



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Química  
Departamento de Bioquímica  
Laboratório de Biotecnologia Microbiana- LaBiM

---

Análise de composição nutricional e produção  
de enzimas em resíduo de Macaúba após  
fermentação no estado sólido

**NATHALIA MACHADO LINO DE MOURA**

Prof<sup>a</sup> Orientadora:

DBQ/IQ: Denise Maria Guimarães Freire, DSc

Prof Co-Orientador:

DBQ/ IQ: Alexandre Guedes Torres, DSc

Abril/2012

Moura, Nathalia Machado Lino de,

Análise de composição nutricional e produção de enzimas em resíduo de  
Macaúba após fermentação no estado sólido

Nathalia Machado Lino de Moura – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2012.

50f.

Dissertação (Projeto de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Centro de Ciências da Matemática e da Natureza, Instituto de Química, Rio  
de Janeiro, 2012.

Orientador: Denise Maria Guimarães Freire e Alexandre Guedes Torres

1.Macaúba. 2. rejeito agroindustrial. 3.composição nutricional. 4.fermentação  
no estado sólido

(Projeto de Curso- UFRJ/IQ) I.Título

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por me dar forças para sempre seguir em frente e proteção.

Aos meus pais pela paciência, por sempre me apoiarem e permitirem minha formação, mesmo com dificuldades.

Aos meus irmãos Luciana e Leonardo por sempre fazerem um ambiente divertido e agradável em casa e me ajudarem tanto no ‘Português’ como na ‘Informática’.

À minha irmã Rachel e cunhado Ercio por acreditarem tanto em mim.

À minha sobrinha Maria Eduarda simplesmente por existir.

À minha avó, que sempre rezou por mim durante minha formação e sempre com sua personalidade otimista.

À toda minha família que mesmo indiretamente me apoiaram.

Aos meus amigos que desde a época do vestibular sempre estiveram ao meu lado e entenderam minha ausência diversas vezes (Camila, Diogo, Nathalia e Taíssa).

À minha amiga Isabelle Ingrid, que se tornou uma peça fundamental nos últimos anos da faculdade, me ensinando muita coisa e sempre me apoiando.

À minha orientadora professora Denise, por acreditar em mim e me dar essa oportunidade de trabalhar e aprender muito em seu laboratório.

Ao professor Alexandre, que me indicou a esse projeto, e por toda atenção.

À Taís, responsável por me ensinar tudo sobre esse trabalho e ter tido muita paciência nesses dois anos comigo.

À Priscila, Bruno e Joab, por fazerem um ambiente divertido de trabalho, sem negar ajuda ou atenção na realização do projeto.

À todos do LaBiM, que mesmo trabalhando em projetos diferentes sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar o que eu não sabia, principalmente ao Mateus pelos “primeiros passos” sobre Fermentação.

## RESUMO

### PROJETO DE CURSO-IQWX01

**TÍTULO: ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM RESÍDUO DE MACAÚBA APÓS FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

ALUNA: Nathalia Machado Lino de Moura

ORIENTADORA: Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc- Instituto de Química- UFRJ

CO-ORIENTADOR: Alexandre Guedes Torres, D.Sc – Instituto de Química - UFRJ

A busca por matérias-primas naturais no âmbito do desenvolvimento tecnológico, em qualquer setor, vem sendo prioridade nas grandes indústrias. Um exemplo é a procura por fontes alternativas para produção de biodiesel. Atualmente, a maior parte do biodiesel produzido no Brasil utiliza o óleo de soja como matéria-prima, entretanto, a possibilidade de diversificação e apoio à agricultura familiar abrem perspectivas promissoras para utilização de outras espécies, como a macaúba (*Acromia Aculeata*).

Com a extração do óleo da macaúba são gerados resíduos sólidos como a torta da polpa, pobre em proteína e bastante fibrosa, podendo ser utilizada como insumo calorífico para caldeiras ou como fertilizante para os campos cultivados de macaúba, tanto “in natura” como na forma de cinzas (CETEC,1983). Estes produtos poderiam ser utilizados para fins mais nobres (maior valor agregado) como, por exemplo, rações. Entretanto, para este fim necessitariam ser melhorados quanto à sua digestibilidade (diminuição de fatores anti- nutricionais) e teor protéico/ nutricional.

Deste modo, o presente trabalho avaliou a utilização da Fermentação no Estado Sólido (FES) na torta de macaúba por fungos filamentosos oriundos da coleção de cultura do LaBiM (Laboratório de Biotecnologia Microbiana- IQ/UFRJ). Além da produção de enzimas, este processo avaliou o enriquecimento nutricional do rejeito utilizado pela redução de componentes anti-nutricionais e produção de proteínas microbianas.

Dentre os fungos utilizados, o *P.brevicompactum* apresentou maior atividade lipásica (27 U/g) em 72 horas, atividade fitásica (0,1U/g) por 96 horas e tanásica de 8 U/g em 96 horas de fermentação. Entretanto, as maiores reduções dos teores de fatores anti-nutricionais foram observados nas fermentações com o *Aspergillus tamarii* (87% de redução de ácido fítico) e *Aspergillus niger* (50% de redução de substâncias tânicas). Em relação ao teor protéico, as proteínas geradas pelo crescimento fúngico não foram suficientes para resultar no enriquecimento, possivelmente apenas substituíram as que foram consumidas pelos mesmos.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>iv</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>vii</b>

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Rejeitos Agroindustriais.....	4
3.2 Macaúba.....	5
3.3 Componentes antinutricionais.....	6
3.3.1 Taninos.....	6
3.3.2 Fitatos.....	6
3.4 Componentes Nutricionais.....	8
3.4.1 Proteína .....	8
3.4.2 Lipídeos.....	9
3.4.3 Glicídios .....	9
3.4.4 Ferro.....	10
3.4.5 Uréia .....	11
3.5 Rejeitos Agroindustriais e enriquecimento Nutricional.....	12
3.6 Fermentação no estado sólido.....	14
3.6.1 Características da Fermentação no Estado Sólido.....	14
3.6.2 Fatores que afetam o crescimento microbiano em FES.....	15
3.6.3 Microrganismos utilizados em FES.....	16
3.7 Enzimas hidrolíticas .....	17
3.7.1 Lipase.....	17
3.7.2 Tanase .....	18
3.7.3 Fitase .....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
4.1 Meio de cultivo para fermentação no estado sólido.....	20
4.2 Microorganismos .....	20
4.3 Preparo do inóculo .....	21

4.4 Fermentação no estado sólido .....	21
4.5 Medida da umidade .....	21
4.6 Determinação da atividade de água ( $A_w$ ).....	22
4.7 Extração das enzimas para determinação das atividades enzimáticas.....	22
4.8 Dosagem de atividade enzimática .....	23
4.9 Análises Nutricionais .....	25
I. Amostragem.....	25
II. Análise de Lipídeos totais.....	26
III. Análise de Proteína bruta.....	26
IV. Determinação de Cinzas.....	26
V. Determinação do teor de Glicídios .....	26
VI. Determinação do teor de Ferro.....	27
VII. Determinação do teor de Ácido Fólico.....	27
VIII. Análise de Substâncias Tânicas.....	27
IX. Análise do teor de Uréia .....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1 Produção de lipase.....	29
5.2 Enriquecimento nutricional .....	32
5.3 Produção de tanase e fitase e composição anti- nutricional.....	36
6. CONCLUSÃO .....	40
7. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: composição do fruto da macaúba .....	06
Tabela 2: principais diferenças entre FES e FS .....	14
Tabela 3: listagem de reagentes utilizados para preparo do meio de cultivo .....	20
Tabela 4: umidade, atividade de água e atividade lipásica para <i>A.niger</i> .....	29
Tabela 5: umidade, atividade de água e atividade lipásica para <i>A.tamaritii</i> .....	30
Tabela 6: umidade, atividade de água e atividade lipásica para <i>P.brevicomactum</i> ...	30
Tabela 7: umidade, atividade de água e atividade lipásica para <i>R. oryzae</i> .....	31
Tabela 8: composição da torta da polpa da macaúba <i>in natura</i> .....	33
Tabela 9: análise de composição nutricional das tortas controle e fermentadas .....	34
Tabela 10: atividade de tanase e fitase na torta de macaúba .....	36
Tabela 11: composição anti- nutricional da torta da macaúba .....	38

# 1. INTRODUÇÃO

A busca por matérias-primas naturais no âmbito de desenvolvimento tecnológico, em qualquer setor, vem sendo prioridade nas grandes indústrias. Um exemplo é a procura por fontes alternativas de matéria-prima para produção de biodiesel. Atualmente, a maior parte do biodiesel produzido no Brasil utiliza o óleo de soja como matéria-prima, entretanto, a possibilidade de diversificação e apoio a agricultura familiar abrem perspectivas promissoras para utilização de outras espécies como a macaúba (*Acromia Aculeata*).

Macaúba é uma palmeira nativa das Américas Central e do Sul, bem adaptada ao cerrado brasileiro por sua resistência às secas e queimadas. Seus frutos são constituídos por uma casca verde-amarelada dura, porém quebradiça; por uma polpa de cor amarelo-esbranquiçada, rica em óleo e fibras e por um caroço, formado por um tecido negro extremamente duro que abriga a amêndoa, branca e rica em óleo (CETEC, 1983).

Com a extração do óleo da macaúba são gerados resíduos sólidos como a torta da amêndoa, que tem alto valor protéico (50%) e tem aplicação no enriquecimento da ração de gado, e as tortas da polpa, da casca e o endocarpo que são pobres em proteína e bastante fibrosas. Estas últimas podem ser utilizadas como insumo calorífico para caldeiras ou como fertilizantes para os campos cultivados de macaúba, tanto “in natura” como na forma de cinzas (CETEC,1983). No presente trabalho, foi utilizada a torta da polpa, que na verdade é uma torta contendo a polpa mais a casca do fruto.

A exploração da macaúba como matéria-prima para a produção do biodiesel e o consequente aumento na produção de resíduos sólidos oriundos da cadeia do biodiesel tornam necessário o desenvolvimento de metodologias que possibilitem a diminuição desses resíduos no meio ambiente. Uma das metodologias que pode ser utilizada é a Fermentação no Estado Sólido (FES) que representa um processo para obtenção de produtos de interesse biotecnológico a baixo custo, tais como as enzimas e ainda possibilita o enriquecimento nutricional do rejeito utilizado pela redução de componentes anti-nutricionais (taninos e fitatos) e produção de proteínas microbianas (HÖLKER *et al.*, 2005; CASTILHO *et al.*, 2000)

Fitatos são sais de ácido fitico (inositol hexafosfato, mio-inositol, 1,2,3,4,5,6-hexaquis dihidrogenofostato) e ocorrem em muitas sementes oleaginosas e cereais utilizados na alimentação humana e animal. (ONYANGO *et al.*, 2008). Estes compostos apresentam ação quelante e, desta forma, atuam inibindo a utilização de proteínas e consequentemente de

aminoácidos, como também complexando minerais importantes para o metabolismo como cálcio, magnésio, cobre e zinco (SELLE *et al.*, 2007).

Já os taninos, são considerados inibidores de digestão de proteínas e fibras em humanos e não-ruminantes, quelando minerais e proteínas dietéticas, diminuindo sua biodisponibilidade assim como a de enzimas digestivas (BATTESTIN, 2007).

Dentre as enzimas possíveis de serem produzidas por FES podemos citar as lipases, que poderiam ser empregadas como catalisadores biológicos na produção do biodiesel; e as fitases e tanases que atuariam na redução de compostos anti-nutricionais destes resíduos.

As lipases são glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3.) que catalisam a hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em triacilgliceróis, liberando digliceróis, monogliceróis, glicerol e ácidos graxos (SHARMA *et al.*, 2001).

As tanases são tanino acil hidrolases (E.C.3.1.1.20) que catalisam a hidrólise de ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico (BANERJEE *et al.*, 2009).

As fitases são mio-inositol-hexaquifosfato fosfohidrolases (EC 3.1.3.8) que catalisam a liberação do fosfato de fitato (mio-inositol hexaquifosfato), o qual é a forma predominantemente de fósforo em grãos cereais, leguminosas e sementes oleaginosas (PANDEY *et al.*, 2001).

Deste modo, o emprego de Fermentação em Estado Sólido utilizando a torta da polpa da Macaúba como meio de cultivo é uma opção interessante para obtenção de enzimas e matéria-prima enriquecida para rações a custo reduzido fechando um ciclo auto-sustentável e contribuindo para fixação do trabalhador no campo (CASTILHO *et al.*, 2000).

## 2. OBJETIVO

O objetivo geral do trabalho foi a realização da fermentação no estado sólido em torta residual da extração do óleo da Macaúba (torta da polpa com a casca), avaliando os efeitos desta sobre a produção de enzimas (lipases, fitases e tanases) e o aumento da qualidade nutricional dos rejeitos após o processo fermentativo.

Como objetivos específicos do trabalho, tem-se:

- Avaliar o uso do rejeito da extração de óleo de Macaúba (torta) como meio de cultivo para a produção de lipases, tanases e fitases por fermentação no estado sólido pelos fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium brevicompactum* e *Aspergillus tamaris*.
- Avaliar o efeito do processo fermentativo no teor de componentes anti-nutricionais como taninos e fitatos.
- Avaliar a composição químico-nutricional dos rejeitos antes e após a fermentação no estado sólido.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:**

#### **3.1 Rejeitos Agroindustriais**

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização quanto ao meio ambiente, iniciada no século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (PELIZER *et al.*, 2007).

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos. Esses resíduos podem apresentar sérios problemas de disposição final e são potencialmente poluentes, além de representarem perdas de matéria-prima e energia. Ao contrário do que acontecia no passado, quando a maior parte dos resíduos era disposta em aterros sanitários sem grandes preocupações dos produtores quanto aos cuidados necessários para esse descarte; ou ainda eram empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários no contexto das cadeias agroindustriais (PINTO, 2004).

Estes resíduos agroindustriais (sólidos ou líquidos) são gerados no processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar e álcool, etc., sendo sua produção, geralmente, sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima. Os resíduos sólidos são constituídos pelas sobras de processo, descartes e lixo proveniente de embalagens, lodo de sistemas de tratamento de águas residuárias, além de lixo gerado no refeitório, pátio e escritório da agroindústria (MATOS, 2005).

Segundo PELIZER *et al.* (2007), resíduos sólidos se diferenciam de lixo porque, enquanto esse último não apresenta valor de nenhuma classe e é destinado inquestionavelmente ao descarte, os primeiros apresentam valor econômico agregado, pela possibilidade de reaproveitamento no processo que o origina. Além disso, os resíduos também podem ser utilizados como matéria-prima para um novo processo, gerando um subproduto de valor agregado.

Desta forma, o aproveitamento destes resíduos sólidos em bioprocessos além de proporcionar substratos alternativos para os mesmos e agregar valor à cadeia produtiva,

também ajuda a solucionar o problema ambiental causado por sua disposição indiscriminada no meio ambiente (REDDY *et al.* 2003; GODOY *et al.*, 2011).

### 3.2 Macaúba:

A macaúba é uma palmeira de vasta distribuição geográfica. Sua área de ocorrência estende-se desde os Estados de São Paulo e do Rio de Janeiro, passando por Minas Gerais e por todo o centro-oeste, nordeste e norte do Brasil, até ultrapassar as fronteiras, atingindo a América Central.



Figura 1: Palmeira macaúba, seus cachos de frutos e seu fruto partido ao meio

Seus frutos são constituídos por: uma casca verde-amarelada, dura, porém quebradiça; a polpa, de cor amarela-esbranquiçada, rica em óleo e fibras; o caroço, formado por um tecido negro extremamente duro que abriga a amêndoa, branca e também rica em óleo (CETEC, 1983) (Fig1).

Na tabela 1 está ilustrada a composição do fruto da Macaúba (SZPIZ *et al.*, 1989; CETEC, 1983):

Tabela 1: Composição do fruto da macaúba (g/100g) (CETEC, 1983)

<b>Características</b>	<b>Valores</b>
Peso do fruto fresco (g)	40,0 – 66,0
Umidade do fruto fresco (%)	33,0 – 36,5
Casca do fruto seco (%)	19,5 – 24,1
Polpa do fruto seco (%)	34,3 – 48,0
Endocarpo do fruto seco (%)	23,9 – 39,3
Amêndoa do fruto seco (%)	6,1 – 7,3
Teor de óleo na casca do fruto seco (%)	5,3 – 9,8
Teor de óleo na polpa do fruto seco (%)	55,9 – 69,9
Teor de óleo na amêndoa do fruto seco (%)	55,2 – 58,0
Teor de óleo no fruto seco (%)	25,5 – 34,3
Teor de óleo no fruto fresco (%)	16,2 – 22,9

A palmeira de macaúba é uma excelente matéria-prima para a produção de biodiesel; podem ser aproveitados, além do óleo, os produtos da polpa, a amêndoa que se transforma em torta para alimentação do gado, e as fibras que se transformam em carvão de excelente qualidade (AGRONEGÓCIO, 2008).

### **3.3 Componentes Antinutricionais**

#### **3.3.1 Taninos:**

Taninos são um grupo de diversos polifenóis oligoméricos e poliméricos classificados como metabólitos secundários em plantas. Estas substâncias são definidas como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas, estando os taninos condensados, galotaninos e lagitaninos entre os mais comuns (FRAZIER *et al.*, 2009).

As principais características dessa classe de compostos são: solubilidade em água, exceto os de elevada massa molar; possuem a habilidade de ligar-se a proteínas, combinar-se com a celulose e a pectina para formar complexos insolúveis. Os taninos são considerados compostos anti-nutricionais devido à propriedade que apresentam em formar complexos insolúveis e permanentes com componentes nutricionais de grande importância, principalmente com proteínas, fazendo com que estes fiquem indisponíveis para serem

absorvidos pelo organismo. Os taninos são classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (BATTESTIN, 2007).

Taninos condensados são considerados inibidores de digestão de proteínas e fibras em humanos e não-ruminantes, agindo no trato digestivo e se ligando a proteínas e enzimas digestivas prejudicando o metabolismo (FRAZIER *et al.*, 2010).

Os taninos hidrolisáveis estão presentes em folhas, galhos, cascas e madeiras de várias árvores como: *Terminalia*, *Phyllanthus* e *Caesalpinia*, dentre outros gêneros. Os taninos hidrolisáveis são unidos por ligação éster entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose e entre os anéis aromáticos, sendo prontamente hidrolisados por ácidos, bases e enzimas (ex. tanase).

Os taninos condensados (TC) ou proantocianidinas, com estrutura química compacta, são mais vastamente distribuídos no reino vegetal que os taninos hidrolisáveis (BATTESTIN, 2007). Eles estão presentes em grande quantidade nos alimentos normalmente consumidos.

### **3.3.2 Fitatos:**

Os fitatos são sais de ácido fítico, sendo encontrados na forma de mio-inositol 1,2,3,4,5,6, hexa-di-idrogêniofosfato. Na maioria das matérias-primas de origem vegetal utilizadas na alimentação animal (grãos de cereais, legumes e sementes oleaginosas), boa parte do fósforo mineral (75-80%) está armazenada na forma de ácido fítico, que não é degradado pelos animais monogástricos, como porcos, galinhas e peixes (OH, 2001; PANDEY *et al.* 2001; SOCCOL *et al.* 2002). Além de tornar o fósforo indisponível, o fitato liga-se aos cátions bivalentes, como o cálcio, cobre, magnésio, ferro, manganês e zinco impedindo a absorção desses nutrientes no intestino do animal (LEHRFELD e MORRIS, 1992; LEHNINGER *et al.* 1993).

O fitato pode alterar significativamente as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos (CHERYAN, 1980), desempenhando um papel antinutricional na alimentação de humanos e monogástricos e a maior parte do fósforo contido neste composto é indisponível e excretado sem ser absorvido (RABOY *et al.*, 1991; REDDY *et al.*, 1989).

Por conseguinte, quando as fitases (enzimas que não estão presentes em humanos e animais monogástricos) são empregadas para catalisar a clivagem dos grupos fosfato do ácido fítico, os cátions complexados e proteínas também são liberados, resultando em um aumento de sua biodisponibilidade.

### **3.4 Componentes Nutricionais**

#### **3.4.1 Proteínas**

As proteínas são macromoléculas complexas que podem constituir 50% ou mais do peso seco das células vivas e tem um papel fundamental na sua estrutura e funcionamento. Já se isolaram e purificaram numerosas proteínas e sua massa molecular varia de 5.000 a vários milhões de Daltons. Estes biopolímeros são constituídos por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e na maioria das vezes enxofre. Algumas proteínas, chamadas de metaloproteínas, contêm ferro, cobre, fósforo ou zinco.

As proteínas podem ser divididas em duas grandes classes: proteínas simples, constituídas apenas por aminoácidos, e proteínas conjugadas, constituídas por aminoácidos (parte protéica) e por outras substâncias (parte não-protéica) ou por compostos orgânicos extremamente complexos e de natureza coloidal. As proteínas das plantas são classificadas em dois grupos: proteínas de folhas e caules e proteínas de sementes (SOUZA *et al.*, 2006).

As proteínas digeríveis, não tóxicas e economicamente utilizáveis são classificadas como alimentares e podem ser estruturais (queratina, colágeno e elastina, por exemplo), ou apresentar atividade catalítica (enzimas) ou de transporte (transportadores de membrana). O valor nutricional das proteínas alimentares, que também é denominado qualidade da proteína, depende da quantidade e composição de aminoácidos essenciais presentes no alimento e da disponibilidade biológica dos aminoácidos. Em última instância, o principal determinante da disponibilidade biológica dos aminoácidos é a digestibilidade das proteínas. Uma proteína com composição de aminoácidos bastante semelhante às necessidades de aminoácidos da espécie a ser alimentada é descrita como sendo de alto valor nutritivo. Uma proteína deficiente em um ou mais aminoácidos essenciais é considerada de baixo valor nutricional; caso o aminoácido da proteína esteja presente em nível inferior ao necessário, este é denominado aminoácido limitante. Por sua vez, a digestibilidade das proteínas é limitada principalmente pela presença de inibidores de proteases, taninos, lectinas, entre outros fatores anti-nutricionais normalmente presentes em sementes vegetais. Assim, geralmente as proteínas alimentares de origem animal apresentam maior valor biológico do que as de origem vegetal. (TAKAHASHI, 2005).

O requisito protéico na dieta envolve dois componentes: aminoácidos essenciais, que não podem ser sintetizados a partir de outros aminoácidos e que são fundamentais para a construção de proteínas e de diversos compostos com funções metabólicas; e aminoácidos não

essenciais ou nitrogênio em quantidade suficiente para que os aminoácidos não essenciais possam ser sintetizados. A síntese de aminoácidos não essenciais requer gasto de energia e usa esqueletos de carbono provenientes do metabolismo de glicídios e lipídios.

### **3.4.2 Lipídeos**

Nos animais os lipídios constituem a reserva energética fundamental, na forma de gorduras (principalmente triglicerídios). Esses compostos armazenam energia de forma mais concentrada do que carboidratos ou proteínas. Nos vegetais os lipídios normalmente se encontram como óleos ou ceras e a maior parte dos vegetais apresenta pequenas quantidades de lipídios, porém algumas sementes apresentam elevado teor destas substâncias. Estas sementes são denominadas oleaginosas e suas plantas são muito importantes comercialmente (MULLER E TOBIN, 1995).

Além de fornecerem energia, os ácidos graxos da alimentação servem de veículo e de estímulo para a absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K e de substrato para a síntese esteróides como o colesterol. Este por sua vez contribui para a manutenção da fluidez de membranas celulares, na neutralização de substâncias citolíticas e para a síntese de numerosos hormônios (SOUZA, 2008).

### **3.4.3 Glicídios**

Os carboidratos são moléculas compostas de carbono, hidrogênio e oxigênio. O nome carboidrato ou hidrato de carbono se refere ao fato de que a proporção de hidrogênio e oxigênio geralmente se iguala à da água (MULLER E TOBIN, 1995).

Nutricionalmente, os carboidratos podem ser classificados em carboidratos fibrosos (CF) e não fibrosos (CNF). Segundo MERTENS (1996), os CF são representados pela celulose e hemicelulose e são descritos como sendo de lenta e às vezes incompleta degradação no trato gastrointestinal (TGI). Enquanto que os CNF são representados pelos açúcares solúveis, amido e pectina, que são de rápida e completa digestão no TGI, que mediante um complexo sistema metabólico representam a principal fonte de energia para o organismo animal (HENRIQUES *et al.*, 2007).

O amido é a principal reserva de carboidratos dos vegetais e o glicogênio dos animais. As sementes e os órgãos de armazenamento subterrâneos como os tubérculos são provavelmente a fonte de amido mais importante para o homem. O glicogênio é conhecido freqüentemente como amido animal porque constituem o carboidrato armazenado nas células animais. No entanto, em plantas como o arroz também pode ser encontrada pequenas quantidades de glicogênio. (MULLER E TOBIN, 1995).

#### **3.4.4 Ferro**

O corpo humano contém aproximadamente 4,0 g de ferro, dos quais 2,5 g se encontram na hemoglobina, 0,5 g se encontram nos tecidos e aproximadamente 1,0 g se encontra como ferritina (um complexo de ferro e proteína) nos fagócitos do sistema retículo-endotelial, principalmente no da medula óssea, baço e fígado (MULLER E TOBIN, 1995).

O ferro desempenha sua principal função em um processo oxidativo corporal, que inclui a transferência do oxigênio desde a atmosfera até os tecidos via sangue e, seguidamente, dentro dos tecidos a oxidação de substratos por transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio em citocromos (MULLER E TOBIN, 1995).

O ferro se apresenta em uma ampla variedade de alimentos, porém em cada alimento se observa uma grande diferença de concentração. Geralmente, a disponibilidade do ferro é mais importante do que sua quantidade total. Normalmente só uma proporção muito pequena da ordem de 1mg por dia é absorvida a partir de uma ingestão total normal de 14mg. O ferro de procedência animal é melhor absorvido do que o das fontes vegetais. Vários outros fatores também tem uma importante função em relação a proporção de ferro absorvida. Por exemplo, a velocidade de absorção (homeostase) é aumentada quando decresce a concentração de ferro já presente no organismo. Este mecanismo regulatório de absorção de ferro ainda não foi elucidado (MULLER E TOBIN, 1995).

Apenas a forma reduzida do ferro (íon ferroso) é absorvida, sendo favorecida pela presença de agentes redutores, tais como o ácido ascórbico e o aminoácido cisteína. Essa absorção é inibida pela presença de ácido fítico (MULLER E TOBIN, 1995). No caso de suplementação de rações para animais a fonte de ferro mais usada é o  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Apesar da alta biodisponibilidade, esta substância, forma grandes cristais cujas propriedades reológicas não permitem boa distribuição nas rações. Ademais, devido à sua elevada reatividade, este

composto possui grande potencial pró-oxidante e reage com outros componentes da ração, produzindo características organolépticas indesejáveis ou se tornando menos disponível para absorção (COCATO *et al.*, 2008).

Uma dosagem excessiva de ferro nas rações pode prejudicar os animais pela maior formação de cristais, dificultando mais a absorção. Com o enriquecimento das rações de maneira adequada, se possível utilizando o ferro biodisponível intrinsecamente na matéria-prima utilizada para fabricação destas rações, o risco de uma super dosagem e de ter prejuízos causados por ela são praticamente nulos (ROSA, 2010).

### **3.4.5 Uréia**

A uréia destaca-se como fonte de nitrogênio não-protéico que é utilizada como complemento na alimentação de animais, principalmente ruminantes, e é tida como uma importante fonte de nitrogênio para estes animais. Por outro lado, esta substância possui baixa aceitabilidade pelos animais e é segregada quando misturada com outros ingredientes e possui alta toxicidade, que é agravada pela elevada solubilidade no rúmen. Deste modo, é importante salientar que o uso da uréia é limitado, sendo encarado como uma complementação, e não uma prática que vai resolver todos os problemas nutricionais, inclusive de custo.

No caso de ruminantes, estes são capazes de converter nitrogênio não protéico – como no caso da uréia – em proteínas de boa qualidade, ou seja, através de sua flora microbiana ruminal. Já no caso de peixes, a uréia atua como elemento tóxico, já que estes não são capazes de realizar a conversão como os ruminantes e excretam amônia, o que ainda resultaria em gasto de energia para converter uréia em amônia para poder haver a eliminação (TAKAHASHI, 2005).

Quando a administração de uréia na ração de animais é realizada de forma indiscriminada permitindo a ocorrência de intoxicação, os sinais clínicos são decorrentes da alta concentração de gás dióxido de carbono e amônia no organismo do animal devido à ação da enzima uréase.

A presença de uréia naturalmente na ração utilizada para alimentação de animais favorece o enriquecimento nutricional, melhorando o teor de nitrogênio necessário para o desenvolvimento animal e diminui a possibilidade de ocorrência de intoxicação.

### 3.5 Rejeitos agroindustriais e enriquecimento Nutricional

O beneficiamento de vegetais, a extração de óleos de sementes oleaginosas e outros processos resultam na produção de rejeitos denominados rejeitos agroindustriais que necessitam de um destino adequado após serem gerados.

Uma das alternativas de utilização destes rejeitos agroindustriais é o seu uso como matéria-prima para ração animal, sendo utilizado diretamente como ração, sem necessitar de qualquer tratamento ou ainda como substituto parcial de algum componente de rações, necessitando ou não de tratamento anterior a sua utilização (ROSA, 2010).

Uma das maneiras de viabilizar a utilização destes rejeitos é promovendo o enriquecimento nutricional destas matérias-primas, aumentando seu valor protéico e removendo componentes anti-nutricionais e/ou tóxicos que possam estar presentes (GODOY *et al*, 2009).

A adição de enzimas à ração, como meio de promover o enriquecimento, permite um aumento da sua digestibilidade e redução da carga poluente produzida, devido a uma menor excreção de nitrogênio e fósforo pelos animais. As enzimas servem para catalisar a degradação de substâncias com efeitos anti-nutricionais ou para suplementar a capacidade de digestão dos animais, em particular na sua fase inicial de desenvolvimento. Estas enzimas exógenas podem ser derivadas de fontes microbianas, animais e vegetais, sendo que a maioria provém da fermentação de bactérias e fungos (FREIRE *et al.*, 2008).

Enzimas também podem ser empregadas para aumentar a disponibilidade de nutrientes, já que, em princípio, a má digestibilidade das matérias primas é consequência de baixa atividade de enzimas endógenas (enzimas do trato digestivo) (FREIRE *et al.*, 2008). Uma tecnologia empregada também para o enriquecimento nutricional é a Fermentação no Estado Sólido (FES), que pode proporcionar aumento no teor de componentes nutricionais, principalmente proteínas oriundas da proliferação dos microrganismos utilizados no processo fermentativo (ROSA, 2010).

O enriquecimento nutricional de rejeitos agroindustriais pode ser realizado por meio do crescimento microbiano.

Fungos filamentosos e leveduras podem ser cultivados em grande escala e serem utilizados como fonte de proteína para alimentação humana e animal. Estas células microbianas quando secas, são denominadas de Proteínas de Organismo Unicelular (POU).

*Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium cyclopium* e alguns fungos da podridão branca são exemplos de microrganismos utilizados mundialmente como fontes de POU. Estes referidos microrganismos podem ser cultivados em diferentes substratos que, geralmente, são oriundos da indústria processadora de alimentos. Possuem, como características principais, açúcares redutores, materiais fibrosos e diversos nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento (VENDRUSCOLO *et al.*, 2009).

*Aspergillus niger* tem sido utilizado para enriquecimento protéico de vários materiais devido a sua facilidade de crescer em meio sólido e por apresentar teores protéicos adequados para alimentação animal além de ser considerado seguro para o consumo animal (ROSA, 2010).

### **3.6 Fermentação no estado sólido (FES)**

#### **3.6.1 Características da Fermentação no estado sólido**

A Fermentação no estado sólido (FES) consiste na utilização de um meio de cultivo sólido como fonte de nutrientes e suporte para crescimento de micro-organismos. O crescimento microbiano pode se dar tanto na superfície do material sólido quanto por meio de penetração do mesmo. Nesse processo deve haver ausência ou o mínimo possível de água livre, uma quantidade que assegure o crescimento e metabolismo das células, mas que não exceda a capacidade de retenção de água na matriz (RAHARDJO *et al.*, 2006; MITCHELL *et al.*, 2002; AIDOO, *et al.*, 1982).

Nos últimos anos, a FES tem atraído grande atenção por parte dos pesquisadores devido às muitas vantagens apresentadas sobre a tradicional fermentação submersa (FS), sendo utilizado principalmente para produção de enzimas hidrolíticas (GODOY *et al.*, 2009; GUTARRA *et al.*, 2009,2007 e 2005; MAHANTA *et al.*, 2008; VARGAS *et al.*, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2005; MITCHELL *et al.*, 2002), aromas (FERRON, *et al.*, 1996) e corantes (JOHNS E STUART, 1991). Algumas diferenças entre FES e FS estão listadas na Tabela 2:

Tabela 2: principais diferenças entre FES e FS

<b>Fermentação no Estado sólido</b>	<b>Fermentação Submersa</b>
Meio de cultivo sem fase líquida;	Meio de cultivo com fase líquida;
Substratos insolúveis em água;	Substratos solúveis em água;
Água presente apenas o suficiente para o crescimento do microrganismo;	Grande quantidade de água;
A absorção de nutrientes ocorre a partir do substrato sólido umedecido;	Ocorre a absorção de nutrientes dissolvidos no líquido;
Presença de gradientes de calor, nutrientes, produtos de metabolismo e O <sub>2</sub> ;	Calor, nutrientes, produtos de metabolismo e O <sub>2</sub> uniformemente distribuídos;
Maiores concentrações de inóculo;	Menores concentrações de inóculo;

Fonte: (MITCHELL E LONSANE, 1992)

Uma vantagem da FES em relação à Fermentação submersa (FS) é o emprego de meios de cultivo de baixo custo, como resíduos agroindustriais. Em um país como o Brasil, onde são geradas anualmente toneladas de resíduos sólidos da agroindústria, tal característica torna-se ainda mais interessante (GRAMINHA *et al.*, 2008).

Outra importante vantagem da FES sobre a FS se baseia no seu aspecto econômico. CASTILHO *et al.* (2000) realizaram uma análise econômica da produção de lipase por *Penicillium restrictum* tanto por FES quanto por FS. Os autores relataram que o investimento total necessário para a produção de lipase por FS foi 78% maior comparativamente à FES.

Entretanto, o processo de FES apresenta algumas desvantagens (LU *et al.*, 1998; HOLKER E LENZ, 2005) como:

- os tipos de micro-organismos que podem ser usados são limitados, em função das condições do processo, tais como baixa concentração de água livre;
- dificuldade de remoção de calor do sistema que, quando em larga escala, torna-se extremamente necessária;
- o monitoramento de pH, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> é dificultado.

### **3.6.2 Fatores que afetam o crescimento microbiano**

Dentre os fatores importantes para o crescimento microbiano em FES, o tamanho de partículas (granulometria) e níveis de umidade ou atividade de água ( $A_w$ ) são considerados os mais críticos (PANDEY *et al.*, 1999). A disponibilidade de água ao microrganismo pode ser tratada em termos de atividade de água do ambiente, sendo definida como a razão entre a pressão de vapor da água no substrato e a pressão de vapor da água pura. A  $A_w$  representa, portanto, a fração de moléculas de água no sistema que apresenta as propriedades da água pura e é a medida da fração de água que está efetivamente disponível para o microrganismo (MITCHELL *et al.*, 2002).

A umidade a ser utilizada na FES irá depender, principalmente, da capacidade máxima de retenção de água da matriz sólida utilizada. Níveis de umidade maiores ou próximos ao limite de retenção de água do substrato levam a uma compactação do meio, diminuindo sua porosidade e, conseqüentemente, dificultando a transferência de oxigênio pelo mesmo. Por outro lado, níveis de umidade muito baixos causam uma maior dificuldade na solubilização do substrato, tornando-o de difícil acesso para o microrganismo e, desta forma, dificultando o seu crescimento (MAHADIK *et al.*, 2002).

O tamanho das partículas do substrato sólido utilizado torna-se fator de grande importância para a fermentação devido à sua influência no crescimento do microrganismo, já que o diâmetro da partícula pode viabilizar ou impedir o acesso a nutrientes e facilitar ou dificultar as transferências de calor e de massa durante o processo de fermentação. Para garantir que a granulometria utilizada seja a ideal, muitas vezes são realizados testes tanto para medir a capacidade de absorção de água quanto testes de crescimento com o próprio microrganismo a ser utilizado para que se possa estabelecer a melhor condição de cultivo (ROSA, 2010).

### **3.6.3 Micro-organismos utilizados em FES**

Muitas bactérias, leveduras e fungos filamentosos crescem em substratos sólidos, dando origem a diversos produtos de interesse, porém, os fungos filamentosos são os mais adaptados a este sistema (MITCHELL E LONSANE, 1992).

A morfologia dos fungos filamentosos permite que estes consigam absorver melhor os nutrientes dos meios de cultivo, promovendo assim um melhor desenvolvimento destes

micro-organismos. A penetração das hifas permite uma maior acessibilidade aos nutrientes do que no caso dos micro-organismos unicelulares, reduzindo a distância em que os processos de difusão devem ocorrer. Este fato permite que o fungo continue se desenvolvendo mesmo que os nutrientes da superfície tenham acabado como acontece nos estágios finais da fermentação (GUTARRA, 2003).

Além disso, os fungos possuem várias características fisiológicas que favorecem o seu uso em FES (GUTARRA, 2003):

- Os fungos têm a capacidade de crescer em meios com baixa atividade de água ( $A_w$ ) e pH baixo. Em alguns sistemas é possível combinar baixa  $A_w$  e pH baixo, produzindo um ambiente favorável ao crescimento do fungo e seletivo contra muitas leveduras e bactérias, evitando contaminações;
- Muitos fungos crescem, na natureza, em materiais sólidos como madeira e folhas, produzindo enzimas hidrolíticas para degradar as macromoléculas presentes. Na presença de meios de cultivo sólidos da agroindústria, as celulasas e amilases são as enzimas mais produzidas, porém proteases e lipases podem ser produzidas para auxiliar na degradação e penetração;
- A grande maioria dos fungos filamentosos produz esporos. O inóculo de esporos é mais fácil de ser preparado e pode ser estocado por mais tempo do que células vegetativas.

### **3.7 Enzimas hidrolíticas**

#### **3.7.1 Lipases:**

As lipases são glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3) classicamente definidas como enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em triacilgliceróis, liberando digliceróis, monogliceróis, glicerol e ácidos graxos (JAEGER *et al.*, 2002;

SHARMA *et al.*, 2001). Além de catalisarem naturalmente reações de hidrólise, são também capazes de promover reações reversas de síntese, como esterificação, acidólise, alcoólise, interesterificação e aminólise, em ambientes aquo-restritos (JAEGER *et al.*, 2002).

As lipases são amplamente distribuídas na natureza em micro-organismos e eucariotos superiores. Em animais, as lipases obtidas do pâncreas de porco e de seres humanos são as mais conhecidas e investigadas dentre todas as outras lipases. Nesses organismos elas estão envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídeos, incluindo digestão de gorduras, absorção, reconstituição e no metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, as lipases são encontradas nos tecidos de reserva de energia de diversas plantas entre elas algumas oleaginosas como a mamona (*Ricinus communis*) e canola (*Brassica napous*). No entanto, para a produção industrial não só de lipases, como da maioria das enzimas industriais, os micro-organismos são a fonte preferida, uma vez que estes possuem menor tempo de geração, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação genética de sua capacidade produtiva e das condições de cultivo (PANDEY *et al.*, 1999).

Como a diversidade de substratos em que se desenvolvem é grande, os micro-organismos produzem diferentes tipos de lipases, no que tange a especificidade em relação aos substratos e também as faixas ótimas de pH e temperatura. As lipases são produzidas por bactérias, fungos filamentosos e leveduras, permitindo que estes micro-organismos utilizem lipídios de origem animal e vegetal como fonte de carbono e energia para o seu crescimento (FREIRE *et al.*, 2000). As lipases microbianas são, em geral, mais interessantes que lipases de origem vegetal e animal devido à sua natureza extracelular, baixo custo de produção e a estabilidade em solventes orgânicos (PANDEY *et al.* 1999).

O uso destas enzimas permite a modificação das propriedades dos lipídeos, transformando um lipídeo não desejável em um lipídeo de propriedades específicas e de alto valor agregado. Na indústria de alimentos, as lipases podem ser empregadas durante o processo ou posteriormente adicionadas para obtenção de propriedades organolépticas adequadas, tais como sabor, aroma, textura e digestibilidade de diversos produtos (GUTARRA *et al.*, 2003).

Tecnologias como recombinação gênica e engenharia de proteínas propiciaram a obtenção de enzimas com novas características (atividade, estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, seletividade, especificidade) e mais dirigidas a substratos e condições de

interesse industrial, promovendo a expansão da aplicação destas enzimas( BJORKKLING *et al.*,1991; JAEGER E EGGERT, 2002).

### **3.7.2 Tanases:**

Tanino acil hidrolase, conhecida como tanase (E.C.3.1.1.20) é uma enzima que catalisa a hidrólise de ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico (BANERJEE, D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R., 2009). Ela é uma enzima extracelular, induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos, bactérias e leveduras (AGUILAR, C. et al., 1999), que age diretamente na quebra dos taninos, compostos anti- nutricionais que quelam proteínas, contribuindo para o enriquecimento nutricional.

A tanase pode ser obtida a partir de fontes vegetal, animal e microbiana, sendo o meio microbiológico a fonte mais importante de obtenção da mesma, uma vez que as enzimas produzidas desta forma são mais estáveis do que aquelas obtidas por outros meios. Além disso, micro-organismos podem produzir altas quantidades desta enzima de maneira contínua, com consequente aumento de rendimento (BANERJEE et al., 2009).

A principal utilização das tanases é na produção de ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da coloração de vinhos, refrigerantes a base de café, processo de tratamento de couro, detanificação de alimentos e para tratamento de efluentes na indústria de couros (BANERJEE et al., 2009).

### **3.7.3 Fitases:**

Fitase (mio-inositol-hexaquifosfato fosfohidrolase (EC 3.1.3.8)) é uma enzima que catalisa a liberação do fosfato de fitato (mio-inositol hexaquifosfato), o qual é a principal forma de fósforo predominantemente ocorrendo em grãos cereais, legumes e sementes oleaginosas (PANDEY, A, 2001).

Pesquisas mostram que o uso da enzima fitase tem proporcionado acréscimo na digestibilidade do fósforo não disponível na alimentação de animais monogástricos, produzindo um significativo benefício econômico e ambiental. Ambiental porque hidrolisando o fitato e produzindo mais fósforo aproveitável para a digestão, há diminuição nos níveis de fósforo eliminados pelos animais no meio ambiente (BASF, 2001).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os nutrientes utilizados na formulação dos meios de cultura para fermentação no estado sólido e seus respectivos fornecedores encontram-se listados na Tabela 3. Todos os demais reagentes utilizados são de grau analítico.

Tabela 3: Listagem de reagentes utilizados no preparo do meio de cultivo para produção do inóculo da fermentação no estado sólido.

PRODUTO	FORNECEDOR
Amido solúvel	Vetec
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Reagen
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Reagen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Reagen
CaCO <sub>3</sub>	Reagen
Extrato de Levedura	Difco
Óleo de Oliva	Galo
Agar	Vetec

### 4.1 Meio de cultivo para Fermentação no Estado Sólido

A torta da polpa do fruto da macaúba utilizada neste trabalho foi adquirida de uma usina de processamento em Montes Claros-MG. Esta torta foi submetida a um processo de separação granulométrica por peneiras obtendo partículas com diâmetro menor que 0,42mm. O meio de cultivo para os micro-organismos foi apenas a torta da polpa da macaúba, sem suplementação.

### 4.2 Microorganismos

Foram utilizadas cepas de quatro microorganismos: *Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum*, *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus tamarii*. Esses dois últimos fungos foram isolados do fruto da macaúba e classificados pela Genotyping Technology Prospecta. Os outros

dois foram isolados por FREIRE (1996) e pertencem à coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM- IQ/UFRJ).

#### **4.3 Preparo do inóculo**

A obtenção do inóculo para a FES foi realizada por meio da propagação dos esporos das cepas de *Penicillium brevicompactum*, *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus tamarii* a 30°C por 7 dias em meio (M1P) com a seguinte composição (% m/v): sulfato de amônio (0,5%) ,amido solúvel (2,0%); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,025%); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,05%); CaCO<sub>3</sub> (0,5%); extrato de levedura (0,1%); óleo de oliva (1,0%); e ágar (2,5%).

Para o fungo *Aspergillus níger*, a propagação foi feita por 7 dias a 30°C em meio (PDA) com a seguinte composição (% m/v): de ágar batata (PDA) (3,9%); Ágar puro (1,5%); óleo de oliva (1%p/v); de água (volume de interesse para quantidade de meio);

Os esporos foram então raspados, suspensos em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7) e contados em câmara de Neubauer. A concentração de esporos utilizada como inóculo foi a de 10<sup>7</sup> esporos/g de meio sólido (massa seca), comum a todos os fungos (GOMBERT *et al*, 1999).

#### **4.4 Fermentação no estado sólido**

Para o processo fermentativo, foram utilizados reatores do tipo bandeja (53cm<sup>2</sup>), contendo 20g de rejeito com 1cm de altura de leite e umidade inicial 50% . Foram incubados em câmaras com temperatura controlada a 30°C e sob injeção de ar úmido com 95% de saturação, de forma a manter a umidade inicial do meio. Parâmetros como umidade e atividade de água (Aw) e atividades enzimáticas foram medidos ao longo da fermentação.

A fermentação foi conduzida por período de 96 horas com amostragem a cada 24 horas de fermentação.

#### **4.5 Medida de umidade**

A umidade foi analisada diretamente em balança determinadora de umidade, com aproximadamente 0,5g do material fermentado.

#### **4.6 Medida da atividade de água (Aw)**

Amostras de aproximadamente 1,0g de material fermentado foram analisadas em um higrômetro, para a determinação da atividade de água.

#### **4.7 Extração das enzimas para determinação das atividades enzimáticas**

##### *Lipase*

Ao final da fermentação, a obtenção do extrato contendo o pool de enzimas foi feita por adição de 5mL de tampão fosfato de sódio (100mM, pH 7,0) por grama de torta fermentada. A extração foi realizada em frascos agitadores na temperatura de 35°C e 200 rpm por 20 minutos.

Posteriormente, o rejeito foi prensado para obtenção do extrato enzimático bruto e depois centrifugado a 3000rpm por 5 minutos para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem da atividade lipásica.

##### *Tanase*

A obtenção do extrato enzimático foi feita utilizando tampão acetato de sódio 0,2M pH 5,0, sendo 5mL por grama de torta fermentada. A extração enzimática foi realizada em um agitador rotatório a 35°C e 200 rpm por 20 minutos. Posteriormente, o material foi prensado manualmente para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para remoção de sólidos mais finos.

##### *Fitase*

A obtenção do extrato enzimático para determinação da atividade fitasica foi feita em água deionizada, sendo 5mL por grama de torta fermentada. A extração enzimática foi realizada em um agitador rotatório a temperatura ambiente e 120 rpm por 1 hora. Posteriormente, o rejeito fermentado foi prensado manualmente para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado a 2000 rpm por 8 minutos para remoção de sólidos mais finos.

## 4.8 Dosagem das atividades Enzimáticas

### *Lipase*

A atividade lipásica foi determinada por método titulométrico, utilizando óleo de oliva como substrato (5,0% m/v) emulsionado por 3 minutos com goma arábica (5% p/v) em tampão fosfato (100 mM, pH 7,0). O extrato enzimático (1 mL) foi adicionado a 19 mL de emulsão e incubado por 20 minutos a 35°C sob agitação (200 rpm). A reação foi interrompida pela adição de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v), que também promove a extração dos ácidos graxos liberados. Os ácidos graxos livres foram titulados com solução 0,04N de NaOH em titulador automático até um valor final de pH 11,0. Os brancos reacionais foram obtidos adicionando-se o preparado enzimático após a solução acetona-etanol.

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que produz 1µmol de ácido graxo por minuto, nas condições de ensaio (FREIRE *et al.*, 1997). O valor da atividade foi expresso em U por grama de massa seca inicial. (GOMBERT *et al.*, 1999):

$$Atividade(U / mL) = \frac{(Va - Vb) \times M \times 1000 \mu mol}{t \times e} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

Va = volume de soda utilizado na titulação da amostra (mL)

Vb = volume de soda utilizada na titulação do branco (mL)

M = molaridade da soda

t = tempo de reação (min)

e = volume de enzima (mL)

A atividade lipolítica por grama de torta seca (U/g) foi calculada pela Equação 2.

$$Atividade(U / g) = \frac{(U / mL) \times Vt}{m} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

V<sub>t</sub> = volume de tampão utilizado na extração da enzima;

m = massa seca de torta (g)

### ***Tanase***

A solução de substrato foi preparada pela adição de 0,5 % (m/v) de ácido tânico em tampão acetato pH 5,5 - 0,2 M. A reação foi realizada adicionando 0,3 mL da solução de substrato com 0,05 mL de extrato enzimático bruto e incubada a 60°C por 10 minutos. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução de albumina de soro bovino (BSA) preparada na concentração de 1 mg/mL e 0,17 M de cloreto de sódio em tampão acetato pH 5,0 - 0,2 M, e em seguida centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 3 mL de solução SDS-trietanolamina acrescido de 1 mL de solução de FeCl<sub>3</sub>. A absorbância foi medida após 15 minutos em 530 nm (MONDAL *et al*, 2001).

A atividade (U) foi calculada segundo a Equação 3, onde o fator de conversão é obtido a partir de uma curva padrão feita com ácido tânico. Uma unidade de atividade enzimática de tanase (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido tânico por minuto, nas condições de reação.

$$\text{Atividade (U / mL)} = \frac{A \times D \times f}{t \times e} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

A = absorvância da amostra;

D = diluição da solução enzimática;

f = fator de conversão, obtido da curva padrão (mg/mL)

e = volume da solução enzimática utilizada no ensaio (mL).

A atividade tanásica por grama de torta seca (U/g) foi calculada segundo a Equação 2.

### ***Fitase***

Em tubo de ensaio foi adicionado 1 mL de solução de Fitato de sódio (1,5mM) preparado em tampão acetato 0,2M (pH 4,8) e 0,5mL do extrato enzimático. Então essa mistura foi incubada a 60°C durante 10 minutos em banho-maria. Após esse tempo a reação foi paralisada com a adição de 1 mL de ácido tricloroacético 10%. A reação foi avolumada com água destilada para 4 mL e então acrescentado 5mL do Reativo TAUSSKY-SCHOOR

(HARLAND E HARLAND, 1980). A absorvância da solução foi lida a 660nm. O fator de conversão de absorvância foi feito com a ajuda de uma curva padrão de fosfato de potássio (LEÓN *et al.*, 2000).

A atividade (U) foi calculada segundo a Equação 4. Uma unidade de atividade enzimática de fitase (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de fosfato inorgânico por minuto, nas condições de reação.

$$\text{Atividade (U / mL)} = \frac{A \times D \times f}{t \times e} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

A = absorvância da amostra;

D = diluição da solução enzimática;

f = fator de conversão, extraído da curva padrão

e = volume da solução enzimática utilizada no ensaio (mL).

t = tempo de reação (min)

A atividade fitásica por grama de torta seca (U/g) foi calculada segundo a Equação 2.

## 4.9 Análises Nutricionais

### I. Amostragem

As amostras utilizadas para a determinação de componentes nutricionais e anti-nutricionais estão listadas a seguir:

- *Amostra não fermentada*- NF- (amostra controle);
- *Amostra fermentada* (AF)

Os tempos de fermentação a serem utilizados para obtenção de amostras destinadas às análises de nutrientes e fatores anti-nutricionais foram os que proporcionaram maior crescimento microbiano: 48, 72 e 96 horas.

### II. Análise de lipídeos totais

Aproximadamente 5,0 g da amostra moída e seca foram colocadas em sistema de extração soxhlet, sob refluxo de éter de petróleo (P. A. 30 a 60°C), durante 8 horas, sob

aquecimento em banho a 90 °C. Após o tempo de extração o solvente foi evaporado em banho a 40 °C e o teor de lipídeos calculado em g/100g de amostra seca.

### III. Análise de proteína bruta

Cerca de 0,2 g da amostra seca e desengordurada (amostra resultante da extração de lipídios realizada segundo procedimento descrito anteriormente) foi colocada em digestor com ácido sulfúrico concentrado e catalisador de keldahl à temperatura de 370°C durante 7 horas e depois colocado em destilador Kjeldhal. A amostra após a digestão foi destilada e esse destilado recolhido em solução de ácido bórico 2% (m/v). O destilado foi titulado com HCl 0,04 N, até incolor, utilizando uma mistura indicadora: soluções alcoólicas de vermelho de metila 0,1% (m/v) e verde de bromocresol 0,1% (m/v). Sendo o conteúdo de nitrogênio das diferentes proteínas aproximadamente 16%, introduz-se o fator empírico 6,25 para transformar o número de gramas de nitrogênio encontrado em número de gramas de proteína (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). O teor de proteína bruta foi calculado como gramas de proteína bruta/100 g de amostra seca.

### IV. Determinação do teor de cinzas (resíduo mineral fixo)

Carbonizou-se cerca de 1,0g de amostra em placa de aquecimento e a seguir a amostra foi mineralizada em mufla a 550°C. Após resfriamento a amostra foi pesada e o processo repetido até peso constante. O teor de cinzas totais foi calculado em g/100g de amostra seca.

### V. Determinação do teor de glicídios

Cerca de 0,05g de amostra foram digeridas em ácido sulfúrico sob aquecimento durante 30 minutos e, após esse tempo os glicídios foram extraídos com soluções de Carrez I (ferrocianeto de potássio ( $K_4Fe(CN)_6$ ; 15%, m/v) e II (sulfato de zinco, (30%, m/v) e filtrados. Foi adicionado Fenol e ácido sulfúrico concentrado na solução filtrada e determinada a absorbância em espectrofotômetro a 490nm. O teor de glicídios foi calculado em g/100g de amostra seca.

### VI. Determinação do teor de ferro

As cinzas resultantes da análise de resíduo mineral fixo (cinzas de aproximadamente 1,0g de amostra) foram utilizadas para dosagem de ferro segundo metodologia descrita por

AOAC (1984). Foram adicionado 2,5 mL de ácido clorídrico (6N) na amostra e a solução aquecida em temperatura baixa durante 15 minutos. Depois de avolumadas para 25mL, 2mL de alíquota foi retirada do balão e acrescida de 250µL de solução de cloridrato de hidroxilamina (10% m/v). Após a reação, que teve duração de 10 minutos, a amostra foi lida em espectrofotômetro a 520 nm e o teor de ferro calculado em g/100g de amostra seca.

#### VII. Determinação do teor de ácido fítico

Aproximadamente 1,5 g de amostra foram extraídos durante 60 minutos com ácido clorídrico diluído (pH 1,0). Em seguida, após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado, diluído e submetido a cromatografia líquida em resina de troca aniônica, na qual é separada a fração em que está contido o ácido fítico. A uma alíquota de 4,5 mL desta fração foi adicionado 1,5mL do reagente de Wade ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,03% m/v)) e ácido sulfosalicílico (0,3% p/v), que foi deixado reagir durante 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo a amostra foi centrifugada e a absorção do sobrenadante lida em espectrofotômetro. O resultado foi expresso em g/100g de amostra seca.

#### VIII. Análise de substâncias tânicas

As amostras secas e desengorduradas foram analisadas segundo método do butanol-ácido, onde se faz extração com solução de acetona (50%v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram avolumadas com metanol a 25mL, de onde foi retirada uma alíquota de 1mL e adicionado 6mL do reagente butanol-acido (95% v/v de butanol e 5% v/v de ácido clorídrico concentrado) e aquecidas em banho durante 50 minutos a 100 °C. Após esse tempo, foram lidas em espectrofotômetro a 550 nm. O resultado foi expresso em g/100g de amostra seca.

#### IX. Análise do teor de Uréia

As amostras foram analisadas segundo metodologia descrita por AOAC para determinação de teor de uréia, com leitura em espectrofotômetro a 720nm e o resultado expresso em g/100g de amostra seca.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE LIPASE

Todos os fungos utilizados neste trabalho já foram reportados como produtores de diversas enzimas hidrolíticas.

O fungo *A. niger* é reconhecido na literatura como produtor de lipases de interesse tecnológico (ELLAIAH *et al.*, 2004). *A. tamaritii* é descrito como produtor de lipases, xilanases e tanases (SAAD, 1995; KADOWAKI *et al.*, 1997; ENEMUOR *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2008). *Rhizopus oryzae*, já foi descrito como produtor de lipases e amilases (SALLEH *et al.*, 1993; BEER *et al.*, 1996; HIOL *et al.*, 2000; SOCCOL *et al.*, 1995 APUD LI *et al.*, 2011), enquanto o fungo *P.brevicompectum* foi descrito como produtor de lipases (SILVA *et al.*, 2011).

As Tabelas 4, 5, 6 e 7 apresentam os resultados das análises de umidade, atividade de água e atividade lipásica em cada tempo de fermentação, para cada microrganismo utilizado. Os experimentos foram realizados em duplicatas biológicas (duplicata de fermentação) e uma dosagem para cada fermentação.

Tabela 4: Teor de umidade, atividade de água e atividade lipásica da torta de polpa de macaúba fermentada com *A. niger*

Tempo de fermentação	Teor de umidade (%)	Atividade de água (Aw)	Atividade lipásica (U/g)
24hs	53,1	0,971	2,1
48hs	40,9	0,959	6,2
72hs	38,7	0,958	7,8
96 hs	26,70	0,962	1,0

Os maiores valores de atividade lipásica foram encontrados em 48 e 72 horas (6,2 e 7,8 U/g) caindo cerca de oito vezes em 96 horas de fermentação.

A atividade lipásica encontrada para o *A.niger* na torta de macaúba foi ainda inferior ao encontrado em outras tortas já estudadas, como por exemplo, Gergelim (102 U/ g) com 50% de umidade inicial por 48 horas de fermentação (KAMINI *et al.*, 1998) e por FALONY *et al.* (2006) que encontraram uma tividade de 9,14U/g em farelo de trigo suplementado com

sulfato de amônio e uréia, após o processo de otimização.. Estes baixos valores de atividade encontrados podem estar relacionados à diferença de composição química entre as duas tortas ou, ainda, à menor capacidade da linhagem utilizada neste trabalho de produzir lipases por FES.

*Tabela 5: Teor de umidade, atividade de água e atividade lipásica da torta de polpa de macaúba fermentada com A. tamaritii*

<b>Tempo de fermentação</b>	<b>Teor de umidade (%)</b>	<b>Atividade de água (Aw)</b>	<b>Atividade lipásica (U/g)</b>
24hs	51,12	0,978	6,6
48hs	45,35	0,962	9,1
72hs	39,99	0,973	0,2
96 hs	42,87	0,931	3,3

Em 48 horas de fermentação com o fungo *A.tamaritii*, observa-se um máximo de atividade lipásica de 9,1 U/g seguida de uma queda 48 vezes deste valor em 72 horas de fermentação. Após este tempo a atividade volta a subir indicando uma provável produção de outra lipase por este microrganismo.

*Tabela 6: Teor de umidade, atividade de água e atividade lipásica da torta de polpa de macaúba fermentada com P. brevicompactum*

<b>Tempo de fermentação</b>	<b>Teor de umidade (%)</b>	<b>Atividade de água (Aw)</b>	<b>Atividade lipásica (U/g)</b>
24hs	51,75	0,975	0
48hs	46,60	0,992	10,1
72hs	44,34	0,982	26,9
96hs	38,80	0,973	2,4

A maior atividade lipásica (26,9 U/g) foi obtida após 72 horas de fermentação da torta de polpa de macaúba por *P. brevicompactum*, caindo em cerca de onze vezes em até 96 horas de fermentação.

SILVA *et al.* 2011, obtiveram atividades similares a obtida no presente trabalho (31,8 U/g) para o *P.brevicompactum* crescido em torta de babaçu suplementada com 0,6% de óleo de soja e com umidade inicial de 70% após 72 horas de fermentação. Já GOMBERT *et al.* (1999) obtiveram atividade lipásica de 30,3 U/g após 24 horas de fermentação com o fungo *Penicillium restrictum* na torta de babaçu suplementada com 2% de óleo de oliva. Para essa mesma torta de babaçu, em outro trabalho GUTARRA *et al.* (2005) obtiveram uma atividade de 20,2 U/g para o fungo *P.simplicissimum* após 48 horas de fermentação com suplementação de 1% com óleo de oliva.

Tabela 7: Teor de umidade, atividade de água e atividade lipásica da torta de polpa de macaúba fermentada com *Rhizopus oryzae*

<b>Tempo de fermentação</b>	<b>Teor de umidade (%)</b>	<b>Atividade de água (Aw)</b>	<b>Atividade lipásica (U/g)</b>
24hs	48,76	0,974	10,5
48hs	46,41	0,978	11,2
72hs	37,33	0,974	1,6
96 hs	40,53	0,976	2,3

No caso do fungo *R.oryzae*, podemos observar uma antecipação do pico de atividade lipásica para 24- 48 horas caindo cerca de sete vezes em 72 horas de fermentação.

O teor de umidade e a atividade de água do meio de cultivo da FES são fatores importantes para viabilizar o crescimento microbiano e a produção de lipase e o que se pode observar nas Tabelas 5, 6 e 7 é a queda da umidade e/ou atividade de água ao longo da fermentação.

Pode-se observar para todos os fungos testados uma queda da atividade enzimática considerável após 48 ou 72 horas de fermentação. Este decaimento pode estar relacionado à queda no teor de umidade e atividade de água e/ou produção de proteases.

Deste modo pode-se supor que o estresse hídrico a que estes micro-organismos foram submetidos nos maiores tempos de fermentação pode ter promovido a queda brusca da atividade enzimática para todos os fungos testados.

Além disso, para o seu crescimento os micro-organismos necessitam produzir diversas enzimas capazes de degradar e tornar disponíveis os nutrientes presentes no meio de cultivo, dentre elas as proteases (GOMBERT *et al.* 1999; PALMA *et al.* 2000). Alguns autores atribuem o decréscimo da produção de lipase à inativação por proteólise (FREIRE *et al.*, 1997 e GOMBERT *et al.*, 1999), visto que as proteases podem catalisar a hidrólise e consequente degradação das lipases produzidas.

Esse efeito de queda brusca após uma máximo da atividade também foi observado por DILUCCIO *et al.* (2004) com a torta de babaçu suplementada com óleo de oliva, onde ele supõe que esse efeito pode estar relacionado com uma menor produção de proteases ou com o aumento da taxa de produção de lipase pelo fungo na presença do óleo de oliva, sendo compensada pela taxa de degradação de proteases, mantendo a atividade constante. Esse comportamento possivelmente é o mesmo observado para esta torta de macaúba, sendo necessária uma otimização do processo juntamente com a dosagem de proteases para uma melhor conclusão.

## 5.2 ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL

O enriquecimento protéico por meio da fermentação no estado sólido é uma alternativa para agregar valor ao rejeito agroindustrial e torná-lo um subproduto de interesse. As vantagens de se promover a produção de proteína microbiana por FES em rejeitos agroindustriais estão no curto tempo de geração e aumento da biomassa; no fato de que o conteúdo de proteína dos micro-organismos é geralmente maior que o de plantas; e esta fermentação requer pouca quantidade de água e espaço, além da diversidade de substratos que podem ser utilizados.

Além da produção de proteína microbiana, a fermentação no estado sólido pode melhorar ou adequar o conteúdo de outros compostos considerados importantes na utilização de resíduos como ração animal.

Os resultados da análise bromatológica da torta da polpa da macaúba *in natura* realizada pelo Laboratório de Controle Bromatológico (LabCBrom- Departamento de produtos naturais e alimentos da Faculdade de Farmácia/UFRJ) estão ilustrados na Tabela 8.

Tabela 8: composição da torta da polpa da macaúba in natura

Componente	g/ 100g de amostra seca*
	Torta da polpa
Cinzas	2,16
Proteínas	4,29
Extrato Etéreo	5,41
Carboidratos totais	15,17
Fibras Totais	66,77
Hemicelulose	18,18
Celulose	21,14
Lignina	27,44

Os altos teores de lignina, celulose e hemicelulose presente na torta da macaúba dificultam a absorção dos nutrientes, caso os micro-organismos utilizados não sejam produtores de enzimas capazes de catalisar a quebra destas moléculas.

A relação Carbono/Nitrogênio (C:N) da torta da macúba é 41, enquanto que a de outras tortas, como a de babaçu é mais baixa (C:N = 14), indicando a possível necessidade de suplementação da torta de macaúba para promover um melhor crescimento microbiano. Neste trabalho, as fermentações foram feitas na torta de macaúba sem suplementação, e ainda assim foi possível observar um crescimento visível dos micro-organismos, em especial o *A.niger*.

Como em 24 horas de fermentação não havia crescimento microbiano aparente, foram feitas análises de composição nutricional e anti- nutricional nas tortas a partir de 48 horas de fermentação para cada fungo testado. A partir deste tempo foi possível observar visualmente um melhor crescimento microbiano.

Os resultados encontrados da composição nutricional para as tortas fermentadas e controle estão listados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados das análises de composição nutricional das amostras controle (não-fermentada) e fermentadas de torta de babaçu pelos fungos descritos.

Análises nutricionais	Controle	<i>P. brevicompactum</i>			<i>A.niger</i>			<i>Rhizopus oryzae</i>			<i>A.tamarii</i>		
		48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
Umidade (%)		47	44	39	51	37	27	46	37	40,53	45	40	43
Proteína Bruta (% m/m)*	$7,2 \pm 0,3^a$	$6,1 \pm 0,2^a$	$5,6 \pm 0,3^b$	$5,9 \pm 0,06^a$	$7,3 \pm 0,2^a$	$7,5 \pm 0,09^a$	$5,9 \pm 0,03^c$	$5,4 \pm 0,4^{de}$	$5,7 \pm 0,01^d$	$5,9 \pm 0,05^e$	$5,7 \pm 0,01^f$	$5,7 \pm 0,2^g$	$6,4 \pm 0,2^h$
Lipídeos (% m/m)	$7,9 \pm 0,1^a$	$4,9 \pm 0,2^b$	$6,2 \pm 2,1^{abc}$	$5,8 \pm 0,3^c$	$8,3 \pm 0,3^a$	$7,3 \pm 1,5^{ad}$	$6,5 \pm 0,4^d$	$7,2 \pm 0,3^e$	$6,3 \pm 1,4^{aef}$	$5,9 \pm 0,3^f$	$4,9 \pm 1,9^{ag}$	$3,6 \pm 1,1^g$	$4,8 \pm 0,8^g$
Glicídios (%m/m)	$42 \pm 4^a$	$60 \pm 1,2^b$	$51,5 \pm 0,3^c$	$52 \pm 0,3^c$	$19 \pm 1,4^d$	$27 \pm 4,5^d$	$52 \pm 0,01^e$	$66 \pm 0,6^f$	$64 \pm 7^f$	$67 \pm 3,8^f$	$44,2 \pm 7,9^a$	$34 \pm 11^a$	$36,6 \pm 3,2^a$
Uréia (% m/m)	$1,6 \pm 0,2^a$	N.D.	$0,8 \pm 0,03^b$	$1,3 \pm 0,2^a$	$0,4 \pm 0,1^c$	—	—	$1,1 \pm 0,3^{ad}$	$0,1 \pm 0,01^e$	$0,9 \pm 0,02^d$	$4,3 \pm 0,5^f$	$0,3 \pm 0,01^g$	$7,9 \pm 0,3^h$
Cinzas (% m/m)	$4,1 \pm 0,04^a$	$3,7 \pm 0,01^b$	$3,7 \pm 0,08^c$	$3,9 \pm 0,02^d$	$4,5 \pm 0,05^e$	$2,6 \pm 0,1^f$	$3,8 \pm 0,05^g$	$4,4 \pm 0,06^h$	$3,0 \pm 1,2^{ah}$	$4,3 \pm 0,05^h$	$3,9 \pm 0,2^a$	$3,9 \pm 0,3^a$	$4,1 \pm 0,01^a$
Ferro (% m/m)	$0,1 \pm 0,001^a$	$0,1 \pm 0,0005^a$	$0,1 \pm 0,0004^c$	$0,1 \pm 0,001^d$	$0,1 \pm 0,02^{abe}$	$0,1 \pm 0,01^b$	$0,1 \pm 0,0006^e$	$0,1 \pm 0,01^{afg}$	$0,1 \pm 0,01^f$	$0,1 \pm 0,002^g$	$0,2 \pm 0,0006^h$	$0,2 \pm 0,02^i$	$0,2 \pm 0,01^j$

\*(%m/m) = gramas do componente nutricional/ 100gramas de amostra seca. Letras sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os valores. Para letras iguais, valores significativamente iguais ao controle (P< 0,05; teste-t) e/ou entre si.

Pode-se observar para o fungo *A.niger* que não houve diferença significativa no teor de lipídeos entre a torta fermentada em diferentes tempos e a não fermentada. Esse fato pode ser consequência da baixa atividade lipásica (Tabela 4). Deste modo pode-se supor que esteja ocorrendo baixa quebra de moléculas de lipídeos para consumo pelo próprio fungo. Por outro lado, para os outros fungos, em todos os tempos de fermentação houve uma redução significativa na quantidade de lipídeos, o que pode ser explicado pela maior atividade lipásica (Tabelas 5, 6 e 7) encontrada.

Para o *A. niger*, houve uma queda de aproximadamente 55% no teor de glicídeos nas primeiras 48 horas de fermentação, possivelmente ocasionado pelo consumo destes para o crescimento microbiano. Após 48 h ocorreu aumento gradativo nos teores de glicídios que pode ter sido promovido pelo metabolismo do fungo para crescimento celular nessa fase, possivelmente pela hidrólise de polissacarídeos de parede celular da torta. O aumento dos teores de glicídios nesse período de fermentação coincidiu com um maior crescimento celular aparente nas culturas de *A. niger*.

Nos outros fungos ocorreu a queda no teor de glicídeos indicando que os mesmos micro-organismos foram capazes de produzir enzimas hidrolíticas que disponibilizaram estes polímeros para seu crescimento celular. Esta hipótese poderá ser elucidada em experimentos futuros de quantificação destas atividades enzimáticas.

Em relação ao teor de ferro, cabe ressaltar que não houve queda pelas fermentações realizadas.

O teor de uréia apresentou um aumento de aproximadamente 400% em relação à amostra *in natura* após 96 horas de fermentação pelo *A.tamarii*. Para os demais fungos, este teor diminuiu consideravelmente, indicando possivelmente que esta fonte de nitrogênio foi utilizada pelo microrganismo para produção de proteínas. Entretanto, este consumo não se traduziu em um aumento significativo do teor protéico das tortas fermentadas em relação à amostra não fermentada. Este resultado pode ser devido ao crescimento do fungo, que consome as proteínas presentes na torta para se desenvolver. Desta forma, as proteínas geradas pelo crescimento fúngico deve substituir as que foram consumidas pelos mesmos.

### 5.3 PRODUÇÃO DE FITASE E TANASE E COMPOSIÇÃO ANTI- NUTRICIONAL

A Fermentação no Estado Sólido também é responsável pelo enriquecimento nutricional no que diz respeito à diminuição de componentes anti-nutricionais que podem estar presentes na torta, tais como taninos e fitatos. Taninos são considerados inibidores de digestão de proteínas e fibras em humanos e não-ruminantes, agindo no trato digestivo e se ligando a proteínas da dieta e enzimas digestivas (BATTESTIN, 2007); já os fitatos apresentam ação potencialmente quelante de nutrientes como proteínas e minerais (SELLE *et al.*, 2007).

O potencial de redução desses componentes anti-nutricionais está na produção de enzimas capazes de hidrolisá-los, tais como fitases e tanases.

Os resultados das atividades tanásica e fitásica para todos os fungos, após 96 horas de fermentação (já que antes desse período não foi detectada atividade), estão ilustrados na Tabela 10.

Tabela 10: Aividade de tanase e fitase na torta fermentada por cada fungo por 96 horas.

Atividade enzimática	<i>A.niger</i>	<i>R.oryzae</i>	<i>A.tamaritii</i>	<i>P.brevicompectum</i>
Tanase (U/g)	3 ± 0,5	-	-	8 ± 0,01
Fitase (U/g)	0,05 ± 0,001	0,1 ± 0,04	-	0,1 ± 0,001

Em relação à tanase, apenas os fungos *P.brevicompectum* (8 U/g) e *A.niger* (3 U/g) foram capazes de produzi-la. AGUILAR *et al.*(2001) encontraram um máximo de atividade de tanase de 7,8 U/g com o fungo *A.niger* utilizando espuma de poliuretano como suporte para fermentação no estado sólido, em umidade inicial de 65%, suplementando o meio de cultivo com sulfato de amônio.

Para a fitase, as maiores atividades encontradas foram para o *P.brevicompectum* e *R.oryzae* com 0,1 U/g. Essas atividades podem ser consideradas desprezíveis se comparadas com as encontradas por SINGH *et al.*, (2007), que alcançou 348,76 U/g de atividade de fitase após 120 horas de fermentação, com umidade inicial de 70% em torta de gergelim pelo fungo *Sporotrichum thermophile*.

Entretanto, é possível que a otimização do meio de cultura dirigida para diferentes enzimas melhore consideravelmente os resultados obtidos.

Na Tabela 11 encontram-se os resultados da análise de composição de anti-nutrientes da torta controle e das tortas fermentadas pelos fungos descritos.

Tabela 11: Composição anti- nutricional da torta de macaúba: controle (não-fermentada) e fermentada por cada fungo descrito.

Componente anti nutricional	Controle	<i>A.niger</i>			<i>R.oryzae</i>			<i>A.tamaritii</i>			<i>P. brevicompactum</i>		
		48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
SubTânicas (%m/m)*	0,4 ±0,02 <sup>a</sup>	0,2 ±0,03 <sup>b</sup>	0,2 ±0,03 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,0001 <sup>d</sup>	0,6 ±0,01 <sup>e</sup>	0,4 ±0,03 <sup>a</sup>	0,7 ±0,005 <sup>e</sup>	0,5 ±0,03 <sup>f</sup>	1,1 ±0,02 <sup>g</sup>	0,5 ±0,02 <sup>f</sup>	0,3 ±0,01 <sup>g</sup>	0,2±0,01 <sup>h</sup>	0,5± 0,01 <sup>i</sup>
Ác.ftico (%m/m)	8,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	15,0 ±0,1 <sup>b</sup>	8,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,0 ± 1,3 <sup>c</sup>	0,9 ± 0,4 <sup>d</sup>	10,5± 1,4 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>d</sup>	21,5± 0,3 <sup>e</sup>	13,6± 0,7 <sup>e</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>f</sup>	3,1 ± 1,1 <sup>gh</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>g</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>h</sup>

\*(%m/m) = gramas do componente anti-nutricional/ 100 gramas de amostra seca.Letras sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os valores. Para letras iguais, valores significativamente iguais ao controle (P< 0,05; teste-t).

Observou-se aumento de 70% no teor do ácido fítico em 48 horas de fermentação seguido de uma redução de aproximadamente 41% e 87% em 72 e 96 horas de fermentação, respectivamente, para o fungo *A.niger*. O mesmo comportamento pode ser observado para o *A.tamaritii*. Este aumento aparentemente discrepante observado em 48 horas de fermentação pode estar relacionado ao aumento inicial da disponibilidade do ácido fítico proporcionado pelo processo fermentativo que facilita a extração de ácido fítico e sua leitura por nosso método de análise.

AGOSTINI *et al.*(2006) conseguiram uma redução de 92% no teor de fitato no farelo de girassol após incubação por oito horas com uma fitase extraída da semente de girassol germinada, com atividade fitásica de apenas 1,6 U/g.

Em 96 horas de fermentação foi possível observar, para todos os fungos, uma redução considerável nos teores de ácido fítico em relação à amostra controle, possivelmente relacionado à hidrólise seguido de utilização destas substâncias. Entretanto, esta redução parece não estar relacionada à presença de fitases na fermentação pelo fungo *A. tamaritii*.

Os fungos *A. niger* e *P. brevicompactum* foram capazes de diminuir o teor de substâncias tânicas em cerca de duas vezes a partir de 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente. A redução dos taninos na fermentação por esses fungos provavelmente foi promovida pela ação das tanases, cuja atividade foi mais alta nessas culturas. Quanto aos teores de taninos na FES de *R. oryzae* e *A. tamaritii*, seu aumento a partir de 48 h de fermentação deve estar relacionado com um aumento na capacidade de extração dos taninos, proporcionado pelo processo fermentativo que facilita sua análise.

Segundo PINTO *et al.* (2004), teores de substancias tânicas acima de 0,46% (% p/p) são prejudiciais para mamíferos pois aumentam a excreção de Nitrogênio, que é indicativo de uma menor absorção e aproveitamento de proteínas. Teores a partir de 0,23% já prejudicam a digestibilidade de lipídios. A torta da macaúba não fermentada possui um teor de 0,4% de substâncias tânicas não sendo considerada, então, prejudicial no que diz respeito à absorção de proteína. Porém, este teor prejudica seu aproveitamento energético, justificando a fermentação afim de reduzir teores de taninos.

## 6. CONCLUSÕES

As melhores atividades lipásicas obtidas por FES da torta da macaúba sem suplementação foram: 26 U/g - *P.brevicompectum*; 11U/g - *R. oryzae*; 9,1U/g - *A.tamaritii* e 8U/g - *A.niger*.

Em relação ao teor de glicídeos, Um aumento de 42% e 57% foi verificado nas fermentações com os fungos *R. oryzae* (48 horas) e *P.brevicompectum* (96horas) respectivamente.

Quanto ao teor de ferro, o mais importante é que não houve uma redução com a fermentações realizadas.

Em relação ao enriquecimento protéico, as proteínas geradas pelo crescimento fúngico possivelmente substituíram as que foram consumidas pelos mesmos, desta forma, para todos os fungos descritos não houve aumento nos teores de proteína bruta.

Uma redução de substâncias tânicas (50%) foi obtida na fermentação por *P.brevicompectum* em 72 horas e *A.niger* a partir de 48 horas de fermentação.

Em 48 horas de fermentação houve uma redução de 89% no teor de ácido fítico pelos fungos *P.brevicompectum* e *R.oryzae* e de 87% pelo *A.niger*. Em 96 horas, uma redução de 93% pelo *A.tamaritii* e 73% pelo *P.brevicompectum*.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Aumento na produção de enzimas e/ou enriquecimento nutricional por meio de otimização das condições de fermentação.
- Avaliação do crescimento fúngico por metodologias específicas para FES.
- Avaliação da atividade de outras hidrolases como celulase e xilanasas.
- Avaliar o efeito de outras fontes de nitrogênio de menor custo como suplementação na torta de macaúba para promover, após a FES, um enriquecimento protéico mais efetivo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC- ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. *OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS*, 14 ED., P.249. 1984

AGRONEGÓCIO, Biodiesel: Minas busca modelo para explorar óleo de macaúba. 2008.

AGUILAR, C. et al. A Comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.42, n.3, p.355-361. 1999.

AGUILAR, C. et al. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid- state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology & Biotec*, 26, 296- 302. 2001.

AIDOO, K.E; HENDRY, R.; WOOD, J.B. Solid substrate fermentation. *adv appl Microbiol*, 28: 201-37. 1982.

BANERJEE, D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF9. *J. Basic Microbiol.* v.41, n.6, p.313-318. 2009.

BASF. Disponível em:

<<http://www.basf.com/business/consumer/animalnutrition/html/pr981001.html>>

acessado em janeiro de 2001 por Andreia Regina Zacarias Silva na dissertação titulada por: Desenvolvimento de bioprocesso para produção de fitase por *Aspergillus Niger* em fermentação no estado sólido utilizando subprodutos agrícolas para aplicação como aditivo na alimentação de aves e suínos. 2002.

BATTESTIN V.; Produção, purificação, caracterização e aplicação da Tanase de *Paecilomyces variotii*. *Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, SP.* 2007.

BJORKLING, F; GODTFEDSEN, S.E; KIRK, O.; The future impact of industrial

- lipases. *Trends Biotechnol*, 9: 360-363. 1991.
- BRAND, D., PANEY, A., ROUSSOS, S., SOCCOL, C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme Microb Technol*, 26, p. 127-133. 2000.
- BRAZACA, S.G.C. Antinutricionais em alimentos. In OETTERER, M. (coord). Palestras apresentadas na disciplina de Processamento e Qualidade nutricional dos alimentos. ESALQ/USP, 20p. 2007.
- CASTILHO LR, POLATO CMS, BARUQUE EA, SANT'ANNA JR GL, FREIRE DMG. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem Eng J*, 4, p.239-47. 2000.
- CAVALCANTI, E.D.C.; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANNA JR, G.L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed reactors. *Braz Arch Biol Technol*, 48: 79-84. 2005.
- CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, V.13, N.4, P.297-335. 1980.
- COCATO, Maria Lúcia et al. Biodisponibilidade de ferro em diferentes compostos para leitões desmamados aos 21 dias de idade. *R. Bras. Zootec.* [online], vol.37, n.12, pp. 2129-2135. ISSN 1806-9290.2008
- DI LUCCIO, M., CAPRA, F., RIBEIRO, N.P., VARGAS, G.D., FREIRE, D.M.G., OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Appl Biochem Biotech*, 113-116:173-80. 2004.
- FALONY, G.; ARMAS, J.C.; MENDOZA, J.C.D.; HERNANDEZ, J.L.M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid- state fermentation. *Food Technol Biotechnol*, 44: 235- 40. 2004.

FERRON, G.; BONNARAME, P.; DURAND, A. Prospects of microbial production of food flavours. *Trends Food Sci tech*, 7: 285- 293. 1996.

FRAIZER, R. A.; DEAVILLE, E. R.; GREEN, R. J.; STRINGANO, E.; WILLOUGHBY, I.; PLANT, J.; MUELLER-HARVY, I.; Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, p.490–495, 2010.

FREIRE, D.M.G. Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. *Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química. Rio de Janeiro, Brasil, 174pp, 1996.*

FREIRE, D.M.G.; TELES, E.M.F.; BOM, E.P.S.; SANT´ANNA, G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation and aeration. *Appl Biochem Biotechnol*, 64: 409-421. 1997.

FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. Lipases em Biocatálise. In: Elba Pinto da Silva BON; Maria Antonieta Ferrara; Maria Luisa Corvo. (Org.). *Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado*. 1 ed. Rio de Janeiro, Editora Interciência, 1, p. 369-385, 2008.

GODOY, M.G. Produção de Lipases fúngicas a partir de rejeitos da produção de biodiesel. Monografia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. Rio de Janeiro, Brasil, 64pp. 2006.

GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E.; MACIEL, F.M.; FELIX, S.P.; BEVILAQUA, J.V.; MACHADO, O.L.T.; FREIRE, D.M.G. Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. *Enzyme Microb Technol*. Article in press. 2009.

GODOY, MATEUS G.; GUTARRA, MELISSA L. E.; CASTRO, ALINE M.; MACHADO, OLGA L. T.; FREIRE, DENISE M. G. Adding value to a toxic residue

from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:945–953. 2011.

GOMBERT, A. K.; LOPES, A. P.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D. M. G. Lipase, amylase and protease production by *Penicillium restrictum* in a solid-state fermentation using babassu oil cake. *Process Biochem*, 35 (1-2):85-90. 1999.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. *Anim Feed Sci Technol*, 144: 1-22. 2008.

GUTARRA M. L. E. Produção de lipase por fermentação no estado sólido: seleção de fungos produtores e estudo das condições de cultivo. *Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro*. 2003.

GUTARRA, M.L.E.; CAVALCANTI, E.D.C.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANNA JR, G.L. Lipase production by solid state fermentation: cultivation conditions and operation of a packed-bed bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol*, 121: 105-116. 2005.

GUTARRA, M.L.E.; GODOY, M.G.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G.. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid state fermentation using a residue of the babssu oil industry. *J Chem technol Biotechnol*, 82: 312-318. 2007.

GUTARRA, M.L.E.; GODOY, M.G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.. Production of an acid and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid state fermentation. *Bioresour Technol*, Article in press. 2009.

HARLAND, B. F.; HARLAND, J.. Fermentative reduction of phytic acid in rye, white and whole wheate bead. *Cereal Chemistry* 57: 226-229. 1980.

- HENRIQUES, L. T. et al. Frações de Carboidratos de quatro gramíneas tropicais em diferentes idades de corte e doses de adubação nitrogenada. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.59 no.3 Belo Horizonte, Junho 2007.
- HOLKER, U., LENZ J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? Curr Opin Microbiol, 8, p. 301-306, 2005.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos – 4ª Edição. São Paulo, 2008.
- JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol, 13; p.396 - 403; 2002.
- JOHNS, M.R.; STUART, D.M. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. J Ind Microbiol, 8: 23-28. 1991.
- KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHMAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid- state fermentation using oil cake. Process Biochemistry vol.33 n.5, 505- 511. 1998
- KUMAR, RAKESH; SHARMA, JITENDER; SINGH, RANDHIR. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. Microbiological Research 162, p.384—390, 2006.
- LAGEMAAT, J. V.; PYLE. D. L. Slid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. Chemical Engineers Journal, [S.l.], v. 84, p. 15-123, 2001.
- LEHHRFELD, J.; MORRIS, E.R. Overstimulation of phytic acid in foods by the AOAC anion-exchange method. *J. Agric. Food Chem.*, v. 40, p. 2208-2210. 1992.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.; COX, M.M., Princípios de bioquímica. São Paulo:

*Sarvier*. 1992.

LEÓN, J.A.R. Determinação da atividade enzimática. *Mensagem recebida por:* <rodleon@icidca.edu.cu> em 13/07/2000.

LU, M.Y.; MADDOX, I.S.; BROOKS, J.D. Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid state fermentation systems: a review. *Process Biochem*, 33: 117-123. 1998.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus Niger* in solid state fermentation. *Process Biochem*, 38: 715-721. 2002.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHAPE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour Technol*, 99: 1729-1735. 2008.

MATOS, ANTONIO TEIXEIRA. Tratamento de resíduos agroindustriais. Departamento de Engenharia Agrícola e Ambiental; Universidade de Viçosa, MG, 2005.

MERTENS, D.R. Using fiber and carbohydrate analyses to formulate dairy rations. In: informational conference with dairy and forages industries. *Wisconsin. Proceedings...* Wisconsin, 1996. p.81-92. 1996

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnol Ann Rev*, 8: 183-225. 2002.

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K. Definition, characteristic and potencial. In: Doelle, H.; Mitchell, D.A.; Rols, C.A. *Solid substrate cultivation*. Elsevier Applied Science, 1-16. 1992.

- MONDAL, K.C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B.R. Colorimetric assay method for determination of the Tannin Acyl Hidrolase (EC 3.1.1.20) activity. *Analytical Biochemistry*, 295, p. 168-171, 2001.
- MULLER H. G. E TOBIN G. *Nutricion y Ciencia de los Alimentos*. Editorial Acribia, S. A.; I.S.B.N.:84-200-0585-1.1995.
- OH, B.C.; CHANG, B.S.; PARK, K.H. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry*, 40, 9669-9676. 2001.
- O'TOOLE, D.K. Characteristic and Use of Okara, The Soybean Residue from Soy Milk Production- A Review, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.47, p.363-371, 1999.
- ONYANGO E. M.; ADEOLA, O. Dietary phytate (inositol hexaphosphate) regulates the activity of intestinal mucosa phytase. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93 (2009) 639–646, 2008.
- PALMA, M.B.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITZ, S.C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl Biochem Biotech*, 84: 1137- 1145. 2000.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; KRIEGER, N.; FONTANA, J. D. Recent developments in microbial inulinases – its production, properties and industrial applicat. *Appl Biochem Biotechnol*, 81:35-53. 1999.
- PANDEY, A., SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LÉON, J.A.; SOCCOL, V.T. Production purification and properties of microbial phytases. *Bioresource technology*. v.77, p.203 – 214, 2001.
- PELIZER, L. H.; PONTIERI, H.M.; MORAES, O.I. Utilização de resíduos

- agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Manag. Innov.* Volume 2, Issue 1. 2007.
- PINTO, L.G.Q.; PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; MARGARIDA, M. B.; FURUYA, W. M. Efeito do tanino na digestibilidade dos nutrientes da ração pela tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticu*. Maringá. V. 26, nº 2, p. 181-186. 2004.
- RABOY, V.; NOAMAN, M.M.; TAUHOR, G.A; PICKETT, S.G. Grain phytic acid and protein are highly correlated in winter wheat. *Crop Science*, v.31, p.631-635, 1991.
- RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J. RINZEMA,A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol Adv*, 24: 161-179. 2006.
- REDDY, N.R.; PIERSON, M.D.; SATHE, S.K.; SALUNKLE,D.K. phytases in cereals and legumes. C R C Press., 159p, 1989.
- REDDY GV, BABU PR, KOMARAIHAH P, ROY KRRM, KOTHARI IL. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem* 38:1457–1462. 2003.
- ROSA, TAÍS DA S. Produção de lipase e enriquecimento proteico de resíduo de pinhão manso (*jatropha curcas*) por fermentação no estado sólido do fungo *Aspergillus Níger*. Dissertação de mestrado. Instituto de Química, UFRJ. 2010.
- SELLE H. P.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 135 (2007) 1–41, 2007.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U.C. Production, purification,

characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*, 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, MARCELI FERNANDES; FREIRE, DENISE MARIA GUIMARÃES; CASTRO, ALINE MACHADO; LUCCIO, MARCO Di; MAZUTTI, MARCIO A.; OLIVEIRA, J.VLADIMIR; TREICHE, HELEN; OLIVEIRA, DÉBORA.

Concentration, Partial Characterization and Immobilization of Lipase Extract from *P.brevicompactum* by Solid-State Fermentation of Babassu Cake and Castor Bean Cake. *Appl Biochem Biotechnol* 164:755–766. 2011.

SOUZA G. B. Avaliação e aplicação de métodos de análise para o fracionamento do nitrogênio em amostras de alimentos para animais. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Embrapa, São Carlos, SP. 2006.

SOUZA A. D. V.. Estudo de nutrientes funcionais nos resíduos de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) e pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) gerados após extração lipídica. Universidade Católica Dom Bosco. Campo Grande, MS. 2008.

SZPIZ, R.R.; LAGO, R.C.A.; JABLONKA, F.H.; PEREIRA, D.A. Oleos de macauba: uma alternativa para a oleoquímica. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1989. p.1-10 (EMBRAPA-CTAA. Comunicado técnico, 14).

TAKAHASHI N. S.. Nutrição de peixes. *Instituto de Pesca, SP, Brasil*. 2005.

VARGAS, G.D.L.P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S.C.; FREIRE, D.M.G.; DiLUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *J Chem Technol Biotechnol*, 83: 47-54. 2008.

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO,C.S.; ESPOSITO, E.; NINOW, J.L.. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. *Rev. bras. eng. agríc. ambient.* [online], vol.13, n.4, pp. 487-493. ISSN 1807-1929. 2009.

