascimento Campos**, agradeço a condução nos primeiros e essenciais passos da minha formação. Grata pelo dinamismo, a confiança, o carinho, enfim, por compreender e incentivar a concretização desse trabalho.

A todos os meus professores que foram mais que transmissores de conhecimento, foram amigos e orientadores para que eu tivesse uma melhor formação profissional.

Aos pesquisadores do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Alimentos CES/UFCG, por toda colaboração e apoio prestado na fase de execução deste trabalho.

A todos os meus colegas de vida e aos meus colegas de curso, pela amizade, cumplicidade, pelo afeto, por cada palavra de otimismo pronunciada.

Ao meu noivo, **Leonardo Diego Silva Nunes**, pelo carinho, cumplicidade e compreensão. Uma brisa em meio a tantas tensões.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

As condições da região semi-árida do Nordeste brasileiro têm levado os criadores a utilizarem o facheiro (*Pilosocereus pachycladus*) como alimento alternativo para os seus rebanhos, uma vez que a sua utilização é possível durante todo o ano, principalmente na ocorrência de estiagens prolongadas. Os ramos da planta são cortados e queimados para a eliminação dos espinhos antes de serem picados ou triturados para serem ofertados aos animais. No entanto, o facheiro após a queima apresenta baixo teor proteico e matéria seca quando comparado a outras forragens utilizadas, o que traz consequências desfavoráveis ao rebanho, quando se faz uso exclusivo dessa forragem. O objetivo deste trabalho foi o estudo do processo de enriquecimento proteico do facheiro pela utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando a concentração inicial de leveduras e a espessura da camada de substrato sobre o teor proteico, aplicando-se o planejamento fatorial completo 2^2 e dois experimentos no ponto central e a metodologia de superfície de resposta. Os ramos do facheiro foram processados, resultando numa mucilagem com consistência pastosa. O enriquecimento proteico dessa mucilagem foi realizado empregando-se a fermentação semissólida em sistema de batelada, condições estáticas, e fazendo-se a adição de diferentes concentrações de leveduras, conforme planejamento fatorial, com determinações de proteína bruta em diferentes intervalos de tempo. O substrato foi posto em biorreator circular de plástico, com volume de 2,5 litros, que foram dispostos em estufa com circulação de ar forçado, a 35 °C. Foram avaliadas diferentes concentrações iniciais de leveduras (1, 3 e 5 %), bem como espessuras de substrato de 3, 6,5 e 10 cm. Antes e após o enriquecimento proteico do facheiro foram realizadas análises de umidade, pH, acidez titulável e proteína bruta. Fez-se uma avaliação das variáveis estudadas e observou-se que, com confiança de 95 %, e um R^2 de 0,974, o maior teor proteico foi obtido com a adição de 5 % de levedura e espessura da camada de substrato de 10 cm. Nestas condições o aumento proteico foi de aproximadamente 163%, tendo como base o teor de proteína do facheiro antes da adição da levedura. Das duas variáveis estudadas, apenas a concentração de leveduras apresentou influência no processo fermentativo do facheiro.

Palavras-chave: *Pilosocereus pachycladus*, levedura, aumento proteico.

ABSTRACT

The conditions of the semi-arid region of northeastern Brazil have led farmers to use the facheiro (*Pilosocereus pachycladus*) as alternative food for their flocks, since its use is possible throughout the year, especially in the occurrence of prolonged droughts. The branches of the plant are cut and burned to eliminate the spikes before they are chopped or crushed to be offered to the animals. However, after burning facheiro has low protein content and dry matter when compared to other fodder used, which brings adverse consequences to the herd when it makes exclusive use of this forage. The objective of this work was the study of protein enrichment facheiro by use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, evaluating the initial concentration of yeast and the thickness of the substrate layer on the protein content, applying the full factorial design experiments $2^2 + 2$ the center point and the response surface methodology. Branches of facheiro were processed, resulting in mucilage with pasty consistency. The enrichment of this protein mucilage was performed employing the solid state fermentation in a batch system, under static conditions, and making the addition of different concentrations of yeast as factorial design with crude protein determinations at different time intervals. The substrate was placed in a cylindrical plastic bioreactor, with a volume of 2.5 liters, were placed in an oven with forced air circulation at 35 °C. Yeast different initial concentrations (1, 3 and 5%) and substrate thicknesses of 3, 6.5 and 10 cm were measured. Before and during protein enrichment facheiro analyzes of moisture, pH, acidity and crude protein performed. An evaluation was made of the variables studied, and it was observed that with 95% confidence, and an R^2 of 0.974, the largest protein content was obtained with the addition of 5% yeast and thickness of the substrate of 10 cm. Accordingly the protein increase was about 163%, based on the protein content of the facheiro prior to addition of yeast. Of the two variables, only the concentration of yeast in the fermentation process showed influence of facheiro.

Keywords: *Pilosocereus pachycladus*, yeast, protein increase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Facheiro (<i>Pilosocereus pachycladus</i>)	21
Figura 2. Queima do facheiro para eliminação dos espinhos.....	36
Figura 3. Facheiro cortado em pequenos cubos.....	37
Figura 4. Mucilagem do facheiro, substrato.....	37
Figura 5. Titulação para determinação de acidez.....	40
Figura 6. Experimento 1, concentração de levedura de 5% e espessura da camada de substrato de 10 cm.....	48
Figura 7. Experimento 2, concentração de levedura de 5% e espessura da camada de substrato de 3 cm.....	49
Figura 8. Experimento 3, concentração de levedura de 1% e espessura da camada de substrato de 10 cm.....	49
Figura 9. Experimento 4, concentração de levedura de 1% e espessura da camada de substrato de 3 cm.....	50
Figura 10. Experimento 5 e 6, concentração de levedura de 3% e espessura da camada de substrato de 6,5 cm.....	51
Figura 11. Gráfico de Pareto para o aumento proteico, com nível de confiança de 95%.....	57
Figura 12. Tendência de aumento no ganho de proteínas durante o processo quando se aumenta a concentração de leveduras.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do facheiro	22
Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial $2^2 + 2$	42
Tabela 3. Valores reais e codificados das variáveis do planejamento fatorial $2^2 + 2$	43
Tabela 4. Caracterização físico-química do facheiro antes do processo de enriquecimento proteico.....	45
Tabela 5. Caracterização físico-química da levedura utilizada no processo de enriquecimento proteico.....	46
Tabela 6. Valores do percentual de proteína bruta do facheiro durante o processo da fermentação semissólida, para experimentos realizados.	47
Tabela 7. Aumento proteico do facheiro durante o processo da fermentação semissólida, para experimentos realizados.	47
Tabela 8. Valores de pH das amostras das amostras no decorrer da fermentação.....	52
Tabela 9. Valores do percentual de umidade das amostras no decorrer da fermentação.....	53
Tabela 10. Valores do percentual de acidez titulável das amostras no decorrer da fermentação.....	54
Tabela 11. Valores de pH, umidade e acidez titulável encontrada no melhor tempo de fermentação para cada experimento realizado.....	55
Tabela 12. Resultados do aumento proteico do facheiro no melhor tempo de fermentação para cada experimento.....	56

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo Geral	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
CAPÍTULO 2	17
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	18
2.1 Cactáceas.....	18
2.1.1 Facheiro.....	18
2.1.1.1 Composição química do facheiro	20
2.2 Fermentação semissólida.....	21
2.2.1 Parâmetros do processo	23
2.2.1.1 Porosidade, tamanho e formato das partículas	23
2.2.1.2 Umidade e Atividade de água	24
2.2.1.3 pH.....	25
2.2.1.4 Substrato.....	26
2.2.1.5 Temperatura	27
2.2.1.6 Aeração	27
2.2.1.7 Microrganismo	28
2.2.2 Biorreator	29
2.3 Estudo da arte.....	31
CAPÍTULO 3	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Substrato.....	35
3.1.1 Caracterização do substrato.....	37
3.2 Microrganismo	37
3.3 Biorreator	37
3.4 Fermentação	37

3.5 Caracterização físico-química	38
3.6 Aumento proteico	40
3.7 Planejamento fatorial.....	40
CAPÍTULO 4	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Caracterização físico-químicas do facheiro antes do processo se enriquecimento proteico	44
4.2 Perfil cinético do enriquecimento proteico do facheiro	45
4.3 Caracterização físico-química do facheiro durante do processo de enriquecimento proteico.....	51
4.4 Planejamento experimental	55
CAPÍTULO 5	58
5- CONCLUSÕES	59
CAPÍTULO 6	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As secas e as incertezas climáticas frequentes na região semiárida do Nordeste do Brasil constituem os fatores mais limitantes à produção animal. Devido as suas características, as cactáceas, destacando-se entre estas o facheiro *Pilosocereus pachycladus*, representam fonte de água e alternativa alimentar para as regiões sub-úmidas e semiáridas (LEAL *et al.*, 2003).

O facheiro é uma cactácea nativa das caatingas dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Essa cactácea é empregada tanto na alimentação humana quanto animal. No primeiro caso é utilizada geralmente como planta frutífera, já no segundo, os ramos são cortados e queimados para a eliminação dos espinhos e em seguida picados ou triturados para serem ofertados aos animais como forragem (LIMA, 1996). Entretanto, o facheiro após a queima apresenta baixo teor proteico e matéria seca quando comparado a outras forragens utilizadas, o que traz consequências desfavoráveis aos animais, quando se faz uso exclusivo dessa forragem.

Na tentativa de poder contribuir para o desenvolvimento sustentável desta região, estão sendo pesquisadas formas alternativas de aumentar o valor nutricional dessa fonte forrageira, através de um processo de enriquecimento proteico microbiano. Os microrganismos cultivados como fonte de proteína para consumo humano e animal são bactérias, algas e fungos (bolores e leveduras). Entre esses organismos processadores de proteínas, as leveduras se destacam pela sua alta eficiência na conversão, possibilidade de ser cultivada em diversos tipos de substrato, possuir um elevado teor de proteína (45-60%), fácil obtenção e baixo custo, além de ser não patogênica.

O processo de enriquecimento proteico utilizando microrganismos pode ser realizado através de fermentação semissólida. Segundo Viniegra-González (1998), a fermentação semissólida apresenta diversas vantagens quando comparada ao processo de fermentação submersa devido a seus aspectos físico-químicos, especialmente sua reduzida atividade de água, o que torna o processo mais produtivo, além de requerer baixo investimento de capital e energia e praticamente não produzir resíduos. Correia (2004) compartilha da mesma opinião e afirma que o processo da fermentação

semissólida pode ser realizado com equipamentos de controle relativamente simples e manuseio pouco sofisticado.

Diversos substratos têm sido enriquecidos proteicamente, com sucesso, por fermentação semissólida com microrganismos: pedúnculo de caju (CAMPOS *et al.*, 2003 e HOLANDA *et al.*, 1998); resíduos de abacaxi (SUHET, 1999; CORREIA, 2004 e OLIVEIRA, 2007); casca de maracujá (OLIVEIRA, 2007); bagaço de maçã (VENDROSCOLO *et al.*, 2007); mandacaru (ARAÚJO, 2004 e ALMEIDA, 2007); vagens de algaroba (PERAZZO NETO, 1999) e palma forrageira (PERAZZO NETO, 1999; ARAÚJO, 2004; CAMPOS, 2008, SANTOS *et al.*, 2012).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar o processo de enriquecimento proteico do facheiro (*Pilosocereus pachycladus*), através da fermentação semissólida, utilizando a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), visando à produção de suplemento proteico para animais.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterização físico-química do facheiro antes do processo de enriquecimento proteico
- Estudo do perfil cinético do enriquecimento proteico do facheiro para verificação do tempo de fermentação em que se obtém o maior valor proteico;
- Caracterização físico-química do substrato durante o processo de enriquecimento proteico;
- Verificação dos efeitos das variáveis independentes (concentração inicial de levedura e espessura da camada de substrato) sobre o teor proteico no processo da fermentação semissólida;
- Otimização do processo de enriquecimento proteico do facheiro.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Cactáceas

Família botânica representada pelos cactos, são aproximadamente 84 gêneros e 1.400 espécies. São adaptados a terrenos e climas com baixa umidade. Geralmente são plantas suculentas, perenes e espinhosas. São nativos dos desertos das Américas. Na sua maioria as folhas são modificadas em espinhos, reunidos em um ponto saliente ou deprimido, que constitui a aréola (de onde se originam ramos, folhas, flores, etc.) (ROSCELI, 2014)

Para Germano *et al.* (1999) as cactáceas são plantas xerófilas com mecanismos de sobrevivência especial, que evitam as perdas de água nas horas mais quentes. Se caracterizam por serem plantas resistentes à seca e bastante adaptadas à região semi-árida.

Segundo Fé *et al.* (2013) as cactáceas têm grande valor alimentício, com benefícios nutricionais podendo ser utilizada na pecuária nordestina como alternativa de alimentação animal.

2.1.1 Facheiro

O Facheiro (*Pilosocereus pachycladus*) é uma planta do Gênero *Pilosocereus* da família das cactáceas. É uma cactácea nativa das caatingas dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (LIMA, 1996).

Na pesquisa sobre morfologia das plantas forrageiras, realizada por Rosceli (2014), o autor descreve, dentre outras, a morfologia do facheiro. Em sua descrição enfatiza que o facheiro possui porte arbóreo, 8-12 m de altura e até 25-30 cm de diâmetro na parte basal do caule; muito ramificada, ramos primários elevando subverticalmente a partir de 1-2 m do solo, formando ramos de várias ordens (segunda, terceira, etc.). Caule suculento, verde griséu, com cerca de 15 costelas (11-18) baixas, 8-10 mm. Aréolas pequenas, circulares e subelíticas (3-5 mm de diâmetro), cerca de 19-25 espinhos (1 maior, central, 15-23 mm, 6-8 medianos e 12-17 radiais) de tamanhos variados até 4-5 mm, cinza claro. Distância média entre as aréolas 12-15 mm. Flores em pequeno número, irregularmente dispostas nas porções terminais dos ramos, Figura 1.

Para Falcon (2014) a cactácea também pode ter outras designações como: *Pseudopilocereus splendidus*, *Pilosocereus superbus*, *Pilosocereus splendidus*, *Pilosocereus schoebelii*, *Pseudopilocereus oreus*, *Pilosocereus cyaneus*, *Pilosocereus azureus*, *Pseudopilocereus azureus*, *Pilosocereus atroflavispinus*, *Pseudopilocereus pachycladus*, *Pseudopilocereus superbus*, *Pilosocereus cenepequei*.

Segundo Lima (1996) o facheiro é utilizado na ornamentação de avenidas, ruas, praças e jardins. Seu fruto é achatado e pode ser comestível, o seu caule quando seco pode servir de lenha, ripas e caibros para coberturas de casas. Ainda é utilizada pelos agricultores como uma alternativa para alimentação dos animais no período de seca na região. A parte aérea da planta geralmente é cortada pelos agricultores no local onde se encontra, sendo ali ofertada para os animais.

Contudo, segundo Lima (1998), essa cactácea possui limitações para uso na alimentação animal, por possuírem grande quantidade de espinhos, além do crescimento lento e o alto custo com mão de obra com o corte da planta, queima dos espinhos e trituração do material forrageiro.

Segundo Lima (1996), em alguns casos, os ramos do facheiro são cortados e queimados para a eliminação dos espinhos e em seguida picados ou triturados para serem ofertados aos animais como forragem. E destaca que após a queima apresenta baixo teor proteico e matéria seca quando comparado a outras forragens utilizadas, o que traz consequências desfavoráveis aos animais, quando se faz uso exclusivo dessa forragem.

Leal *et al.* (2003) analisando a herbivoria de caprinos na região de Xingó, registraram o consumo de facheiro pelos caprinos. Eles observaram que em algumas comunidades, a planta é cortada e queimada para a eliminação dos espinhos antes de ser ofertada aos animais. Contudo, nos anos de seca severa, os animais consomem as plantas diretamente no campo mesmo com seus espinhos.



Figura 1. Facheiro (*Pilosocereus pachycladus*)

Na época da seca principalmente, os ramos e frutos do facheiro podem ser utilizados, sendo garantia de alimentos para caprinos, ovinos e pássaros. Segundo Cavalcanti (2014), os frutos do facheiro são consumidos pelos pássaros no estágio de pré-maturação e uma parte das sementes do facheiro espalhadas nas fezes dos pássaros germina e forma novas plantas.

Além das sementes, a propagação do facheiro pode ser feita também a partir de partes da planta e sua utilização se dá também na ornamentação de praças e jardins. No entanto, de acordo com Cavalcanti (2004) não existe plantio de facheiro pelos agricultores, assim podendo haver uma extinção proveniente a utilização atual.

2.1.1.1 Composição química do facheiro

O facheiro quando comparado com outras plantas nativas da região, como por exemplo, xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) e mandacaru (*Cereus jamacaru*), destaca-se pelo seu elevado teor de proteína bruta chegando a aproximadamente 15,0% (CAVALCANTI e RESENDE, 2004; LIMA, 1996). Também em seus estudos sobre o facheiro Cavalcanti e Resende (2004) obtiveram teores de umidade de 87,14%, fibra bruta 5,32 % e matéria seca de 12,86 %.

Conforme Lima (1996) em trabalho sobre o uso e as potencialidades das plantas forrageiras, o facheiro apresenta 0,27% de enxofre, 0,08% de fósforo, 1,86% de cálcio e 0,42 de magnésio.

Pinheiro *et al.* (2008) que analisaram química e bromatologicamente a farinha de feno de facheiro observaram que o teor de proteína bruta do facheiro após queima em forno, para eliminação dos espinhos, foi de 4,56%, conforme Tabela 1. Ainda segundo os mesmos autores a farinha obtida do facheiro apresenta alto percentual de carboidratos totais, 77,32% e de nutrientes digestíveis totais, 41,06%.

Tabela 1. Composição química do facheiro

	Facheiro <i>Pilosocereus gounellei</i>
Matéria Orgânica (%)	82,92
Proteína Bruta (%)	4,56
Extrato Etéreo (%)	0,81
Fibra em Detergente Neutro (%)	35,76
Fibra em Detergente Ácido (%)	28,14
Carboidratos totais (%)	77,32
Carboidratos Não Fibrosos (%)	41,56
Matéria Mineral (%)	17,08
Nutrientes Digestíveis Totais (%)	41,06
Energia Digestiva (Mcal/Kg)	1,78

Fonte: Pinheiro *et al.* (2008)

2.2 Fermentação semissólida

No Brasil, em nível industrial, o processo de fermentação submersa continua sendo o principal sistema de geração de produtos biotecnológicos, sendo insignificante o número de empresas que empregam a fermentação semissólida para estes fins (SCHIMIDELL *et al.*, 2001). E por ser uma técnica ainda não muito difundida, autores

divergem quanto à definição do processo da fermentação semissólida. Por este motivo, serão apresentadas algumas das definições encontradas na literatura.

Fermentação em estado sólido, fermentação em substrato sólido, fermentação em meio semissólido ou simplesmente fermentação semissólida, é o processo que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Segundo Moraes (2001) fermentação semissólida é um processo microbiano que se desenvolve na superfície de materiais sólidos, biodegradáveis ou não, que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis, sendo necessário que os microrganismos cresçam com nutrientes difusíveis sob ou sobre a interface gás-sólido.

Pandey *et al.* (2001) define fermentação semissólida como a fermentação que envolve sólidos em ausência (ou próxima ausência) de água livre; porém o substrato deve possuir umidade necessária para garantir o crescimento e metabolismo de microrganismos.

Fermentação semissólida pode ser caracterizada por um processo de fermentação que ocorre em um meio sólido com um baixo teor de umidade (a_w), tipicamente 0,40-0,90, que ocorre em um estado asséptico e natural (NIGAM & SINGH, 1994; GERVAIS *et al.*, 1996).

Fermentação semissólida pode ser simplesmente definida como qualquer processo de fermentação que permite o crescimento de microrganismos em materiais sólidos, na ausência de água livre corrente. O material sólido pode ser usado como apoio (FSS) ou como apoio e fonte de carbono e energia (fermentação em substrato sólido) (ROUSSOS *et al.*, 1995).

O termo fermentação semissólida, ou em estado sólido, ou fermentação em meio semissólido aplica-se aos processos que há crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde a quantidade de líquido (água ou outro líquido) apresenta um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e metabolismo dos microrganismos, mas não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (PINTO *et al.*, 2006).

Vários autores apresentam as vantagens e desvantagens da FSS (SOCCOL, 1994; KOLICHESKI, 1995; VANDENBERGHE, 2000; SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003). Podem ser citadas algumas vantagens como: condições da cultura em FSS próximas as que se desenvolvem em meios naturais; simplicidade no preparo do meio de cultura; diminuição de contaminações; redução dos efluentes líquidos a tratar; resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação; produção concentrada de metabólitos e eliminação da formação de espuma.

Por outro lado, as limitações da técnica ainda impedem sua ampla utilização industrial: dificuldade de remoção de calor devido à baixa condutividade térmica da matéria, tipos de substratos limitados e a dificuldade de se medir parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, quantidade de água e concentração do substrato no estado sólido (RODRIGUES, 2006).

2.2.1 Parâmetros do processo

Como em todo processo fermentativo, o controle de determinados parâmetros se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes.

Segundo Pandey (2003) os parâmetros do processo podem ser divididos em físico-químicos e bioquímicos como tamanho da partícula, umidade inicial, pH e pré-tratamento do substrato, umidade relativa, temperatura de incubação, agitação e aeração, microrganismo, suplementação de nutrientes como: N, P e traços de elementos, suplementação de fonte de carbono adicional e indutor e extração de produto e sua purificação. Dependendo do tipo, nível e aplicação do processo fermentativo um e/ou vários parâmetros podem ser usados para sua otimização.

2.2.1.1 Porosidade, tamanho e formato das partículas

A principal qualidade da porosidade é a capacidade de absorção de água, que facilita o transporte de enzimas e metabólitos por entre o meio e os microrganismos.

Schimidell *et al.* (2001) afirmam que quanto menor for o tamanho das partículas maior será a área superficial e, conseqüentemente, maior o grau de transformação. No entanto, o processo necessita ter uma granulometria própria que permita a circulação do

ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos, os quais poderiam vir a prejudicar o rendimento do processo.

Algumas vezes é necessário um pré-tratamento no substrato, para este se adequar às condições necessárias ao crescimento e à produção de metabólitos pelos microrganismos. Assim, para facilitar a atuação dos microrganismos sobre o meio, podem ser empregados os processos de:

- esmagamento, quebra, moagem e peneiramento, visando adequar o meio à granulometria mais adequada do processo;
- suplementação de nutrientes e correção de pH, para suprir a falta de algum nutriente ou adequar às melhores condições de crescimento microbiano;
- hidrólise ácida ou alcalina de material celulósico, visando facilitar a atuação enzimática;
- embebição, para regular o teor de umidade inicial do processo;
- vaporização ou aquecimento, visando a gelatinização ou inchamento do substrato;
- adição de agente sequestrante, com o objetivo de retirar íons metálicos do meio, que podem diminuir o rendimento do processo;
- processo de esterilização, que visa a diminuição ou eliminação de possíveis contaminações.

Nesse último caso, a adição de grande quantidade de inóculo pode evitar ou abrandar o problema da contaminação e a não esterilização do meio não afetaria a produtividade.

2.2.1.2 Umidade e Atividade de água

Na FSS, a água está envolvida no desenvolvimento de biomassa e reações metabólicas, nas atividades enzimáticas e no transporte de gás, nutrientes e metabólitos extracelulares (ROBINSON & NIGAM, 2003).

Segundo Lonsane *et al.* (1985) e Thiemann (1985) a natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá ter no início e ao longo da fermentação.

A umidade é considerada ótima no substrato saturado, e varia de 30 a 85% dependendo do substrato. As principais causas da variação de umidade são a evaporação devido ao calor metabólico e hidrólise do substrato, e produção de água metabólica (DORTA *et al.*, 1994).

Atividade de água, quantidade de água não ligada e que está à disposição dos microrganismos, é definida como a razão entre a pressão de equilíbrio de vapor do substrato em relação à água pura, à mesma temperatura. A atividade de água influencia o desenvolvimento microbiano e os processos bioquímicos, tendo por isso, cada microrganismo um nível de atividade de água mínimo para que possa efetuar suas atividades metabólicas (RAMANA *et al.*, 1993). Segundo Robinson & Nigam (2003) as bactérias suportam valores de atividade de água de até 0,75, as leveduras toleram valores de até 0,62 a 0,64 e os fungos filamentosos crescem rapidamente em meios relativamente secos, com atividade de água inferior a 0,61.

Segundo Sato *et al.* (1982), normalmente, em estudos de laboratório, a atividade de água é controlada colocando-se o biorreator em uma câmara de cultura, cuja umidade é fixada através de soluções salinas saturadas. Em maior escala, o biorreator é arejado com água-ar saturado.

2.2.1.3 pH

O controle do pH do meio é um parâmetro crítico para o sucesso da fermentação semissólida.

As variações no pH são resultados do consumo do substrato (por exemplo, hidrólise proteica) e/ou produção de metabólitos (por exemplo, ácidos orgânicos). Ele é o indicador das mudanças das atividades metabólicas (MAUREL *et al.*, 2003). De acordo com Lonsane *et al.* (1985), a variação brusca do potencial hidrogeniônico pode ser amenizada com a utilização de substratos com boa capacidade tamponante ou com a adição de soluções tampão durante a etapa de umidificação do substrato.

Na FSS, nenhum eletrodo existente pode registrar o pH do meio sólido, por causa da falta de água livre (DUNAND *et al.*, 1996). Alguns autores sugerem o uso de um eletrodo potenciométrico (VILLEGAS *et al.*, 1993) ou um eletrodo de pH Padrão, depois de diluir a amostra em água destilada (DURAND & CHÉREAU, 1988).

Sendo o pH uma variável importante no processo, há valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente os fungos preferem pH baixo e as bactérias pH próximos da neutralidade (PERAZZO NETO, 1999). De acordo com Franco (1996) os valores de pH ótimo para a multiplicação da *Saccharomyces cerevisiae* é entre 4 e 5.

Holanda *et al.* (1997) estudando o enriquecimento proteico do pedúnculo de caju por *Saccharomyces cerevisiae*, constataram que em pH menor do que 3,5 pode ocorrer redução na eficiência da conversão proteica da levedura, embora este índice de acidez evite contaminação do meio por bactérias.

2.2.1.4 Substrato

Dependendo do processo que se quer realizar, da facilidade de se obter determinadas matérias-primas ou dos resultados que se deseja conseguir, o substrato pode ser usado tanto na forma natural como na forma sintética. Os materiais utilizados são provenientes de matérias-primas, produtos e/ou resíduos agroindustriais, que normalmente têm baixo ou nenhum valor comercial.

Segundo Schimidell *et al.* (2001) o substrato deve possuir características que possibilitem um maior rendimento do processo. A principal peculiaridade é o alto grau de acessibilidade do microrganismo a todo o meio, devendo-se levar em conta a porosidade, o tamanho e o formato das partículas.

Diversas matérias-primas e, dentre estas, principalmente diversos tipos de resíduos agroindustriais, podem ser empregadas na fermentação semissólida. A escolha de cada meio, logicamente, irá depender do produto final que se deseja obter: torta de soja (CAPRA *et al.*, 2003); resíduo fibroso de soja (STREIT *et al.*, 2003a); casca de limão Taiti (PANAROTTO *et al.*, 2003); bagaço de laranja e farelo de arroz (HERMANN *et al.*, 2003); bagaço de maçã (STREIT *et al.*, 2003b; ALBUQUERQUE *et al.*, 2003); bagaço de pedúnculo de caju (HOLANDA *et al.*, 1997); bagaço de abacaxi (SUHET, 1999); borra de café (RAINHO *et al.*, 2003); mandacaru sem espinho (ARAÚJO *et al.*, 2003).

2.2.1.5 Temperatura

Como os demais parâmetros, a temperatura apresenta uma forte influência no crescimento microbiano, havendo uma temperatura mínima, abaixo da qual o microrganismo não cresce. Uma temperatura ótima na qual o crescimento é máximo e uma temperatura máxima acima da qual não ocorrem crescimento. Em processos fermentativos há a necessidade de observar a temperatura para que a mesma não se eleve demais prejudicando o processo (PERAZZO NETO, 1999).

Segundo Schmidell *et al.* (2001) e Nagel *et al.* (2001a) a grande quantidade de calor produzida durante o processo fermentativo, pode estar associada às atividades metabólicas dos microrganismos e à altura da camada de substrato.

Em escala industrial, a temperatura é normalmente controlada por ar forçado, agitação ou evaporação (DUNAND *et al.*, 1996). Segundo Fernandez *et al.* (1997) o último método é o mais efetivo: a umidade do ar é ajustada de acordo com modelos de troca de água entre sólidos e gases, permitindo dessa forma uma rápida regulagem, dentro de uma faixa de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, sendo a regulagem da temperatura ligada ao controle da umidade da fase sólida. Raimbault & Ramires (1980) afirmam que em condições experimentais, a temperatura do biorreator, normalmente é controlada com um banho termostático ou através da regulagem da temperatura ambiente.

2.2.1.6 Aeração

Para um bom rendimento e uma rápida fermentação em substrato sólido, é necessário o uso de uma grande área superficial do meio de cultura, no qual o microrganismo pode se desenvolver em contato com o ar. Na maior parte dos processos, tanto em nível laboratorial como industrial, a oxigenação do meio é realizada pela introdução de ar esterilizado sob pressão no equipamento de fermentação.

Segundo Lonsane *et al.* (1985) a quantidade de ar estéril a ser introduzida no processo fermentativo vai depender da natureza dos microrganismos, da quantidade de calor metabólico a ser dissipada no processo, da espessura da camada de substrato, da quantidade de CO_2 e outros metabólitos voláteis a serem eliminados e da necessidade de oxigênio para a síntese dos produtos.

De acordo com Thiemann (1985) a fermentação semissólida necessita de quatro a cinco vezes, mais oxigênio que a fermentação submersa.

2.2.1.7 Microrganismo

Segundo Pandey (1992), tanto microrganismos em seu estado natural, como na forma de culturas puras individuais ou mistas, podem ser utilizados no processo da fermentação semissólida.

Muitos microrganismos são capazes de crescerem em substratos sólidos, mas só os fungos filamentosos podem crescer significativamente na ausência de água livre. Bactérias e leveduras crescem em substrato sólido com um teor de umidade entre 40-70%, como na compostagem ou na ensilagem aeróbica ou anaeróbica, mas o crescimento e propagação das células ricas em proteínas sempre requerem água livre (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

Para um melhor desempenho do processo fermentativo, a escolha da linhagem do microrganismo, deve levar em conta detalhes deste processo, como meio de cultura e condições ambientais da fermentação (temperatura e umidade do sistema), pois a fermentação semissólida tem obtido com sucesso vários tipos de transformação, seja ela por fungos ou bactérias.

Como exemplo para a obtenção do enriquecimento proteico, podem ser citados, dentre muitos outros, o uso de culturas de *Rizopus* (SUHET, 1999; MORAES, 1999; ALBUQUERQUE *et al.*, 2003); *Candida* (CANOILAS, 1991); *Aspergillus* (MORAES, 1999) e *Saccharomyces* (HOLANDA *et al.*, 1997; ARAÚJO *et al.*, 2003).

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 (OSTERGAARD *et al.*, 2000), podendo assim ser aplicada para alimentação animal.

Para Pelcsa Jr. *et al.* (2004) citado por Carvalho *et al.* (2006) a *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura típica na utilização de fermentações, na produção de pães e bebidas alcoólicas. Assim, tendo uma grande importância econômica. As células de *S. cerevisiae* são elípticas, medindo cerca de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura. Reproduzem-se de forma assexuada por brotamento. Onde durante o processo o seu núcleo se divide.

De acordo com Perazzo (1999) os microrganismos possuem uma velocidade média de multiplicação de 500 vezes maior que dos vegetais e 10.000 vezes em relação aos

bovinos. Isso se dá pela área específica dos microrganismos que lhes proporcionam uma velocidade metabólica maior. Explicando, assim, a sua capacidade de produção de proteína em poucas horas.

2.2.2 Biorreator

O biorreator é onde a matéria-prima, sob condições satisfatórias, é convertida a um produto desejado. Maximizar a taxa de formação e o rendimento dos produtos dentro do biorreator é uma das metas mais importantes no aperfeiçoamento do processo de FSS. Em contraste com os sistemas de FSm (Fermentação Submersa), os biorreatores da FSS, não alcançaram ainda um alto grau de desenvolvimento, devido aos problemas associados ao meio sólido, como baixa transferência de energia e difícil manuseio do material (ROBINSON & NIGAM, 2003).

O processo de FSS envolve preparação do substrato, esterilização inicial do substrato e da biomassa depois da recuperação do produto, preparação do inoculo, carga e descarga do equipamento, como também recuperação do produto. Um biorreator deve ser projetado de maneira a facilitar todas essas operações e apresentar as seguintes características:

- Retenção do substrato. O material de construção do biorreator de sistema de FSS deve ser firme, resistente à corrosão e atóxico ao organismo usado no processo. Também deve ter um custo relativamente baixo;
- Prevenção de contaminantes na entrada no processo, como também controle da liberação do organismo usado no processo ao ambiente. O segundo item é importante considerando-se que a maioria dos processos de FSS envolvem esporos de fungos, que podem ser patogênicos e causar danos ao meio ambiente. Isto pode ser alcançado pela incorporação de filtros no fluxo de saída de ar e por um cuidadoso lacre e filtração do fluxo de ar na entrada, porém estes cuidados aumentam os custos do equipamento;
- Efetiva regulação da aeração, mistura e remoção de calor para o controle dos parâmetros operacionais de temperatura, atividade de água e concentração de oxigênio. Frequentemente, os processos de FSS sofrem problemas de remoção de

calor ou perdas de água do substrato por evaporação, o que afeta o rendimento e a qualidade do produto desejado;

- Manutenção e uniformidade dentro do substrato. Isto pode ser alcançado através de uma mistura efetiva que também é importante para minimizar os gradientes térmicos, que é um fator importante na FSS.

A seguir, são citados alguns tipos de biorreatores comumente empregados para a realização de uma fermentação semissólida.

- Biorreatores de vidro - Erlenmeyers, frasco de Fernbach e garrafas de culturas são bastante utilizados devido à facilidade de manuseio durante as pesquisas. No entanto embora sejam excelentes para o início de uma pesquisa, deixam a desejar quando se quer a ampliação de escala do processo.
- Bandejas - elas podem possuir seu fundo intacto, o que significaria uma atuação muito parecida com a dos Erlenmeyers, porém com uma área superficial de troca e uma capacidade de alocar meio de cultura muito maior. Podem também ter seu fundo substituído por uma tela perfurada, o que lhes confere uma maior eficiência na circulação de ar por todo o meio, e não somente na parte superior exposta ao ambiente.
- Tanques circulares - Toyama (1976) indica um equipamento denominado produtor de “Koji” automático estacionário, que consiste de dois tanques rotatórios de 7 m de diâmetro, dotados de um agitador helicoidal, dentro de uma câmara de condições controladas. Podem ser processados, a cada batelada, cerca de 2 a 3 toneladas de meio de cultura, com alimentação, esterilização, inoculação e retirada do produto, realizados automaticamente.
- Esteira rolante - as etapas de inoculação e incubação do material esterilizado são realizadas em longas esteiras de fundo perfurado por onde circula ar úmido. E segundo Thiemann (1985), dependendo das necessidades do produto, pode ser realizada uma agitação ocasional.
- Tubular horizontal - neste processo, também denominado tambor rotativo, o substrato é esterilizado e resfriado diretamente no tambor. A aeração da massa é realizada pela passagem de ar esterilizado e umidificado através do reator, objetivando também o controle da temperatura interna. Segundo Thiemann (1985), esse equipamento apresenta um custo relativamente elevado para o volume de material produzido, dificuldades na manutenção da integridade do

micélio devido à agitação do sistema, além das dificuldades de ampliação de escala do processo.

- Tubular vertical - também denominado de fermentador tipo coluna, tem sido o reator utilizado em pesquisas quando se deseja obter o controle do processo. Thiemann (1985) explica que esse tipo de reator apresenta como vantagens, um espaço reduzido, a rapidez de carga e descarga e uma relação volume total /volume útil próximo a 1. Como desvantagens, a compactação da massa, a dificuldade de dissipação de calor e um grau de umidade da massa não uniforme ao longo do equipamento.
- Saco plástico - Suhet (1999) utilizou sacos plásticos para a realização do enriquecimento proteico do resíduo da industrialização do abacaxi, por FSS. O referido autor destaca que é necessário perfurar os sacos após certo período, para permitir a aeração do meio.

2.3 Estudo da arte

Holanda *et al.*, (1998) identificou a porcentagem de inoculo e tempo de fermentação adequado para promover o enriquecimento proteico de pedúnculos de caju, por meio de desenvolvimento de leveduras. Os autores utilizaram a *Saccharomyces cerevisiae* com inoculação de até 72 horas. Com 5% de inoculo e tempo de fermentação inferior a 24 horas obtiveram o maior ganho líquido proteico e a maior população final de células viáveis de levedura. Concluindo-se dessa forma que o emprego de levedura na fermentação de pedúnculos de caju viabiliza a obtenção de um concentrado proteico, similar à torta de algodão, como fonte alternativa de alto potencial para a alimentação animal.

Visando o enriquecimento proteico da palma forrageira e das vagens de algaroba foi empregado o cultivo semissólido do *Aspergillus niger*, avaliando-se a utilização de fonte de nitrogênio e espessura da camada de substrato. Tanto a palma como para a algaroba, a concentração de 0,5% de nitrogênio foi a que apresentou o melhor resultado, atingindo um máximo por volta das 84 e 197 h de cultivo, respectivamente e proporcionado um teor final de proteína verdadeira para ambos de 15%. A camada de substrato com 0,75 cm de espessura foi a que proporcionou maior teor de proteína verdadeira em torno de $12 \pm 3\%$ em ambos os substratos. Os resultados alcançados

mostram ser viáveis, do ponto de vista técnico, o enriquecimento proteico da palma e algaroba com *Aspergillus niger* a ser utilizada como ração animal (PERAZZO NETO, 1999).

Araújo *et al.*, (2003) estudaram o enriquecimento proteico do mandacaru sem espinhos, utilizando levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, por fermentação semissólida a 38°C. Após 48 horas de fermentação obtiveram um aumento de três vezes no teor proteico do fermentado.

Campos *et al.*, (2003) estudaram o enriquecimento proteico do bagaço do pedúnculo de caju por fermentação semissólida, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O maior teor de proteína bruta, 20,25%, foi encontrado com a adição de 12% de concentração de levedura e uma temperatura de fermentação de 33 °C, após 28 h de processo. Os resultados alcançados mostraram ser viável a utilização da levedura para obtenção de um concentrado proteico, utilizando o bagaço de caju como substrato.

Correia (2004) utilizou resíduos de abacaxi como substrato no estudo do enriquecimento proteico por FSS, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e suplementação de nitrogênio (sulfato de amônia e ureia). Após 48 h de fermentação verificou-se um ganho proteico de quase quatro vezes do conteúdo inicial de proteína.

Vendruscolo *et al.*, (2007) analisaram o enriquecimento proteico do bagaço da maçã, a levedura usada foi a *Gongronella butleri* CCT4274, e tiveram como resultado 2,5 vezes o seu aumento proteico, a temperatura de incubação de 30°C, com uma aeração de 0,4L.min⁻¹.coluna⁻¹ e o tempo de cultivo de 7 dias.

Almeida (2007) realizou estudos sobre o enriquecimento proteico do mandacaru com a utilização do *Aspergillus niger* e da *Saccharomyces cerevisiae* por fermentação semissólida. O maior aumento proteico encontrado utilizando o *Aspergillus niger* foi após 72 h de fermentação em bandeja a uma temperatura de 30 °C. Nessas condições o teor proteico encontrado foi de 76,9%. Para as fermentações realizadas em tambor rotativo com a *Saccharomyces cerevisiae* o teor de proteína bruta máximo alcançado foi de 23% após 10 h de processo a temperatura de 25 °C.

Oliveira (2007) estudou o enriquecimento nutricional por bioconversão de resíduos agroindustriais para utilização na alimentação animal. Resíduos de casca de maracujá e casca e coroa de abacaxi foram enriquecidos separadamente por FSS com a *Saccharomyces cerevisiae*. As fermentações foram realizadas em bandejas durante um período de 48 h. O aumento proteico encontrado para os três resíduos foi em média de 2,40 vezes, em relação ao *in natura*. O autor conclui que os resíduos alcançam

concentrações nutricionais que, podem ser transformados em suplemento nutricional, sendo uma alternativa alimentar para os animais, na época de escassez de alimento no semiárido.

Araújo *et al.*, (2008) avaliaram o enriquecimento proteico da palma forrageira com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo semissólido visando melhorar o valor nutritivo da palma para ser utilizada na alimentação de ruminantes. A levedura foi utilizada nas concentrações de 1, 2 e 3% em base úmida no substrato formado pela palma forrageira, incubada em biorreatores durante 6, 12, 24 e 36 horas de fermentação. Os efeitos concentração do inoculo e tempo de fermentação sobre os teores de proteína bruta foram maximizados em 2% em 12 horas, demonstrando, segundo os autores que uma fonte alternativa para arração de ruminantes, pode ser obtida pela bioconvesão da palma forrageira.

Correia & Aquino (2012) usaram a farinha de semente de mangaba como seu meio de estudo. Na fermentação semissólida foi utilizado a *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo. Os seus experimentos foram realizados a temperatura de 28 e 35°C, tiveram como resultado em seu maior enriquecimento proteico de 2,5 vezes maior em relação a seu valor inicial com a temperatura marcando 35°C.

Santos *et al.* (2012) estudaram o enriquecimento proteico da palma forrageira do sertão pernambucano com foco para alimentação animal. O enriquecimento proteico foi realizado através de fermentação semissólida com a utilização da *Saccharomyces cerevisiae*. Com o auxílio de um planejamento fatorial 3² mais três repetições no ponto central, os autores estudaram a influência dos variáveis concentrações de uma fonte adicional de nitrogênio (sulfato de amônio) e concentração uma fonte de carboidrato (glicose) sobre um teor de proteínas totais da palma forrageira. As concentrações estudadas foram: % concentração de nitrogênio (0,30; 0,60 e 1) e concentração de carboidrato (1, 2 e 3%). Neste estudo os maiores percentuais de proteína totais foram alcançados quando utilizaram 1% de fonte de nitrogênio e 1% de fonte de carboidrato, sendo esta percentual de 34,66% após 4 horas de fermentação.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

No capítulo presente serão descritos os materiais selecionados para o estudo e as metodologias que foram utilizadas no estudo do enriquecimento proteico do facheiro.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Alimentos do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande (CES/UFCG).

3.1 Substrato

A matéria-prima utilizada como substrato para o estudo foi o facheiro (*Pilosocereus pachycladus*). As plantas foram provenientes de propriedade próxima ao município de Barra de Santa Rosa, Paraíba. Estas foram obtidas a partir de cactos adultos colhidos, ao acaso, no mês de julho de 2014.

A coleta do facheiro foi realizada levando em consideração estudar os ramos mais novos, com isso, foram coletados os cilindros vascular que estavam presentes na área mais alta da planta conforme a tradição da região. Imediatamente após a coleta o cilindro vascular do facheiro, foi queimado em uma fogueira feita de lenha seca, o cilindro vascular era rotacionado em pequenos intervalos de tempo, com a finalidade de promover toda a eliminação dos espinhos, presente na planta (Figura 2).



Figura 2. Queima do facheiro para eliminação dos espinhos

Após a queima o material foi levado para o Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Alimentos (CES/UFCG) onde foi cortado manualmente com faca de aço inoxidável, em pedaços com formato de pequenos cubos, com o aproveitamento do talo presente em seu meio (Figura 3) e, logo em seguida os mesmos foram triturados em liquidificador, resultando em uma massa com aspecto de mucilagem e de consistência pastosa, constituindo o substrato (Figura 4).



Figura 3. Facheiro cortado em pequenos cubos



Figura 4. Mucilagem do facheiro, substrato.

3.1.1 Caracterização do substrato

Antes e após a inoculação da levedura ao substrato foram retiradas amostras da mucilagem do facheiro, como também após 4, 8, 24, 48 e 72 horas de fermentação, para a determinação de pH, acidez titulável e umidade. Também foram retiradas amostras, que foram transferidas para estufa a 55°C, até peso constante, para determinação de proteína bruta, pH, acidez titulável e umidade.

3.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado para se enriquecer proteicamente o facheiro foi a levedura, *Saccharomyces cerevisiae* prensada, fermento biológico comercial.

3.3 Biorreator

As fermentações foram realizadas em biorreatores cilíndricos de plásticos, com volume total de 2,5 litros. Estes foram colocados em estufa com circulação de ar forçado, na temperatura de 35°C, o que proporciona uma boa aeração e assemelha-se as condições ambientais.

3.4 Fermentação

A fermentação empregada para o enriquecimento proteico do facheiro foi do tipo semissólida, em sistema de batelada, com agitações nos tempos de retirada de amostra, com a finalidade de facilitar a oxigenação na qual o substrato foi adicionado ao biorreator, ocorrendo então à inoculação do substrato e a incubação do mesmo durante um período de 72 horas.

3.5 Caracterização físico-química

- pH

Para a determinação do pH foi utilizado o método AOAC (1990), onde 5,0g de amostra foi transferida para um Erlenmeyer de 250 ml seco, com auxílio de 50 ml de água à 25 °C, recentemente fervida. O frasco foi agitado ocasionalmente por 30 minutos, e deixado em repouso por 10 minutos. O pH foi determinado através de medidas potenciométricas do líquido sobrenadante.

- Umidade

Para a determinação do teor de umidade as amostras foram levadas à estufa a 105 °C, durante 24 h (SILVA, 1998). As umidades, expressas em base úmida, foram calculadas a partir da Equação 1.

$$U(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

$U(\%)$ - umidade, b.u

m_i - massa inicial da amostra, g

m_f - massa da amostra seca, g

- Acidez Titulável

A metodologia seguida foi descrita por IAL (2005) e baseia-se na titulação com hidróxido de sódio até o ponto de viragem com o indicador fenolftaleína.

Foram pesados 5,0g de amostra e adicionado 100 mL de água destilada e adicionado 0,3 mL de fenolftaleína. As amostras foram tituladas com NaOH com

concentração de 0,1M, sob agitação constante, até coloração alaranjada persistente por 30 segundos (Figura 5).



Figura 5. Titulação para determinação de acidez

A acidez foi determinada através da Equação 2:

$$Acidez (\%) = \frac{v * f * 100}{P} \quad (2)$$

Sendo:

v – mL da solução de hidróxido de sódio 0,1M gasto na titulação

f – fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1M

P – peso (g) da amostra usada na titulação

- Determinação de proteína bruta

O método Kjeldahl, descrito por Silva (1998) foi utilizado para determinação de proteína bruta nas amostras deste trabalho. De acordo Silva (1998) este método é largamente utilizado em nível mundial e baseia-se na análise de nitrogênio total contido nas amostras, incluindo o nitrogênio proteico propriamente dito e outros compostos nitrogenados como ácido nucléicos, ureia, nitratos etc.

Os métodos de Kjeldahl com pré-tratamento da amostra, Biureto e Lowry, são os mais utilizados para a determinação da proteína verdadeira nos alimentos.

O método clássico de Biureto para a determinação direta de proteínas, segundo Roger *et al.*, citados por Shuet (1999), não é aplicável a materiais contendo fungos, pois estes contêm substâncias que interferem com a reação colorida, obtida com o sulfato de cobre.

O método de Lowry é também bastante utilizado, quando se quer determinar a proteína verdadeira do alimento, no entanto Shuet (1999) comenta que este método para análise de proteínas de fungos superestima o conteúdo em 100% .

3.6 Aumento proteico

Para verificar-se qual o incremento de proteína bruta no facheiro enriquecido, calculou-se o aumento proteico (AP) de cada amostra retirada durante as fermentações.

As determinações do aumento proteico das amostras tiveram como base o valor proteico contido na massa seca do facheiro após queima. O aumento proteico foi definido como a razão entre o valor proteico do facheiro enriquecido (%) e o valor inicial de proteína bruta na forma *in natura*, conforme Equação 3.

$$AP = \frac{(\%)Proteína\ Bruta\ (Enriquecida) - (\%)Proteína\ Bruta\ (Após\ queima)}{(\%)Proteína\ Bruta\ (Após\ queima)} \times 100 \quad (3)$$

3.7 Planejamento fatorial

Selecionadas as variáveis a serem estudadas do processo fermentativo semissólido, foi empregado um planejamento fatorial completo, com o objetivo de fazer um estudo mais abrangente da influência das variáveis sobre o sistema, de maneira organizada e em quantidade mínima de experimentos. Inicialmente foram especificados os níveis para cada variável, isto é os valores dos fatores que foram empregados nos experimentos e com isso foram realizados os ensaios, registrando-se as respostas

observadas em todas as possíveis combinações na matriz de planejamento (BARROS NETO *et al.*, 1995).

Tendo como finalidade avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada (concentração de levedura e espessura da camada de substrato) sobre o teor proteico, bem como suas possíveis interações, com a realização mínima de experimentos, foi realizado um planejamento fatorial 2^2 mais 2 experimentos no ponto central, totalizando 06 experimentos.

A matriz do planejamento fatorial 2^2 mais 2 experimentos no ponto central é apresentada na Tabela 2, e na Tabela 3 encontram-se as variáveis de que foram estudadas, sendo seus níveis definidos com base na literatura.

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória, para se evitar o erro sistemático, variando-se simultaneamente a concentração de levedura e a espessura da camada de substrato.

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial $2^2 + 2$

Experimentos	Concentração de levedura (%)	Espessura da camada de substrato (cm)
01	+1	+1
02	+1	-1
03	-1	+1
04	-1	-1
05	0	0
06	0	0

Tabela 3. Valores reais e codificados das variáveis do planejamento fatorial $2^2 + 2$

Variável	Nível	Nível	Nível
	-1	0	+1
Concentração de levedura (%)	1	3	5
Espessura da camada de substrato (cm)	3	6,5	10

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-químicas do facheiro antes do processo se enriquecimento proteico

As amostras de facheiro analisadas antes do processo enriquecimento proteico, apresentaram um pH de 4,9, o que está de acordo com Lima *et al.*, (2005) que determinaram um pH variando de 4,69 a 4,98, para a polpa do facheiro em função das partes do ramo. Os valores de pH, umidade e acidez titulável para o facheiro antes do processo de enriquecimento proteico encontram-se na Tabela 4.

Mesmo após a queima dos ramos para a retirada dos espinhos, o facheiro apresentou um valor de umidade alto, de 91,42%, como esperado, já que se trata de uma planta com excelente capacidade de armazenamento de água e a coleta do material se deu após os meses de chuva na região. Outro fator que pode ser destacado para justificar o alto valor de umidade foi a utilização neste estudo, dos ramos mais novos do facheiro para o enriquecimento proteico, uma vez que são estes os oferecidos pelos criadores aos animais. Este valor de umidade assemelha-se ao encontrado por Lima, 1996, que foi de 95,33% levando-se em consideração que o material analisado pelo autor era *in natura*, ou seja, não foi queimado. O valor apresentado é maior que o citado por Cavalcanti e Resende (2004) que encontraram um valor de umidade 87,09 %, para o facheiro *in natura*.

Tabela 4. Caracterização físico-química do facheiro antes do processo de enriquecimento proteico.

pH	4,91
Umidade (%)	91,42
Acidez Titulável %	26
Proteína Bruta (%)	4,46

Com relação ao teor de proteína bruta do facheiro, IRPAA (2014), Lima (1996), Cavalcanti (2014), encontraram respectivamente valores de 15,5, 15,66 e 14,47 %, quando expresso na base seca. No entanto, Pinheiro *et al.*, (2008) encontrou um valor de 4,56% na farinha do facheiro, valor mais próximo ao encontrado neste trabalho. A

diferença encontrada pelos autores nos resultados de proteína bruta pode ser justificada pela queima do material analisado antes do processo de análise, causando a provável desnaturação das proteínas. O valor de 4,46% de proteína bruta será utilizado como referencia para o cálculo do aumento proteico durante as fermentações, em todos os experimentos.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada neste estudo apresentou um valor de pH igual a 4,54, umidade de 70,0%, e Proteína bruta de 45%, conforme valores da Tabela 5. Valores semelhantes foram descritos por Campos (2008).

Tabela 5. Caracterização físico-química da levedura utilizada no processo de enriquecimento proteico.

pH	4,54
Umidade (%)	70
Proteína Bruta (%)	45

4.2 Perfil cinético do enriquecimento proteico do facheiro

Os valores de proteína bruta e aumento proteico, referentes aos seis experimentos realizados durante 72 h de fermentação encontram-se na Tabela 6 e 7. O tempo 0, descrito nas tabelas referem-se a tempo logo após a adição da *Saccharomyces cerevisiae*, no início na fermentação semissólida.

Nas Figuras 6, 7, 8, 9 e 10 estão representadas graficamente as variações do aumento proteico do facheiro durante o processo fermentativo. A escolha do tempo ótimo de fermentação baseou-se no tempo onde foi alcançado o maior aumento proteico para cada experimento.

Tabela 6. Valores do percentual de proteína bruta do facheiro durante o processo da fermentação semissólida, para os experimentos realizados.

Tempo (h)	Proteína Bruta (%)					
	Exp.1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
0	10,76	10,85	5,94	6,04	6,4	6,62
4	8,58	11,02	7,33	6,45	8,84	8,84
8	11,72	10,93	7,68	7,45	9,48	9,08
24	10,24	11,46	8,38	6,47	4,52	6,04
48	5,75	5,34	5,03	6,29	4,85	4,5
72	5,16	5,22	5,44	4,99	4,67	4,51

Tabela 7. Aumento proteico do facheiro durante o processo da fermentação semissólida, para os experimentos realizados.

Tempo (h)	Aumento proteico (%)					
	Exp.1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
0	141,26	143,27	33,23	35,39	43,5	48,43
4	92,38	147,08	64,29	44,54	98,21	98,21
8	162,7	145,07	72,15	67,0	112,5	103,6
24	129,59	156,9	88,0	45,19	1,34	35,41
48	28,95	19,69	12,77	41,08	8,74	0,89
72	15,69	17,0	21,97	12,0	4,71	1,12

Relacionando os valores encontrados nas Tabelas 6 e 7, verifica-se que o experimento 1 obteve um percentual máximo de proteína bruta de aproximadamente 12%, o que corresponde a um aumento proteico de 162,7%, esse aumento foi conseguido após 8 h de fermentação. A Figura 6 mostra o comportamento do aumento proteico (%) durante as 72 horas de fermentação.

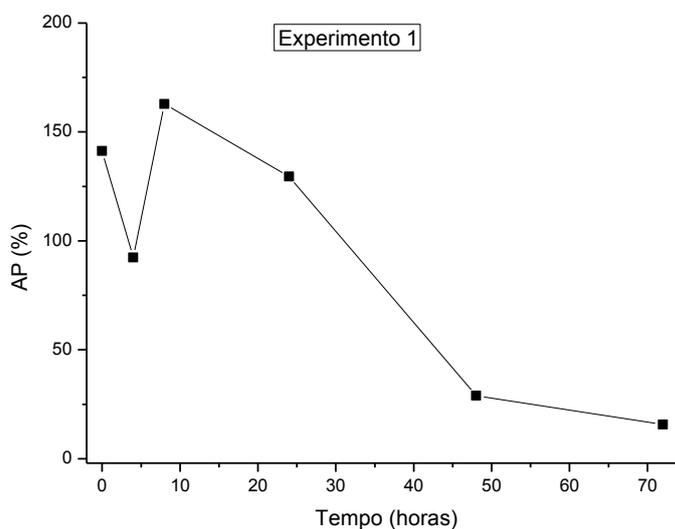


Figura 6. Experimento 1, concentração de levedura de 5% e espessura da camada de substrato de 10 cm.

O aumento proteico alcançado no experimento 2, após 24 h de processo, foi de 156,9%. O teor de proteína bruta do facheiro neste experimento aumentou de 4,46 para 11,46%. Através da Figura 7 pode-se observar o melhor tempo de fermentação.

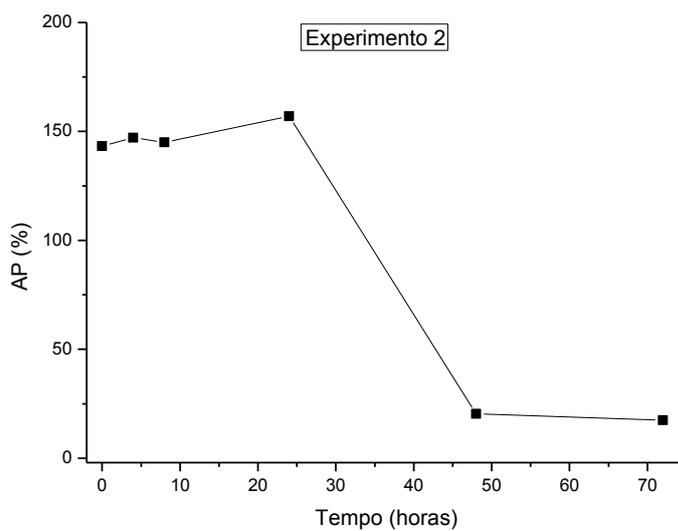


Figura 7. Experimento 2, concentração de levedura de 5% e espessura da camada de substrato de 3 cm.

Para o experimento 3, o maior teor proteico encontrado foi de 8,39%, que correspondeu a um incremento de 88 %, para o tempo de 24 h. Este tempo é observado no pico apresentado pela da Figura 8.

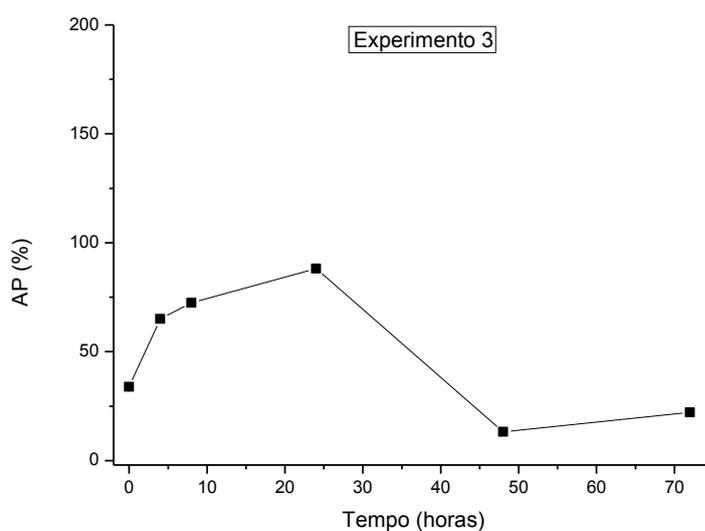


Figura 8. Experimento 3, concentração de levedura de 1% e espessura da camada de substrato de 10 cm.

Após 8 horas de fermentação o substrato do experimento 4 obteve um aumento de 67 %, aumentando a proteína bruta de 4,46 para 7,45%, conforme figura 9.

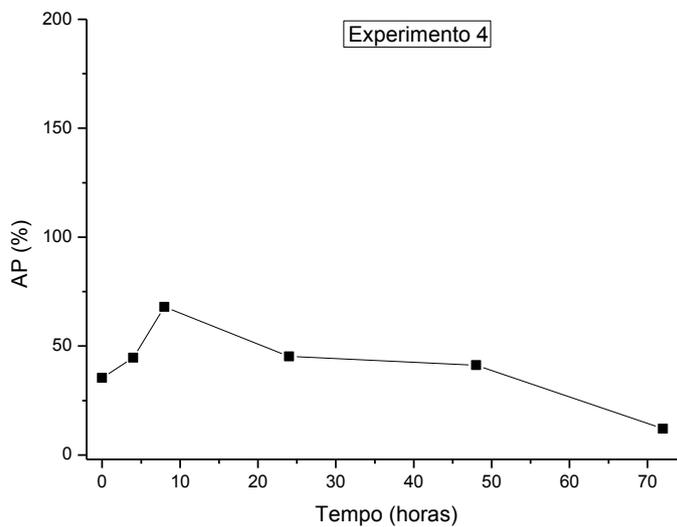


Figura 9. Experimento 4, concentração de levedura de 1% e espessura da camada de substrato de 3 cm.

De acordo com a Figura 10, os experimentos 5 e 6 alcançaram um aumento proteico de 112,5 e 103,6 %, respectivamente, obtendo-se valores de proteína bruta em torno de 9%. Este aumento foi alcançado após 8 horas de fermentação.

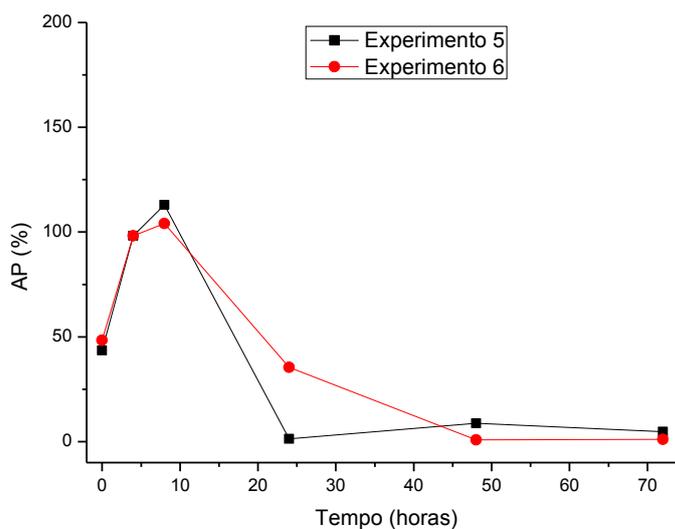


Figura 10. Experimento 5 e 6, concentração de levedura de 3% e espessura da camada de substrato de 6,5 cm.

Dos seis experimentos realizados, o experimento com concentração de levedura de 5% e espessura da camada de substrato de 10 cm (exp. 1), foi o que apresentou um maior aumento proteico, aproximadamente 163%, que correspondeu a um aumento de 2,63 vezes. Este aumento foi verificado após 8 horas de fermentação. Indicando serem estas as melhores condições de enriquecimento proteico do facheiro, dentro da faixa de valores estudadas.

Araújo (2004), estudando a influência das variáveis, concentração inicial de levedura, temperatura do processo e espessura da camada de substrato, observou que com a concentração inicial de levedura acima de 10% e temperatura entre 30 e 40 °C, o teor de proteína bruta foi aproximadamente 25%.

Almeida (2007) estudou a cinética do enriquecimento proteico do mandacaru através da fermentação semissólida com a levedura *saccharomyces cerevisiae*, em bandejas. Após 32 h de fermentação o mandacaru atingiu um teor proteico máximo de 27,67%.

Perazzo Neto (1999) utilizou o microrganismo *Aspergillus niger* associado a 0,5% de fonte de nitrogênio no enriquecimento proteico da palma forrageira e obteve resultado de 21,36% de proteína bruta. O valor máximo de proteína bruta alcançado por Carvalho (1999), que também estudou o enriquecimento proteico desta cactácea foi em

torno de 24%, utilizando o microrganismo *Fusarium* e ureia e, de 34,6% quando utilizou *Aspergillus niger* e ureia. O mesmo autor também utilizou os mesmos microrganismos, sem adição de fonte de nitrogênio e obteve valores em torno de 5% de proteína bruta, para ambos os microrganismos, o que inviabilizou a utilização desses fungos sem aplicação de ureia para o enriquecimento proteico da palma forrageira.

4.3 Caracterização físico-química do facheiro durante do processo de enriquecimento proteico

A Tabela 8 apresenta os resultados de pH das amostras retiradas durante o processo de fermentação semissólida do facheiro. De acordo com a tabela observa-se que no decorrer do processo houve um decaimento do valor do pH em todos os experimentos, no entanto não observou-se grandes variações. Os valores destacados na tabela referem-se ao valor de pH encontrado no melhor tempo de fermentação para cada experimento.

Correia (2004) estudou o pH durante o cultivo semissólido em resíduos de abacaxi, com a *Saccharomyces cerevisiae*, justificando a importância desta determinação no fato de que o pH constitui um fator intrínseco, que regula o crescimento dos microrganismos capazes de se desenvolver no meio. Em seus estudos percebeu-se pouca variação dos níveis de pH durante o cultivo (entre 4,2 e 4,7).

Tabela 8. Valores de pH das amostras das amostras no decorrer da fermentação.

Tempo (h) \ Exp.	4	8	24	72
1	4,93	4,82	4,64	4,58
2	4,89	4,84	4,73	4,61
3	4,89	4,78	4,56	4,53

4	4,92	4,85	4,73	4,52
5	4,90	4,84	4,63	4,59
6	4,91	4,84	4,64	4,61

Os resultados do percentual de umidade das amostras retiradas durante o processo de fermentação semissólida do facheiro encontram-se na Tabela 9. Os valores destacados na tabela referem-se ao valor de umidade encontrado no melhor tempo de fermentação para cada experimento.

Através dos valores apresentados na Tabela 9, pode-se observar que na maioria dos experimentos não houve mudanças significativas no percentual de umidade no curso das fermentações. A diferença maior observada ocorreu nos experimentos 2 e 4, após 72 horas de fermentação. A principal causa para esta variação é a evaporação da água contida no substrato. Estes dois experimentos possuíam menor quantidade de substrato, ou seja, tinham menor espessura de camada de substrato, o que facilita a evaporação da água, que foi acelerada pelo fato de se utilizar uma estufa com circulação de ar forçada para controlar e fixar a temperatura da fermentação desejada. Ao final do processo fermentativo as amostras dos experimentos 2 e 4 já estavam notavelmente secas.

Tabela 9. Valores do percentual de umidade das amostras no decorrer da fermentação.

Tempo (h) Exp.	4	8	24	48	72
	1	89,67	88,80	88,94	89,50
2	89,92	89,08	86,04	88,04	50,99
3	90,36	89,15	89,55	87,63	88,87

4	90,47	89,77	87,81	89,21	65,37
5	90,03	89,37	89,33	89,79	86,05
6	90,73	89,43	89,13	89,60	87,41

A Tabela 10 apresenta os resultados de acidez titulável das amostras retiradas durante o processo de fermentação semissólida do facheiro. De acordo com a tabela observa-se que no decorrer do processo houve aumento do percentual de acidez em todos os experimentos.

Tabela 10. Valores do percentual de acidez titulável das amostras no decorrer da fermentação.

Tempo (h) \ Exp	4	8	24	48	72
1	34	36	48	58	70
2	36	30	51	56	64
3	40	42	50	60	68
4	44	32	52	54	62
5	48	26	50	66	92
6	42	36	48	56	72

A Tabela 11 apresenta os valores de pH, umidade e acidez titulável encontrada no melhor tempo de fermentação para cada experimento realizado. Para os experimentos 1, 4, 5 e 6, que apresentaram tempo ótimo de fermentação de 8 horas, o pH apresentado foi de 4,82, 4,85, 4,84 e 4,84, respectivamente. O percentual de

umidade foi de 88,80, 89,77 89,37 e 84,18% e acidez titulável de 36, 32 26 e 36%, respectivamente.

Com relação ao experimento 2, que teve seu melhor tempo de fermentação de 24 horas, assim como o experimento 3, os valores de pH apresentados foram de 4,73 e 4,56, respectivamente. Os valores de umidade foram de 86,04 e 89,55% e de acidez titulável de 51 e 50% respectivamente.

Tabela 11. Valores de pH, umidade e acidez titulável encontrada no melhor tempo de fermentação para cada experimento realizado.

	Experimento					
	1	2	3	4	5	6
pH	4,82	4,73	4,56	4,85	4,84	4,84
Umidade (%)	88,80	86,04	89,55	89,77	89,37	84,18
Acidez Titulável (%)	36	51	50	32	26	36

4.4 Planejamento experimental

Utilizando o planejamento fatorial 2^2 e duas repetições no ponto central, proposto neste trabalho, realizou-se um estudo da influência das combinações das variáveis, concentração de levedura e espessura da camada de substrato, sobre o aumento proteico do facheiro. A Tabela 12 apresenta os resultados do aumento proteico facheiro tomando como base o valor de proteína bruta inicial do facheiro, 4,46%, no melhor tempo de fermentação para cada experimento,

Tabela 12. Resultados do aumento proteico do facheiro no melhor tempo de fermentação para cada experimento

Exp.	Concentração Levedura	Espessura camada substrato	Aumento Proteico (%)	Tempo (horas)
1	+1 (5%)	+1 (10cm)	162,7	8
2	+1 (5%)	-1 (3cm)	156,9	24
3	-1 (1%)	+1 (10cm)	88,0	24
4	-1 (1%)	-1 (3cm)	67,0	8
5	0 (3%)	0 (6,5cm)	112,5	8
6	0 (3%)	0 (6,5cm)	103,6	8

O planejamento foi analisado usando o software Statistic, versão 5,0 para realizar a regressão dos dados. O modelo linear codificado obtido para o aumento proteico do facheiro, em função das variáveis estudadas, é mostrado abaixo. Os parâmetros que foram estatisticamente significativos, ao nível de 95% de confiança, estão em negrito.

$$AP = 115,12 + 82,3 C_L + 13,4 E_s - 7,6 C_L \cdot E_s$$

Onde: AP- Aumento Proteico

C_L – Concentração de levedura

E_s – espessura da camada de substrato

O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo encontrado foi de 0,974, significando que, o modelo de regressão prevê satisfatoriamente a relação entre as variáveis independentes (C_L e E_s) e a resposta (AP), para um nível de confiança de 95%.

O diagrama de Pareto apresenta graficamente os efeitos significativos ao nível de confiança utilizado. Os valores que ultrapassam o valor de “p” são considerados estatisticamente significativos. A Figura 11 representa o gráfico de Pareto para o aumento proteico, com nível de confiança de 95%. Neste Gráfico, verifica-se que apenas a concentração de levedura influenciou no aumento proteico alcançado durante o processo.

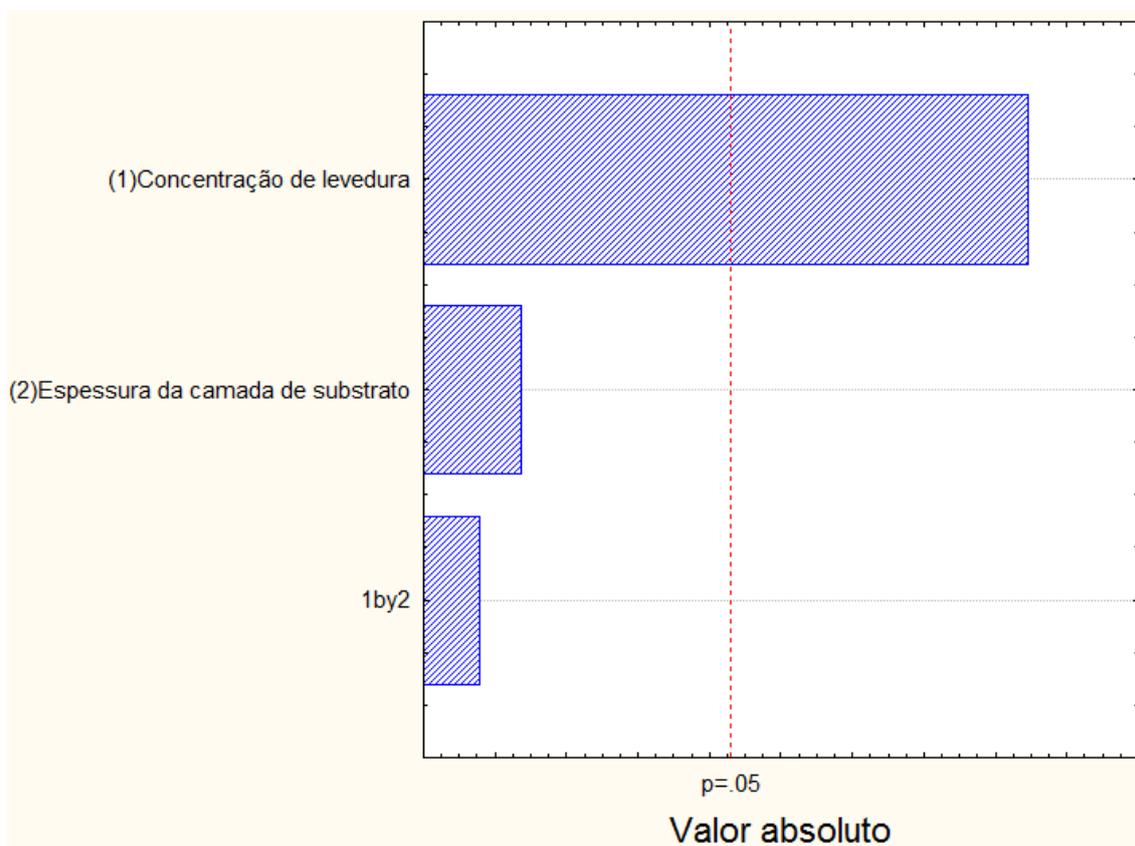


Figura 11. Gráfico de Pareto para o aumento proteico, com nível de confiança de 95%.

A Figura 12 ilustra a superfície de resposta construída para a concentração de levedura e espessura da camada de substrato, buscando observar tendências. Pode-se verificar, dentro da faixa estudada de concentração de levedura e espessura da camada de substrato, que apenas a concentração de levedura influenciou no ganho proteico do facheiro. A Figura 12 apresentou uma tendência de aumento no ganho de proteínas

durante o processo quando se aumenta a concentração de leveduras adicionadas ao substrato, independente da espessura da camada de substrato.

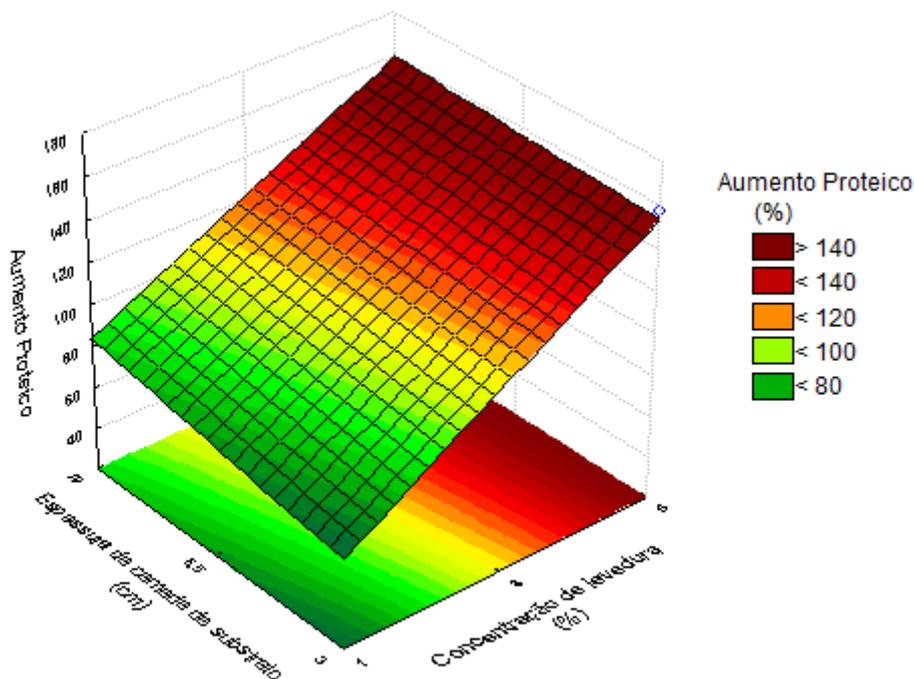


Figura 12. Tendência de aumento no ganho de proteínas durante o processo quando se aumenta a concentração de leveduras.

Campos (2003) e (2008) quando estudaram a influencia da concentração de leveduras no processo de enriquecimento proteico do bagaço de caju e da palma forrageira, também verificaram que esta variável influencia de forma significativa no processo. Alcançou-se nestes estudos um aumento de 3,5 e 2,6 vezes, respectivamente.

Araújo (2004) trabalhando com o enriquecimento proteico da palma forrageira e estudando a influencia das variáveis concentração de levedura e temperatura de fermentação, fixando a espessura de camada de substrato, encontrou um aumento proteico de 4 vezes, sendo a concentração inicial de levedura a única variável que teve influência significativa sobre a resposta.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5- CONCLUSÕES

- O tempo de fermentação necessário para obtenção do maior aumento proteico do facheiro foi de 8 horas de fermentação.

- A fermentação semissólida a 35°C do facheiro com inoculação de 5% de levedura e espessura da camada de substrato de 10 cm, proporcionou maior aumento proteico encontrado. O aumento proteico foi de aproximadamente de 2,6 vezes, tendo como base o teor de proteína do facheiro antes da adição da levedura.

- Das duas variáveis estudadas, apenas a concentração de leveduras apresentou influência significativa no processo fermentativo do facheiro.

- O emprego da levedura na fermentação semissólida do facheiro viabiliza a obtenção de um concentrado proteico, que poderá posteriormente ser utilizado como fonte alternativa de maior potencial proteico, quando comparada ao facheiro oferecido aos animais.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P.M.; KOCH, F.; GOULART, T.T.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J.L. Enriquecimento proteico do bagaço de maçã com proteína fúngica através da fermentação em estado sólido. In: Simpósio Nacional de Fermentações (CD Rom), Florianópolis, 2003.

ALMEIDA, M.M. Estudo da bioconversão do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) para produção de bioprodutos. Tese Doutorado, Universidade de Campina Grande, Campina Grande, 2007.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Washington, Ed.12, 1990.

ARAÚJO, L. F. Enriquecimento proteico da palma forrageira com *saccharomyces cerevisial* para alimentação de ruminantes. Arq. Bras. Med. Vet . Zootec. V.60, n.2, p. 401- 407, 2008.

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

ARAÚJO, L.F. Enriquecimento proteico do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P.DC) e palma forrageira (*Opuntia ficus- indica* Mill) por fermentação semissólida. Tese Dotorado, Universidade de Campina Grande, Campina Grande, 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Editora da UNICAMP, Campinas, 1995.

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

CAMPOS, A.R.N. Enriquecimento nutricional da palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill): Estudo experimental de ampliação de escala. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2008.

CANOILAS, L.M. Enriquecimento proteico de resíduos de farinha de mandioca pelo desenvolvimento de leveduras. Dissertação Mestrado, ESALQ, Piracicaba, 1991.

CAPRA, F.; RIBEIRO, N.P.; VARGAS, G.D.L.P.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; LUCCIO, M.D. Efeito da umidade temperatura e suplementação do meio na produção de lipase por *Penicillium simplicissium* utilizando torta de soja como substrato. In: Simpósio Nacional de Fermentações (CD Rom), Florianópolis, 2003.

CARVALHO, G. B. M. et al. Elementos Biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – As leveduras. Revista Analytica. n. 25. p. 36 – 42, 2006.

CARVALHO, M.A.H. Influência do cultivo dos fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum* sobre a composição química da palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill). Dissertação mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 1999.

CAVALCANTI, N., B. Cíndice de sobrevivência e crescimento do (*Pilosocereus pachycladus ritter.*) na caatinga. XXVII Reunião Nordestina de Botânica. 2004.

CAVALCANTI, N., B.; RESENDE, G., M. Plantas nativas da caatinga utilizadas pelos pequenos agricultores para alimentação dos animais na seca, III congresso nordestino de produção animal, Campina Grande. 2004.

CORREIA, L. K. C. & AQUINO, L. C. L. Aplicação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para o enriquecimento proteico de farinha de sementes de mangaba. Scientia Plena. v. 8, n. 12. 2012.

CORREIA, R.T.P. Estudo do cultivo semissólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus Oligosporus* em resíduo de abacaxi. Tese Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, I.; ERTOLA, R. Water balance in solid state fermentation without forced aeration. Enzyme Microbiology Technology, v.16, p.562-565, 1994.

DUNAND, A.; RENAUD, R.; MARATRAY, J.; ALMANZA, S.; DIEZ, M. Dijon reactors for solid state fermentation: designs and applications. Journal of Scientific and Industrial Research, v.55, n.3, p.317-332, 1996.

DURAND, A.; CHÉREAU, D. A new pilot reactor for solid-state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnology and Bioengineering*, v.31, p.476-486, 1988.

FAUCON, P. Gardenig in Arizona. Disponível em: <http://www.deserttropicals.com/Plants/Cactaceae/Facheiroa_squamosa.html>. Acesso em: 9 março. 2014.

FÉ, C, R, M et al. Uso das cactáceas na alimentação animal e humana no Brasil e no mundo. II EITEC: Ciências e Inovação: Tecnologias Sustentáveis Para Preservação do Meio Ambiente. 2013.

FERNANDEZ, M.; PÉREZ, J.R.; SOLAR, I.; AGOSIN, E. Automation of a solid substrate cultivation pilot reactor. *Bioprocess Engineering*, v.16, p.1-4, 1997.

FRANCO, B. D. G. M. Microbiologia de alimentos. São Paulo, Editora Atheneu, p.174, 1996.

GERMANO, B. H. et al. Avaliação da composição química e mineral de cactáceas na semi-árido paraibano. *Agropecuária técnica, areia*, v. 20, n.1, 1999.

GERVAIS, P.; MARECHAI, P.A; MOLIN, P. Water relations of solid-state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v.55, p.343-357, 1996.

HERMANN, S.R.; HERNANDEZ, F.; RIVALDI, J.D.; SILVEIRA, G. G. Produção de pectina liase e amilase por fermentação no estado sólido à base de bagaço de laranja e farelo de arroz. In: Simpósio Nacional de Fermentações (CD Rom), Florianópolis, 2003.

HOLANDA, J. S. et al. Enriquecimento proteico de pedúnculos de caju com emprego de levedura, para alimentação animal. *Pesq. Agropec. Bras.* V.33, p. 787- 792, 1998.

HOLANDA, J. S.; OLIVEIRA, A. J. E.; FERREIRA, A. C. Enriquecimento proteico de pedúnculos de caju com emprego de leveduras, para alimentação animal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. v.33, n.5, p.79-82, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: IMESP, 1995. p.184.

INSTITUTO REGIONAL DA PEQUENA AGROPECUÁRIA APROPRIADA.

Cultivo de facheiro é garantia de alimento animais da caatinga. Acesso em 01 de agosto de 2014.

KOLICHESKI, M. B. Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando como substrato bagaço de mandioca. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Paraná, Curitiba, 1995.

LEAL, I. R.; VINCENTE, A.; TABARELLI, M. Herbivoria por caprinos na caatinga da região de Xingó: uma análise preliminar. Ecologia e conservação da caatinga. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 822p. 2003.

LIMA, E. E. et al. Estudo das polpas do facheiro em função da parte do ramo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 34., 2005, Canoas. Anais... Canoas: SBEA, 2005.p. 34.

LIMA, G. F. C. Alternativas de seleção e manejo de volumosos forrageiros para a atividade leiteira no nordeste. In: LIMA, G. F. C.; MACIEL, F. C. O Agronegócio de Leite no Nordeste, 1998, Natal. Anais. EMPARN, P. 190-226. 1998.

LIMA, J, L, S. Plantas forrageiras das caatingas usos e potencialidades. Empresa brasileira de pesquisa. Programa planta do nordeste 1996.

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

MAUREL, V. B.; OORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. Process Biochemistry, v.38, p.881-896, 2003.

MORAES, A. F. Enriquecimento proteico de farelo e arroz por fermentação semissólida em biorreator de coluna com leito fixo. Dissertação mestrado, Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 1999.

MORAES, I. O. Fermentação semissólida: definições e conceitos básicos envolvidos; importância dos processos na obtenção de bioprodutos. Embrapa (CD Rom), 2001.

NAGEL, F. J. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N. RINZEMA, A. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid station fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.72, p.219-230, 2001.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *Journal Basic Microbiology*. v.34, p.405-423, 1994.

OLIVEIRA, M. M. Enriquecimento nutricional por bioconversão de resíduos agroindustriais para utilização na alimentação animal. Tese Dotourado, Universidade de Campina Grande, Campina Grande, 2007.

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

PANAROTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Avaliação de cascas de limão Taiti como fonte indutor na produção de polligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido. In: Simpósio Nacional de Fermentações (CD Rom), Florianópolis, 2003.

PANDEY, A. Recent devlopments in solid-state fermentation. *Process Biochemist*, v.27, p.109-117, 1992.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J.; NIGAM, P. Solid-State fermentation in biotechnology, Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India, 2001.

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

PINHEIRO, K.; P.; et al. Análise química e bromatológica de farinha de feno de facheiro (*Pilocereus Piauhensis*), associação Brasileira de zootecnista, João Pessoa. 2008.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido - uma alternativa para o aproveitamento e

valorização de resíduos agroindustriais. Revista de Química Industrial. Ano 74, n.724. p.17-20, 2006.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v.13, p.127-135, 2003.

RAIMBAULT, M.; RAMIRES T. C. Grow of *Rhizopus sp* on ungelatinized cassava flour in solid state fermentation for protein enrichment. In: ROSSOS, S. LONSANE, B.K; RAIMBAULT, M; VINEGRA-GONZALEZ, G. Advances in solid state fermentation. Netherlands. Kluwer Academic Publishers. p.169-181, 1980.

RAINHO, J. C. M.; CHUONG, W.; ESPÓSITO, E. Fermentação sólida da borra de café para produção de *Plurotus ostrreatus*. In: Simpósio Nacional de Fermentações (CD Rom), Florianópolis, 2003.

RAMANA, M. M. V.; KARANTH, N. G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. Advances in Applied Microbiology, v.38, p.99-146, 1993.

ROBISON, T.; NIGAM, P. Bioreactor desing for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v.13, p.179-203, 2003.

RODRIGUES, C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ROSCELI, A. Forragicultura morfologia, pt.scribd.com/doc. Acesso em 01 de Julho de 2014.

ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Advances in solid state fermentation. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Kluwer Academic Publishers, 1995.

SANTOS, S. F. et al. estudo do enriquecimento proteico da palma forrageira do sertão pernabucano com foco para alimentação animal. VII CONNEPI: ciência, tecnologia e

inovação: ações sustentáveis para o desenvolvimento regional. Congresso Norte Nordeste de pesquisa e inovação 2012.

SATO, K.; NAGATANI, M.; SATO, S. A. method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. *Journal Fermentation Technology*, v.60, p.607-610, 1982.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia industrial. Engenharia Bioquímica.* v.2. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 2001.

SILVA, J. D. *Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos).* Editora UFV. São Paulo, 1998.

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

STREIT, F.; HECK, J. X.; SCHIRMER, A.; AYUB, M. A. Z.; HERTZ, P. F. Goma xantana: produção e extração em cultivo semissólido a partir de um resíduo fibroso de soja. In: *Simpósio Nacional de Fermentações (CD Rom)*, Florianópolis, 2003a.

STREIT, F.; KOCH, F.; TROSSINI, T. G.; LARANJEIRA, C. M.; NINOW, J. L. Aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica. In: *Simpósio Nacional de Fermentações (CD Rom)*, Florianópolis, 2003b.

SUHET, M. I. Enriquecimento proteico do resíduo da industrialização do abacaxi (*Ananas comosus* Merrill) por fermentação: utilizando fungos filamentosos. *Dissertação Mestrado*, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1999.

THIEMANN, J. E. Produção de enzimas por fermentação em substrato semissólido com especial referência às celulases. In: *Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá. p.107-131, 1985.

TOYAMA, N. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, n.6, p.207-219, 1976.

VANDENBERGHE, L. Développement d'un procédé pour la production d'acide citrique par fermentation en milieu solide à partir de résidus de l'agro-industrie du manioc. Tese Doutorado, Université de Technologie de Compiègne, 2000.

VENDRUSCOLO, F. *et al.* produção de proteína unicelular a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. v. 01, n. 01: p. 53-57, 2007

VILLEGAS, E.; AUBAGUE, S.; ALCANTARA, L.; AURIA, R.; REVAH, S. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. Biotechnology, v.11, p.387-397, 1993.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Strategies for the selection of mold strains geared to produce enzymes on solid substrates, In: GALINDO, E.; RAMYREZ, O.T. (Eds.), Advances in Bioprocess Engineering II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht , p. 123–136, 1998.