

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

MARIANNY SILVA CANEDO

**ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO BAGAÇO DE MALTE
POR *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 E ADIÇÃO EM DIETAS
DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Goiânia
2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Marianny Silva Canedo		
E-mail:	mariannycanedo@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Bolsista		
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO CNPJ: 00889834/0001-08
Título:	Enriquecimento proteico do bagaço de malte por <i>Rhizopus oligosporus</i> CCT 4134 e adição em dietas de juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)		
Palavras-chave:	Fermentação em estado sólido, bagaço de malte fermentado, resíduos agroindustriais, bioconversão, alimentação de peixes.		
Título em outra língua:	Protein enrichment of brewery spent grain from <i>Rhizopus oligosporus</i> CCT 4134 and addition in diets for juvenile Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)		
Palavras-chave em outra língua:	Solid state fermentation, fermented brewery spent grain, agro-industrial residues; bioconversion, fish feeding.		
Área de concentração:	Ciência e Tecnologia de Alimentos		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/09/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Ciência e Tecnologia de Alimentos		
Orientador (a):	Flávio Alves da Silva		
E-mail:	flaviocamp@gmail.com		
Co-orientador (a):*	Franciello Vendruscolo / Fernanda Gomes de Paula		
E-mail:	franciello@hotmail.com / ferdepaulazootec@yahoo.com.br		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 18 / 12 / 2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

MARIANNY SILVA CANEDO

**ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO BAGAÇO DE MALTE
POR *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 E ADIÇÃO EM DIETAS
DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, como exigência para a obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Alves da Silva

Co-orientadores: Prof. Dr. Franciello Vendruscolo e
Profa. Dra. Fernanda Gomes de Paula

Goiânia
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Canedo, Marianny Silva

Enriquecimento proteico do bagaço de malte por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 e adição em dietas de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). [manuscrito] / Marianny Silva Canedo. - 2015. 82 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Alves da Silva; co-orientador Dr. Francielo Vendruscolo; co-orientador Dr. Fernanda Gomes de Paula. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Goiânia, 2015. Bibliografia.

1. Fermentação em estado sólido. 2. Bagaço de malte fermentado. 3. Resíduos agroindustriais. 4. Bioconversão. 5. Alimentação de peixes. I. Silva, Flávio Alves da, orient. II. Vendruscolo, Francielo, co-orient. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MARIANNY SILVA CANEDO

ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO BAGAÇO DE MALTE POR *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 E ADIÇÃO EM DIETAS DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 29 de setembro de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Tatianne", written above a horizontal line.

Profa. Dra. Tatianne Ferreira de Oliveira
Membro – EA/UFG

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Inti D. Cavalcanti", written above a horizontal line.

Profa. Dra. Inti Doraci Cavalcanti Montano
Membro – IQ/UFG

A large, stylized handwritten signature in black ink, appearing to read "Flávio", written above a horizontal line.

Prof. Dr. Flávio Alves da Silva
Presidente – EA/UFG

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter guiado meus passos todos os dias, pela força e sabedoria para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Ana Maria e Francisco, por estarem sempre ao meu lado, apoiando todas as minhas decisões e me acompanhando em cada uma delas, pelo exemplo de luta e fé.

À minha família pelo amparo e preocupação comigo em cada momento, em especial minhas primas Fernanda, Júlia e Tathiane por me acompanharem aos finais de semana.

Aos meus orientadores, Flávio Alves da Silva, Franciolo Vendruscolo e Fernanda Gomes de Paula, pelos ensinamentos, orientação e confiança na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pós-graduação, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À empresa Reall Chopp pela doação do bagaço de malte.

À professora Fabyola Barros Carvalho pela doação do material necessário para elaboração e preparo das dietas dos peixes.

Aos alunos de graduação Isabella Ventura e Matheus Castro pela disponibilidade em ajudar nos experimentos.

Aos meus colegas de mestrado, em especial à Midiana Gusmão, Letícia Freire e Welker Denner, pela ajuda, amizade e momentos de alegria.

Aos técnicos do Setor de Engenharia de Alimentos por toda ajuda e esclarecimentos.

Aos funcionários e estagiários do Setor de Piscicultura, em especial à Tatiane, pelos momentos alegres, amizade e cuidado com os peixes na minha ausência.

Aos alunos de pós-graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, Moisés Sena e Fabrício Sado, pela atenção, ensinamentos e auxílio no experimento.

Às minhas vizinhas e amigas Caroline Miranda e Ester Priscila, por me acompanharem no trajeto para a faculdade e me ajudarem a finalizar o experimento.

À professora Cristiéle da Silva Ribeiro, pela recepção em sua casa, atenção e ensinamentos para realização das análises na Universidade Estadual Paulista.

Ao técnico do Laboratório Multiusuário da Pós-graduação – EVZ/UFG, Helton Freires Oliveira, pela realização das análises sanguíneas dos peixes.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas que, de certa forma, contribuíram na realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A maioria dos subprodutos agroindustriais é rica em fibras com baixa digestibilidade, e o processo de bioconversão para produção de proteína microbiana, pode ser uma alternativa prática e promissora para aumentar o teor proteico, o valor nutritivo do substrato e a qualidade da alimentação, transformando estas fibras em componentes digestíveis para alimentação de animais não ruminantes. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo o enriquecimento proteico do bagaço de malte por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 via fermentação em estado sólido e adição em dietas de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Na fermentação em estado sólido foram realizados experimentos visando determinar o maior aumento proteico, estudando as variáveis umidade inicial (50, 60 e 70%) e suplementação de fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, ureia e nitrato de sódio). Para estudar a adição do bagaço de malte fermentado em dietas de tilápia do Nilo, foram utilizados 120 juvenis, distribuídos em 24 caixas que representa os seis níveis de adição (0, 2, 4, 6, 8 e 10%) do bagaço de malte fermentado e quatro repetições de cada tratamento. Os peixes foram alimentados por 67 dias compreendidos entre os meses de maio a agosto de 2015, período que a temperatura da água estava abaixo do conforto térmico da espécie. A fermentação em estado sólido proporcionou enriquecimento proteico do bagaço de malte em aproximadamente 2 e 4 vezes no conteúdo de proteína bruta e proteína solúvel, respectivamente, sendo considerada uma alternativa para aproveitamento dos subprodutos industriais na substituição de ingredientes tradicionais em dietas de tilápia do Nilo, pois com a adição do bagaço de malte fermentado não observou diferença significativa nos parâmetros de desempenho produtivo e parâmetros hematológicos e bioquímicos dos juvenis de tilápia do Nilo. Com isso, a fermentação do bagaço de malte é uma boa alternativa para seu aproveitamento como substrato para o cultivo de *Rhizopus oligosporus* e produção de proteína microbiana, permitindo sua utilização como suplemento proteico em dietas para juvenis de tilápia do Nilo, com adição de até 10%, sem comprometer o desempenho produtivo e parâmetros hematológicos da espécie.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido, bagaço de malte fermentado, resíduos agroindustriais, bioconversão, alimentação de peixes.

PROTEIN ENRICHMENT OF BREWERY SPENT GRAIN FROM *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 AND ADDITION IN DIETS FOR JUVENILE NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT

The majority of agroindustrial by-products are rich in low digestible fiber, and the bioconversion process for the production of microbial protein can be a practical and promising alternative to increase the protein content and nutritional value of substrate and food quality, turning these fibers into digestible components for the feeding of non-ruminant animals. Thus, this paper was aimed at protein enrichment of brewery spent grain by *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 by solid state fermentation to be added in diets of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Solid state fermentation experiments were performed in order to determine the highest protein increment studying variables initial moisture (50, 60 and 70%) and supplemental nitrogen sources (ammonium sulfate, urea and sodium nitrate). To study the addition of fermented brewery spent grain in diets of Nile tilapia, 120 juveniles were used, divided into 24 boxes representing the six levels of addition (0, 2, 4, 6, 8 and 10%) of fermented brewery spent grain and four replications of each treatment. Fish were fed for 67 days between May and August 2015, the period where the water temperature was below the thermal comfort for the species. Solid state fermentation provided protein enrichment of brewery spent grain in about 2 and 4 times the content of crude and soluble protein, respectively, and is considered an alternative to use of industrial by-products to replace traditional ingredients in diets of juvenile Nile tilapia, because with the addition of fermented brewery spent grain, no significant difference in productive performance, hematological and biochemical parameters of juveniles Nile tilapia was found. Thus, the fermentation of brewery spent grain is a good alternative to be used as substrate for the cultivation of *Rhizopus oligosporus* and microbial protein production, allowing its use as a protein supplement in diets for juvenile Nile tilapia, with addition of up to 10 % without compromising growth performance and hematological parameters of the species.

Keywords: solid state fermentation, fermented brewery spent grain, agro-industrial residues; bioconversion, fish feeding.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	8
1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Subprodutos agroindustriais	9
2.2 Bagaço de malte	10
2.3 Fermentação em estado sólido	11
2.4 Enriquecimento proteico	13
2.5 Alimentação animal	15
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2	23
ARTIGO 1: ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO BAGAÇO DE MALTE POR <i>Rizhopus oligosporus</i> VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	23
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Preparo do bagaço de malte	27
2.1.1 Determinações analíticas.....	28
2.2 Micro-organismo	30
2.3 Fermentação em estado sólido	30
2.3.1 Determinações analíticas.....	31
2.4 Planejamento experimental	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 3	51
ARTIGO 2: ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO BAGAÇO DE MALTE POR <i>Rhizopus oligosporus</i> CCT 4134 E ADIÇÃO EM DIETAS DE TILÁPIA DO NILO	51
RESUMO	51
ABSTRACT	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Preparo do bagaço de malte	55
2.2 Fermentação em estado sólido	56
2.3 Preparo das dietas	56
2.4 Testes biológicos	57
2.4.1 Parâmetros biométricos.....	59
2.4.2 Análises sanguíneas	59
2.4.3 Análise do fígado e filé	60
2.4.4 Qualidade da água.....	61
2.5 Determinações analíticas	61
2.5.1 Composição proximal	61
2.5.2 Minerais.....	62
2.6 Análise estatística	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos produzem vários tipos de subprodutos que podem ser aproveitados, estes necessitam de destino adequado, e vários estudos têm sido realizados para minimizar o impacto ambiental causado pelas indústrias na região em que estão situadas e ainda agregando valor aos produtos do mercado (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007). Atualmente, parte desses materiais não possui aplicação específica, o que gera problemas ambientais de contaminação provenientes de práticas como descarte no meio ambiente, em lixões ou aterros sanitários e queimadas a céu aberto (AFONSO, 2012).

Como alternativa para a diminuição da poluição por subprodutos agroindustriais, incentiva-se a reciclagem e a compostagem, ou sua utilização como ração animal, além de serem usados como fonte de carbono e/ou nutriente nos processos de fermentação em estado sólido para a produção de compostos com valor agregado (MUSSATTO et al., 2012). Pois mesmo apresentando boa qualidade proteica e energética, alguns subprodutos precisam ser melhorados quanto a sua digestibilidade, presença de fatores antinutricionais e componentes tóxicos, para posterior utilização em alimentação animal (ROSA, 2010).

A fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais é utilizada para estudar a degradação de resíduos lignocelulósicos e amiláceos provenientes da agroindústria, e tem gerado vários produtos, dentre eles a proteína unicelular ou *single cell protein* (SCP) (ARAÚJO et al., 2011). A utilização de SCP para alimentação animal pode ser considerada uma via de produção de alimentos alternativos, pois sua obtenção é independente das restrições sazonais e variações climáticas que existem nas regiões das agroindústrias, e a seleção dos micro-organismos podem ser baseadas no valor nutricional e no conteúdo proteico (ARAÚJO et al., 2009; SILVEIRA; FURLONG, 2007).

A alimentação dos peixes é um dos aspectos de maior importância na aquicultura, pois apresenta relação direta com o desempenho, saúde e custos de produção. Com o objetivo de avaliar a utilização de alimentos alternativos na substituição de ingredientes tradicionais na ração, foi realizada a fermentação em estado sólido do bagaço de malte, aumentando seu teor proteico, e sua posterior adição em dietas de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Subprodutos agroindustriais

Os subprodutos compostos por materiais lignocelulósicos são os mais abundantes no mundo, apresentando potencial biotecnológico para a obtenção de produtos de interesse industrial como bioetanol, glicose, proteínas, enzimas, compostos aromáticos, pigmentos, entre outros. Esses subprodutos são fontes de carboidratos e sua bioconversão tem recebido grande atenção nos últimos anos, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais (SANTOS et al., 2011).

Diversos subprodutos agroindustriais, como bagaço de cana de açúcar, resíduos de abacaxi (SUHET; FIOREZE, 2011), bagaço de maçã (VENDRUSCOLO et al., 2009), e bagaço do pedúnculo de caju (CAMPOS et al., 2005), têm sido usados como substratos para a produção de *single cell protein* e enriquecimento proteico, devido à disponibilidade local e por representarem uma fonte alternativa de baixo valor comercial.

O aproveitamento desses resíduos lignocelulósicos oriundos da produção agrícola para produção de proteína microbiana na forma de biomassa fúngica parece ser uma alternativa prática e promissora para aumentar o teor proteico e o valor nutritivo do substrato, agregando valores aos rejeitos agroindustriais. Nos processos de bioconversão, os componentes principais dos resíduos lignocelulósicos, a celulose, a lignina e a hemicelulose, são utilizados pelos fungos como fonte de carbono e energia (OLIVEIRA et al., 2007; SILVEIRA; FURLONG, 2007; VILLAS-BÔAS; ESPOSITO; MITCHELL, 2002).

No Brasil, há leis, normativas e resoluções que abordam a questão dos resíduos sólidos, sua classificação e limites de parâmetros para sua utilização. A NBR 10004/2004 dispõe sobre a classificação dos resíduos sólidos quanto aos seus riscos potenciais ao meio ambiente e à saúde pública, para que possam ser gerenciados adequadamente. E a Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, dispõe sobre seus princípios, objetivos e instrumentos, bem como sobre as diretrizes relativas à gestão integrada e ao gerenciamento de resíduos sólidos, incluídos os perigosos, às responsabilidades dos geradores e do poder público e aos instrumentos econômicos aplicáveis. O bagaço de malte é classificado como resíduos sólido de classe II A, não perigosos e não inerte, sendo destinado a ração animal (ABNT, 2004; BRASIL, 2010).

A indústria cervejeira gera quantidades relativamente grandes de subprodutos e resíduos, dentre eles o bagaço de malte. Estima-se que 20 kg de bagaço são obtidos a cada 100 litros de cerveja produzida. Investigações com o objetivo de melhorar o teor proteico do bagaço de malte usando o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, que foi isolado a partir dos mesmos (OGUNJOBI; MEJEHA; FAGADE, 2011); e seu uso como ingrediente do substrato para cultivo do corpo de frutificação de *Pleurotus ostreatus* e produção da enzima (GREGORI et al., 2008), já foram realizadas. O bagaço de malte obteve aumento de 1,5 vezes no teor de proteína bruta; e foi considerado como substrato adequado para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* e produção das enzimas manganês peroxidase e lacase, quando utilizado uma mistura de 10% de bagaço de malte e 20% de farelo de trigo.

2.2 Bagaço de malte

A cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo, onde é permitida a substituição do malte de cevada por outros cereais malteados ou não, como o arroz, o trigo e o milho (BRASIL, 2009). O malte utilizado em cervejaria é obtido usualmente a partir de cevadas de variedades selecionadas especificamente para esta finalidade. A cevada é uma gramínea do gênero *Hordeum* e sua cultura é efetuada em climas temperados sendo cultivada na América do Sul, principalmente em algumas partes do Rio Grande do Sul e na Argentina (CARVALHO et al., 2009).

O Brasil é o terceiro produtor mundial de cerveja, com produção de 13,5 bilhões de litros, superado apenas pela China e Estados Unidos (CERVBRASIL, 2015), gerando grandes volumes de subprodutos como, por exemplo, levedura residual cervejeira e *trub* (resíduo tirado na filtração após o cozimento, composto de gordura vegetal e proteínas coaguladas).

O bagaço de malte retido após a separação do mosto, constituído basicamente da casca do grão de cevada, é o principal subproduto sólido do processo de produção de cerveja, é produzido durante todo o ano, correspondendo a aproximadamente 85% do total de subprodutos gerados por uma cervejaria (MUSSATTO, 2014; STEINER; PROCOPIO; BECKER, 2015). Sua composição química varia de acordo com a variedade de cevada, o tempo da colheita, as condições de maltagem e trituração, com a qualidade e tipo de adjuvantes adicionada no processo e a tecnologia utilizada na fabricação de cerveja, para a obtenção de cervejas com sabores diferenciados (MUSSATTO, 2014; SANTOS et al., 2003).

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados encontrados na literatura para a composição do bagaço de malte.

Tabela 1. Composição do bagaço de malte (g 100 g⁻¹) segundo autores.

Componente	Cordeiro, El-Aouar e Gusmão (2012)	Kaur e Saxena (2004)	Mussatto e Roberto (2006)	Wang, Sakoda e Suzuki (2001)
Umidade	75,45	80 – 85	n.d.	n.d.
Proteína	5,67	29,50	15,25	25,2
Lipídios	2,49	6,90	n.d.	6,45
Fibra Bruta	4,15	n.d.	n.d.	n.d.
Cinzas	1,31	4,7	4,6	3,67
Celulose	n.d.	n.d.	16,8	15,57
Hemicelulose	n.d.	n.d.	28,4	n.d.
Lignina	n.d.	n.d.	27,8	12,07

n.d. Não determinado

Geralmente, o bagaço de malte é descartado diretamente no solo ou usado em aterro sanitário, no entanto, o subproduto disponível a baixo ou nenhum custo, tem sido utilizado atualmente na nutrição animal, principalmente em ração para gado, devido ao seu alto teor de fibra. Pesquisas têm buscado ampliar as aplicações deste potencial subproduto, como por exemplo, incorporação na alimentação humana, utilizando a farinha do resíduo para a produção de flocos, pão integral, biscoitos e *snacks*, na produção de energia, em processos biotecnológicos na produção de substrato para o cultivo de micro-organismos e produção de enzimas, como α -amilase, celulase, xilanase, feruloil esterase, lacase e acetil esterase (ALIYU; BALA, 2011; MUSSATTO, 2014; STEINER; PROCOPIO; BECKER, 2015).

2.3 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido consiste no desenvolvimento microbiano na superfície do substrato, no caso de bactérias e leveduras, ou no interior dos mesmos, no caso de fungos filamentosos, na ausência ou perto da ausência de água livre, porém, o substrato deve possuir umidade suficiente para auxiliar o desenvolvimento e metabolismo microbiano, atuando como fonte de carbono e energia, simulando o habitat e as condições naturais de crescimento do micro-organismo no ambiente (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; MONDALA, 2015).

Sindhu, Pandey e Binod (2015) destacam que a fermentação sólida oferece várias vantagens quando comparada ao processo de fermentação submersa, tais como a utilização de subprodutos agroindustriais, que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento microbiano; possui menor probabilidade de contaminação devido à baixa umidade e atividade de água, produzindo pouco resíduo líquido; fácil aeração devido à porosidade do material; volume do fermentador menor que o da fermentação submersa, tendo maior produtividade. E as desvantagens estão relacionadas a limitação de micro-organismos que desenvolvem em umidade reduzida; difícil remoção do calor metabólico gerado durante o desenvolvimento microbiano, especialmente em grande escala; difícil monitoramento dos parâmetros do processo; difícil estimativa da biomassa produzida; rendimento inferior devido à taxa de crescimento específico menor dos micro-organismos; o pré-tratamento dos suportes pode ser necessário em alguns casos, podendo modificar negativamente a estrutura do substrato; e os extratos podem estar contaminados com componentes indesejáveis do substrato.

A seleção adequada do substrato e do micro-organismo, a otimização dos parâmetros do processo e a separação e purificação dos produtos são considerações importantes para a fermentação em estado sólido (PANDEY, 2003). Alguns fatores como umidade, atividade de água, temperatura, pH, aeração, tamanho da partícula, porosidade e a escolha do substrato que atua como melhor fonte de nutrientes afetam significativamente o desenvolvimento celular e a formação de produto (SAHNOUN et al., 2015).

Os micro-organismos, entre eles os fungos, são considerados fonte unicelular de elevado teor proteico, pois apresentam rápido desenvolvimento e possibilidade de cultivo em vários tipos de substratos, com a possibilidade de substituir suplementos proteicos convencionais usados na alimentação animal. O frequente aumento dos preços dos suplementos vegetais utilizados na alimentação animal tem despertado grande interesse pelo aproveitamento destes alimentos não convencionais no Brasil. A produção desse tipo de proteína é independente de efeitos climáticos e alterações ambientais, porém, estes processos requerem investimentos substanciais de capital e devem ser operados com a máxima eficiência (ARAÚJO et al., 2009).

Os fungos desempenham importante função nas indústrias de alimentos, pois possuem diferentes tipos de enzimas capazes de metabolizar misturas complexas de compostos orgânicos presentes na maioria dos subprodutos. Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Sendo a linhagem microbiana

um dos fatores mais importante para o sucesso ou fracasso de um processo fermentativo, pois deve apresentar bom rendimento de produção, fácil cultivo e manutenção, e manter constância fisiológica. (COLEN, 2006; SOUSA, 2009).

O fungo do gênero *Rhizopus* pertence ao filo Zigomiceto, ordem Mucorales, caracteriza-se pelo desenvolvimento rápido em diversos ambientes como solos e vegetais, e as colônias possuem aparência semelhante ao algodão. A espécie *Rhizopus oligosporus* tem sido utilizada como produtor de alimentos fermentados em estado sólido, especialmente nos países asiáticos, para a fabricação de diversos alimentos a base de vegetais fermentados; e na bioconversão de subprodutos agroindustriais, para produção de enzimas, sendo capaz de colonizar rapidamente esses substratos, uma vez que simula o habitat destes micro-organismos (MIRANDA, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O *Rhizopus oligosporus* é considerado seguro para a aplicação na área de alimentos e recebe a denominação GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (BOURDICHON et al, 2012). Dentre as principais vantagens no seu uso estão a facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos, sendo importante pela produção de proteínas com elevada digestibilidade e prevenindo a formação de substâncias tóxicas (ARAÚJO et al., 2011; SOUSA, 2009).

Christen et al. (2000), avaliaram a bioconversão de bagaço de mandioca, bagaço de maçã, grãos de soja e amaranto por fungos do gênero *Rhizopus*, produzindo além de biomassa, compostos voláteis como álcoois flavorizantes e ésteres. Os substratos foram misturados em diferentes proporções, a fim de ter uma variedade na relação C/N. O meio de cultivo influenciou significativamente o desenvolvimento dos fungos do gênero *Rhizopus*, obtendo maior produção de biomassa com os meios contendo relação C/N entre 10 e 21.

2.4 Enriquecimento proteico

Na fermentação em estado sólido o substrato além de fornecer nutrientes para os micro-organismos, serve de suporte para o desenvolvimento destes, sendo considerados substratos ideais, os materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento celular. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes encontram-se em concentrações abaixo da mínima, sendo necessária suplementação do meio. Soluções de nutrientes podem ser incorporadas ao substrato sólido, visando adequá-lo às condições

nutricionais do micro-organismo para a fermentação desejada quando são utilizadas fontes de nitrogênio (SANTOS, 2007).

No enriquecimento proteico, subprodutos agroindustriais são utilizados como substrato por micro-organismos. Para melhor conversão do substrato em *single cell protein* (SCP) no processo de fermentação sólida, além da fonte de carbono, controle da temperatura, pH, umidade e oxigenação, é necessário o fornecimento de uma fonte de nitrogênio não proteico, o qual promove o aumento do conteúdo de proteína na biomassa residual do fungo. As fontes de nitrogênio mais adequadas para a produção de SCP são amônia, sais de amônio, nitratos, ureia e fontes orgânicas como os hidrolisados proteicos. Porém, o excesso de nitrogênio também pode inibir a síntese de enzimas que degradam a lignina pelo fungo, o equilíbrio da suplementação deve ser feito a fim de alcançar a máxima digestibilidade dos subprodutos bioconvertidos (BISARIA; MADAN; VASUDEVAN, 1997; CAMPOS et al., 2005; SUHET; FIOREZE, 2011).

A composição da SCP é afetada pelas condições de cultivo, especialmente pelo substrato. A relação carbono/nitrogênio (C/N) é uma característica importante quando se quer avaliar a adequabilidade de um substrato como suprimento de nutrientes, tendo influência no metabolismo do micro-organismo utilizado, alterando as concentrações e tempo de produção de determinados produtos. Quando se esgota a concentração de nitrogênio, cessa-se o desenvolvimento do micro-organismo, este por sua vez, continua a utilizar o carbono presente, porém podendo passar a produzir metabólitos secundários e não mais primários como de início (BIER, 2011). Para minimizar o acúmulo de substâncias de armazenamento e favorecendo a síntese proteica a relação C/N deve ser mantida em torno de 10:1 durante o desenvolvimento (LITCHFIELD, 1983).

A biomassa é produzida a partir de micro-organismos como: algas, fungos e bactérias, cuja produção tem contribuído para aumentar o teor proteico do substrato ou para agregar valores a subprodutos agroindustriais, sendo um parâmetro fundamental para caracterização do desenvolvimento microbiano em estudos cinéticos de cultivos em estado sólido (ARAÚJO et al., 2011). Dados de biomassa são usados para balancear, calcular a produtividade, e modelagem do processo, sendo essencial para o direcionamento, otimização e aumento de escala da fermentação (STEUDLER et al., 2015).

A produção industrial em larga escala de biomassa fúngica apresenta inúmeras vantagens, quando comparada aos métodos tradicionais para a produção de proteínas, como a alta velocidade de desenvolvimento; alto conteúdo de proteína; pode ser utilizada grande diversidade de fontes de carbono alternativas, entre elas os subprodutos agroindustriais; as

instalações para a produção de proteínas fúngicas ocupam pequenas áreas e resultam em alta produção; e a produção microbiana independe das variações climáticas (SILVEIRA; FURLONG, 2007).

Métodos fiáveis para quantificação da biomassa são essenciais para a análise da cinética de crescimento dos fungos, porém a quantificação direta da biomassa em cultivos envolvendo fungos filamentosos é bastante difícil, devido à dificuldade de separar o micro-organismo do substrato, pois os fungos penetram e ligam-se firmemente às partículas do substrato sólido (AUGUSTINE; JOSEPH; RAJ, 2006; RUTSATZ, 2006). Isto implica a utilização de métodos indiretos que são ou muito trabalhoso e demorado, ou só podem fornecer medições de biomassa durante determinados períodos de crescimento (STEUDLER et al., 2015). Muitos autores têm descrito métodos indiretos para estimar a concentração de biomassa em fermentação em estado sólido baseado na medição do teor de certos componentes celulares como quitina, ergosterol e proteína. O conteúdo dos diferentes componentes celulares pode alterar significativamente em fungos, dependendo da espécie, das condições de desenvolvimento e idade da cultura (DESGRANGES et al., 1991; OOIJKAAAS; TRAMPER; BUITELAAR, 1998).

A glicosamina, geralmente utilizada como um indicador de desenvolvimento é o monômero da quitina, componente da parede celular de fungos e não é encontrada em materiais vegetais, que são comumente utilizados como substratos na fermentação em estado sólido. Sua determinação quantitativa envolve a hidrólise química da quitina e quantificação da glicosamina liberada (DALSENTER, 2005).

A precisão do método depende de se estabelecer um fator de conversão confiável entre o conteúdo de glicosamina e o peso seco da biomassa. A principal desvantagem do método é exatamente que este fator de conversão varia de acordo com o meio e as condições de cultivo, e fatores obtidos de cultivos submersos podem não ser apropriados para o cultivo em meio sólido (RUTSATZ, 2006).

2.5 Alimentação animal

A utilização de subprodutos agroindustriais na alimentação animal é uma alternativa mais barata, onde os recursos estão prontamente disponíveis para produzir alimentos de boa qualidade e substituir os ingredientes caros na dieta suplementar tradicional (KAUR; SAXENA, 2004).

Subprodutos da agroindústria como o bagaço de maçã (VENDRUSCOLO et al., 2009), resíduo de abacaxi (LIMA et al., 2012), resíduo de café (PIMENTA et al., 2011), farelo de coco e resíduo de goiaba (SANTOS et al., 2009) entre outros, vêm sendo avaliados como fontes alternativas que permitam reduzir o custo da alimentação e a dependência dos ingredientes convencionalmente utilizados em rações na aquicultura (HISANO et al., 2008).

Para a utilização de um novo ingrediente na ração, deve se obter informações sobre sua composição química e valor nutricional. Os níveis adequados para a incorporação na dieta são em função do tipo de animal, da fase produtiva e das características climáticas da região, devendo ainda levar em consideração a melhor maneira de manipulação, transporte e armazenamento do ingrediente (VIEIRA et al., 2006).

Na dieta a ser adotada, deve-se fornecer quantidades adequadas de proteína, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais, sendo a quantidade de cada um, dependente da palatabilidade, custo, disponibilidade e a qualidade do ingrediente, determinando níveis práticos e seguros de inclusão desses alimentos, além de considerar a disponibilidade regional e economia de custos (PAIVA, 2010).

A maior parte dos subprodutos e resíduos da indústria de alimentos são pobres em nutrientes, como proteínas e vitaminas e são ricos em fibras com baixa digestibilidade. Esses materiais não são adequados para os animais não ruminantes, sendo a utilização de micro-organismos, principalmente os fungos, para converter subprodutos agroindustriais a fim de obter produtos com maior valor nutritivo, uma solução potencial, especialmente em relação aos teores de proteína e vitaminas, e com o aumento da digestibilidade. Uma vez que os animais não ruminantes não são capazes de metabolizar as fibras naturais que compreendem a maior parte dos resíduos lignocelulósicos, o processo de bioconversão deve ter por objetivo transformar estas fibras em componentes digestíveis (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO; MITCHELL, 2002).

A fim de determinar o nível de substituição máxima de proteína de farinha de peixe pela farinha proteica de malte na ração de alevinos de carpas, Yamamoto et. al (1996) elaboraram dietas com substituição de 20, 40 e 60% na dieta controle, obtendo bons resultados de crescimento e eficiência alimentar nas dietas com 20 e 40%. Graeff, Pruner e Spengler (2001), quando avaliaram a substituição em 0, 33, 66 e 100% do farelo de soja pelo resíduo de cervejaria em alimentação de alevinos, encontrou maiores valores de conversão alimentar nos tratamentos de 100 e 66%, concluindo que o resíduo pode ser substituído em até 66% o farelo de soja na alimentação de carpa-comum, sem prejuízo de ganho de peso, sendo que o tratamento com 100% ocasionou menor ganho de peso dos alevinos.

REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: Resíduos Sólidos – Classificação. Rio de Janeiro, 2004. 71p.
- AFONSO, L. C. **Produção de celulasas por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 3, p. 324-331, 2011.
- ARAÚJO, K. B.; SANTOS, R. C. A.; SOUZA, F. M.; AQUINO, L. C. L. Enriquecimento proteico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*: otimização utilizando a metodologia de superfície de resposta. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 5, n. 4, p. 45-50, 2011.
- ARAÚJO, L. F.; DIAS, M. V. C.; BRITO, E. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. Enriquecimento proteico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 47-53, 2009.
- AUGUSTINE, A., JOSEPH, I.; RAJ, R. P. Biomass estimation of *Aspergillus niger* S₁₄ a mangrove fungal isolate and *A. oryzae* NCIM 1212 in solid-state fermentation. **Journal of the Marine Biological Association of India**, Cochim, v. 48, n. 2, p. 139-146, 2006.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, Barking, v. 47, p. 175-185, 2012.
- BIER, M. C. J. **Produção de compostos de aroma através da biotransformação do limoneno por fermentação em estado sólido utilizando resíduo natural de laranja como substrato**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, Barking, v. 59, n. 1, p. 5-8, 1997.
- BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, WALTER P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; SCHURE, E. T.; BOVEN, A. V,

VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S., HANSEN, E. B. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 154, p. 87-97, 2012.

BRASIL. **Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010**. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União, Brasília, 05/06/2009.

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

CARVALHO, G. B. M.; SILVA, D. P.; TEIXEIRA, J. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Cerveja a partir de banana como adjunto do malte. In: Venturini Filho, G. W. **Ciência e Tecnologia de Bebidas**. São Paulo: Edgar Blücher, 2009.

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. **Anuário 2014 do Setor Cervejeiro**. Disponível em <<http://www.cervbrasil.org.br/>> Acesso em: 8 jun. 2015.

CHRISTEN, P.; BRAMORSKI, A.; REVAH, S.; SOCCOL, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, Barking, v. 71, n.3, p. 211-215, 2000.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, Â. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 7, n. 3, p. 20-22, 2012.

DALSENTER, F. D. H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido**. 2005. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DESGRANGES, C., VERGOIGNAN, C., GEORGES, M., DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, p. 200-205, 1991.

GRAEFF, A.; PRUNER, E. N.; SPENGLER, M. M. Efeito da substituição do farelo de soja pelo resíduo de cevada na alimentação da carpa comum (*Cyprinus carpio L.*). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n.280, p. 691-698, 2001.

GREGORI, A.; SVAGELJ, M., PAHOR, B., BEROVIC, M.; POHLEVEN, F. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. **New Biotechnology**, Amsterdam, 2008.

HISANO, H.; MARUYAMA, M. R.; ISHIKAWA, M. M.; MELHORANÇA, A. L.; OTSUBO, A.A. **Potencial da utilização da mandioca na alimentação de peixes**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, Documentos, 94, 2008. 29p.

KAUR, V. I.; SAXENA, P. K.. Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps. **Bioresource Technology**, Barking, v. 91, p. 101-104, 2004.

LIMA, M. R.; LUDKE, M. C. M. M.; HOLANDA, M. C. R.; PINTO, B. W. C.; LUDKE, J. V.; SANTOS, E. L. Performance and digestibility of Nile tilapia fed with pineapple residue bran. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 34, n. 1, p. 41-47, 2012.

LITCHFIELD, J. H. Single-cell proteins. **Science**, Washington, DC, v. 219, n. 4585, p.740-746, 1983.

MIRANDA, J. C. **Bioconversão energética da folha e bagaço de mandioca pelo fungo *Rhizopus oligosporus* para obtenção de alimento funcional**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP, 2014.

MONDALA, A. H. Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Basingstoke, v. 42, p. 487-506, 2015.

MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 94, n.7, p. 1264–1275, 2014.

MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes, In: SHOW, K. Y., GUO, X. **Industrial Waste**, InTech, 2012, cap. 6, p. 121-140.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 81, p. 268-274, 2006.

OGUNJOBI, A. A.; MEJEHA, O. K.; FAGADE, O. E. Protein Enrichment of Brewery Spent Grains Using *Aspergillus oryzae*. **AU Journal of Technology**, Bangkok, v. 15, n. 1, p. 53-56, jul., 2011.

OLIVEIRA, M. A.; DONEGA, M.A.; PERALTA, R.M; SOUZA, C.G.M. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet – CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 84-87, 2007.

OOIJKAAS, L. P., TRAMPER, J., BUITELAAR, R. M. Biomass estimation of *Coniothyrium minitans* in solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 22, p. 480-486, 1998.

PAIVA, K. C. **Utilização de ração a base de sorgo na alimentação de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre as características zootécnicas do peixe e características físicas, químicas, bioquímicas, histomorfológicas viscerais e sensoriais do filé.** 2010. 122 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

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

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management and Innovation**, Santiago, v. 02, n. 01, 2007.

PIMENTA, C. J.; OLIVEIRA, M. M.; FERREIRA, L.O.; PIMENTA, M. E. S. G.; LOGATO, P. V. R.; LEAL, R. S.; MURGAS, L. D. S. Aproveitamento do resíduo do café na alimentação de tilápia do Nilo. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 231, p. 583-593, 2011.

ROSA, T. S. **Produção de lipase e enriquecimento proteico de resíduo de pinhão manso por fermentação no estado sólido do fungo *Aspergillus niger*.** 2010. 78 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências de Alimentos) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

RUTSATZ, M. D. **Cultivo em estado sólido: modelagem e quantificação de biomassa em biorreator cilíndrico horizontal agitado**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2006.

SAHNOUN, M.; KRIAA, M.; ELGHARBI, F.; AYADI, D.; BEJAR, S.; KAMMOUN, R. *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: Optimization of culture conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 75, p. 73-80, 2015.

SANTOS, E. L.; LUDKE, M. C. M. M.; BARBOSA, J. M.; RABELO, C. B.; LUDKE, J. V. Digestibilidade aparente do farelo de coco e do resíduo de goiaba para tilápia do Nilo. **Caatinga**, Mossoró, v. 22, p. 175-180, 2009.

SANTOS, M.; JIMÉNEZ, J. J.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; NOZALA, M. J. Variability of brewer's spent grain within a brewery. **Food Chemistry**, Berlin, v. 80, p. 17-21, 2003.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 151 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2007.

SANTOS, T. C.; AMORIM, G. M.S; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Determinação da Atividade de CMCase e FPase da estipe fúngica *Rhizopus* sp. através da bioconversão do resíduo de seriguela (*Spondias purpurea* L.). **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 145-149, 2011.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.4, p. 805-811, 2007.

SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Solid-state Fermentation for the Production of Poly(hydroxyalkanoates). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Zagreb, v. 29, n. 2, p. 173-181, 2015.

SOUSA, B. A. A. **Funcionalidade dos extratos fenólicos obtidos pelo cultivo semi-sólido de resíduos de abacaxi (*Ananas comosus L.*) e goiaba (*Psidium guajava L.*)**. 2009. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

STEINER, J.; PROCOPIO, S.; BECKER, T. Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 303-315, 2015.

STEUDLER, S.; BÖHMER, U.; WEBER, J.; BLEY, T. Biomass Measurement by Flow Cytometry During Solid-State Fermentation of Basidiomycetes, **Cytometry Part A**, Hoboken, v. 87, p. 176-188, 2015.

SUHET, M. I.; FIOREZE, R. Fermentação semissólida do resíduo do abacaxi. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.5, n.1, p.47-52, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012. 934 p.

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C. S.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J. L. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 04, p.487-493, 2009.

VIEIRA, A.A.; BRAZ, J.M.; COSTA, A.D. Desempenho de suínos em crescimento alimentados com dietas contendo bagaço de cevada. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 16, 2006, Recife. **Anais...** Recife: Associação Brasileira de Zootecnistas, 2006. Disponível em: <http://www.abz.org.br/files.php?file=documentos/R0324_1_998671327.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2015.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 98, p. 1-12, 2002.

WANG, D., SAKODA, A., SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, Barking, v. 78, p. 293-300, 2001.

YAMAMOTO, T.; UNUMA, T.; AKIYAMA, T.; KISHI, S. Utilization of Malt Protein Flour in Fingerling Carp Diets. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 62, n. 5, p. 783-789, 1996.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1: ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO BAGAÇO DE MALTE POR *Rhizopus oligosporus* VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

RESUMO

O bagaço de malte representa, aproximadamente, 85% do total de subprodutos gerados em uma cervejaria. Constituído por carboidratos, fibras, minerais e baixas quantidades de proteína, seu aproveitamento limita-se a alimentação de ruminantes, no entanto, seu potencial de aproveitamento deve ser investigado. O aproveitamento deste subproduto pelo emprego de micro-organismos pelo processo de fermentação em estado sólido, como o caso do enriquecimento proteico pela incorporação de *single cell protein* é uma alternativa para garantir a sustentabilidade além de gerar produtos de interesse comercial. Ante isto, o objetivo deste trabalho foi cultivar o *Rhizopus oligosporus* no bagaço de malte sob diferentes umidades iniciais e fontes de nitrogênio visando aumentar o teor proteico do bagaço de malte fermentado. Após os 7 dias de fermentação foi verificado aumento de 2 e 4 vezes no conteúdo de proteína bruta e proteína solúvel, respectivamente, em relação ao bagaço de malte *in natura*. A cinética do enriquecimento proteico demonstrou a possibilidade da aplicação desta técnica, tornando-se uma ótima alternativa para seu aproveitamento em dietas para animais de pequeno porte.

Palavras chave: Bagaço de malte, resíduos agroindustriais, fermentação em estado sólido, bioconversão, proteína microbiana.

PROTEIN ENRICHMENT OF BREWERY SPENT GRAIN FROM *Rhizopus oligosporus* BY SOLID STATE FERMENTATION

ABSTRACT

Brewery spent grain represents approximately 85% of total by-products generated in a brewery. Consisting of carbohydrates, fiber, minerals and low amounts of protein, the use of brewery spent grain is limited to the feeding of ruminants; however, its potential use should be investigated. The reuse of this by-product using microorganisms by solid-state fermentation process as the case of protein enrichment by single cell protein incorporation is an alternative to ensure sustainability and generate commercially interesting products. In this context, the aim of this study was to grow *Rhizopus oligosporus* in brewery spent grain under different initial moisture contents and nitrogen sources to increase the protein content of the fermented material. After 7 days of fermentation, increase of 2 to 4 times in the crude protein and soluble protein content was verified, respectively, compared to unfermented brewery spent grain. The kinetics of protein enrichment demonstrated the possibility of application of this technique, which can a great alternative for use in diets for small animals

Keywords: Brewery spent grain; agro-industrial residues; solid state fermentation; bioconversion, microbial protein.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro produtor mundial de cerveja, com produção de 13,5 bilhões de litros, superado apenas pela China e Estados Unidos (CERVBRASIL, 2015). O bagaço de malte retido após a separação do mosto, constituído basicamente da casca do grão de cevada, é o principal subproduto sólido do processo de produção de cerveja, é produzido durante todo o ano, correspondendo a aproximadamente 85% do total de subprodutos gerados (MUSSATTO, 2014; STEINER; PROCOPIO; BECKER, 2015).

Geralmente, o bagaço de malte é descartado diretamente no solo ou usado em aterro sanitário, no entanto, o subproduto disponível a baixo ou nenhum custo, tem sido utilizado principalmente para a alimentação de ruminantes devido ao seu alto teor de fibra, no entanto, pesquisas têm buscado ampliar as aplicações deste potencial subproduto, como por exemplo, incorporação na alimentação humana sob a forma de farinha e flocos na elaboração de pães e biscoitos. Na biotecnologia tem sido aplicado visando a obtenção de biocombustíveis e produção de enzimas, como α -amilase, celulase, xilanase, lacase e acetil esterase (ALIYU; BALA, 2011; MUSSATTO, 2014; STEINER; PROCOPIO; BECKER, 2015).

O aproveitamento de subprodutos lignocelulósicos oriundos da produção agrícola para produção de proteína microbiana na forma de biomassa fúngica, parece ser uma alternativa prática e promissora para aumentar o teor proteico e o valor nutritivo do substrato, agregando valores aos rejeitos agroindustriais, porém a suplementação de alguns substratos deve ser realizada principalmente como forma de adequar a relação carbono/nitrogênio (C/N) (BERNARDI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; SILVEIRA; FURLONG, 2007; VILLAS-BÔAS; ESPOSITO; MITCHELL, 2002).

O processo de enriquecimento proteico em subprodutos agroindustriais pode ser realizado pela fermentação sólida, que possibilita a utilização desses subprodutos como substrato para o desenvolvimento de micro-organismos (KUMAR; KANWAR, 2012). As fontes de nitrogênio mais adequadas para a produção de proteína unicelular são amônia, sais de amônio, nitratos, ureia e fontes orgânicas como os hidrolisados proteicos. Porém, o excesso de nitrogênio também pode inibir a síntese de enzimas que degradam a lignina pelo fungo, o equilíbrio da suplementação deve ser feito a fim de alcançar a máxima digestibilidade dos subprodutos bioconvertidos (BISARIA; MADAN; VASUDEVAN, 1997).

A espécie *Rhizopus oligosporus* tem sido utilizada como produtor de alimentos fermentados em estado sólido; e na bioconversão de subprodutos agroindustriais, sendo capaz

de colonizar rapidamente esses substratos, uma vez que simula o habitat destes microorganismos (MIRANDA, 2014; SABU et al., 2002). O gênero *Rhizopus* é especialmente importante, pela produção de proteínas com elevada digestibilidade e prevenindo a formação de substâncias tóxicas, sendo considerado seguro para a aplicação na área de alimentos e recebe a denominação GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (ARAÚJO et al., 2011; BOURDICHON et al., 2012).

Frente a isto o objetivo do trabalho foi o enriquecimento proteico do bagaço de malte, oriundo de microcervejarias, pelo processo de fermentação em estado sólido, utilizando o fungo filamentoso *Rhizopus oligosporus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Setor de Engenharia de Alimentos da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (UFG) localizado no município de Goiânia – GO.

O trabalho foi dividido em três etapas: i – preparo do bagaço de malte (BM); ii – fermentação em estado sólido do bagaço de malte por *Rhizopus oligosporus*; e iii – cinética do processo fermentativo. A Figura 1 representa o fluxograma geral do processo de fermentação em estado sólido do bagaço de malte.

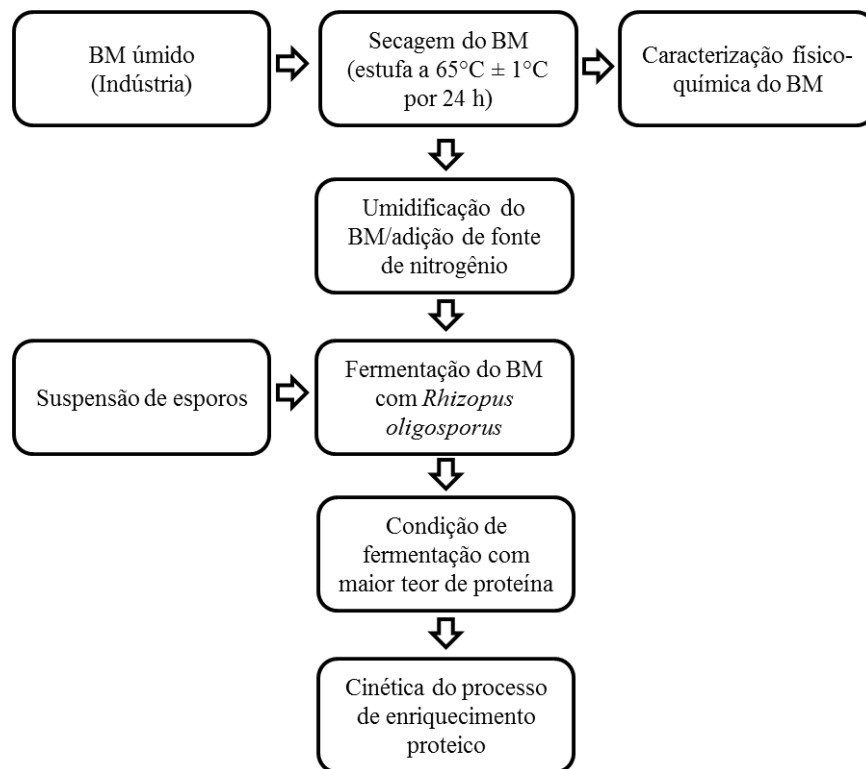


Figura 1. Fluxograma geral do processo de fermentação em estado sólido do bagaço de malte.

2.1 Preparo do bagaço de malte

O bagaço de malte foi cedido pela empresa Reall Chopp, microcervejaria localizada no município de Goiânia – GO. O material úmido foi desidratado em estufa com circulação de ar, a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (~10% base úmida), e armazenado em sacos de polietileno de

baixa densidade (PEBD), em *freezer* a -20°C . Para realização dos experimentos o bagaço de malte foi descongelado até atingir temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

2.1.1 Determinações analíticas

A análise granulométrica do bagaço de malte foi realizada pelo peneiramento de 150 g do bagaço de malte seco em peneiras da série Tyler sob agitação mecânica durante 10 minutos. O diâmetro médio de partícula foi obtido pela equação 1. Onde \bar{d}_p é o diâmetro médio de Sauter (mm), d_{pi} é o diâmetro médio das partículas retidas entre as peneiras (mm) e ΔX_i é a fração mássica retida na peneira “i”.

$$\bar{d}_p = \frac{1}{\sum_{i=1}^k \frac{\Delta X_i}{d_{pi}}} \quad (1)$$

A umidade foi determinada por método gravimétrico em estufa de secagem (ES1A, Olidef CZ, Ribeirão Preto, São Paulo) a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ até peso constante. A análise de cinzas foi realizada pelo método de incineração em mufla (200F, Magnu's, Belo Horizonte, Minas Gerais) a $550^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ por 6 horas. Para determinação do pH, o bagaço de malte foi misturado a água destilada na proporção de 1:10 (g mL⁻¹), e após agitação realizou leitura em potenciômetro (MPA210, Instrutemp, Belenzinho, São Paulo). A proteína bruta foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl, multiplicando o valor obtido de nitrogênio total da amostra por 6,25. A determinação de lipídeos foi realizada em equipamento tipo Soxhlet (MA486, Marconi, Piracicaba, São Paulo) usando como solvente éter de petróleo. O teor de carboidratos foi obtido por diferença, subtraindo-se de cem os valores obtidos de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibras (AOAC, 2005). O valor energético foi estimado de acordo com os valores de conversão de *ATWATER* (4 kcal g⁻¹ para carboidratos e proteínas e 9 kcal g⁻¹ para lipídeos) (FAO, 2003).

A concentração de proteína solúvel foi determinada pela metodologia descrita por Lowry, Rosebrough e Farr (1951). A absorbância lida foi comparada a uma curva padrão de soroalbumina bovina (Sigma-Aldrich) em concentrações variando de zero a 0,3 mg mL⁻¹.

A determinação de fibra bruta foi realizada a partir de uma amostra seca, a qual foi submetida à digestão em béquer com uma solução de 200 mL de ácido sulfúrico 1,25% (0,225 N) em ebulição por 30 minutos, filtrado sob vácuo em funil de Buchner provido de tela de náilon, com lavagens sucessivas do resíduo com água fervente até completa neutralização e, posteriormente, seguiu a digestão em béquer com uma solução de 200 mL de hidróxido de sódio 1,25% (0,313 N) em ebulição por 30 minutos. O material foi filtrado sob vácuo em

cadinho de Gooch e lavado com água fervente, e em seguida com aproximadamente 20 mL de álcool etílico e 20 mL de acetona. O resíduo resultante foi levado em estufa a 105°C até peso constante (4 a 6 horas) e em seguida incinerado em mufla à temperatura de 550°C por 2 horas (BRASIL, 2013).

As amostras seguiram procedimento de rotina de análise foliar do Laboratório Análise de Solos e Foliar (LASF) da UFG, para determinação do perfil mineral. A extração dos teores de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu) e zinco (Zn), foi utilizada a digestão nitroperclórica. Após a digestão e resfriamento, o extrato foi transferido para balão volumétrico de 50 mL e completado com água destilada (extrato A). Para determinação do P foi utilizado método espectrométrico azul, onde 0,25 mL do extrato A é transferido para tubos de ensaio e adicionou 4,5 mL de água destilada, 10 mL de molibdato de amônio diluído e aproximadamente 30 mg de ácido ascórbico, como redutor. Após 30 minutos foi feita a leitura de transmitância no espectrofotômetro de absorção atômica (3110, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para a determinação do teor de K, foram utilizados tubos de ensaio com 0,25 mL do extrato A e adicionado a 4,75 mL de água destilada. A leitura foi feita em um fotômetro de chama (FC180, Celm, São Caetano do Sul, São Paulo) em que o teor de potássio foi dado pela leitura direta no aparelho. O Ca e o Mg foram quantificados em espectrofotômetro de absorção atômica (3110, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) com lâmpada de cátodo oco de cálcio-magnésio, com adição de lantânio para prevenir interferências ocasionais pela presença de fosfatos e de alumínio. Os tubos de leitura foram preparados adicionando-se 0,25 mL do extrato A e 4,5 mL de lantânio a 0,22%. A leitura de cada nutriente foi feita separadamente. A determinação dos elementos Fe, Mn, Cu e Zn foram realizadas diretamente nos extratos nitroperclóricos por espectrofotometria de absorção atômica (EMBRAPA, 1997).

Fotomicrografias foram realizadas para verificar modificações estruturais ocorridas durante o processo de fermentação em estado sólido. As amostras do bagaço de malte foram desidratadas em estufa a 60 °C por 24 horas, esterilizadas em autoclave (121 °C por 15 min), em seguida, foram colocadas na base de um suporte metálico, onde foram aderidas através de uma fita adesiva, recobertas com ouro por “sputtering” e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM – 6610), equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging, sendo então obtidas as fotomicrografias. Esta análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da UFG.

O teor de carbono orgânico total, hidrogênio e nitrogênio foram realizados por combustão a seco em Analisador Elementar (CHNS/O PE2400 Série II), pelo Laboratório de

Análise Elementar, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado no município de Belo Horizonte – MG. Este equipamento usa um método de combustão para converter os elementos medidos em gases simples, os quais são detectados por um sensor de termcondutividade e convertidos em porcentagem do elemento.

2.2 Micro-organismo

O fungo *Rhizopus oligosporus* CCT 4134, foi obtido da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello localizada no município de Campinas – SP. A manutenção da linhagem foi realizada em tubos de ensaio contendo meio ágar batata dextrose (PDA) inclinado, incubados em estufa BOD a 25°C por um período de 7 dias e armazenados em refrigerador a 4°C para uso posterior, sendo repicado a cada 30 dias.

A obtenção do inóculo foi realizada segundo metodologia proposta por Ogunjobi, Mejeha e Fagade (2011) e Paris et al. (2012). O micro-organismo, mantido em tubos de ensaio contendo PDA, foi transferido para inocular garrafas de Roux contendo 150 mL do meio de cultura PDA, previamente autoclavadas (121°C por 15 min) e incubadas a 25°C por 7 dias. Os esporos foram raspados da superfície das garrafas com água destilada estéril, sendo em seguida filtrado em gaze estéril, recuperados em frasco e mantidos a 4°C. A concentração de esporos na suspensão foi estimada pela contagem em microscópio usando Câmara de Neubauer.

2.3 Fermentação em estado sólido

Os experimentos utilizando o cultivo em meio sólido foram realizados para avaliar o enriquecimento proteico do bagaço de malte pelo fungo *Rhizopus oligosporus* tendo como respostas a quantidade de proteína bruta, proteína solúvel, pH e umidade. Cada espécie apresenta melhor desenvolvimento e/ou melhor produção em materiais com relação C/N específica, sendo a suplementação de alguns substratos realizada principalmente como forma de adequar essa relação (BERNARDI et al., 2007). Levando em consideração essas exigências nutricionais, foram realizados experimentos visando determinar o maior aumento proteico, estudando as variáveis umidade inicial (50, 60, 70%) em base úmida e a suplementação de fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, ureia e nitrato de sódio). As

massas de substrato e os volumes da solução aquosa de nitrogênio e da solução de esporos foram calculados por balanços de massa, de forma a garantir uma umidade inicial do meio fermentativo pré-determinada para cada ensaio. O bagaço de malte desidratado foi umidificado com água destilada contendo a fonte de nitrogênio em solução, levando em consideração o volume da suspensão de esporos a ser adicionado. A concentração de nitrogênio adicionada, das diferentes fontes de nitrogênio, foi padronizada em 1% (p/p) em meio seco. A fermentação foi realizada com 100 g de bagaço de malte úmido em frascos de *Erlenmeyer* de 500 mL, cobertos com tampão de algodão, esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriados a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionada uma suspensão de esporos contendo uma concentração padrão de 2×10^6 esporos g^{-1} de meio seco. Os frascos foram agitados manualmente para homogeneização e acondicionados em estufa BOD a 25°C por 7 dias.

Os tratamentos foram denominados bagaço de malte (BM), bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* sem suplementação de nitrogênio, com suplementação de sulfato de amônio, com suplementação ureia e com suplementação de nitrato de sódio (BMF, BMS, BMU, BMN, respectivamente).

A cinética do processo fermentativo do bagaço de malte por *Rhizopus oligosporus* foi realizado com a melhor condição determinada pelo experimento de enriquecimento proteico, seguindo o mesmo processo de fermentação. Os frascos foram acondicionados em estufa BOD a 25°C por 18 dias, sendo retirado um frasco a cada dois dias para realização das análises de umidade, pH, proteína solúvel e glicosamina.

2.3.1 Determinações analíticas

Foram realizadas as determinações de umidade, cinzas, pH, proteína bruta, extrato etéreo, carboidratos, valor energético, proteína solúvel, fibra bruta, perfil de minerais e microscopia eletrônica de varredura conforme as metodologias apresentadas no item 2.1.1.

Pela dificuldade da determinação da biomassa, optou-se pela estimativa de forma indireta, pela quantificação do desenvolvimento celular, utilizando o teor de glicosamina do bagaço fermentado. A concentração de glicosamina foi determinada pela metodologia descrita por Aidoo; Hendry; Wood (1981). A absorvância lida em espectrofotômetro a 530 nm foi comparada a uma curva padrão de glicosamina (SERVA Electrophoresis GmbH) em concentrações variando de zero a $0,2 \text{ g L}^{-1}$.

2.4 Planejamento experimental

No experimento foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 3^2 para avaliar o efeito das variáveis independentes (fonte de nitrogênio e umidade inicial) por meio das respostas (proteína bruta e proteína solúvel), utilizando metodologia de superfície de resposta. Na Tabela 1 estão apresentados os níveis codificados para as variáveis em estudo. A análise estatística foi realizada através do *Software Statistica 7.0*.

Tabela 1. Níveis do planejamento experimental fatorial 3^2 .

Níveis	Fonte de nitrogênio	Umidade (%)
-1	Sulfato de amônio	50
0	Ureia	60
+1	Nitrato de sódio	70

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios obtidos na análise granulométrica para massa retida em cada peneira, os valores da fração mássica e a fração mássica acumulada após a agitação são apresentados na Tabela 2. Com esses valores foi possível determinar o diâmetro médio de Sauter, obtendo-se diâmetro médio de 2,24 mm para o bagaço de malte, observando que aproximadamente 70% da amostra corresponde a partículas com tamanho maior que 2 mm.

A distribuição granulométrica com o uso de peneiras é bastante comum por sua praticidade, porém é mais adequado para partículas que apresentam formato próximo a uma esfera. O bagaço de malte, assim como o bagaço de cana, é formado basicamente de partículas com formato próximo ao de um cilindro, porém, há a possibilidade de se colher partículas cilíndricas de diversos comprimentos em cada peneira, sendo que o que limita esta situação é o diâmetro das partículas, que tem que ser menor que o orifício da peneira (CORRÊA, 2003), pois por mais fina que a partícula seja, ela pode apresentar alguma das outras dimensões maior do que a abertura da peneira e não passar para a peneira subsequente.

Tabela 2. Distribuição granulométrica do bagaço de malte.

Tyler (mesh)	Abertura da peneira D_i (mm)	Diâmetro médio das partículas D_{pi} (mm)	Massa Retida (g)	Fração em massa retida (ΔX_i)	Fração em massa acumulada (X_i)
+ 5	4,00	4,00	7,97	0,0531	0,0531
- 5 + 9	2,00	3,00	101,59	0,6772	0,7303
- 9 + 12	1,41	1,705	24,48	0,1632	0,8935
- 12 + 16	1,00	1,205	11,68	0,0779	0,9714
- 16 + 24	0,71	0,855	3,10	0,0207	0,9921
-24 + 32	0,50	0,605	0,68	0,0045	0,9966
- 32 + 100	0,15	0,325	0,43	0,0028	0,9995
- 100	0	0,075	0,08	0,0005	1,0000

A análise elementar do bagaço de malte apresentou resultados de carbono, hidrogênio e nitrogênio de $45,66 \pm 0,03$, $7,24 \pm 0,09$ e $3,84 \pm 0,14$ g $100g^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos na composição do bagaço de malte, subproduto de microcervejaria, e das fermentações com umidade inicial próxima a umidade *in natura* do bagaço de malte, estão apresentados na Tabela 3. Houve aumento quanto aos teores de cinza, proteína bruta, extrato etéreo e fibra bruta, porém não se observa diferença quanto à composição mineral. Resultados

semelhantes quanto à composição do bagaço de malte foram observados por Anigbogu (2003), Mussatto e Roberto (2006) e Ogunjobi, Mejeha e Fagade (2011) e Wahab, Shahedur e Takashi (2009). Os resultados de minerais do bagaço de malte quando comparados aos apresentados por Mussatto e Roberto (2006), que avaliaram o subproduto obtido a partir de um processo que utiliza 100% de malte (sem adição de adjunto), são semelhantes em magnésio e zinco, e superiores quanto a cálcio, fósforo, potássio, cobre, ferro e manganês

As diferenças apresentadas entre os valores obtidos neste estudo e os da literatura são perfeitamente compreensíveis quando se sabe que a composição centesimal do bagaço de malte é função de diversos fatores, tais como: variedade da cevada, o tempo de colheita, os cereais utilizados na maltagem, o processo tecnológico empregado na cervejaria, condições de moagem e mosturação, dentre outros (CORDEIRO, 2012).

A umidade final não apresentou diferenças significativas durante a fermentação (dados não mostrados). Experimentos com maiores quantidades de água resultaram no aumento do pH no decorrer da fermentação (Figura 2). Foi possível observar que os valores de pH dos substratos da fermentação aumentaram, com exceção da fermentação com adição de sulfato de amônio, fato também observado por Hsu et al. (2013) onde afirmam que este comportamento pode estar relacionado à liberação de NH_4^+ e OH^- com a decomposição dos compostos nitrogenados.

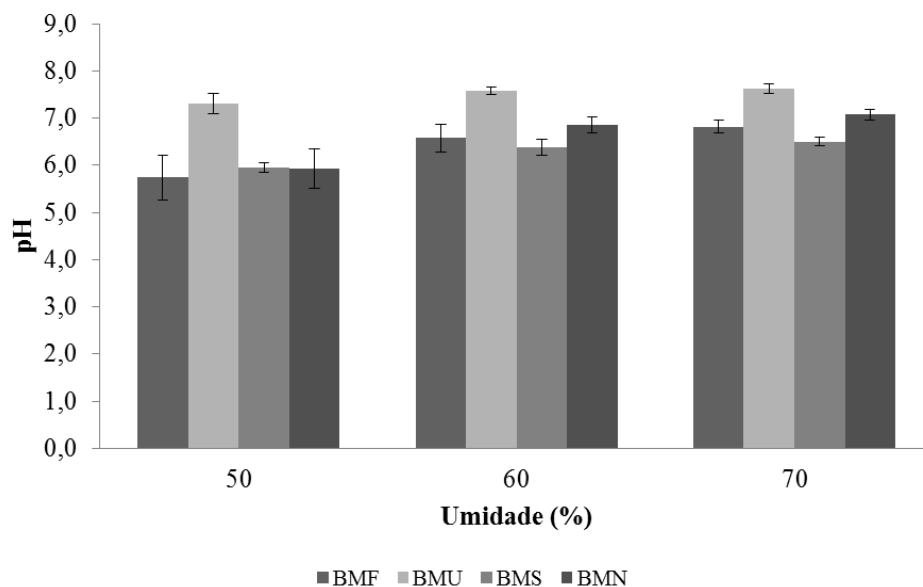


Figura 2. pH final do bagaço de malte suplementado por diferentes fontes de nitrogênio na fermentação por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134.

Tabela 3. Composição do bagaço de malte e do bagaço de malte suplementado com diferentes fontes de nitrogênio e fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134.

Componente (g 100 g ⁻¹)	BM	BMF ¹	BMS ¹	BMU ¹	BMN ¹
Umidade	72,54 ± 0,49	4,74 ± 0,01	6,01 ± 0,07	4,68 ± 0,08	3,03 ± 0,03
Proteína Bruta	17,96 ± 0,21	26,25 ± 0,22	32,90 ± 0,63	32,10 ± 2,57	27,41 ± 0,57
Extrato etéreo	4,21 ± 0,05	3,41 ± 0,19	3,50 ± 0,12	4,25 ± 0,09	2,62 ± 0,04
Cinzas	3,41 ± 0,04	4,42 ± 0,07	3,88 ± 0,02	4,23 ± 0,02	5,70 ± 0,03
Fibra Bruta	9,77 ± 0,30	21 ± 0,00	14,6 ± 0,70	18,2 ± 0,00	17,00 ± 2,12
Carboidrato	60,01 ± 0,32	40,18 ± 0,46	39,10 ± 0,57	38,08 ± 0,63	44,23 ± 1,27
Valor Energético (Kcal g ⁻¹)	349, 81 ± 1,56	296,43 ± 0,69	319,52 ± 1,68	313,87 ± 1,70	310,18 ± 6,08
Minerais (g.100 g ⁻¹)					
Cálcio	0,05	0,05	0,06	0,08	0,06
Fósforo	1,01	1,26	1,07	1,10	0,81
Magnésio	0,19	0,29	0,24	0,31	0,25
Potássio	2,66	1,92	2,10	1,28	1,36
Cobre	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
Ferro	0,28	0,22	0,19	0,25	0,23
Manganês	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
Zinco	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02

Resultados expressos em base seca. ¹ Amostras da fermentação com 70% de umidade após secagem em estufa a 65°C por 24 horas.

BM – Bagaço de malte, BMF – Bagaço de malte fermentado por *R. oligosporus* sem suplementação de nitrogênio, BMS – Bagaço de malte fermentado por *R. oligosporus* com suplementação de sulfato de amônia, BMU – Bagaço de malte fermentado por *R. oligosporus* com suplementação de ureia, BMN – Bagaço de malte fermentado por *R. oligosporus* com suplementação de nitrato de sódio.

A proteína solúvel (Figura 3) apresentou maiores valores quando a umidade inicial foi de 70%, representando aumento de 10,5, 10,7 e 16,8% para as fermentações com suplementação de ureia, nitrato de sódio e sulfato de amônio, respectivamente, em relação a fermentação controle, sem adição de fonte de nitrogênio, na mesma umidade, e aumento médio de 4 vezes em relação ao bagaço de malte. No entanto, o maior aumento foi com a suplementação de nitrato de sódio na umidade de 60%, com valor correspondente a 28,4% mais proteína solúvel comparada à fermentação controle na mesma umidade.

A proteína bruta (Figura 4) teve seu maior resultado no experimento com suplementação de sulfato de amônio e umidade inicial de 50%, representando aumento de aproximadamente 95% de proteína em relação ao bagaço de malte sem tratamento. Porém, todos os resultados mostraram-se eficiente quanto ao aumento do teor proteico do bagaço de malte, sendo que não houve diferença significativa quando comparado às suplementações nos teores de umidade de 60 e 70%. O valor médio de aumento no teor proteico no bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus*, com umidade inicial em 70%, foi de aproximadamente 1,7 vezes, quando comparado com o bagaço de malte não fermentado.

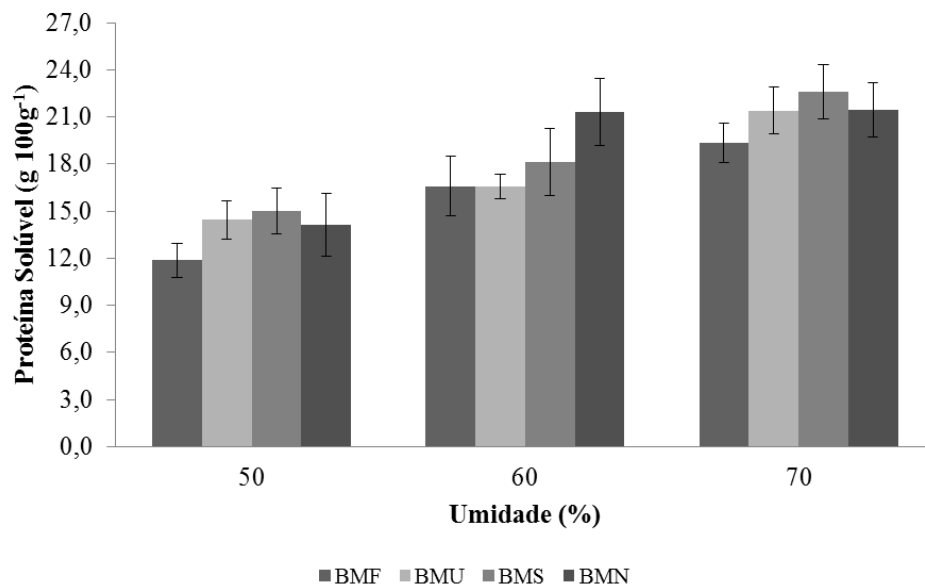


Figura 3. Proteína solúvel final do bagaço de malte suplementado por diferentes fontes de nitrogênio na fermentação por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134.

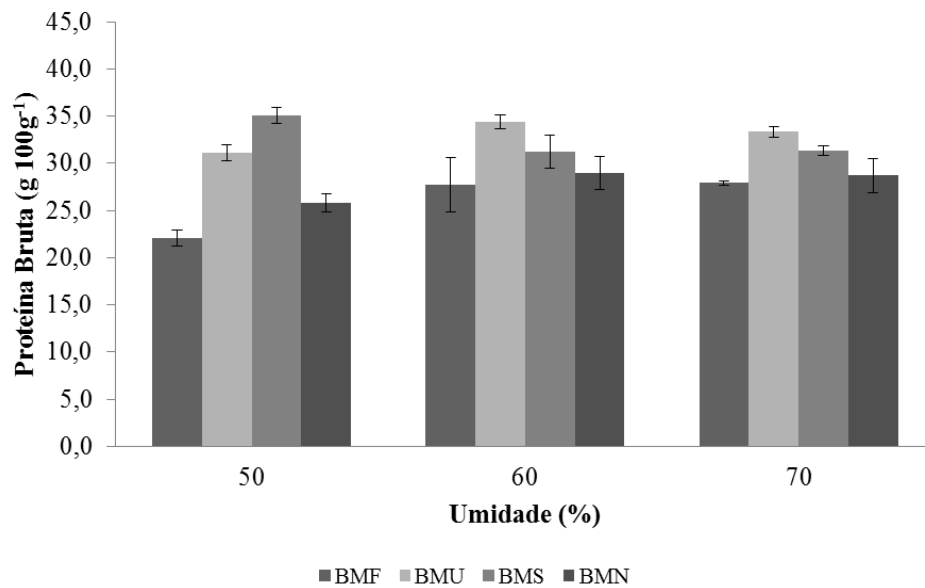


Figura 4. Proteína bruta final do bagaço de malte suplementado por diferentes fontes de nitrogênio na fermentação por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134.

O enriquecimento proteico do bagaço de malte em termos de proteína solúvel foi semelhante aos encontrados por Vendruscolo et al. (2009) que utilizaram umidade inicial de 70% no tratamento biológico do bagaço de maçã pelo fungo *Gongronella butleri*, realizados com adição de nitrato de sódio e ureia e por Araújo et al. (2011) onde observaram que a umidade inicial de 60% e temperatura de 40 °C aumentou consideravelmente a quantidade de proteína solúvel da farinha de sementes de mangaba fermentada por *Rhizopus oryzae*. Já os resultados de proteína bruta são semelhantes aos apresentados por Silveira e Furlong (2007), Campos et al. (2005) e Ogunjobi, Mejeha e Fagade (2011), que observaram aumento em proteína de aproximadamente 2 vezes nas melhores condições de seus trabalhos. Albuquerque (2003), Araújo et al. (2011) e Correia, Magalhães e Macêdo (2007) obtiveram maior aumento proteico em níveis de proteína bruta, devido a maior suplementação da fonte de nitrogênio. Níveis de enriquecimento proteico muito superiores foram observados por Hsu et al. (2013), com condições iniciais de 65% de umidade, pH 6,8 e suplementação de sulfato de amônio para ajustar a relação C/N na faixa de 10 a 20, na fermentação de capim-elefante e capim-pangola com *Bacillus subtilis* H8 e *Entrophospora* sp. NP1.

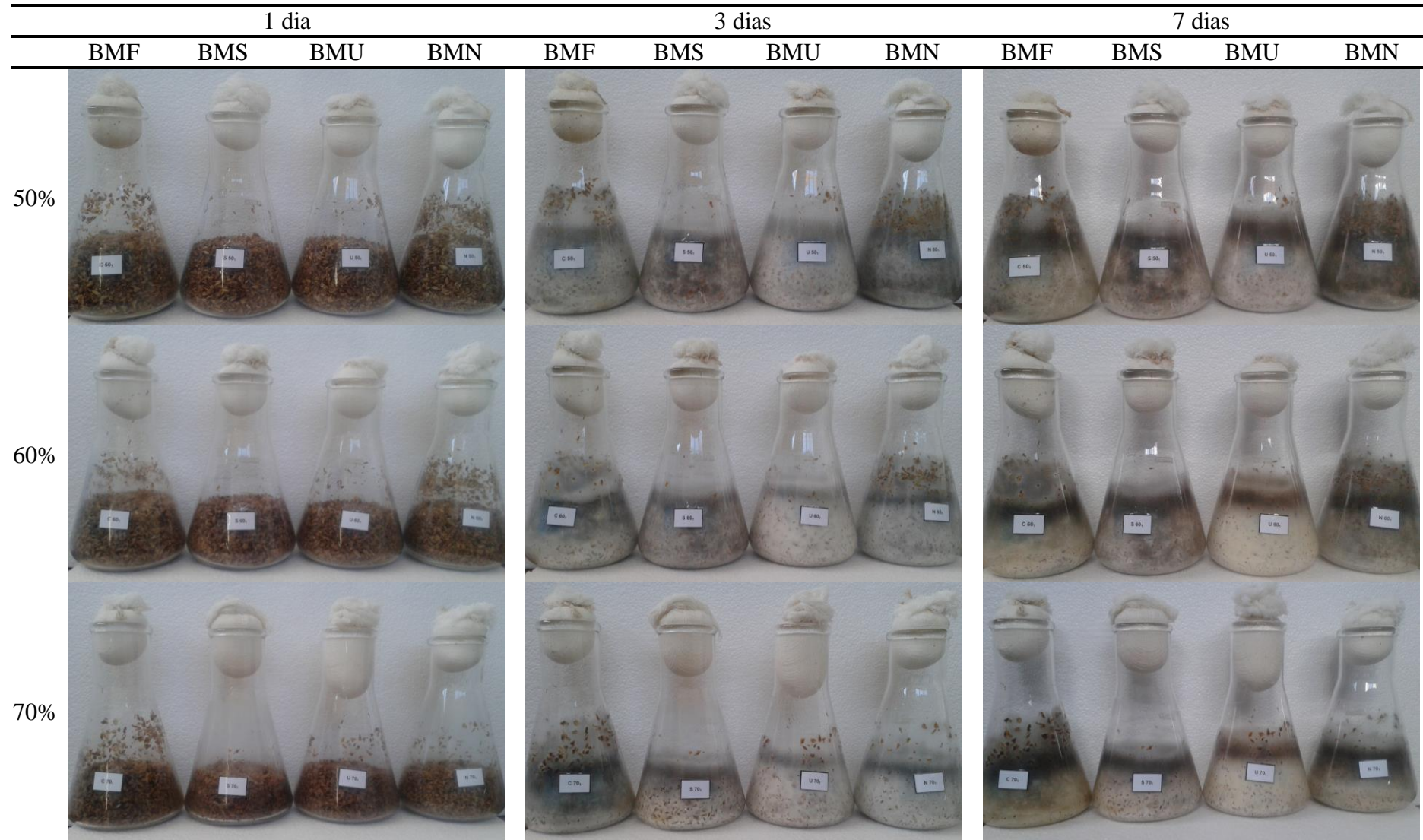
Na Tabela 4 é possível observar o desenvolvimento do *Rhizopus oligosporus* no substrato de bagaço de malte. Em todas as fotos, estão em sequência os frascos de Erlenmeyer com bagaço de malte fermentado sem adição de fonte de nitrogênio, fermentado com sulfato de amônio, fermentado com ureia e fermentado com nitrato de sódio. A fermentação com nitrato de sódio apresentou, visualmente, maior esporulação e menor teor proteico quando

comparado às demais suplementações de nitrogênio. Por outro lado, a fermentação com ureia apresentou menor esporulação do que as fermentações com outras suplementações e sem adição de fonte de nitrogênio, a qual diminuiu também com o aumento da umidade, produzindo maior teor de proteína microbiana.

Quando as condições de cultivo não são adequadamente controladas ou quando o substrato é consumido até limitar as atividades metabólicas, o micro-organismo pode desencadear processos como a esporulação, redução no crescimento ou morte celular (LIMA, 2009). Lareo et al. (2006) e Suhet e Fioreze (2011), indicaram que a esporulação na fermentação em estado sólido, ocorre quando o metabolismo glicídico diminui ou imediatamente após o esgotamento da glicose no meio.

A Figura 5 apresenta a superfície de resposta e curva de nível para o planejamento experimental fatorial 3^2 , as quais indicaram a existência de uma região ótima relacionada aos fatores fonte de nitrogênio e umidade inicial do meio de cultivo para o enriquecimento proteico do bagaço de malte fermentado com *Rhizopus oligosporus* ao nível de proteína solúvel e proteína bruta. Observa-se que a produção de proteína solúvel possui maior aumento quando utilizado os três níveis de fontes de nitrogênio e a umidade inicial de 60 e 70%. Enquanto a proteína bruta possui maior aumento quando utilizado as fontes de nitrogênio sulfato de amônio e ureia nos três níveis de umidade. Estes resultados não indicam valores fixos, mas identificam faixas de operações.

Na Figura 6, pelo Diagrama de Pareto, pode-se observar que a umidade inicial e a fonte de nitrogênio são fatores significativos no intervalo de confiança de 95% para as respostas proteína solúvel e proteína bruta, respectivamente, no processo de fermentação do bagaço de malte. Observa-se que a umidade linear, fonte de nitrogênio e interação entre os fatores possui efeito positivo sobre a resposta proteína solúvel, desta forma, o aumento da umidade nas três fontes de nitrogênio, resulta no aumento da proteína solúvel do bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus*. Enquanto que para resposta proteína bruta, a fonte de nitrogênio é o efeito de maior importância para o processo, pelo valor negativo, o maior valor de proteína bruta é atingida para o menor nível (-1) da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio).

Tabela 4. Imagens do crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 em bagaço de malte nas diferentes umidades.

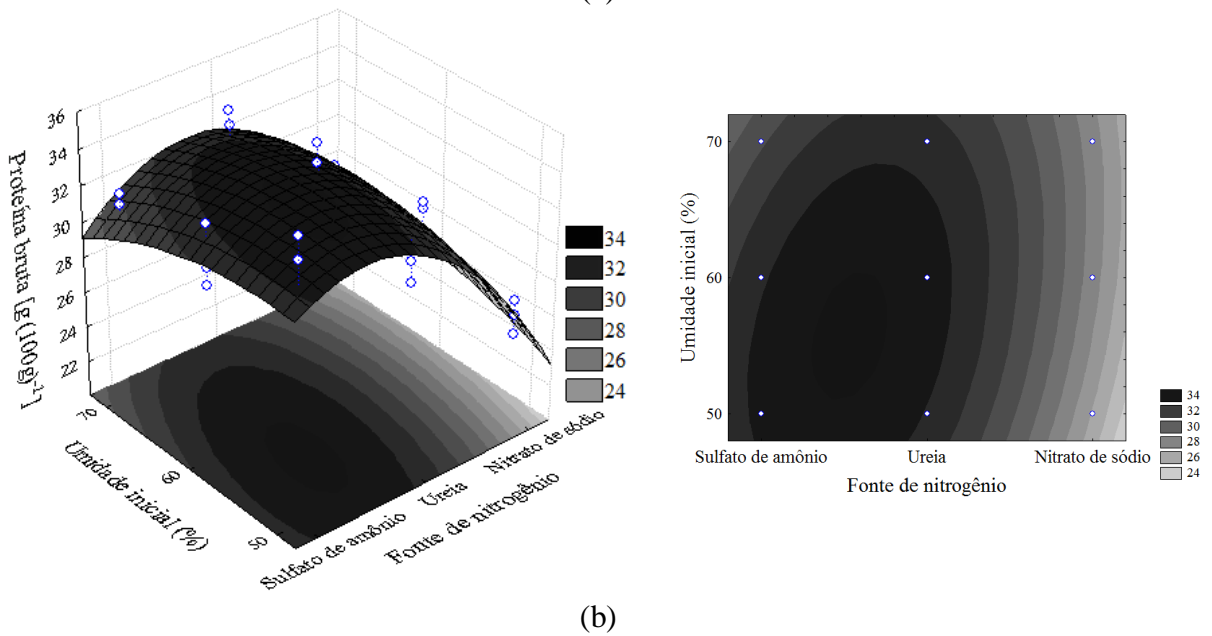
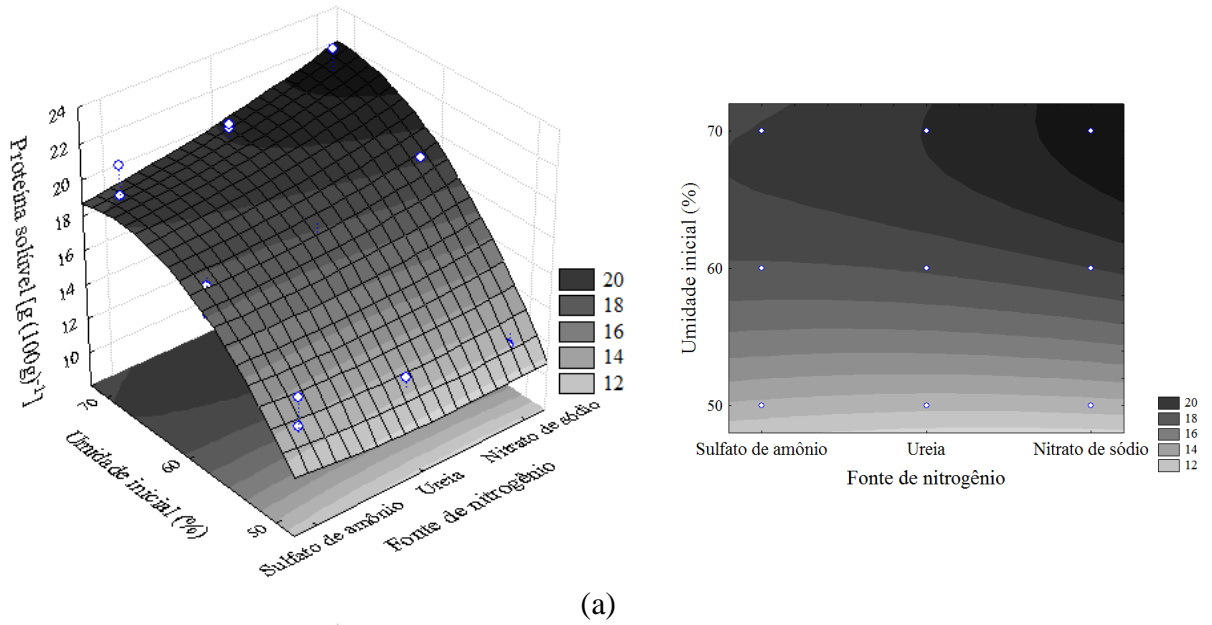


Figura 5. Superfície de resposta e curva de nível para o enriquecimento proteico em termos de proteína solúvel (a) e proteína bruta (b) do bagaço de malte fermentado com *Rhizopus oligosporus* CCT 4134, para os fatores fonte de nitrogênio e umidade inicial.

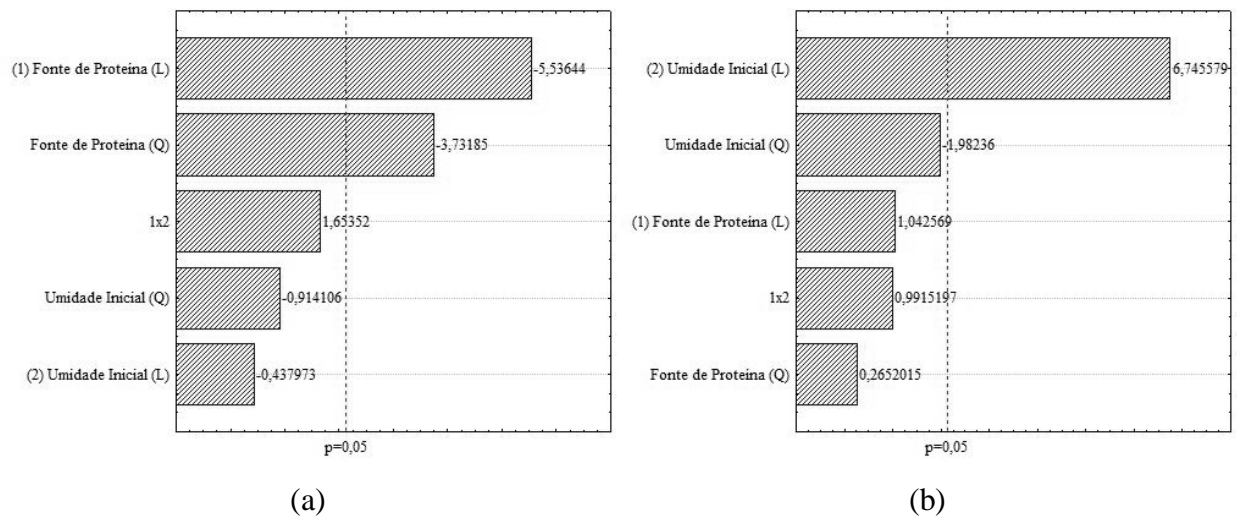


Figura 6. Diagrama de Pareto para o enriquecimento proteico em termos de proteína solúvel (a) e proteína bruta (b) do bagaço de malte fermentado com *Rhizopus oligosporus* CCT 4134, para os fatores fonte de nitrogênio e umidade inicial.

O emprego de fungo na fermentação em estado sólido do bagaço de malte viabiliza a obtenção de um concentrado proteico, que pode ser utilizado como fonte alternativa para aproveitamento de subprodutos da indústria cervejeira. Com o intuito de verificar a cinética de crescimento e alterações microscópicas provocadas pelo fungo *Rhizopus oligosporus* no bagaço de malte, foram escolhidas as suplementações com sulfato de amônio, pois apresentaram os melhores resultados para o enriquecimento proteico.

Utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura, foi observada a estrutura do bagaço de malte e do bagaço de malte fermentado, inteiro e moído, por *Rhizopus oligosporus*, com suplementação de sulfato de amônio e 70% de umidade inicial. Na Figura 7 as fotomicrografias obtidas representam a estrutura do bagaço de malte inteiro, e do bagaço de malte fermentado inteiro e moído. O processo de fermentação em estado sólido não provocou diferença na estrutura do bagaço de malte, observado ao aumento de 30 vezes.

Foi observado que a estrutura do bagaço de malte fermentado praticamente não sofre alterações, porém os esporos foram capazes de se imobilizar no bagaço de malte. Esse fenômeno também foi encontrado por Dragone (2007) utilizando o bagaço de malte como suporte para a imobilização das leveduras para a fermentação primária para produção de cervejas de altas densidades por processo contínuo, revelando que a distribuição das células na superfície do suporte ocorreu de forma heterogênea, com acúmulos locais de biomassa dentro de fissuras, poros e fibras entrelaçadas, o que sugere a existência de sítios preferenciais de ligação.

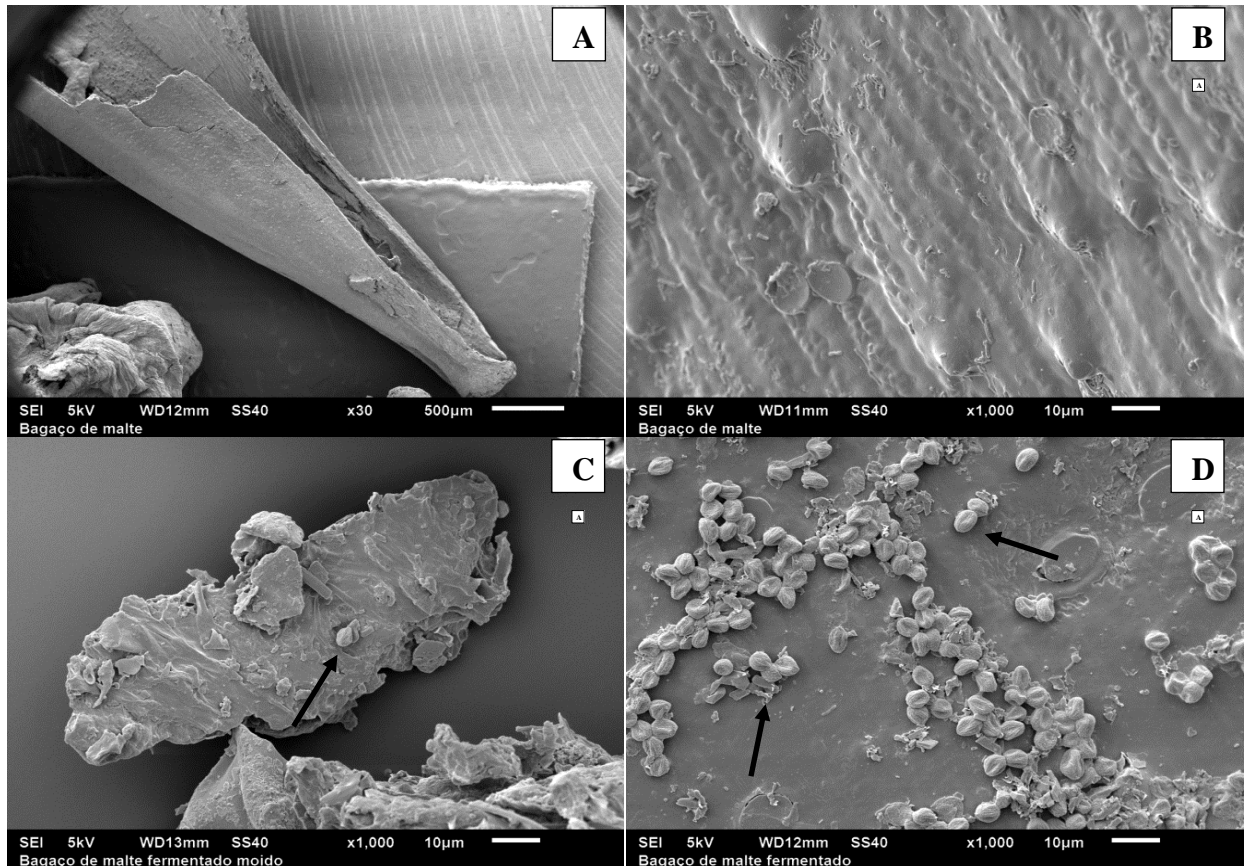


Figura 7. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço de malte inteiro com aumento de 30 vezes (A); e com aumento de 1000 vezes (B); bagaço de malte fermentado, por *Rhizopus oligosporus*, com suplementação de sulfato de amônio e 70% de umidade inicial, e moído com aumento de 1000 vezes (C); bagaço de malte fermentado, por *R. oligosporus*, com suplementação de sulfato de amônio e 70% de umidade inicial, inteiro com aumento de 1000 vezes (D). As setas indicam os esporos de *Rhizopus oligosporus* CCT 4134.

De acordo com os resultados e as condições estabelecidas nas fermentações preliminares, foi acompanhada a cinética de desenvolvimento do fungo *Rhizopus oligosporus* em bagaço de malte suplementado com sulfato de amônio, com umidade inicial de 50, 60 e 70% por um período de 18 dias, sendo realizadas amostragens a cada dois dias. As amostras foram analisadas determinando-se umidade, pH, proteína solúvel e biomassa.

A umidade inicial foi ajustada em 50, 60 e 70%, e na cinética de fermentação em estado sólido (Figura 8) teve um ligeiro aumento durante os 18 dias, principalmente na umidade inicial de 50%, que ao final do experimento teve aumento de aproximadamente 20%. Amorim (2011), na produção de lipase em meio contendo farelo de cacau, observou que teve diminuição da umidade durante a fermentação, enquanto Bier (2011) observa que a umidade

do meio manteve-se quase constante durante o processo fermentativo, entretanto a partir do quinto dia o teor de umidade aumenta devido à incorporação da umidade do ar atingindo seu ápice no último dia de fermentação.

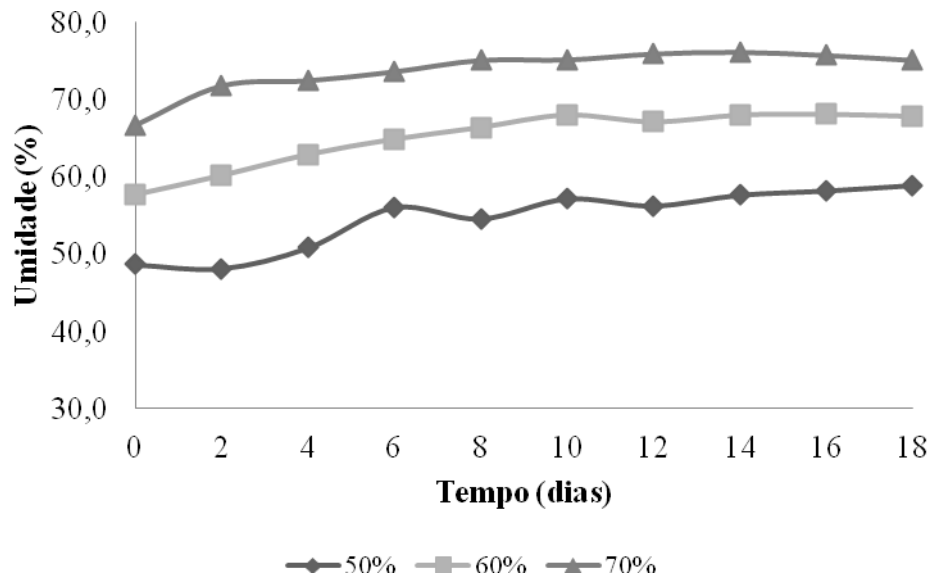


Figura 8. Cinética da umidade do bagaço de malte durante o período de fermentação em estado sólido por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 em diferentes umidades iniciais.

O pH não foi ajustado para controle inicial, no entanto, observa-se que inicialmente sua concentração reduziu nos primeiros 4 dias de fermentação, aumentando gradativamente até o final da análise cinética (Figura 9), fato esse que também foi observado Bier (2011). Segundo Santos (2000), algumas espécies de fungos possuem uma característica autorreguladora de pH do substrato, ou seja, a tendência é de que se estabilize no valor de pH ótimo, independentemente do valor de pH inicial, que varia de acordo com o substrato e o micro-organismo.

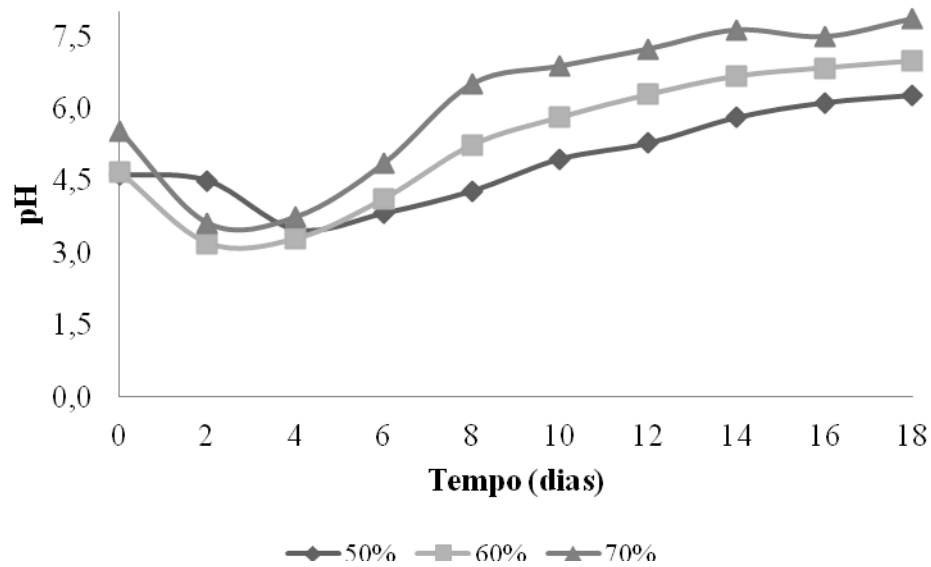


Figura 9. Cinética do pH do bagaço de malte durante o período de fermentação em estado sólido por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 em diferentes umidades iniciais.

Em todas as fermentações a produção de proteína solúvel (Figura 10) aumentou ao longo do tempo de fermentação, atingindo valores máximos no sexto dia. Estes resultados podem ser explicados pelo aumento da atividade microbiana do *Rhizopus oligosporus* pelo aumento da concentração de glicosamina (Figura 10) que representa a evolução da concentração celular e, conseqüentemente, o aumento da atividade metabólica do micro-organismo no bagaço de malte. O valor máximo de glicosamina foi $1,4 \text{ mg g}^{-1}$ de meio seco no quarto dia sob a condição de umidade inicial de 60%, observando diminuição da concentração após esse dia, fato não observado nos experimentos com umidade inicial de 50 e 70%. Apesar das estimativas indiretas de quantificação de biomassa pela determinação do teor de glicosamina ou ergosterol serem difíceis de serem interpretadas, os resultados foram satisfatórios para a análise e interpretação dos resultados.

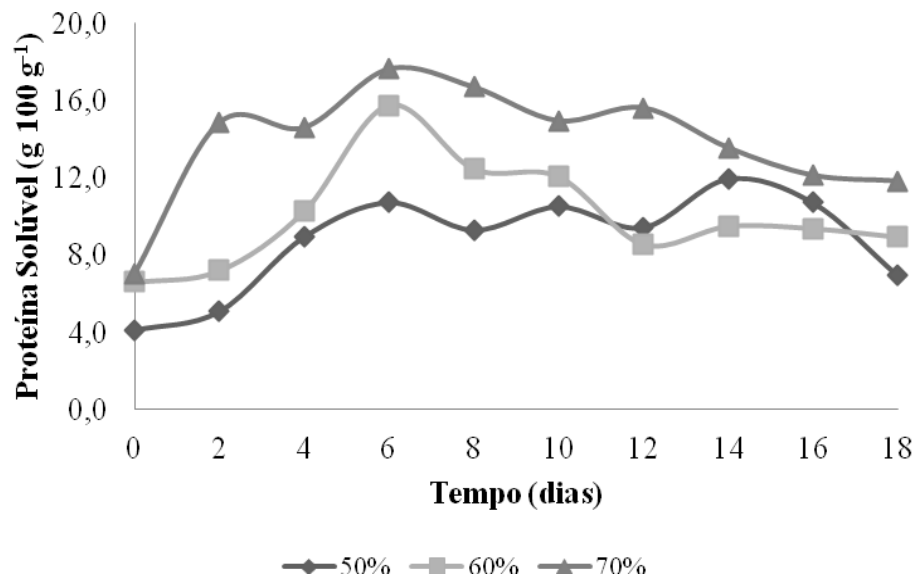


Figura 10. Cinética da proteína solúvel do bagaço de malte durante o período de fermentação em estado sólido por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 em diferentes umidades iniciais.

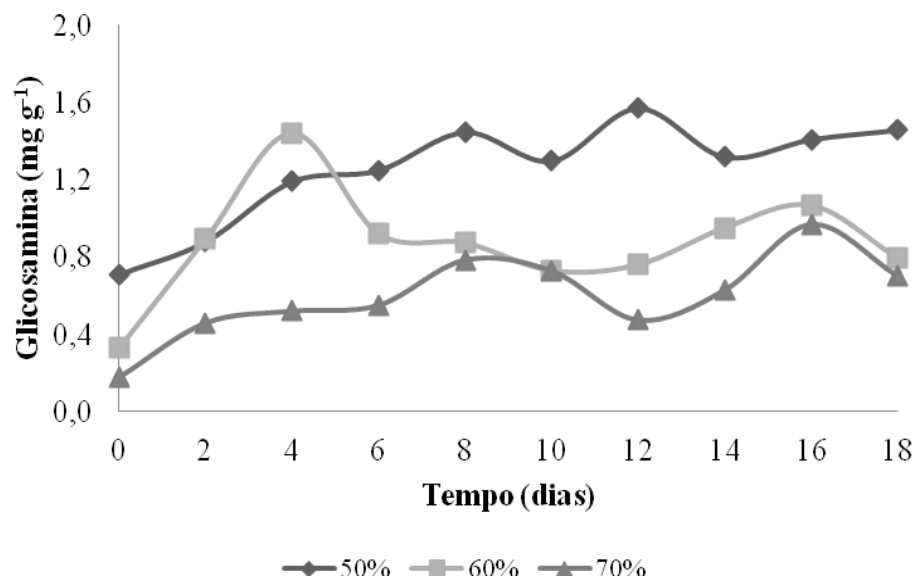


Figura 11. Cinética da concentração de glicosamina do bagaço de malte durante o período de fermentação em estado sólido por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 em diferentes umidades iniciais.

4 CONCLUSÃO

O enriquecimento proteico do bagaço de malte pelo *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 proporcionou aumento de aproximadamente 2 vezes em relação ao teor de proteína bruta e 4 vezes em relação ao teor de proteína solúvel, demonstrando a potencialidade deste resíduo agroindustrial para adição em alimentação animal. Além do aumento proteico, a fermentação em estado sólido foi capaz de promover pequeno aumento no teor de fibra bruta, cinzas e extrato etéreo, porém não provocou aumento no perfil mineral, quando comparado ao bagaço de malte não fermentado. Níveis mais altos de proteína foram encontrados em suplementação de sulfato de amônio e ureia na umidade de 70%, o que seria mais vantajoso, pois pode diminuir o processo de secagem do bagaço de malte para posterior enriquecimento proteico.

REFERÊNCIAS

- AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 12, p. 6-9, 1981.
- ALBUQUERQUE, P. M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã**. 2003. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 3, p. 324-331, jan., 2011.
- AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal**. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, 2011.
- ANIGBOGU, N. M. Supplementation of dry brewer's grain to lower quality forage diet for growing lambs in southeast Nigeria, **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, South Korea, v. 16, n. 3, p. 384-388, 2003.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC, 2v. 2005.
- ARAÚJO, K. B.; SANTOS, R.C. A.; SOUZA, F. M.; AQUINO, L. C. L. Enriquecimento proteico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*: otimização utilizando a metodologia de superfície de resposta. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 5, n. 4, p. 45-50, 2011.
- BERNARDI, E.; DONINI, L. P. ; MINOTTO, E. ; NASCIMENTO, J. S. Utilização de Diferentes Substratos para a Produção de Inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 1, p.84-89, 2007.
- BIER, M. C. J. **Produção de compostos de aroma através da biotransformação do limoneno por fermentação em estado sólido utilizando resíduo natural de laranja como substrato**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

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

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, WALTER P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; SCHURE, E. T.; BOVEN, A. V, VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S., HANSEN, E. B. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 154, p. 87-97, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. **Compêndio brasileiro de alimentação animal**. Sindirações, 2013.

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

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. **Anuário 2014 do Setor Cervejeiro**. Disponível em <<http://www.cervbrasil.org.br/>> Acesso em: 8 jun. 2015.

CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, Â. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 7, n. 3, p. 20-22, 2012.

CORRÊA, J. L. G. **Discussão de Parâmetros de Projeto de Secadores Ciclônicos**. 2003. 169 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2003.

CORREIA, R.; MAGALHÃES, M.; MACÊDO, G. Protein enrichment of pineapple waste with *Saccharomyces cerevisiae* by solid state bioprocessing. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v. 66, p. 259-262, 2007.

DRAGONE, G. **Fermentação primária para produção de cervejas de altas densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte**. 2007. 140 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2007.

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise de solo**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. 212 p.

FAO. Food energy – methods of analysis and conversion factors. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, 2003.

HSU, P. K.; LIU, C. P.; LIU, L. Y.; CHANG, C. H.; YANG, S. S. Protein enrichment and digestion improvement of napiergrass and pangolagrass with solid-state fermentation. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v. 46, p. 171-179, 2013.

KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Lipase Production in Solid-State Fermentation (SSF): Recent Developments and Biotechnological Applications. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, Takamatsu, v. 6, p. 13-27, 2012.

LAREO, C.; SPOSITO, A. F. ; BOSSIO, A. L. ; VOLPE, D. C. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 38, p. 391-399, 2006.

LIMA, T. **Modelo de inferência para a estimação da umidade do leito de um biorreator de fermentação no estado sólido**. 2009. 166 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

MIRANDA, J. C. **Bioconversão energética da folha e bagaço de mandioca pelo fungo *Rhizopus oligosporus* para obtenção de alimento funcional**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP, 2014.

MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 94, n.7, p. 1264-1275, 2014.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 81, p. 268-274, 2006.

OGUNJOBI, A. A.; MEJEHA, O. K.; FAGADE, O. E. Protein Enrichment of Brewery Spent Grains Using *Aspergillus oryzae*. **AU Journal of Technology**, Bangkok, v. 15, n. 1, p. 53-56, jul., 2011.

OLIVEIRA, M. A.; DONEGA, M. A.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet – CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 84-87, 2007.

PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; TEIXEIRA JÚNIOR, A.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M. Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 34, n. 2, p. 193-200, 2012.

SABU, A.; SARITA, S.; PANDEY, A.; BOGAR, B.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R. Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Amsterdam, v. 102-103, p. 251-260, 2002.

SANTOS, V. M. C. S. **Contribuição ao estudo da produção de *Pleurotus spp.* Em resíduos lignocelulósicos**. Dissertação de Mestrado. 2000. 141 f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.4, p. 805-811, 2007.

STEINER, J.; PROCOPIO, S.; BECKER, T. Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 303-315, 2015.

SUHET, M. I.; FIOREZE, R. Produção de proteína unicelular a partir do resíduo da industrialização do abacaxi utilizando fermentação em estado semissólido. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 05, n. 02: p. 584-592, 2011.

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C. S.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J. L. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 04, p.487-493, 2009.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 98, p. 1-12, 2002.

WAHAB, K. A.; SHAHEDUR, R. M.; TAKASHI, A. Application of malt residue in submerged fermentation of *Bacillus subtilis*. **Journal of Environmental Sciences Supplement**, p. 33-35, 2009.

CAPÍTULO 3

ARTIGO 2: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE MALTE POR *Rhizopus oligosporus* E ADIÇÃO NA ALIMENTAÇÃO DE *Oreochromis niloticus*

RESUMO

O aproveitamento de subprodutos pelo emprego da fermentação em estado sólido tem recebido considerável atenção por parte da indústria alimentícia, por ser uma alternativa prática e promissora para aumentar o teor proteico e o valor nutritivo dos subprodutos do processamento industrial. Diante disso, o objetivo do trabalho foi o enriquecimento proteico do bagaço de malte por fermentação em estado sólido pelo fungo *Rhizopus oligosporus* e adição em dietas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados 120 juvenis, distribuídos em 24 caixas que representa os seis níveis de adição (0, 2, 4, 6, 8 e 10%) do bagaço de malte fermentado e quatro repetições de cada tratamento. Os peixes foram alimentados com ração peletizada durante 67 dias e avaliados quanto ao desempenho produtivo, o peso final, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico, sobrevivência, índice de gordura visceral, índice hepatossomático e parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue. Não houve diferença significativa nos parâmetros de desempenho produtivo e parâmetros hematológicos e bioquímicos dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A proteína produzida pelo fungo filamentosso *Rhizopus oligosporus* durante enriquecimento proteico do bagaço de malte permite sua utilização como suplemento proteico em dietas para juvenis de tilápia do Nilo, com adição de até 10%, sem comprometer o desempenho produtivo e parâmetros sanguíneos da espécie, representando um destino útil para o subproduto.

Palavras chave: *single cell protein*, fermentação em estado sólido, alimentação de peixes tilápia do Nilo, resíduos agroindustriais.

SOLID STATE FERMENTATION OF SPENT MALT BY *Rhizopus oligosporus* AND ADDITION ON *Oreochromis niloticus* FEEDING

ABSTRACT

The use of by-products through solid state fermentation has received considerable attention from the food industry, as a practical and promising alternative to increase the protein content and nutritional value of by-products from industrial processing. Thus, this study was aimed at protein enrichment of brewery spent grain by solid state fermentation with fungus *Rhizopus oligosporus* to be added in diets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). One hundred and twenty juveniles were used, distributed in 24 boxes representing the six levels of addition (0, 2, 4, 6, 8 and 10%) of fermented brewery spent grain and four replications of each treatment. Fish were fed with pelleted feed for 67 days and evaluated for productive performance, final weight, weight gain, feed intake, apparent feed conversion, specific growth rate, survival, visceral fat index, hepatosomatic index, hematological parameters and blood biochemistry. There was no significant difference in productive performance, hematological and biochemical parameters of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The protein produced by filamentous fungus *Rhizopus oligosporus* during protein enrichment of brewery spent grain allows its use as a protein supplement in diets for juvenile Nile tilapia, with the addition of up to 10% without compromising productive performance and blood parameters of the species, representing a useful destination for this by-product.

Keywords: Single cell protein; state solid fermentation, fish feeding; Nile tilapia; agroindustrial residues.

1 INTRODUÇÃO

O bagaço de malte representa aproximadamente 85% dos resíduos sólidos gerados em uma cervejaria. Rico em fibras e sais minerais, este subproduto é gerado após a separação do mosto cervejeiro (MUSSATTO, 2014; STEINER; PROCOPIO; BECKER, 2015). Este resíduo geralmente é doado para agricultores para utilizá-lo como adubo orgânico ou como suplemento alimentar em dietas para ruminantes, no entanto, estudos têm sido realizados buscando a valoração deste resíduo.

É rico em fibras e sais minerais, mas pobre em proteínas, o que muitas vezes limita sua aplicação em dietas de animais que não sejam ruminantes, no entanto, pelo cultivo de micro-organismos como os fungos filamentosos que possuem versatilidade em sua adaptação, é possível aumentar o conteúdo proteico deste material pela bioconversão de nutrientes do bagaço de malte em proteína microbiana, possibilitando sua aplicação como suplemento em dietas de animais de pequeno porte, como no caso da alimentação de peixes.

Bagaço de maçã (VENDRUSCOLO et al., 2009), bagaço de cana-de-açúcar (APÁS et al., 2008), sorgo (HONGZHANG et al., 2012), abacaxi (SUHET; FIOREZE, 2011), mangaba (CORREIA; AQUINO, 2012), caju (HOLANDA et al., 1998), tomate (ABDOLLAHZADEH et al., 2010) e mandioca (BOONOP et al., 2009) têm sido utilizado como substratos no enriquecimento proteico destes materiais visando à suplementação em dietas para animais.

O processo de enriquecimento proteico em subprodutos agroindustriais pode ser realizado pela fermentação sólida, que possibilita a utilização desses subprodutos como substrato para o desenvolvimento de micro-organismos (KUMAR; KANWAR, 2012), a fim de obter produtos com maior valor nutritivo, especialmente em relação aos teores de proteína e vitaminas, e com o aumento da digestibilidade (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO; MITCHELL, 2002). A produção de *single cell protein* para alimentação animal está sendo considerada como uma via de produção de alimentos alternativos, as quais eliminam as restrições sazonais e variações climáticas que existem em muitas safras agrícolas, pois a seleção de micro-organismos pode ser baseada no valor nutricional e no conteúdo proteico (ARAÚJO et al., 2009).

A alimentação dos peixes é um dos aspectos de maior importância na aquicultura, pois apresenta relação direta com o desempenho, saúde e custos de produção. Tilápias apresentam grande habilidade em digerir e aproveitar alguns destes alimentos alternativos, sendo que dietas formuladas quase que exclusivamente com produtos de origem vegetal, têm sido usadas sem prejuízo ao seu desempenho (KUBITZA, 2011). O desempenho da tilápia do Nilo depende dos ingredientes utilizados, além dos aspectos técnicos. Portanto, a busca por ingredientes alternativos, bem como a sua concentração torna-se muito importante, quando se pretende avaliar a inclusão de um novo ingrediente na ração (PIMENTA et al., 2011).

Com o intuito de estudar a utilização de alimentos alternativos na substituição de ingredientes tradicionais em dietas para peixes, o objetivo deste trabalho foi enriquecer proteicamente o bagaço de malte pelo cultivo do fungo filamentoso *Rhizopus oligosporus* em fermentação em estado sólido e adicionar o material fermentado em dietas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho pode ser dividido em três etapas: i – preparo do bagaço de malte (BM); ii – enriquecimento proteico do bagaço de malte por *Rhizopus oligosporus*; e iii – Realização de testes biológicos em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A Figura 1 representa o fluxograma geral do processo de fermentação em estado sólido do bagaço de malte para adição em ração de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

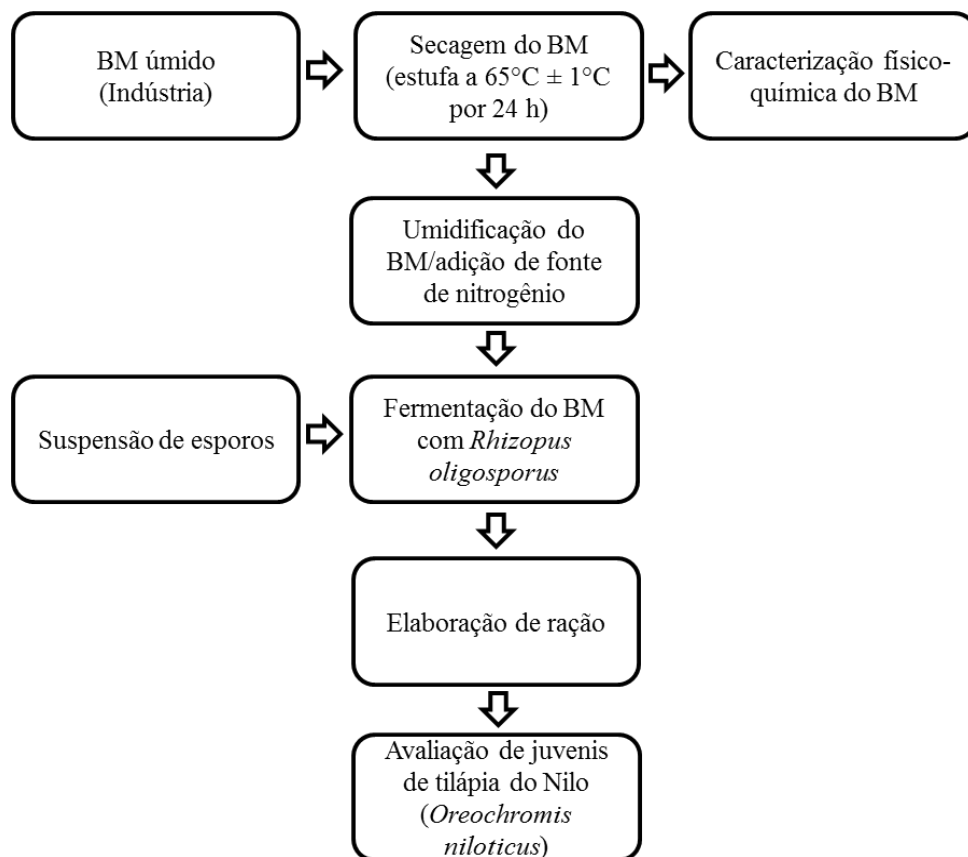


Figura 1. Fluxograma geral do processo de fermentação em estado sólido do bagaço de malte para adição em dietas de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2.1 Preparo do bagaço de malte

O bagaço de malte foi cedido pela empresa Reall Chopp, microcervejaria localizada no município de Goiânia – GO. O material úmido foi desidratado em estufa com circulação de ar, a 65°C ± 1°C por 24 horas (~10% base úmida), e armazenado em sacos de polietileno de

baixa densidade (PEBD), em *freezer* a -20°C . Para realização dos experimentos o bagaço de malte foi descongelado até atingir temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

2.2 Fermentação em estado sólido

O fungo filamentosso *Rhizopus oligosporus* CCT 4134, foi obtido da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello localizada no município de Campinas – SP. A manutenção da linhagem foi realizada em tubos de ensaio contendo meio ágar batata dextrose (PDA) inclinado, incubados em estufa BOD a 25°C por um período de 7 dias e armazenados em refrigerador a 4°C para uso posterior, sendo repicado a cada 30 dias.

A obtenção do inóculo foi realizada segundo metodologia proposta por Ogunjobi, Mejeha e Fagade (2011) e Paris et al. (2012). O micro-organismo, mantido em tubos de ensaio contendo PDA, foi transferido para garrafas de Roux contendo 150 mL do meio de cultura PDA, previamente autoclavadas (121°C por 15 min) e incubadas a 25°C por 7 dias. Os esporos foram raspados da superfície das garrafas com água destilada estéril, sendo em seguida filtrado em gaze estéril, recuperados em frasco e mantidos a 4°C . A concentração de esporos na suspensão foi estimada pela contagem em Câmara de Neubauer.

O bagaço de malte foi umidificado com água destilada até 70% contendo sulfato de amônio, levando-se em consideração a adição de 1% de N (1 g de nitrogênio para cada 100 g de bagaço de malte seco). Cerca de 300 g de bagaço de malte úmido foram colocados em frascos de *Erlenmeyer* de 1000 mL, cobertos com tampão de algodão, esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min e resfriados a temperatura ambiente. O meio de cultivo foi inoculado com 2×10^6 esporos g^{-1} de meio seco. Os frascos foram agitados manualmente para homogeneização e acondicionados em estufa a 25°C por 7 dias. O bagaço de malte fermentado foi desidratado em estufa, a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas ou até atingir umidade inferior a 10% (base úmida), moído em liquidificador, até obtenção de pó, e armazenado em sacos de polietileno de baixa densidade a -20°C .

2.3 Preparo das dietas

Foram elaboradas seis dietas isoproteicas com 36% de proteína (Tabela 1) contendo 0, 2, 4, 6, 8 e 10% de bagaço de malte fermentado pelo *R. oligosporus*. As dietas foram

formuladas com o software *Super Crac* e após pesagem e homogeneização dos ingredientes foi adicionada água a 55°C na proporção de 40% (v/p). A mistura foi peletizada em picador de carne (CAF, modelo 22 S, ciclagem 60 Hz) e desidratada em estufa com ventilação forçada a 55°C ± 1°C, durante 24 horas, sendo posteriormente desintegrada em diâmetros entre 4 e 5 mm e armazenadas em sacos de polietileno de baixa densidade a -20°C.

A fonte proteica da ração foi de origem vegetal, com seis níveis crescentes de adição do bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10%, constituindo os tratamentos R0, R2, R4, R6, R8 e R10, respectivamente.

Tabela 1. Composição das dietas administradas aos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Ingrediente (g 100g ⁻¹)	R0	R2	R4	R6	R8	R10
Farelo de Soja	55,41	54,50	53,58	52,59	51,76	50,84
Farelo de Trigo	33,90	32,41	30,91	29,54	27,92	26,43
Bagaço de malte fermentado	0,00	2,00	4,00	6,00	8,00	10,00
Óleo de soja	4,37	4,76	5,15	5,56	5,93	6,32
Fosfato bicálcico	2,41	2,41	2,41	2,41	2,41	2,41
Calcário calcítico	1,77	1,78	1,79	1,75	1,81	1,82
Premix	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
DL-metionina	0,67	0,68	0,69	0,68	0,71	0,72
L-lisina HCl	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
L-triptofano	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Butil hidroxi tolueno	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Sal (NaCl)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

2.4 Testes biológicos

Os experimentos foram conduzidos por 67 dias, no período de maio a agosto de 2015, no Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Goiás (UFG), no município de Goiânia – Goiás, que se localiza a uma latitude sul de 16° 40' 22" e longitude de 49°15' 29" a oeste de Greenwich, com altitude média de 730 m.

Foram utilizados 120 juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), revertidos sexualmente, com peso médio de 68 ± 5 g, distribuídos aleatoriamente em 24 unidades experimentais (seis tratamentos com quatro repetições). Cada unidade experimental foi representada por uma caixa de polipropileno (780 x 560 x 410 mm) com capacidade total de

130 L cada, providas de fluxo individual para troca total da água com vazão de 100 L h^{-1} . O sistema de produção de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) está representado na Figura 2. Os tanques foram instalados a céu aberto, cobertos com tela para evitar predadores e conter os peixes. A água utilizada era proveniente de uma represa da UFG, conduzida por tubulação e estocada em uma caixa d'água e distribuída para as caixas após passagem pelo filtro de brita.

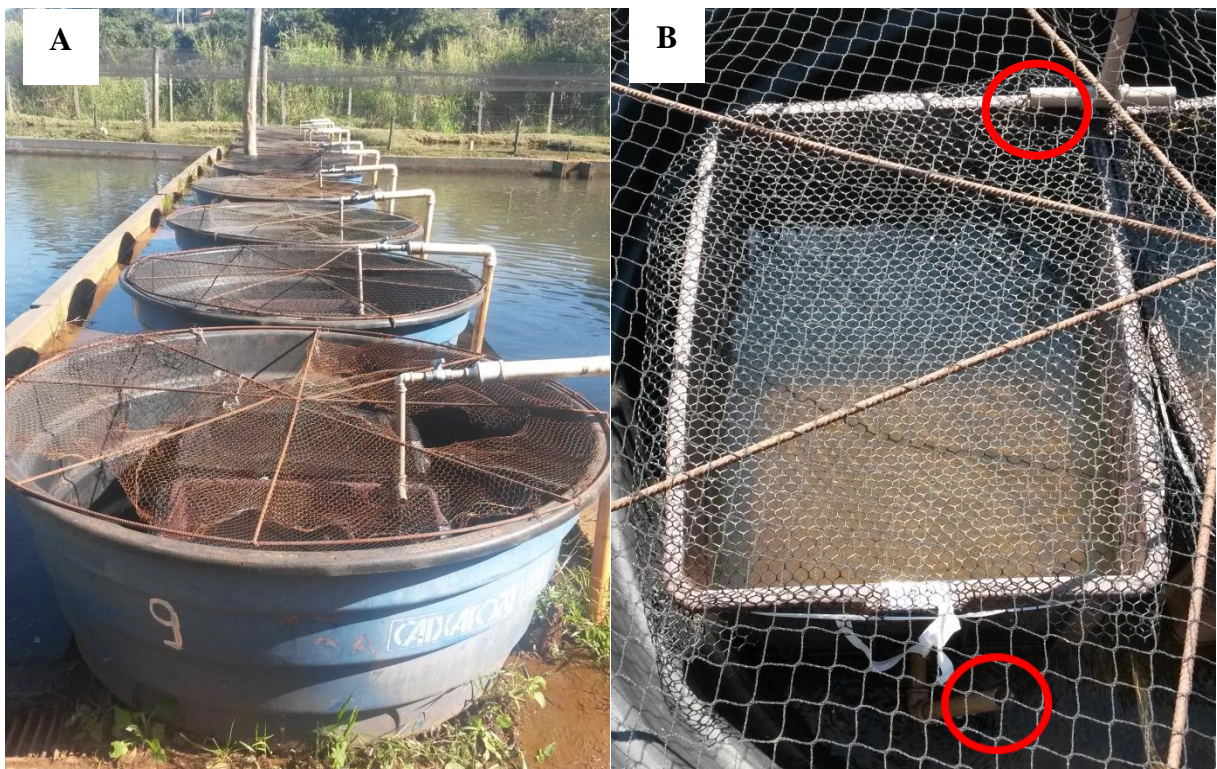


Figura 2. (A) Tanques distribuídos a céu aberto com caixas internas onde se realizou o experimento. (B) detalhe da entrada e saída de água da caixa interna.

Os juvenis de tilápia foram alimentados *ad libitum*, duas vezes por dia, as 9h00min e as 16h00min por arraçamento manual, determinando como momento de saciedade aparente quando os peixes apresentavam pouca atividade na superfície da água. O consumo das rações foi controlado por pesagem da ração oferecida, mensurado diariamente por meio da pesagem do recipiente utilizado no armazenamento da ração e individualmente designado para cada unidade experimental. A limpeza das caixas foi realizada a cada três dias por meio de sifonagem, com renovação de 30% da água, para retirar excesso de ração e fezes acumuladas. O trabalho foi executado de acordo com as normas éticas para pesquisa envolvendo animais e foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG, registrado sob Protocolo n. 081/14.

2.4.1 Parâmetros biométricos

A cada quinze dias os peixes permaneceram em jejum por 12 horas, para realização da biometria. Todos os peixes foram pesados e medidos individualmente para avaliar o ganho de peso, comprimento, altura, biomassa, taxa de sobrevivência e taxa de conversão alimentar. A pesagem foi feita em balança (Urano, POP-S 20/2) e o comprimento (extremidade cranial até o pedúnculo caudal) e atura foram medidas com paquímetro digital. Os peixes que ocasionalmente morreram foram pesados, sendo o peso utilizado para a correção do consumo de ração e do índice de conversão alimentar aparente. O ganho de peso médio foi calculado pela diferença entre o peso inicial e peso final dos peixes de cada unidade experimental. O consumo de ração por unidade foi obtido pela quantidade da ração pesada durante o experimento, corrigido pela mortalidade. A conversão alimentar aparente foi determinada pela razão do consumo de ração pelo ganho de peso médio. A taxa de crescimento específico em peso ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ao dia) foi determinada pelo $[(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) \div \text{período}] \times 100$. O índice de gordura visceral foi determinado pela razão do peso da gordura pelo peso do peixe, multiplicado por 100, e o índice hepatossomático pela razão do peso do fígado pelo peso do peixe, multiplicado por 100. A taxa de sobrevivência foi determinada pela razão entre o número final e o número inicial de peixes, multiplicado por 100.

2.4.2 Análises sanguíneas

Ao término do experimento, os peixes permaneceram em jejum por 24 horas para o esvaziamento do trato digestivo e foi utilizado um peixe de cada caixa para insensibilização por eugenol (50 mg L^{-1}) e, após estarem completamente sedados, foram realizadas as coletas de sangue por punção no vaso caudal, com auxílio de seringas descartáveis de 5 mL sem anticoagulantes para determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Uma alíquota foi transferida pra microtubos (Guangzhou Improve Medical Instruments, Guangzhou, China) de 0,5 mL contendo EDTA K2 para determinação dos parâmetros hematológicos. A contagem do número de eritrócitos e leucócitos foi realizada pelo método do hemocítômetro, em câmara de Neubauer, com solução de Natt e Harick (1952). A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, com o kit comercial (Doles[®], Goiânia, GO), por análise colorimétrica, e seguindo as recomendações de Santos (2011), ao indicar que logo após o repouso da diluição para a determinação da hemoglobina os tubos devem e foram centrifugados a 2500 rmp por cinco minutos, em seguida encaminhados para a leitura em espectrofotômetro, neste caso, o semiautomático modelo BIO 2000 (BIOPLUS[®], Barueri, São Paulo), essa centrifugação

previa é necessária na intenção de minimizar as interferências de possíveis resíduos de parasitas e de restos nucleares que podem ficar dispersos no preparo e durante a realização da leitura. A percentagem de hematócrito (Htc) foi determinada pelo método do microhematócrito, de acordo com Goldenfarb et al. (1971) e Santos (2011). Posteriormente, foram calculados os índices hematimétricos, conforme Wintrobe (1934), como descritos a seguir: Volume corpuscular médio [$VCM = (Htc \times 10)/eritrócitos$]; hemoglobina corpuscular média [$HCM = (Hb \times 10)/eritrócitos$]; concentração de hemoglobina corpuscular média [$CHCM = (Hb/Htc) \times 100$]. A diferenciação dos leucócitos (heterófilos, eosinófilo, basófilo, linfócitos, e monócitos), contagem de trombócitos e avaliação da morfologia das hemácias, foram obtidas mediante leitura dos esfregaços sanguíneos corados com corante hematológico Panótico rápido. A contagem diferencial foi realizada em microscópio utilizando-se aumento 100x em óleo de imersão. Outra alíquota de sangue foi transferida pra tubos para coleta de sangue de 4ml com gel separador (Zhejiang Gongdong Medical Plastic Factory, Zhejiang, China), logo após a espera de 30 minutos para o início da retração do coágulo os tubos foram acondicionados em macrocentrífuga refrigerada para a centrifugação à 2800 rpm por 5 minutos à temperatura de 25°C, para a obtenção do soro e realização das análises bioquímicas: albumina, colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos, cálcio, fósforo, proteína, glicose, ureia, creatinina e ácido úrico, todos determinados por ensaio enzimático-colorimétrico com kits comerciais padronizados (Labtest[®], Lagoa Santa, MG) e imediatamente foram analisadas em analisador bioquímico automático modelo CM 200 (Wiener lab[®], Rosário, Argentina).

2.4.3 Análise do fígado e filé

Ao término do experimento, os peixes permaneceram em jejum por 24 horas para o esvaziamento do trato digestivo e um peixe de cada caixa foi selecionado aleatoriamente e insensibilizado em água e gelo, na proporção de 1:1 (0°C). Os peixes foram pesados e sacrificados por demedulação, abertos ventralmente para retirada das vísceras e dissecação dos órgãos. O fígado e a gordura visceral foram removidos e pesados. Os dados referentes aos pesos dos órgãos foram utilizados para calcular o índice hepatossomático e o índice de gordura visceral.

Proteínas totais e lipídeos foram quantificados no fígado e no tecido muscular que foi retirado da lateral esquerda, acima da linha lateral, com dimensões aproximadas de 20 x 10 mm, sendo congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em *ultrafreezer* (Panasonic, MDF-U56VC) a -80°C. A concentração de proteínas foi determinada pelo

método de Lowry, Rosebrough e Farr (1951) após precipitação e solubilização das proteínas totais segundo metodologia empregada por Milligan e Girard (1993). A absorbância lida foi comparada a uma curva padrão de soroalbumina bovina (Sigma-Aldrich). Os lipídeos totais foram extraídos de acordo com a metodologia de Folch, Less e Stanley (1957) adaptada por Parrish (1999) para amostras de organismos aquáticos. A partir desse extrato os lipídeos totais foram determinados pelo método de Frings et al., (1972), utilizando-se como padrão óleo de fígado de bacalhau (Sigma-Aldrich). A fim de avaliar as alterações de proteína e lipídeos nos tecidos musculares e hepáticos, compararam-se os resultados obtidos no experimento a peixes alimentados, nas mesmas condições experimentais, com ração comercial (VB Alimentos), denominados como tratamento RC.

2.4.4 Qualidade da água

A água dos tanques foi monitorada diariamente quanto à temperatura e semanalmente quanto ao pH, oxigênio dissolvido e amônia total. O pH foi determinado diretamente em potenciômetro (MPA210, Instrutemp, Belenzinho, São Paulo), o oxigênio dissolvido foi medido em oxímetro digital (Alfakit, AT 150), a amônia foi quantificada pela utilização de kits colorimétricos (Spectro Kit Amônia Indotest – Cód. 2542) e a temperatura foi medida com termômetro com bulbo de mercúrio.

2.5 Determinações analíticas

2.5.1 Composição proximal

O bagaço de malte não fermentado, o bagaço de malte fermentado e as dietas foram submetidos à determinação da composição proximal. A umidade foi determinada por método gravimétrico em estufa de secagem (ES1A, Olidef CZ, Ribeirão Preto, São Paulo) a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ até peso constante. Cinzas foram determinadas pelo método de incineração em mufla (200F, Magnu's, Belo Horizonte, Minas Gerais) a $550^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ por 6 horas. O pH foi determinado pela adição de 1 g em 10 mL de água destilada e após agitação foi realizada a leitura em potenciômetro (MPA210, Instrutemp, Belenzinho, São Paulo). Proteína bruta foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl, multiplicando o valor obtido de nitrogênio total por 6,25. Lipídeos foram quantificados em Soxhlet (MA486, Marconi, Piracicaba, São Paulo) usando como solvente éter de petróleo. O teor de carboidratos foi obtido por diferença, subtraindo-se de cem os valores obtidos de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibras.

Todas as metodologias seguiram as recomendações da AOAC (2005). O valor energético foi estimado de acordo com os valores de conversão de *ATWATER*: 4 kcal g⁻¹ para carboidratos e proteínas e 9 kcal g⁻¹ para lipídeos (FAO, 2003).

A determinação de fibra bruta foi realizada a partir de uma amostra seca, a qual foi submetida à digestão em béquer com uma solução de 200 mL de ácido sulfúrico 1,25% em ebulição por 30 min, filtrado sob vácuo em funil de Buchner provido de tela de náilon, com lavagens sucessivas do resíduo com água fervente até completa neutralização e, posteriormente, seguiu a digestão em béquer com uma solução de 200 mL de hidróxido de sódio 1,25% em ebulição por 30 min. O material foi filtrado sob vácuo em cadinho de Gooch e lavado com água fervente, e em seguida com aproximadamente 20 mL de álcool etílico e 20 mL de acetona. O resíduo resultante foi levado em estufa a 105 °C até peso constante (4 a 6 horas) e em seguida incinerado em mufla à temperatura de 550 °C ± 10°C por 2 horas (BRASIL, 2013).

2.5.2 Minerais

Para a quantificação da concentração de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, cobre e zinco, o bagaço de malte foi digerido com ácido nitroperclórico. A determinação de Fe, Mn, Cu e Zn foram realizadas diretamente nos extratos nitroperclóricos em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer 3110, Waltham, Massachusetts, USA). Cálcio e magnésio e foram determinados em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer 3110, Waltham, Massachusetts, USA) com lâmpada de cátodo oco de cálcio-magnésio, com adição de lantânio para prevenir interferências ocasionais pela presença de fosfatos e de alumínio e o fósforo foi quantificado pelo método espectrométrico azul em espectrofotômetro de absorção atômica. A quantificação de potássio foi realizada em fotômetro de chama (FC180, Celm, São Caetano do Sul, São Paulo) (EMBRAPA, 1997).

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos dos experimentos foram analisados estatisticamente por análise de variância e as médias de cada tratamento foram comparadas pelo teste Tukey, adotando nível de significância de 5% de probabilidade, utilizando o programa *Assistat 7.7*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição do bagaço não fermentado e do bagaço fermentado pelo *Rhizopus oligosporus* está apresentada na Tabela 2. A fermentação em estado sólido do bagaço de malte por *R. oligosporus* apresentou maior quantidades de proteína bruta e fibra bruta, representando aumento proteico de 1,8 vezes em relação ao bagaço de malte não fermentado, por outro lado percebe-se a redução na concentração de carboidratos de $60,01 \pm 0,32 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ para $39,10 \pm 0,57 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, resultado da atividade microbiana no substrato sólido. Resultados semelhantes de aumento de proteína por fermentação em estado sólido são apresentados por Silveira e Furlong (2007), Campos et al. (2005) e Ogunjobi, Mejeha e Fagade (2011). Os resultados de minerais do bagaço de malte foram semelhantes aos apresentados por Mussatto e Roberto (2006). As diferenças apresentadas entre os valores obtidos neste estudo e os da literatura são perfeitamente compreensíveis quando se sabe que a composição centesimal do bagaço de malte é função de diversos fatores, tais como: variedade da cevada, o tempo de colheita, os cereais utilizados na maltagem, o processo tecnológico empregado na cervejaria.

Tabela 2. Composição do bagaço de malte desidratado e do bagaço de malte fermentado com *Rhizopus oligosporus* CCT 4134.

Componente (g 100g ⁻¹)	BM	BMF
Umidade	4,64 ± 0,02	6,01 ± 0,07
Proteína bruta	17,96 ± 0,21	32,90 ± 0,63
Extrato etéreo	4,21 ± 0,05	3,50 ± 0,12
Cinzas	3,41 ± 0,04	3,88 ± 0,02
Fibra Bruta	9,77 ± 0,30	14,6 ± 0,70
Carboidrato	60,01 ± 0,32	39,10 ± 0,57
Cálcio	0,05	0,06
Fósforo	1,01	1,07
Magnésio	0,19	0,24
Potássio	2,66	2,10
Cobre	0,05	0,06
Ferro	0,28	0,19
Manganês	0,03	0,04
Zinco	0,02	0,02
Valor Energético (Kcal g ⁻¹)	349, 81 ± 1,56	319,52 ± 1,68

BM – Bagaço de malte; BMF – Bagaço de malte fermentado por *R. oligosporus*. Resultados expressos em base seca.

A composição proximal das diferentes dietas para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com adição do bagaço de malte fermentado por *R. oligosporus* nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10% está apresentada na Tabela 3. As dietas foram balanceadas quanto aos níveis exigidos e não teve diferença significativa quanto aos teores de umidade, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta, fósforo e nutrientes digestíveis totais.

As respostas biométricas de massa corpórea, comprimento e altura estão apresentadas nas Figuras 3, 4 e 5, respectivamente. Essas variáveis não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, porém os indivíduos do grupo controle (R0) apresentaram maiores valores em relação aos outros tratamentos, o que pode ser explicado pela maior taxa de mortalidade (Tabela 4), resultando como sobreviventes peixes com desempenho maior. A ausência de diferença entre os tratamentos quanto à massa corpórea pode ser explicada pela grande variação dos dados, visualizada pelos coeficientes de variação quase sempre iguais ou superiores a 10%. Esse crescimento heterogêneo pode ser explicado pela hierarquia de dominância da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de confrontos agressivos gerando estresse social, sendo os submissos mais afetados pelo estresse que os dominantes, podendo haver redução do crescimento do submisso devido ao aumento da taxa metabólica (CORRÊA et al., 2003).

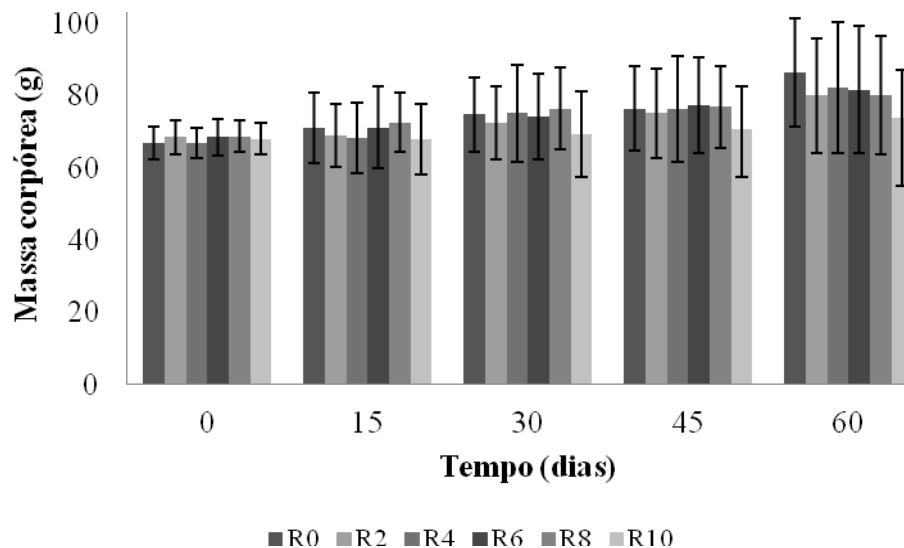


Figura 3. Média e desvio padrão da massa corpórea dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas às dietas contendo diferentes quantidades de bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134.

Tabela 3. Composição proximal das dietas para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com adição do bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10%.

Componente (g 100g ⁻¹)	Tratamentos					
	R0	R2	R4	R6	R8	R10
Umidade	4,60 ± 0,14 ^a	4,35 ± 0,21 ^a	4,80 ± 0,28 ^a	4,30 ± 0,14 ^a	4,20 ± 0,14 ^a	4,55 ± 0,07 ^a
Proteína Bruta	36,05 ± 0,64 ^a	35,25 ± 1,06 ^a	36,25 ± 0,35 ^a	37,25 ± 1,06 ^a	37,15 ± 0,49 ^a	35,10 ± 1,27 ^a
Extrato etéreo	6,80 ± 0,14 ^a	6,45 ± 0,49 ^a	6,40 ± 0,28 ^a	6,65 ± 0,35 ^a	6,80 ± 0,28 ^a	7,30 ± 0,14 ^a
Fibra Bruta	4,75 ± 0,07 ^a	4,70 ± 0,14 ^a	5,00 ± 0,14 ^a	5,05 ± 0,07 ^a	4,80 ± 0,14 ^a	5,15 ± 0,21 ^a
Cinzas	8,05 ± 0,07 ^{ab}	8,15 ± 0,07 ^{ab}	7,85 ± 0,07 ^b	8,20 ± 0,14 ^{ab}	8,30 ± 0,14 ^a	8,10 ± 0,14 ^{ab}
Cálcio	1,52 ± 0,02 ^c	1,75 ± 0,07 ^{ab}	1,63 ± 0,04 ^{bc}	1,55 ± 0,07 ^c	1,83 ± 0,04 ^a	1,64 ± 0,03 ^{abc}
Fósforo	1,24 ± 0,01 ^a	1,25 ± 0,07 ^a	1,20 ± 0,03 ^a	1,27 ± 0,02 ^a	1,21 ± 0,01 ^a	1,22 ± 0,03 ^a
NDT	80,25 ± 0,21 ^a	80,10 ± 0,71 ^a	79,60 ± 0,42 ^a	79,95 ± 0,49 ^a	80,25 ± 0,21 ^a	80,55 ± 0,21 ^a
Carboidrato (g 100g ⁻¹)	39,75 ± 0,49 ^a	41,10 ± 0,71 ^a	39,70 ± 0,14 ^a	38,55 ± 0,78 ^a	38,75 ± 0,07 ^a	39,80 ± 1,13 ^a
Valor Energético (kcal kg ⁻¹)	3644,00 ± 7,07 ^a	3634,50 ± 30,41 ^a	3614,00 ± 16,97 ^a	3630,50 ± 20,51 ^a	3648,00 ± 8,49 ^a	3653,00 ± 7,07 ^a

Resultados expressos em base seca. NDT (Nutrientes Digestíveis Totais) = (Proteína Digestiva + Fibra Bruta + Extrato Etéreo Digestivo + Extrato Não Nitrogenado Digestivo). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. n = 4.

Tabela 4. Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com as diferentes rações ao final de 67 dias.

Variáveis	Tratamentos					
	R0	R2	R4	R6	R8	R10
Peso final (g)	88,50 ± 6,61	80,00 ± 7,20	81,83 ± 9,98	86,20 ± 12,96	79,97 ± 11,05	78,98 ± 13,90
Ganho de peso (g)	21,60 ± 7,04	16,13 ± 5,33	20,73 ± 5,90	11,87 ± 6,58	14,36 ± 8,61	15,97 ± 11,80
Consumo de ração (g peixe ⁻¹)	46,18 ± 6,52	60,49 ± 11,27	51,48 ± 17,77	53,55 ± 11,32	54,53 ± 11,01	48,46 ± 6,03
Conversão alimentar aparente	2,40 ± 1,00	4,10 ± 0,70	2,70 ± 0,80	3,00 ± 1,50	5,10 ± 2,70	5,00 ± 3,90
TCE (g 100g ⁻¹ ao dia)	0,41 ± 0,12	0,32 ± 0,10	0,41 ± 0,11	0,41 ± 0,18	0,35 ± 0,11	0,40 ± 0,19
Índice de gordura visceral (g 100g ⁻¹)	0,46 ± 0,33	0,40 ± 0,32	0,42 ± 0,24	0,32 ± 0,23	0,32 ± 0,17	0,33 ± 0,21
Índice hepatossomático (g 100g ⁻¹)	1,21 ± 0,17	1,00 ± 0,16	1,11 ± 0,15	0,94 ± 0,14	1,10 ± 0,22	1,03 ± 0,26
Taxa de sobrevivência (%)	45	100	60	60	100	60

TCE – taxa de crescimento específico. n = 20. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e as médias não diferiram estatisticamente entre si.

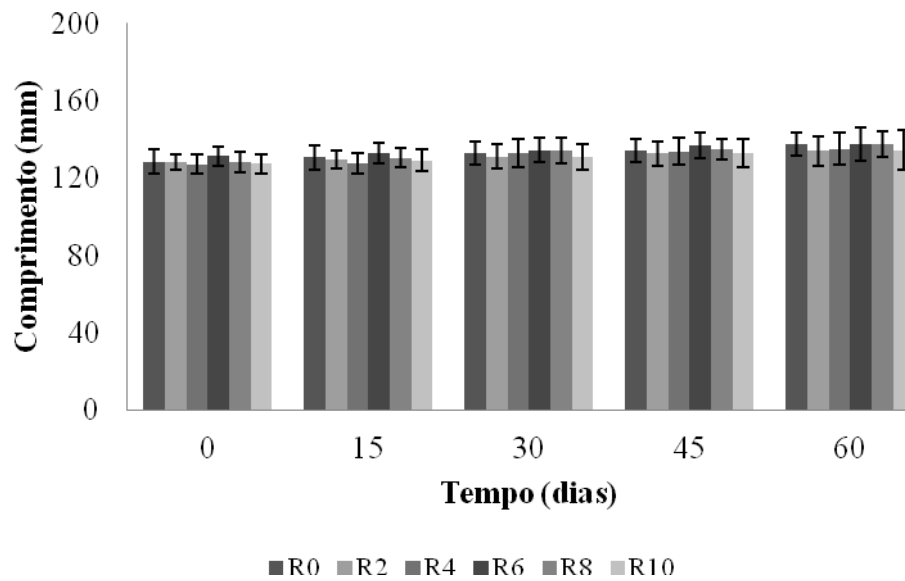


Figura 4. Média e desvio padrão do comprimento padrão dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas às dietas contendo diferentes quantidades de bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134.

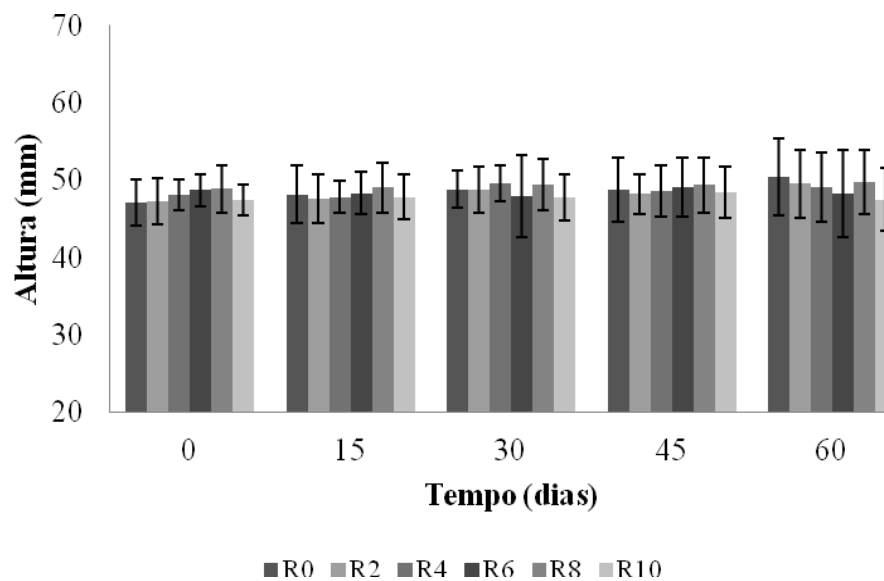


Figura 5. Média e desvio padrão da altura dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas às dietas contendo diferentes quantidades de bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134.

A água foi monitorada durante todo o período experimental (Figura 6). A temperatura média foi de $22,5^{\circ}\text{C} \pm 1,7^{\circ}\text{C}$, com média de $21,3 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ às 9 horas e $23,7 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ às 16 horas, valor abaixo do ideal para a criação de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que apresenta conforto térmico entre 26 e 30°C . A temperatura da água foi diretamente influenciada pela temperatura ambiental, observando médias inferiores entre as biometrias de 30 e 45 dias, o que ocasionou menor consumo de ração e, conseqüentemente, menor desenvolvimento dos peixes, quanto à massa corpórea, comprimento e altura. Resultados semelhantes foram observados por Ribeiro et al. (2012), nos meses de inverno, avaliando o crescimento de tilápia do Nilo, demonstrando a influência desta variável no crescimento dos animais. Os valores médios de pH, oxigênio dissolvido e amônia total foram $6,59 \pm 0,34$; $6,39 \pm 0,55 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,08 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Todos os parâmetros analisados, com exceção da temperatura, mantiveram-se dentro da faixa de conforto para a espécie, conforme estabelecida por Kubitzka (2011). Os dados obtidos indicam que os tratamentos que receberam a adição do bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* não apresentou mudança na qualidade da água, pois não diferiu significativamente em relação ao tratamento R0. A manutenção da boa qualidade da água pode ter sido decorrente da renovação do volume total das caixas, em 60 minutos, suficiente para arrastar os metabólitos totais.

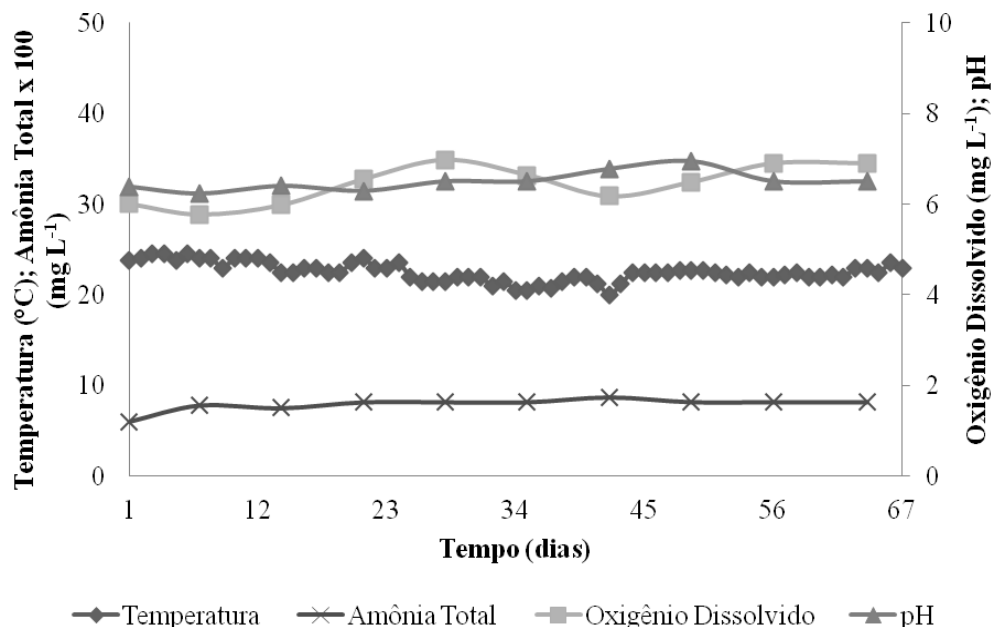


Figura 6. Variação dos parâmetros de qualidade da água durante o período experimental.

A inclusão de até 10% de bagaço de malte fermentado por *R. oligosporus* em dietas para tilápias do Nilo não alterou significativamente os resultados de ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico, gordura visceral e índice hepatossomático (Tabela 4), fato esse pode ser explicado, pois as dietas têm composições nutricionais semelhantes. Porém, observou-se menor conversão alimentar em níveis maiores de inclusão do bagaço de malte. O mesmo comportamento foi observado por Santos et al. (2009) na inclusão de farelo de coco em rações para alevinos de tilápia do Nilo, explicado por Baccarin e Pezzato (2001) por reduzir ou alterar o valor nutricional da dieta, provavelmente em virtude da falta de suplementação vitamínica, pois alimentos de baixo valor nutricional proporcionam aumento no consumo alimentar, mas com menor eficiência no aproveitamento. Por outro lado, o tratamento R0 apresentou taxa de sobrevivência de apenas 45%, quando comparado aos tratamentos onde o bagaço de malte fermentado foi adicionado, alcançando de 60 a 100% de sobrevivência. A maior mortalidade observada pode ser relacionada ao manuseio dos peixes nos meses de inverno, pois são mais susceptíveis a infecções bacterianas e fúngicas, além do não conhecimento do perfil vitamínico do bagaço de malte fermentado, afetando a imunidade e a resistência do animal a ambientes desfavoráveis (BACCARIN; PEZZATO, 2001). Também foram observados alguns fatores nos peixes mortos, como dificuldade respiratória, perda do apetite, olhos escuros, opérculo hemorrágico, hemorragia e lesões e crescimento de colônias de protozoários sobre a pele.

A baixa temperatura durante todo o experimento influenciou os parâmetros zootécnicos analisados, como o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e taxa de sobrevivência. A alimentação foi fornecida à vontade, até saciedade aparente, no entanto, observou o consumo médio diário de aproximadamente 1% da biomassa (peso vivo) ao dia, sendo o recomendado de 3 a 4% (KUBITZA, 2011). Melhores taxas de conversão alimentar estão próximas a 1, sendo observado taxas de conversão maiores na avaliação dos peixes deste experimento, devido ao baixo consumo de ração. Sem o consumo de ração, o animal utiliza de maneira menos eficiente o aporte energético proveniente do alimento que é direcionado à atividade externa e manutenção interna do organismo e, ainda, suprime substâncias específicas para sua conservação e crescimento (FERNANDES, 2010). O consumo da ração é influenciado por fatores como a temperatura da água, tamanho dos peixes, concentração de oxigênio dissolvido, gás carbônico, amônia não ionizada na água, disponibilidade de alimento natural, ocorrência de doenças e parasitoses, qualidade da ração, palatabilidade, valor nutritivo, tamanho e estabilidade do *pellet* na água (KUBITZA, 2011).

Não foi observado rejeição às dietas experimentais pelos juvenis tilápias do Nilo, porém após a biometria de 30 dias pelo menos uma caixa de cada tratamento teve redução no peso médio dos peixes. Hauptman et al. (2014) verificou que o aumento da inclusão de levedura, coproduto proveniente da fermentação do milho na produção de etanol, em dietas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), reduziu significativamente o crescimento e proporcionou aumento da conversão alimentar; porém não teve efeito sobre o consumo de ração, isso significa que esses fatores de desempenho não estão associados a reduções na palatabilidade, porque os peixes consumiram quantidades equivalentes das dietas. Apesar de não mostrarem diferença estatística significativa, os valores de conversão alimentar aparente e de consumo de ração diária, mostraram-se melhores para os animais alimentados com a ração R2, demonstrando uma possível melhor digestibilidade desta ração, o que pode ter favorecido a palatabilidade.

As vísceras são o principal local de depósito de gordura em peixes magros, no entanto, a variação na adição de bagaço de malte fermentado não proporcionou diferença em sua deposição nas vísceras. Em teoria, isto significa que a dieta estava sendo aproveitada para a manutenção da higidez e deposição muscular dos peixes (LUI et al., 2012). Resultados semelhantes quanto ao índice de gordura visceral foram observados por Lui et al. (2012) na utilização de trigo orgânico em dieta para juvenis de tilápia do Nilo, sendo possível adicionar até 20% de farelo sem prejudicar seu desempenho produtivo.

Os resultados das determinações de proteínas totais e lipídeos musculares e hepáticos estão apresentados nas Figuras 7 e 8. Os testes de variância mostraram que existe diferença estatística nos valores de proteínas totais musculares e hepáticas, com maiores valores para o grupo alimentado com maior nível de adição do bagaço de malte fermentado (R10), e para o grupo alimentado com 0 e 2% de adição, respectivamente.

Os animais foram mantidos sob as mesmas condições abióticas, porém a qualidade das proteínas na dieta suplementada, e a consequente utilização da proteína corpórea para manutenção dos tecidos e funções vitais, pode ter influenciado sobre o comportamento de deposição de proteínas musculares e menores valores de crescimento. Desta forma, um balanceamento de aminoácidos essenciais e não essenciais é imprescindível para obtenção de um desempenho produtivo satisfatório. As diferenças encontradas entre as concentrações de proteínas musculares e hepáticas denotam o papel do fígado como rápido mobilizador de proteínas sintetizadas, enquanto que o tecido muscular armazena grandes quantidades desse substrato (RIBEIRO et al., 2012).

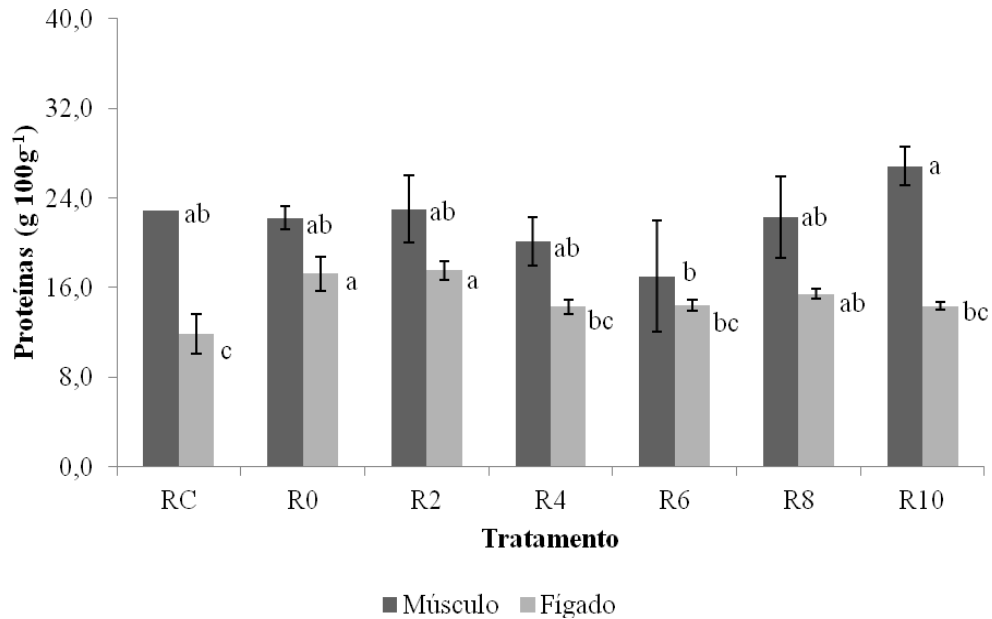


Figura 7. Concentração de proteínas totais musculares e hepáticas em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas às dietas contendo diferentes quantidades de bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134. (n=4)

O teor de lipídeo muscular não apresentou diferença estatisticamente significativa, elemento de prova que a tilápia tem um filé de carne magra e essa qualidade não foi alterada pela adição do bagaço de malte fermentado. Porém, foi encontrada diferença estatisticamente significativa no teor de lipídeos totais hepáticos. Os peixes que receberam dietas com adição de bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* apresentaram menores valores de lipídeos hepáticos quando comparado a peixes que se alimentaram de ração comercial, observando aumento na concentração lipídica nos tecidos hepáticos com o aumento do nível de adição de bagaço de malte fermentado. Diferente do encontrado por Ribeiro et al. (2012), que observaram maiores taxas de lipídeos hepáticos em peixes que receberam dietas com leveduras.

As características das vísceras são importantes para melhor avaliação das condições fisiológicas, quando o animal está submetido a dietas com alimentos alternativos de origem vegetal. Estes produtos podem conter relações com fatores antinutricionais presentes nesses alimentos que venham a comprometer o normal funcionamento do organismo dos peixes, causando problemas no seu metabolismo (SANTOS et al., 2009).

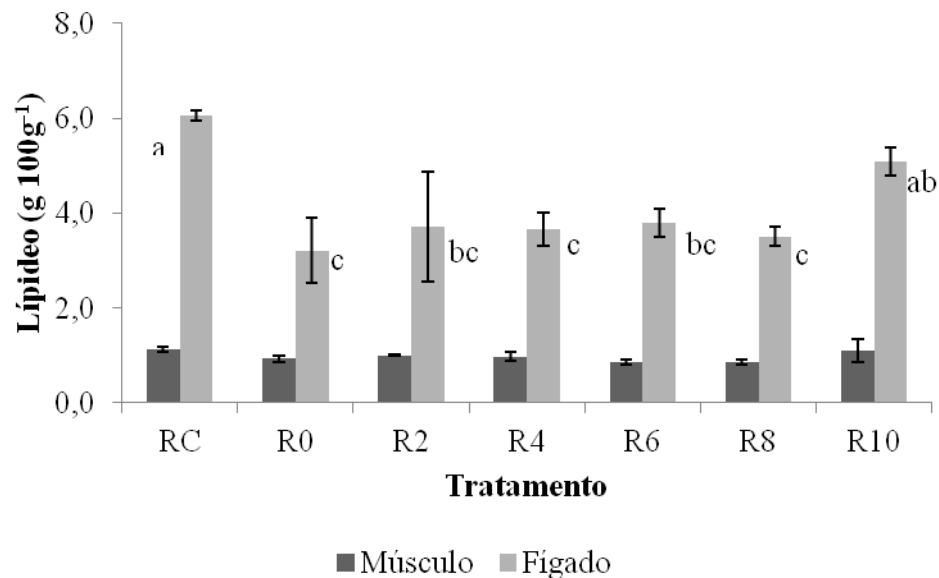


Figura 8. Concentração de lipídeos musculares e hepáticos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas às dietas contendo diferentes quantidades de bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134. (n=4)

A Tabela 5 apresenta as médias dos parâmetros bioquímicos e a Tabela 6 apresenta as médias dos parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados de dietas com adição do bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus*.

Os parâmetros bioquímicos são importantes na determinação do estado de saúde e equilíbrio do metabolismo dos peixes, além de fornecer informações sobre a utilização dos nutrientes das dietas bem como das reservas corporais desses animais (BICUDO et al., 2009; ISHIKAWA et al., 2010). A subnutrição causada por dieta desequilibrada é um dos mais prejudiciais condições adversas para a homeostase biológica do organismo, contribuindo para o fracasso do cultivo (TAVARES-DIAS, 2004). A concentração de proteína total, albumina, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL não foram afetados estatisticamente pela adição do bagaço de malte fermentado, porém apresentou maiores concentrações quando comparados aos peixes que receberam ração comercial. A concentração de proteína total, albumina, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL não foram afetados estatisticamente pela adição do bagaço de malte fermentado, porém teve concentrações maiores quando comparado a peixes que receberam ração comercial. Os resultados de proteína total plasmática são semelhantes aos descritos por Ishikawa et al. (2010).

Os tratamentos empregados não influenciaram os resultados dos parâmetros hematológicos quanto à contagem total de trombócitos e eritrócitos, e teor de hemoglobina e

hematócrito, porém quando utilizados para cálculo, teve influência quanto aos índices hemantimétricos (VGM, HCM e CHCM), observando em geral resultados inferiores em relação aos tratamentos que receberam dieta comercial (RC) e controle (R0). A contagem de leucócitos totais apresentou diferença estatística entre os tratamentos, porém não foi observada essa diferença estatística quanto à contagem diferencial de leucócitos, observando predominância de linfócitos seguidos de heterófilos e monócitos, semelhante ao observado por Silva et al. (2012), e não foi observada a presença de basófilos ou eosinófilos, geralmente escassos no sangue de peixes (NAKANDAKARE et al., 2013). Quanto à morfologia das hemácias, foi observado hipocromia leve nos peixes dos tratamentos R0, R2, R4 e R6.

As médias dos parâmetros bioquímicos e, em geral, os parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados de dietas com adição do bagaço de malte fermentado, encontraram-se dentro da faixa considerada para tilápias saudáveis que foram obtidos por Hrubec et al. (2000) em tilápias híbridas (*O. niloticus* x *O. mossambicus* x *O. aureus*), por Chen et al. (2003) em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) e por Mael, Miller e Merrill (2007) em tilápias híbridas (*O. aureus* x *O. niloticus*), com a exceção do teor de hemoglobina que foi superior aos valores relatados, e o número de leucócitos totais, referente a diferenciação em linfócitos, que foram inferiores aos resultados relatados. Esses resultados indicando que a incorporação de bagaço de malte fermentado não provocou alterações sanguíneas nos animais avaliados. De acordo com Nakandakare et al. (2013), por não observar alteração significativa nos parâmetros hematológicos da série vermelha, indica que as tilápias do Nilo encontraram-se saudáveis, pois esses parâmetros dizem respeito ao estado geral da saúde dos peixes.

Com isso, a produção de proteína microbiana pela fermentação em estado sólido do bagaço de malte utilizando *Rhizopus oligosporus*, pode ser utilizada como fonte alternativa para aproveitamento de subprodutos da indústria cervejeira, demonstrando qualidade e potencialidade para incorporação em dietas de peixes.

Tabela 5. Média dos parâmetros bioquímicos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados de rações com adição do bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10%.

Variáveis	Tratamentos					
	R0	R2	R4	R6	R8	R10
Albumina (mg dL ⁻¹)	1,22 ± 0,21 ^a	1,06 ± 0,08 ^a	1,16 ± 0,31 ^a	1,44 ± 0,08 ^a	0,99 ± 0,16 ^a	1,42 ± 0,26 ^a
Colesterol total (mg dL ⁻¹)	111,80 ± 10,93 ^a	112,57 ± 9,00 ^a	128,37 ± 17,47 ^a	110,02 ± 20,12 ^a	127,97 ± 7,66 ^a	129,35 ± 29,44 ^a
Cálcio (mg dL ⁻¹)	14,38 ± 0,75 ^a	13,63 ± 0,72 ^a	13,53 ± 0,61 ^a	13,48 ± 0,81 ^a	13,14 ± 1,37 ^a	12,87 ± 1,63 ^a
Fósforo (mg dL ⁻¹)	16,79 ± 1,33 ^c	18,12 ± 0,80 ^c	18,79 ± 1,02 ^c	26,02 ± 3,55 ^a	15,27 ± 2,84 ^c	19,50 ± 2,72 ^{bc}
Glicose (mg dL ⁻¹)	33,92 ± 1,70 ^b	34,52 ± 3,89 ^b	31,26 ± 3,44 ^b	35,79 ± 9,97 ^b	27,15 ± 1,83 ^b	30,82 ± 6,92 ^b
Colesterol HDL (mg dL ⁻¹)	28,22 ± 1,09 ^a	27,03 ± 2,67 ^a	26,47 ± 3,68 ^a	26,36 ± 0,92 ^a	29,87 ± 1,61 ^a	28,73 ± 3,33 ^a
Proteína (g dL ⁻¹)	4,14 ± 0,40 ^a	4,16 ± 0,06 ^a	4,55 ± 0,88 ^a	4,84 ± 0,76 ^a	3,86 ± 0,63 ^a	5,18 ± 0,22 ^a
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	92,21 ± 41,47 ^a	75,33 ± 11,77 ^a	103,94 ± 18,87 ^a	115,29 ± 19,41 ^a	67,37 ± 6,51 ^a	119,20 ± 17,75 ^a
Ureia (mg dL ⁻¹)	3,80 ± 1,46 ^b	0,60 ± 1,04 ^c	0,40 ± 0,54 ^c	0,82 ± 0,62 ^c	0,64 ± 0,73 ^c	0,61 ± 1,04 ^c
Creatina (mg dL ⁻¹)	0,29 ± 0,06 ^{bc}	0,30 ± 0,07 ^b	0,28 ± 0,05 ^{bc}	0,47 ± 0,12 ^a	0,25 ± 0,05 ^{bc}	0,12 ± 0,06 ^c
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	0,10 ± 0,02 ^a	0,06 ± 0,02 ^{ab}	0,06 ± 0,01 ^{ab}	0,07 ± 0,03 ^{ab}	0,04 ± 0,02 ^b	0,04 ± 0,02 ^b

RC - Albumina (mg dL⁻¹) = 0,96^a; Colesterol total (mg dL⁻¹) = 92,69^a; Cálcio (mg dL⁻¹) = 13,91^a; Fósforo (mg dL⁻¹) = 25,86^{ab}; Glicose (mg dL⁻¹) = 59,87^a; Colesterol HDL (mg dL⁻¹) = 18,65^b; Proteína (g dL⁻¹) = 3,93^a; Triglicerídeos (mg dL⁻¹) = 90,17^a; Ureia (mg dL⁻¹) = 7,75^a; Creatina (mg dL⁻¹) = 0,26^{bc}; Ácido úrico (mg dL⁻¹) = 0,11^a. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. n = 4.

Tabela 6. Média dos parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados de rações com adição do bagaço de malte fermentado por *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10%.

Variáveis	Tratamentos					
	R0	R2	R4	R6	R8	R10
Eritrócitos (10^6 mm^{-3})	2,84 ± 0,28 ^a	2,88 ± 0,24 ^a	2,76 ± 0,25 ^a	2,85 ± 0,13 ^a	2,66 ± 0,40 ^a	2,71 ± 0,20 ^a
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	10,27 ± 1,45 ^a	10,08 ± 0,94 ^a	9,58 ± 0,55 ^a	9,33 ± 0,36 ^a	10,82 ± 2,19 ^a	11,58 ± 0,85 ^a
Hematócrito (g 100g ⁻¹)	33 ± 4,03 ^a	33 ± 2,63 ^a	32 ± 2,83 ^a	32 ± 1,26 ^a	32 ± 5,06 ^a	33 ± 1,71 ^a
VCM (fL)	117,02 ± 4,42 ^{bcd}	115,37 ± 0,87 ^{cd}	115,86 ± 0,41 ^{bcd}	113,39 ± 1,64 ^d	119,13 ± 2,14 ^{abc}	122,86 ± 3,04 ^a
CHCM (g dL ⁻¹)	30,85 ± 1,00 ^{bc}	30,29 ± 0,44 ^{bc}	30,01 ± 1,19 ^{bc}	28,94 ± 0,68 ^c	33,92 ± 2,11 ^a	34,78 ± 0,88 ^a
HCM (pg)	36,12 ± 2,34 ^{bc}	34,95 ± 0,47 ^c	34,77 ± 1,48 ^c	32,82 ± 1,14 ^c	40,43 ± 3,01 ^a	42,72 ± 0,68 ^a
Leucócitos totais ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	13,07 ± 2,28 ^{abc}	16,87 ± 2,18 ^a	14,63 ± 3,11 ^{ab}	7,65 ± 2,41 ^c	9,65 ± 1,52 ^{bc}	12,55 ± 3,79 ^{abc}
Heterófilos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	1,60 ± 0,81 ^a	1,64 ± 0,48 ^a	2,87 ± 1,60 ^a	0,93 ± 0,53 ^a	1,26 ± 0,11 ^a	1,48 ± 1,12 ^a
Linfócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	8,58 ± 1,58 ^a	11,23 ± 4,03 ^a	10,45 ± 2,45 ^a	6,15 ± 1,77 ^a	7,37 ± 1,63 ^a	10,01 ± 2,70 ^a
Monócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	1,63 ± 0,87 ^a	1,76 ± 0,80 ^a	0,98 ± 0,28 ^a	0,50 ± 0,26 ^a	1,02 ± 0,60 ^a	1,00 ± 0,38 ^a
Trombócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	46,50 ± 1,64 ^a	52,50 ± 7,14 ^a	56,50 ± 18,57 ^a	49,00 ± 9,20 ^a	48,00 ± 10,20 ^a	51,75 ± 16,58 ^a

VCM: Volume Corpuscular Médio, CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média.

RC - Eritrócitos (10^6 mm^{-3}) = 2,61; Hemoglobina (g dL⁻¹) = 10,50; Hematócrito (g 100g⁻¹) = 32; VCM (fL) = 122,60^{ab}; CHCM (g dL⁻¹) = 32,81^{ab}, HCM (pg) = 40,23^{ab}; Leucócitos totais (10^3 mm^{-3}) = 8,50^{bc}; Heterófilos (10^3 mm^{-3}) = 0,60, Linfócitos (10^3 mm^{-3}) = 7,14, Monócitos (10^3 mm^{-3}) = 0,68, Trombócitos (10^3 mm^{-3}) = 46,00. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. n = 4.

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a proteína produzida pelo fungo *Rhizopus oligosporus* durante enriquecimento proteico do bagaço de malte, permite sua utilização como suplemento proteico em rações para juvenis de tilápia do Nilo, com adição de até 10%, sem comprometer o desempenho zootécnico e parâmetros hematológicos e bioquímicos da espécie. No entanto, pesquisas devem ser feitas para melhor conhecimento da sua digestibilidade, conseqüentemente, testando níveis apropriados na tentativa de obter a melhor resposta do animal.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, F.; PIRMOHAMMADI, R.; FATEHI, F.; BERNOUSI, I. Effect of feeding ensiled mixed tomato and apple pomace on performance of holstein dairy cows. **Slovak Journal of Animal Science**, Prague, v.43, n. 1, p. 31-35. 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC, 2v. 2005.

APÁS, A. L.; ARENA, M. E.; DRAKSLER, D.; GONZÁLEZ, S. N. Utilization of Sugarcane Industrial Residues as Animal Food and Probiotic Medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 104, n. 4, p. 363-367. 2008.

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

BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.36, p. 549-556, 2001.

BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; CYRINO, J. E. P. Growth and haematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. **Aquaculture Research**, Oxford, v.40, p.486-495, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. **Compêndio brasileiro de alimentação animal**. Sindirações, 2013.

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

CHEN, C.Y.; WOOSTER, G.A.; GETCHELL, R.G.; BOWSER, P.R.; TIMMONS, M.B. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis - affected and ozone - treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. **Aquaculture**, Amsterdam, v.218, p.89-102, 2003.

CORRÊA, S. A.; FERNANDES, M. O.; ISEKI, K. K.; NEGRÃO, J. A. Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.36, p.1725-1731, 2003.

CORREIA, L. K. C., AQUINO, L. C. L. Application of the *Saccharomyces cerevisiae* protein for enriching seed meal mangaba. **Scientia Plena**, v. 8, n. 12. 2012.

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise de solo**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 212 p, 1997.

FAO. Food energy – methods of analysis and conversion factors. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, 2003.

FERNANDES, R. do N. **Valor nutritivo do farelo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2010.

FOLCH, J., LESS, M., STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, p. 497-503. 1957.

FRINGS, C. S., FENDLY, T. W. Improves determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. **Clinical Chemistry**, Edinburgh, v. 18, p. 673-674, 1972.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.56, p.35-39, 1971.

HAUPTMAN, B. S.; BARROWS, F. T.; BLOCK, S. S; GAYLORD, T. G., PATERSON, J. A.; RAWLES, S. D. ; SEALEY, W. M. Evaluation of grain distillers dried yeast as a fish meal substitute in practical-type diets of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 432, p. 7-14, 2014.

HOLANDA, J. S.; OLIVEIRA, A. J.; FERREIRA, A. C. Enriquecimento proteico de pedúnculos de caju com emprego de leveduras, para alimentação animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 737-792, 1998.

- HONGZHANG, C.; YUMEI, W.; SHUHUA, D. Production of protein feed from sweet sorghum stalk by the two-step solid. **Journal of Biofertilizers and Biopesticides**, Sunnyvale, v. 3, n. 1, p. 112, 2012.
- HRUBEC, T. C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, Philadelphia, v.29, n.1, p.7-12, 2000.
- ISHIKAWA, M. M.; PÁDUA, S. B; SATAKE, F. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum x P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.7, p. 1577-1561, 2010.
- KAUR, V. I.; SAXENA, P. K. Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps. **Bioresource Technology**, Barking, v. 91, p. 101-104, 2004.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2 ed. Jundiaí: F. Kubitza, 316 p, 2011.
- KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Lipase Production in Solid-State Fermentation (SSF): Recent Developments and Biotechnological Applications. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, Takamatsu, v. 6, p. 13-27, 2012.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUI, T. A., NEU, D. H., BOSCOLO, W. R., BITTENCOURT, F., FREITAS, J. M. A. DE, FEIDEN, A. Uso de trigo orgânico na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 4, p. 383-389, 2012.
- MAUEL, M.J.; MILLER, D.L.; MERRILL, A.L. Hematologic and plasma biochemical values of health hybrid tilapia (*Oreochromis aureus x Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculating system. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 38, n. 3 p.420-424, 2007.
- MILLIGAN, C. L. E; GIRARD, S. S. Lactate Metabolism in rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**, Londres, v. 180, p. 175-193. 1993.
- MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 94, n.7, p. 1264–1275, 2014.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 81, p. 268–274, 2006.

NAKANDAKARE , I. B.; IWASHITA, M. K. P.; DIAS, D. de C.; TACHIBANA, L.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ROMAGOSA, E. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 121 – 135, 2013.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, Danville, v. 31, n.4, p. 735-738, 1952.

OGUNJOBI, A. A.; MEJEHA, O. K.; FAGADE, O. E. Protein Enrichment of Brewery Spent Grains Using *Aspergillus oryzae*. **AU Journal of Technology**, Bangkok, v. 15, n. 1, p. 53-56, jul., 2011.

PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; TEIXEIRA JÚNIOR, A.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M. Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 34, n. 2, p. 193-200, 2012.

PARRISH, L. Determination of total lipid, lipid classes and fatty acids in aquatic samples. **Lipids in freshwater**.v. 37, p. 4-12. 1999.

PIMENTA, C. J.; OLIVEIRA, M. M.; FERREIRA, L.O.; PIMENTA, M. E. S. G.; LOGATO, P. V. R.; LEAL, R. S.; MURGAS, L. D. S. Aproveitamento do resíduo do café na alimentação de tilápia do Nilo. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 231, p. 583-593, 2011.

RIBEIRO, C. S.; MOREIRA, R. G.; CANTELMO, O. A.; ESPOSITO, E. The use of *Kluyveromyces marxianus* in the diet of Red-Stirling tilapia (*Oreochromis niloticus*, *Linnaeus*) exposed to natural climatic variation: effects on growth performance, fatty acids, and protein deposition. **Aquaculture Research**, Oxford, p. 1-16, 2012.

SANTOS, E. L.; LUDKE, M. C. M. M.; BARBOSA, J. M.; RABELLO, C. B. V., LUDKE, J. V., WINTERLE, W. M. C.; SILVA, E. G. Níveis de farelo de coco em rações para alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.10, n.2, p.390-397, 2009.

SANTOS, L. C. **Laboratório Ambiental**. 2ed. Cascavel: EDIUNIOESTE, Paraná, 404 p. 2011.

SILVA, R. D.; ROCHA, L. O.; FORTES, B. D. A.; VIEIRA, D.; E FIORAVANTI, M. C. S. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n.1, p. 99-107, Seropédica, RJ, 2012.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.4, p. 805-811, 2007.

SUHET, M. I.; FIOREZE, R. Production of single cell protein from residue of industrialization of pineapple using state semi solid fermentation. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 5, n.2, p. 584-592, 2011.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto, SP: Tavares-dias; 2004.

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C. S.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J. L. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 04, p.487-493, 2009.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 98, p. 1-12, 2002.

WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, Leipzig, v.51, p.32-49, 1934.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O enriquecimento proteico do bagaço de malte é uma boa alternativa para seu aproveitamento como substrato para o cultivo de *Rhizopus oligosporus* e produção de proteína microbiana, permitindo sua utilização como suplemento proteico em dietas para juvenis de tilápia do Nilo.

O processo de fermentação em estado sólido por *Rhizopus oligosporus* aumentou aproximadamente 2 vezes o teor de proteína bruta e 4 vezes o teor de proteína solúvel em relação ao bagaço de malte.

A inclusão de até 10% do bagaço de malte fermentado em dietas para tilápia do Nilo não alterou significativamente os resultados do desempenho produtivo e parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue dos juvenis de tilápia do Nilo.