

UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL - UNISC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL –
MESTRADO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

Thomas Müller Schmidt

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE *Citrus sp.* PARA OBTENÇÃO DE
BIOMASSA DE *Agaricus bisporus*

Santa Cruz do Sul

2016

Thomas Müller Schmidt

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE *Citrus sp.* PARA OBTENÇÃO DE
BIOMASSA DE *Agaricus bisporus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado e Doutorado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Dr. Valeriano Antonio Corbellini
Co-orientadora: Dra. Michele Hoeltz

Santa Cruz do Sul

2016

Thomas Schmidt

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE *Citrus sp.* PARA OBTENÇÃO DE
BIOMASSA DE *Agaricus bisporus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado e Doutorado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.



Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Professor orientador - UNISC



Dra. Michele Hoeltz

Professora co-orientadora - UNISC



Dr. Diego de Souza

Professor - UNISC



Prof. Dr. Rosana de Cassia de Souza Schneider
Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental
UNISC



Dra. Cláucia Fernanda Volken de Souza

Professora - UNIVATES

Ao meu irmão Lucas, responsável por iluminar meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini pela orientação, incentivo em todo o trabalho e, principalmente, pelo conhecimento transmitido a mim.

À Prof^a Dra. Michele Hoeltz pelo conhecimento, dedicação, entusiasmo e amizade.

À Camila e nosso filho Gustavo pelo carinho, amor, compreensão, paciência e apoio durante a realização desse trabalho.

Aos meus amigos, pelo constante incentivo, apoio e atenção.

Aos professores do Programa de Pós-graduação da Universidade Santa Cruz do Sul (UNISC), pelo ensinamento e pela disponibilidade em fornecer contribuições ou ajuda para elaboração deste trabalho.

A todos os funcionários, bolsistas e colaboradores da UNISC que participaram e foram fundamentais para a realização desse trabalho. Em especial, agradecimento ao Carlos Eduardo, Ana, Jeniffer, José, Guilherme e Yuri.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

RESUMO

Os frutos pertencentes ao gênero *Citrus* sp. são as culturas mais abundantes no mundo, sendo produzidos e consumidos em diversas partes do planeta. Durante o cultivo e o processamento de *Citrus* sp., geram-se toneladas de resíduos que possuem elevados teores de nutrientes, com destaque para os açúcares solúveis e insolúveis, passíveis de conversão biológica. Pensando nisso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial do uso de resíduos de *Citrus* sp. como substrato para o crescimento vegetativo de *Agaricus bisporus*, visando à obtenção de biomassa fúngica, pelas técnicas de cultivo submerso (em fase líquida, CFL) e em fase sólida (CFS). No primeiro foi utilizada a fração líquida do resíduo de mandarina (*Citrus reticulata*) como fonte de carboidratos. A otimização do bioprocessamento através da metodologia de superfície de resposta (MSR) possibilitou alcançar um valor máximo de 47,06 g.L⁻¹ de biomassa de *A. bisporus* com tempo de 8 dias, pH inicial igual a 6,0 e temperatura de 28°C. Entretanto, através da análise das superfícies de respostas estudadas, verificou-se que a utilização de um valor de pH mais ácido (4,5) pode ser realizado sem perdas no rendimento de biomassa. No CFS utilizaram-se os resíduos sólidos de mandarina e de laranja (*Citrus sinensis*), previamente triturados e sem adição de nutrientes. Para ambos os resíduos, verificou-se o desenvolvimento de *A. bisporus* mais rápido após ajuste de pH para 4,5 com CaCO₃. O monitoramento dos bioprocessos foi realizado pela quantificação de atividade pectinase (AP), de açúcares redutores (AR), além de proteínas totais (PT) para CFL. A espectroscopia de absorção molecular no visível foi empregada como método de supervisão. A aplicação de espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) associada à regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) possibilitou quantificar, simultaneamente, os parâmetros de CFL com erro quadrático médio de previsão (RMSEP) e coeficientes de determinação (R²) de 0,0012 U.L⁻¹ e 0,9760, 0,23 mmol.L⁻¹ e 0,9956 e 0,03 g.dL⁻¹ e 0,9957, respectivamente. Dessa forma, este trabalho mostrou dois resultados impactantes para a área de Tecnologia Ambiental. Primeiramente, os resíduos de mandarina e laranja podem servir como substrato e fonte de nutrientes, principalmente na forma de carboidratos, nos processos fermentativos estudados, obtendo-se como resultado bioprodutos de alto valor agregado que podem estar associados à biomassa de *A. bisporus*. Além disso, o monitoramento do bioprocessamento de CFL pode ser realizado por tecnologias mais limpas, usando a FT-IR associada à quimiometria como método unificado em substituição a diferentes métodos espectrofotométricos, mais onerosos, e com maior consumo de reagentes.

Palavras-chave: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, cultivo submerso, cultivo em fase sólida, *Agaricus bisporus*, espectroscopia no infravermelho.

ABSTRACT

The fruits of the genus *Citrus* sp. are the most abundant crops in the world, being produced and consumed in different parts of the planet. During the cultivation and processing of *Citrus* sp., several tons of wastes are generated. These materials have high levels of nutrients, especially the soluble and insoluble sugars, able to biological conversion. The aim of this study was to evaluate the potential of using waste *Citrus* sp. as a substrate for vegetative growth of *Agaricus bisporus*, to obtain fungal biomass, by the submerged cultivation technique (liquid phase, LPC) and solid state cultivation (SSC). For LPC it was used the liquid fraction of the mandarin residue (*Citrus reticulata*) as a source of carbohydrates. Optimization of bioprocess by response surface methodology (RSM) allowed a maximum value of 47.06 g.L⁻¹ biomass of *A. bisporus* at 8 days, initial pH of 6.0 and temperature of 28°C. However, by analyzing the surfaces responses studied, it was found that a more acidic pH (4.5) can be used without loss in biomass yield. In SSC it was used the solid waste of mandarin and orange (*Citrus sinensis*), previously crushed and without adding nutrients. For both residues, the development of *A. bisporus* occurred faster after adjusting pH to 4.5 with CaCO₃. The monitoring of bioprocesses was performed by quantification of pectinase activity (PA) of reducing sugars (RS), and total protein (TP) to LPC. The spectroscopy of molecular absorption in the visible was employed as a method of supervision. Application of molecular absorption spectroscopy with infrared fourier transform (FT-IR) associated with regression by partial least squares (PLS) made possible to quantify simultaneously the parameters of LPC with error average forecast quadratic (RMSEP) and determination coefficients (R²) of 0.0012 U.L⁻¹ and 0.9760, 0.23 mmol.L⁻¹ and 0.9956 and 0.03 g.dL⁻¹ and 0.9957, respectively. This study showed two impactful results for the environmental area technology. First, the waste of mandarin and orange can be used as substrate and source of nutrients, mainly in the form of carbohydrates, studied in fermentation processes, obtaining added value bioproducts that can be associated with the biomass of *A. bisporus*. In addition, monitoring the bioprocess can be accomplished by LPC cleaner technology, using FT-IR and chemometrics associated with the unified method to replace different spectrophotometric methods, more costly and higher reagent consumption.

Keywords: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, submerged cultivation, solid state fermentation, *Agaricus bisporus*, infrared spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Agaricus bisporus</i> isolado a partir de fragmento de corpo de frutificação em meio BDA.	38
Figura 2 - Superfície de contorno da produção de biomassa em função da temperatura e pH no CFL, com tempo fixado em 8 dias.	42
Figura 3 - Produção de biomassa de <i>A. bisporus</i> em função do pH e tempo.	43
Figura 4 - Superfícies de resposta da produção de biomassa por fermentação submersa por <i>A. bisporus</i> em função da (A) temperatura e tempo, (B) pH e tempo e (C) temperatura e pH. Os fatores que não foram incluídos nos eixos foram fixados em seus respectivos níveis ótimos.	44
Figura 5 - Concentração de açúcares redutores (AR) em um conjunto de 21 experimentos realizados no CFL em meio contendo extrato líquido do resíduo de mandarina.	47
Figura 6 - Atividade pectinolítica em um conjunto de 21 experimentos realizados no CFL em meio de cultivo contendo extrato líquido do resíduo de mandarina.	48
Figura 7 - Teor de proteínas totais em um conjunto de 21 experimentos realizados no CFL em meio contendo extrato líquido do resíduo de mandarina.	48
Figura 8 - Espectro normalizado DRIFTS do cultivo submerso contendo o conjunto de espectros (A) e (B) o espectro médio do CFL, ambos com padrão interno de ferricianeto de potássio na região 4000 a 450 cm^{-1}	50
Figura 9 - Curva de correlação entre as amostras de calibração e validação externa dos valores de AR (A), AP (B) e PT (C) tabelados com os valores preditos pelo modelo PLS e seus respectivos vetores de regressão.	52
Figura 10 - Sequência de desenvolvimento de <i>A. bisporus</i> em teste preliminar de CFS sobre resíduo de mandarina. À esquerda: sem correção de pH. À direita: pH 4,5.	53
Figura 11 - Crescimento de <i>A. bisporus</i> em 6 (A) e 14 (B) dias de incubação no resíduo de mandarina CFS.	54
Figura 12 - Crescimento de <i>A. bisporus</i> em 6 (A) e 14 (B) dias de incubação no resíduo de laranja no CFS.	54
Figura 13 - Perfil do consumo AR por <i>A. bisporus</i> no resíduo de mandarina no CFS.	55

Figura 14 - Perfil do consumo de AR por *A. bisporus* no resíduo de laranja no CFS.

.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química dos açúcares fermentescíveis de resíduos de <i>Citrus</i> sp.	18
Tabela 2 - Composição centesimal (%) de cascas de laranja e tangerina.....	19
Tabela 3 - Teor (%) de nutrientes das partes comestíveis da laranja e mandarina. .	19
Tabela 4 - Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento 2^3	32
Tabela 5 - Combinação de variáveis originadas a partir do planejamento completo 2^3 utilizando Delineamento Composto Central.	32
Tabela 6 - Resultados da caracterização das amostras <i>in natura</i> dos resíduos de mandarina e de laranja.....	37
Tabela 7 - Combinação de variáveis originadas a partir do planejamento completo 2^3 utilizando Delineamento Composto Central com a resposta da quantidade de biomassa obtida em cada experimento.....	39
Tabela 8 - Estimativa dos efeitos para produção de biomassa no extrato líquido de mandarina verde para o planejamento DCC.	40
Tabela 9 - Análise da variância obtida para o planejamento DCC para produção de biomassa no extrato líquido de mandarina.....	41
Tabela 10 - Concentração dos açúcares no CFL analisadas por HPLC.....	45
Tabela 11 - Bandas do espectro de infravermelho médio atribuídas a grupos funcionais.	49
Tabela 12 - Figuras de mérito de modelos PLS/FT-IR de parâmetros de cultivo submerso.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – Atividade enzimática (U.mL^{-1})

AR – Açúcares redutores (g.L^{-1})

a_w – Atividade de água

BDA – Batata dextrose ágar

Bm – Biomassa

C/N – Relação carbono e nitrogênio

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

CFL – Cultivo em fase líquida

CFS – Cultivo em fase sólida

FS – Fermentação submersa

F_{calc} – F calculado (teste “F”)

Fonte de C – Fonte de carbono

GL – Graus de liberdade

MQ – Média quadrática

SM – Soma quadrática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 RESÍDUOS DE CITRUS SP.	16
3.1.1 <i>Composição química de resíduos de Citrus sp.</i>	17
3.2 PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	20
3.2.1 <i>Cultivo em fase líquida (CFL)</i>	20
3.2.2 <i>Cultivo em fase sólida (CFS)</i>	21
3.2.3 <i>Fatores que influenciam os processos fermentativos</i>	24
3.3 <i>AGARICUS SP.: PROPRIEDADES NUTRICIONAIS E POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS</i>	25
3.3.1 <i>PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA DE AGARICUS SP.</i>	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAIS	30
4.2 ISOLAMENTO DE <i>AGARICUS BISPORUS</i>	30
4.3 PREPARO DO INÓCULO	30
4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS	31
4.5 CULTIVO EM FASE LÍQUIDA (CFL) UTILIZANDO O EXTRATO LÍQUIDO DO RESÍDUO DE MANDARINA VERDE	31
4.6 CULTIVO EM FASE SÓLIDA (CFS)	31
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	33
4.7.1 <i>Caracterização dos resíduos de Citrus sp.</i>	34
4.7.2 <i>Determinação do pH</i>	34
4.7.3 <i>Determinação da biomassa de Agaricus bisporus em CFL</i>	34
4.7.4 <i>Determinação de glicose e frutose</i>	34
4.7.5 <i>Determinação do conteúdo de açúcares redutores (AR)</i>	35
4.7.6 <i>Determinação da atividade pectinolítica</i>	35
4.7.7 <i>Determinação de proteínas totais</i>	36
4.7.8 <i>Análise por FT-IR do cultivo submerso</i>	36

4.7.9 Otimização do cultivo em fase líquida (CFL).....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DE CITRUS SP.	37
5.2 ISOLAMENTO DE AGARICUS BISPORUS	38
5.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS DO CFL COM AGARICUS BISPORUS ...	38
5.3.2 <i>Análise de consumo de glicose e frutose no CFL para o extrato líquido de mandarina</i>	45
5.3.3 <i>Monitoramento do CFL para extrato líquido de mandarina</i>	46
5.4 CULTIVO EM FASE SÓLIDA (CFS)	53
5.4.1 <i>CFS: ensaio preliminar</i>	53
5.4.2 <i>Cultivo em fase sólida (CFS)</i>	54
6 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

As frutas cítricas, pertencentes ao gênero *Citrus*, são originárias das regiões tropicais e subtropicais da Ásia sendo os frutos mais produzidos e consumidos no mundo. Países como Brasil, China e EUA lideram o mercado mundial de produção de *Citrus*, sendo o Brasil o maior exportador de sucos cítricos e produtor de laranjas na atualidade.

Acompanhando este cenário, destaca-se o volume de resíduos de *Citrus* sp. gerados em diferentes etapas e processos na citricultura. No manejo dos pomares é realizado o desbaste ou raleio, que é a remoção e o descarte de parte dos frutos verdes para atingir melhor qualidade final e evitar a alternância de produção dos frutos. Já na extração industrial de suco de *Citrus*, praticamente 50% da massa do fruto é considerado subproduto ou resíduo.

Quando aproveitados, os resíduos constituídos de casca, polpas e sementes são utilizados, principalmente, para produção de ração animal, porém o custo de secagem e transporte é um fator economicamente limitante nesses casos. Por outro lado, a porção descartada ou acumulada desses resíduos no ambiente, sem o devido tratamento, representa um problema ambiental a ser considerado.

Alternativamente, em função do elevado teor de matéria orgânica, os resíduos de *Citrus* sp. podem ser utilizados como substrato para a produção de pectinases fúngicas, metano e para adsorção de corantes residuais.

A utilização de técnicas que permitem a conversão biológica desses materiais, como os cultivos em fase líquida e sólida, baseiam-se na ação microbiana sobre substrato(s) objetivando a formação de bioprodutos diversos, como por exemplo, agentes flavorizantes, polissacarídeos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos, entre outros.

Os fungos são comumente utilizados nesses processos pelo potencial de obtenção de bioprodutos. *Agaricus bisporus*, é a espécie de cogumelo comestível mais cultivado no mundo, porém a produção de seu micélio vegetativo vem sendo cada vez mais explorada nesses cultivos, para fins alimentícios, nutracêuticos ou como inoculantes.

Nesse sentido, o uso de resíduos de *Citrus* sp. como substrato em processos fermentativos pode vir a reduzir os custos de produção, minimizar os impactos

ambientais associados ao seu acúmulo no ambiente e, ainda, promover a conversão de um resíduo agroindustrial em um produto com alto valor agregado.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de uso de resíduos de *Citrus* sp. como substrato para o crescimento vegetativo de *Agaricus bisporus*, através dos cultivos em fase líquida e em fase sólida, visando à obtenção de biomassa.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar os resíduos sólidos de mandarina verde (*Citrus reticulata*) e laranja (*Citrus sinensis*) em relação à composição centesimal;
- Isolar e manter uma cultura pura do fungo *Agaricus bisporus*;
- Analisar as condições do cultivo em fase líquida para a máxima conversão do extrato líquido do resíduo de mandarina verde em micélio vegetativo, através da técnica de análise de superfície de resposta;
- Avaliar a aplicação dos parâmetros açúcares redutores, atividade pectinolítica e proteínas totais para monitorar o cultivo em fase líquida;
- Avaliar a aplicabilidade da Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) supervisionado pelo método de referência UV-VIS, para quantificar a concentração de açúcares redutores, atividade pectinolítica e proteínas totais em cultivo submerso;
- Analisar o consumo de açúcares redutores no resíduo sólido de mandarina verde e de laranja durante o cultivo em fase sólida.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Resíduos de *Citrus* sp.

Citrus, os quais incluem-se laranjas, mandarinas, limões, limas e toranjas (*grapefruits*) são as culturas mais abundantes no mundo, sendo produzidos cerca de 115 milhões de toneladas de frutos anualmente e, aproximadamente, 30 milhões de toneladas são destinadas à produção de sucos (CHOI et al., 2015).

No Brasil, 19 milhões de toneladas de *Citrus* sp. foram produzidos em 2013 sendo o cultivo da laranja responsável por mais de 17 milhões de toneladas do total nesse ano. A região sudeste do país, principalmente o estado de São Paulo, é o maior produtor de laranjas doces do país, com 72,6% da produção nacional (IBGE, 2013).

A produção anual de *Citrus* sp. no Rio Grande do Sul é de 537 mil toneladas, realizada em 42 mil hectares, o que gera uma receita direta de 250 milhões de reais (GERHARDT et al., 2012). Embora essa produção seja pequena quando comparada à de São Paulo, é maior que a de muitos países e representa a principal atividade econômica de dezenas de municípios (SARTORI et al., 2007). O Estado se destaca nacionalmente sendo o terceiro maior produtor de mandarinas, atrás apenas de São Paulo e Paraná, produzindo cerca de 160 mil toneladas do fruto cítrico (Embrapa, 2013).

Durante o cultivo da mandarina, a produção irregular é caracterizada por um período excessivo de frutos seguido por baixa produção. De acordo com KOLLER (1994), quando há florescimento excessivo, os frutos são de baixa qualidade: ácidos, aguados, pequenos e com coloração deficiente. Assim, na intenção de melhorar a qualidade da fruta para o mercado *in natura*, a técnica do raleio manual é utilizada por citricultores, sendo necessário ralear 60 a 80% dos frutos. (SCHWARZ; KOLLER; NIENOW, 1992).

Na industrialização de *Citrus*, em especial na indústria de sucos, há a geração de grandes quantidades de resíduos como cascas, polpas e sementes, representando 50% da massa inicial do fruto, que geralmente é transformada em farelo peletizado para ração animal (CHOI et al., 2015; NEVES et al., 2010). Entretanto, o custo de secagem e transporte é um fator economicamente limitante nesses processos e a parcela de resíduos descartados sem tratamento no ambiente,

representa um problema ambiental crescente (REDA et al., 2005; SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001).

Os despejos líquidos, após processamento na indústria de sucos, denominados de “água amarela”, são considerados como agente de alto grau poluidor por possuírem elevados índices de matéria orgânica, sendo compostos por proteínas, óleos essenciais, pectina, açúcares e ácidos orgânicos. (RIVAS et al., 2008).

Além da produção de ração animal, outras formas de utilização dos resíduos de *Citrus* sp. são a incineração para obtenção de energia, a secagem para mais tarde serem usados na extração pectinas ou, ainda, quando não secos, podem ser reutilizados como fertilizantes orgânicos (BHATNAGAR; SILLANPÄÄ; WITEK-KROWIAK, 2015; GUERRERO et al., 1995; MAMMA; KOURTOGLOU; CHRISTAKOPOULOS, 2008).

Das cascas de *Citrus* sp. podem ser extraídos óleos essenciais que possuem diversas aplicações na indústria de alimentos, como flavorizantes em bebidas, sorvetes e outros produtos alimentícios, cosméticos, perfumes e, em fármacos, por suas propriedades antibióticas e anti-inflamatórias (BOUKROUFA et al., 2015).

Alternativamente, em função do elevado teor de matéria orgânica, os resíduos de *Citrus* sp. podem ser utilizados como substrato para a produção de pectinases fúngicas, metano e para adsorção de corantes residuais (TAVARES et al., 1998). A produção de bioetanol a partir dos açúcares solúveis e insolúveis disponíveis nas cascas de *Citrus* sp. foi analisada por CHOI et al. (2015).

3.1.1 Composição química de resíduos de *Citrus* sp.

Os resíduos de *Citrus* sp. são ricos em carboidratos solúveis e insolúveis, o que faz com que possuam potencial como fonte de energia para conversões biológicas em produtos de maior valor agregado (CHOI et al., 2015; GROHMANN; CAMERON; BUSLIG, 1995). Entre os açúcares solúveis destacam-se a glicose, frutose e sacarose, enquanto que a fração insolúvel, os polissacarídeos das cascas dos resíduos de *Citrus* sp., são pectina, celulose e hemicelulose (GROHMANN et al., 1995; WILKINS et al., 2007). A pectina e as hemiceluloses são ricas em ácido

galacturônico, arabinose, galactose e pequenas quantidades de xilose, ramnose e glicose (UENOJO; PASTORE, 2007).

Ainda, esses resíduos contêm elevado teor de água, aproximadamente 86%, fazendo com que o processo de secagem torne-se oneroso e difícil (TRIPODO et al., 2004). Nas casca dos frutos de *Citrus* sp. encontram-se diversos metabólitos secundários, responsáveis por sua proteção contra fatores bióticos e abióticos, como terpenoides, carotenoides, cumarinas, furanocumarinas e flavonoides, principalmente flavononas e flavonas polimetoxiladas, raras em outras plantas (GERHARDT et al., 2012).

Ao caracterizar os componentes da casca de laranja, RIVAS et al. (2008) obtiveram como resultados 16,9% de açúcares solúveis, 9,21% de celulose, 10,5% de hemicelulose e 42,5% de pectina. A composição do bagaço de laranja para produção de composto foi analisada por KIEHL (1985) tendo como resultado (g/kg): carbono (127,8), nitrogênio (7,1), pentóxido de fósforo (P_2O_5) (1,8) e óxido de potássio (K_2O) (4,1). A partir desses dados, o autor obteve uma relação carbono e nitrogênio (relação C/N) de 18/1.

CHOI et al. (2015) analisaram o percentual dos açúcares solúveis e insolúveis da casca de diversos tipos de *Citrus* sp., através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), e verificaram a disponibilidade dos açúcares fermentescíveis (Tabela 1) por *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bioetanol.

Tabela 1 - Composição química dos açúcares fermentescíveis de resíduos de *Citrus* sp.

matéria seca	Sacarose (%)	Glicose (%)	Frutose (%)	AF* (%)
CL	5,6	35,5	12,1	53,2
CM	7,4	39,4	10,3	57,1
CLi	nd	27,9	3,3	31,2
CLa	nd	22,5	0,7	23,2
CTo	1,4	30,6	8,2	43,2

Abreviações utilizadas: CL, casca de laranja; CM, casca de mandarina; CLi, casca de limão; CLa, casca de lima; CTo, casca de toranja; nd, não disponível.

*AF: Açúcares fermentescíveis são a soma de sacarose, glicose e frutose, fermentados por *S. cerevisiae*.

Fonte: Adaptado de CHOI et al. (2015).

Como pode ser observado na Tabela 1, há uma quantidade significativa de açúcares fermentescíveis (AF) disponíveis na matéria seca dos resíduos de *Citrus* sp. analisados. Destaca-se que, para casca de laranja (CL) e casca de mandarina (CM), mais de 50% da matéria seca desses resíduos é composta por açúcares solúveis. Quanto à fração insolúvel, os autores obtiveram uma variação entre 15 e 20% de matéria seca, dependendo do tipo da fruta.

STEFANELLO; ROSA (2012) analisaram a composição centesimal de diferentes tipos de cascas de frutas, incluindo cascas de laranja variedade Pêra (*Citrus sinensis*) e tangerina variedade Ponkã (*Citrus reticulata*) (Tabela 2), e as compararam com o teor de nutrientes da parte comestível dos mesmos frutos (Tabela 3).

Tabela 2 - Composição centesimal (%) de cascas de laranja e tangerina.

Amostras	Umidade	Cinzas	Fibra	Lipídeos	Proteínas	CHO
CL	76,55	1,04	16,70	0,26	1,00	4,45
CT	74,70	1,11	9,40	0,09	2,20	12,43

Abreviações utilizadas: casca de laranja (CL); casca de tangerina (CT); carboidratos (CHO).

Fonte: Adaptado de STEFANELLO; ROSA (2012).

Tabela 3 – Teor (%) de nutrientes das partes comestíveis da laranja e mandarina.

Amostras	Umidade	Cinzas	Fibra	Lipídeos	Proteínas	CHO
Laranja	86,90	0,40	1,70	0,20	0,80	11,70
Tangerina	83,70	0,50	3,10	0,10	0,90	14,90

Abreviações utilizadas: carboidratos (CHO).

Fonte: Adaptado de STEFANELLO; ROSA (2012).

Os autores verificaram que o teor de fibras na casca de laranja (16,7%) é bastante superior ao da parte comestível (1,7%) e também destacaram o elevado teor de carboidratos disponíveis nas cascas de tangerina (12,43%) quando comparado à parte comestível do mesmo fruto (14,90%), reforçando, assim, o

potencial do aproveitamento integral dos alimentos e, conseqüentemente, evitando o desperdício.

O fato de os resíduos de *Citrus* sp. apresentarem elevados teores de nutrientes, principalmente na forma de açúcares e água, torna-os passíveis de serem utilizados em processos fermentativos (TRIPODO et al., 2004).

3.2 Processos fermentativos

Os processos fermentativos podem ser separados em dois tipos básicos: cultivo em fase líquida (CFL), na qual ocorre o desenvolvimento de microrganismo(s) em um meio líquido contendo nutrientes e cultivo em fase sólida (CFS), que simula o crescimento de microrganismos em substratos sólidos devidamente hidratados, semelhante ao que ocorre no ambiente natural em que são encontrados (PANDEY, 2003).

De modo geral, esses cultivos implicam na utilização de microrganismos na transformação de matéria orgânica catalisada por enzimas, podendo ser conduzidas por processos descontínuos, descontínuo-alimentados ou contínuos, bem como por variações desses processos (WANDERLEY; NEVES; DE ANDRADE, 2011).

3.2.1 Cultivo em fase líquida (CFL)

O cultivo em fase líquida (CFL) consiste em um processo que disponibiliza os nutrientes para o microrganismo em um meio líquido. Os nutrientes podem ser peptonas, açúcares solúveis e substâncias complexas (vitaminas e íons) que são dissolvidos em água ou mesmo em soluções tampão (OLIVEIRA et al., 2012).

Conforme HÖLKER; HÖFER; LENZ (2004), aproximadamente 90% da produção enzimática a nível industrial é realizada através desse processo, geralmente aprimorado pelo uso de técnicas de otimização e uso de microrganismos geneticamente modificados.

No CFL, além da maior facilidade de monitoramento e controle de processo, a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa são facilitadas, sendo realizadas por filtração simples ou centrifugação para remoção de células. Geralmente, para recuperação de enzimas o sobrenadante é utilizado e o crescimento microbiano é quantificado após secagem da biomassa, por gravimetria,

podendo ainda ser realizado por densidade ótica no caso de cultivo de bactérias (FERNANDES, 2007).

Quanto ao cultivo em grande escala, o CFL possui relativa facilidade, pois garante um meio com bastante homogeneidade e controle mais efetivo de parâmetros de processo ao serem usados sensores adequados (COUTO; SANROMÁN, 2006). Entretanto, a maior probabilidade de contaminação do meio de cultivo, em função da grande quantidade de água disponível, é um inconveniente desse processo (PINHEIRO, 2006).

Diversos substratos podem ser utilizados no CFL como fonte de nutrientes. ALEGRE et al. (2009) analisaram a produção de invertase por CFL de diversos resíduos agroindustriais tais como, farelo de trigo, bagaço de cana de açúcar, palha de arroz, dentre outros, obtendo os maiores valores da enzima utilizando o farelo de trigo. CAMARGO et al. (2009) testaram o bagaço de laranja no processo submerso e compararam a produção de pectinase por *Aspergillus* sp. no cultivo em meio com pectina como única fonte de carboidratos. A maior produção de pectinases ocorreu ao utilizarem o bagaço de laranja na proporção de 2% m/v.

O CFL é considerado a melhor técnica para obtenção de micélio fúngico e biomoléculas devido ao curto tempo de processo (7 dias), pouco espaço requerido e maior controle de parâmetros fermentativos (MOKOCHINSKI et al., 2015; PETRE; TEODORESCU, 2012).

Também, é o método preferido para produção de exopolissacarídeos (EPS) de origem fúngica, pois permite a manipulação e otimização de parâmetros bióticos que favorecem a produção de determinados bioprodutos (XIAO, J.-H. et al., 2010). A produção de biomassa de *Cordyceps taii* pelo CFL foi estudada por XIAO, J.-H. et al. (2010) em função da alta especificidade de fatores ambientais necessários para o seu crescimento em ambiente natural. Através da manipulação de parâmetros fermentativos como fontes distintas de carbono e nitrogênio, pode-se induzir e maximizar a produção de compostos bioativos presentes no EPS desse fungo.

3.2.2 Cultivo em fase sólida (CFS)

O cultivo em fase sólida (CFS) pode ser definido como processo que se refere à cultura de microrganismos em matriz sólida (substrato ou material inerte), na

ausência, ou próximo à ausência de água livre, sendo necessário, entretanto, que o substrato possua umidade suficiente para garantir o desenvolvimento e atividade metabólica do(s) microrganismo(s) de interesse (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Conforme a natureza do substrato, dois tipos de sistemas de CFS podem ser utilizados: (a) CFS em substratos sólidos naturais, e (b) CFS aderido a suportes inertes (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). A utilização de CFS em substratos sólidos naturais tem sido fortemente investigada e modernizada nas últimas décadas, principalmente quando objetiva-se a produção de enzimas microbianas e metabólitos secundários ou compostos bioativos (MARTINS et al., 2011).

O CFS pode ser aplicado como processo de biorremediação, biodegradação, detoxificação de resíduos agroindustriais, bioconversão de biomassas lignocelulósicas e de resíduos agroindustriais, bem como na geração de bioprodutos de alto valor agregado como antibióticos, fatores de crescimento para plantas, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biosurfactantes, biocombustíveis, compostos de aromas, entre outros (PANDEY, 2003).

Destacam-se como vantagens do CFS: condições da cultura próximas às que se desenvolvem em meios naturais; alta concentração de produtos, simplicidade no preparo do meio de cultura e de equipamentos para fermentação, diminuição da contaminação; baixos custos, redução dos efluentes a tratar, resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação, produção concentrada de metabólitos e eliminação de espuma (HU et al., 2011).

Por outro lado, o processo possui algumas desvantagens, tais como: uso de microrganismos que crescem em baixos níveis de umidade, dificuldades referentes à transferência de calor e massa, escassez de dados e de projeto para fermentadores, dificuldade na medida e no controle de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados, dentre outras (HU et al., 2011; PANDEY, 1992).

O CFS possui potencial econômico considerável para as indústrias alimentícias, considerando o consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola. Além disso, esses procedimentos são de interesse econômico, especialmente para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (COUTO; SANROMÁN, 2006).

A escolha correta do substrato no CFS é um fator muito importante para uma produção economicamente viável e eficiente visando o bioproduto de interesse.

Dessa forma, o substrato escolhido deve fornecer condições favoráveis ao desenvolvimento do microrganismo e, ao mesmo tempo, ter um custo acessível no bioprocessamento (MARTINS et al., 2011). Comumente utilizam-se produtos ou subprodutos oriundos da agroindústria, que têm como característica servir de matriz sólida e fornecer o carbono e fontes de energia para o crescimento do microrganismo, além de apresentarem um custo relativamente baixo (PANDEY et al., 1999; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

O uso de resíduos agroindustriais como fonte de carbono no CFS promove a redução dos custos da fermentação e evita problemas ambientais com a disposição final desses resíduos, surgindo como uma solução econômica e ambiental para países com abundância desses materiais. Diversos resíduos como borra de café, bagaço de cana de açúcar, resíduos de frutas, espigas e palhas de milho, entre outros, são utilizados nesse bioprocessamento para produção de compostos de alto valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, agentes flavorizantes e compostos bioativos (MARTINS et al., 2011).

Os resíduos de *Citrus* sp. podem ser utilizados no CFS na produção de enzimas, como por exemplo pectinases (FAVELA-TORRES; VOLKE-SEPÚLVEDA; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2006; PITOL et al., 2016) ou como suportes para o desenvolvimento de fungos diversos devido à alta absorção de água e nutrientes que favorecem o crescimento desses microrganismos (ORZUA et al., 2009), na produção de ácido cítrico (DHILLON et al., 2011; TORRADO et al., 2011), entre outros.

A escolha do microrganismo a ser utilizado no CFS depende do produto final desejado. Fungos, leveduras e bactérias podem ser aplicados nesses processos, entretanto, em função da baixa umidade contida nos substratos ou meios de cultura, fungos e leveduras são preferencialmente utilizados por sua capacidade de crescimento em ambientes com essas características (MARTINS et al., 2011).

Fungos filamentosos tem recebido maior atenção no CFS por sua capacidade de produção de enzimas termo-estáveis de alto valor científico e comercial, como amilases, pectinases, xilanases, celulasas, quitinases, proteases, lipases, β -galactosidases, entre outras (DÍAZ-GODÍNEZ et al., 2001; ELINBAUM et al., 2002; MARTINS et al., 2011). Dentre os fungos filamentosos, Phycomycetes (*Mucor* e *Rhizopus*), Ascomycetes (*Aspergillus* e *Penicillium*) e Basidiomycetes (fungos

ligninolíticos) continuam sendo os mais explorados nesse bioprocesso (DÍAZ-GODÍNEZ et al., 2001; MOKOCHINSKI et al., 2015; PANDEY et al., 2000).

3.2.3 Fatores que influenciam os processos fermentativos

Diversos fatores influenciam os cultivos em fase líquida e fase sólida. Fatores como umidade, temperatura, pH e tempo são parâmetros que, geralmente, necessitam de controle em ambos os processos. No CFS, destacam-se também fatores como a quantidade água, que costuma variar entre 30 e 85% dependendo do tipo de substrato utilizado e a atividade de água (a_w), relacionada à transferência de massa (água) e solutos para as células microbianas (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003; PANDEY, 2003).

O crescimento microbiano é um processo exotérmico, e o calor gerado deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis ao crescimento dos microrganismos. A dificuldade na remoção de calor no CFS está relacionada à baixa condutividade térmica da matéria fermentada. Pode-se contornar este problema com a introdução de ar comprimido através do meio de cultura, para produções industriais, controle de temperatura da sala ou do equipamento onde ocorre a fermentação, ou pelo sistema de camisas em torno do fermentador com circulação de água refrigerante (SCHMIDELL et al., 2001).

O controle de pH, corrigido de maneira relativamente simples em meio líquido, durante o CFS dificilmente é conseguido devido à heterogeneidade e consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (SCHMIDELL et al., 2001).

O revolvimento de biomassa no CFS pode vir a fornecer uma melhor homogeneização quanto à distribuição dos inóculos e do umidificante, impedir a formação de agregados e favorecer a exaustão de gases e a troca de calor do meio. Porém, pode interferir na formação dos esporos, devido à fragmentação do micélio. (PARIS, 2008).

Associado a troca de gases do processo, o tamanho da partícula do substrato é mais um fator a ser considerado. Geralmente, substratos com menor tamanho de partícula fornecem maior área de contato, favorecendo o crescimento de microrganismos. Partículas maiores de substrato oferecem melhores condições de

respiração/aeração, mas fornecem também superfície limitada para o crescimento do microrganismo (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Outro fator importante para os CFL e CFS é a concentração inicial de inóculo. Conforme WANDERLEY et al. (2011), a escolha da linhagem e preparo do inóculo são parâmetros significativos em todos os processos fermentativos. De acordo com PAMBOUKIAN (1997) existem diversos estudos que avaliam a influencia da concentração de células do inóculo no desempenho de processos fermentativos e que essa concentração é definida, basicamente, como uma relação entre o volume do inóculo e o volume total de líquido ou sólido no fermentador.

3.3 *Agaricus* sp.: propriedades nutricionais e potencial para obtenção de bioprodutos

Agaricus bisporus (J. Lange) Imbach é um fungo de decomposição secundária, cosmopolita e sua presença na ciclagem de carbono de resíduos vegetais nas florestas é evidenciada devido à formação de corpos de frutificação (cogumelos) e à presença de micélio sobre folhas e restos de vegetais (KERRIGAN; CHALLEN; BURTON, 2013).

O cultivo de *A. bisporus* teve início na França, cerca de 200 anos atrás, e nas últimas décadas a produção de cogumelos em escala industrial vem expandindo-se por todo planeta sendo produzidos milhões de toneladas anualmente, sendo o seu uso, principalmente, na gastronomia (LEIVA et al., 2015). O conhecido “champignon” (*A. bisporus*) é uma das espécies de cogumelos comestíveis mais cultivada no mundo (FURLANI; GODOY, 2005; PUTZKE; PUTZKE; KÖHLER, 2015).

No Brasil, o cultivo de *Agaricus* sp. teve início na década de 50 e estima-se que a produção esteja na ordem de 15 mil toneladas anuais de cogumelos frescos, das quais 62,5% é devida ao *A. bisporus*, 15% ao *Agaricus blazei* e o restante para outros cogumelos (DE JESUS, 2011). O cultivo de cogumelos comestíveis vem crescendo no país, já que a cultura possibilita reciclar economicamente certos resíduos agrícolas e agroindustriais (FURLANI; GODOY, 2005).

O ciclo de vida deste basidiomiceto pode ser dividido em duas etapas: “vegetativa” e reprodutiva. A fase “vegetativa” corresponde ao micélio, o qual é formado por um conjunto de hifas. O cogumelo corresponde à fase reprodutiva, sendo macroscopicamente constituído pelo estípete e píleo. No píleo, situam-se as

lamelas, em cujas superfícies estão localizados os basídios que produzem e ejetam os basidiósporos (esporos sexuais) (DE ANDRADE, 2007).

Como ocorre em diversos cogumelos comestíveis, *A. bisporus* possui elevado valor nutricional contendo proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, vitaminas e, ainda, possuem componentes ativos com efeitos benéficos nos tratamentos de hiperglicemia e hipercolesterolemia (DE JESUS, 2011). Estes constituintes podem ser encontrados tanto no micélio (fase vegetativa) como nos corpos de frutificação (MANZI et al., 2004).

As propriedades farmacológicas de *A. bisporus* já foram elucidadas em trabalhos que demonstraram sua ação antimicrobiana, antitumoral, anticarcinogênica, antioxidante, ativadora de sistema imunológico e de proteção hepática (CREMADES et al., 2012; LEIVA et al., 2015).

Um dos componentes mais presentes na biomassa de fungos, assim como *Agaricus* sp., são os exopolissacarídeos (EPS), correspondendo a cerca de 75% dos polissacarídeos constituintes das hifas (DE MELO BARBOSA et al., 2004). Os EPS possuem diversas aplicações farmacológicas, tais como efeito imunomodulatórios, anticarcinogênico, antioxidante, atividade hipoglicêmica e de combate ao colesterol (XIAO, J.-H. et al., 2010).

As fibras estão presentes na forma insolúvel, principalmente como celulose e lignina, e solúveis, sendo a β -glucana o polissacarídeo mais conhecido, com ação potencializadora do sistema imunológico. As β -glucanas são polissacarídeos com função estrutural na parede celular do micélio, das frutificações do fungo, ou ainda podem ser exo-polissacarídeos (MANZI et al., 2004). A presença de β -glucanas lineares com ligações glicosídicas do tipo β -(1->6) em *A. brasiliensis* e *A. bisporus* com função imunomoduladora foi analisada por SMIDERLE et al. (2013).

A biomassa de *A. bisporus* pode ser utilizada, também, em processo de biorremediação, através da adsorção de compostos tóxicos fenólicos ou compostos com alta concentração de metais pesados (Hg, Pb e Cd) pelo micélio do fungo (KERRIGAN et al., 2013). Do ponto de vista biomolecular, uma curiosidade é que as cepas de *A. bisporus* utilizadas comercialmente são idênticas ou derivadas de apenas duas cepas híbridas, HorstU1 e HorstU3 (DE GROOT et al., 1998).

3.3.1 Produção de biomassa fúngica de *Agaricus* sp.

Tradicionalmente, para obtenção de corpos de frutificação de *A. bisporus*, é produzido um composto sólido que segue duas fases distintas: Fase 1, matérias primas ou substratos são misturados, umedecidos e empilhados, o que resulta em considerável redução de volume em função da digestão anaeróbia por microrganismos – essa fase pode levar de 5-15 dias dependendo das condições de processo e tipos de substratos. Na Fase 2, são realizados tratamentos de pasteurização e condicionamento do composto, que podem durar de 5-7 dias e objetivam um substrato seletivo e livre de patógenos (SANCHEZ; MEJIA; ROYSE, 2008; SONG et al., 2014).

Entretanto, este é um processo complexo que exige grande espaço para aplicação e longo período (semanas até alguns meses) até obtenção dos corpos de frutificação (MOKOCHINSKI et al., 2015). GONZÁLEZ-FIGUEREDO et al. (2011) já consideram a “Fase 2” do processo tradicional como uma fermentação em estado sólido bastante complexa.

Geralmente, corretivos precisam ser adicionados no composto tradicional de *A. bisporus* a fim de se obter as melhores condições para o desenvolvimento do microrganismo. Os condicionantes mais comuns são fontes de carbono e nitrogênio para determinação da relação C/N; a adição de gesso, importante para estrutura do composto e eliminação do excesso de água; carbonato de cálcio, que tem como principal função fornecer ao meio o efeito tamponante, que eleva e mantém o pH no valor desejado e uso de superfosfato e cloreto de potássio (EIRA, 2000; MOLENA, 1986).

Alternativamente, a produção de micélio vegetativo, através do CFL, possui uma perspectiva mais atraente do que o processo tradicional (HADAR; COHEN-ARAZI, 1986). Já a produção da biomassa fúngica pelo CFS apresenta potencial tecnológico para bioconversão dos resíduos agroindustriais, principalmente quando objetiva-se a produção em larga escala (MOKOCHINSKI et al., 2015; PANDEY, 2003).

Para poder utilizar o micélio fúngico em substituição ao corpo de frutificação é necessário verificar, além do tempo do processo de produção, as estruturas químicas de ambas as fases. Ao compararem as composições químicas entre o corpo de frutificação crescido em substratos de algodão e o micélio produzido em

cultura submersa de *Pleurotus ostreatus*, HADAR; COHEN-ARAZI (1986), verificaram uma grande similaridade entre as duas estruturas fúngicas, concluindo que a produção de micélio vegetativo, em um curto espaço de tempo, é viável.

Estudos comprovaram que polissacarídeos bioativos estão presentes por todo micélio vegetativo que compõe a massa micelial de *A. blazei* (FIRENZUOLI; GORI; LOMBARDO, 2008; MIZUNO et al., 1999). MACHADO et al. (2007) testaram polissacarídeos bioativos provenientes de composto exaurido do cogumelo de *A. blazei* como aditivo alternativo ao antibiótico usado em frangos de corte e concluíram que o mesmo pode ser utilizado sem perdas no rendimento das carcaças.

MOKOCHINSKI et al. (2015) utilizaram *A. brasiliensis* nos CFL e CFS em diferentes substratos vegetais objetivando a produção máxima de biomassa e esteróis e ergosterol. Os autores verificaram que ambas as técnicas são eficientes para produção de biomassa, com destaque para produção de esteróis e ergosteróis pelo processo submerso.

A utilização de micélio de *A. bisporus*, a partir de substratos baratos e por CFL, possui potencial para alimentação humana (KURBANOGLU; ALGUR; ZULKADIR, 2004). A produção de micélio vegetativo de *A. bisporus* para fins alimentícios, mais especificamente como equivalente à carne, foi estudada por KIM et al. (2011), sendo a escolha do fungo não somente pelo elevado teor de proteínas presente na biomassa, mas também devido à consistência das fibras.

MAO et al. (2013) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar os parâmetros da extração de exopolissacarídeos (EPS) de *A. bisporus*, para o uso como antioxidantes e hipoglicêmico naturais, através do CFL. Após otimização, os autores obtiveram o valor de 2,69 g.L⁻¹ de produção de EPS a partir da biomassa fúngica.

Para poder extrair e isolar quitosanas das hifas de *A. bisporus*, HÄNSELER et al. (1983), optaram pelo cultivo submerso utilizando frutose como fonte preferencial de carbono (10 g.L⁻¹), temperatura de incubação de 28°C e tempo de fermentação totalizando 6 dias (correspondente a fase log). Os autores realizaram correção de pH do meio, com NaOH, para 5,3.

A produção de micélio de *Agaricus bisporus* Suksung em cultivo submerso para utilização como análogo à carne foi estudada por KIM et al. (2011). Em biorreator de 20 L, a composição do meio de cultivo para produção de biomassa consistiu de

(g.L⁻¹): extrato de líquido de cana de açúcar (20 g.L⁻¹) como fonte de carboidratos, NaNO₃ (10 g.L⁻¹) e extrato de levedura (5 g.L⁻¹). Os parâmetros de processo foram 150 rpm, temperatura de 28 °C, pH 6,5 e tempo de fermentação de 4 dias. Nessas condições, os autores obtiveram um rendimento de micélio na ordem de 15 g.L⁻¹ estando bastante próximo do teste realizado em bancada (15,3 g.L⁻¹), a qual foi realizada com meios de cultivos específicos e inviáveis economicamente para produção em larga escala.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O microrganismo utilizado neste trabalho, *Agaricus bisporus*, foi obtido de um fornecedor de Santa Cruz do Sul, RS.

As amostras de resíduos de mandarina verde (*Citrus reticulata*) foram gentilmente cedidas pela cooperativa dos Citricultores Ecológicos do Vale do Caí - Ecocitrus, localizada no município de Montenegro, RS. Estes frutos são provenientes do raleio e foram utilizados na agroindústria para a extração de óleos essenciais orgânicos e, posteriormente, descartados ou então utilizados na alimentação animal.

As amostras de resíduos de laranja (*Citrus sinensis*) foram obtidas de um comércio local, localizada no município de Santa Cruz dos Sul, RS.

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento da pesquisa são de padrão analítico.

4.2 Isolamento de *Agaricus bisporus*

O isolamento de *Agaricus bisporus* foi realizado a partir da transferência de um fragmento de basidiocarpo, previamente imerso em solução de NaClO a 2% durante três minutos, para uma placa de petri contendo meio BDA. A incubação foi realizada em estufa bacteriológica à temperatura de 28°C, por um período de doze dias.

4.3 Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido segundo a metodologia proposta por CARVAJAL et al. (2012). Amostras de cinco discos de 5 mm de micélio em ágar BDA (7 dias, 28°C) foram transferidos para frascos Erlenmeyer (250 mL), com 50 mL de caldo estéril (121°C, 15 min) composto por (g.L⁻¹): glicose 40, extrato de levedura 3, peptona bacteriológica 3, K₂HPO₄ 0,5, MgSO₄.7H₂O 0,3, água deionizada 1L. A incubação foi realizada sob agitação de 150 rpm em incubador rotatório tipo *shaker*, à temperatura de 28°C, por um período de sete dias.

4.4 Preparo das amostras

Os resíduos de mandarina verde e laranja foram usados na forma *in natura* em todos os experimentos fermentativos.

A fração líquida do resíduo de mandarina verde foi obtida a partir da extração do suco desse resíduo e, em seguida, peneirada para remoção de excesso de sólidos e sementes. A extração se deu através do auxílio de um espremedor manual para sucos. Esse extrato líquido foi utilizado no cultivo em fase líquida. O material restante, após extração do suco, foi triturado objetivando a fração sólida utilizada no cultivo em fase sólida.

Os resíduos de laranja foram apenas triturados e em seguida utilizados no cultivo em fase sólida.

As amostras de todos os resíduos processados foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em *freezer*.

4.5 Cultivo em fase líquida (CFL) utilizando o extrato líquido do resíduo de mandarina verde

O meio para CFL foi semelhante ao caldo para preparo de inóculo porém sem adição de glicose e substituindo a água por extrato líquido de resíduo de mandarina verde. Para as correções de pH utilizaram-se as soluções de NaOH 6 mol.L⁻¹ e HCl 1 mol.L⁻¹. Frascos erlenmeyers (triplicatas de 250 mL) contendo 50 mL deste caldo estéril (121°C, 15 min) foram inoculados com suspensão de micélio (inóculo) de 5% (v/v). A incubação foi realizada sob agitação constante de 150 rpm. O controle foi realizado sem adição de inóculo.

4.6 Otimização do cultivo em fase líquida (CFL)

Realizou-se estudo da otimização da produção de biomassa no CFL por planejamento estatístico fatorial 2³. A especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento pode ser visualizada na Tabela 4. Com auxílio do *software* Minitab 17, elaborou-se o planejamento fatorial 2³, utilizando o Delineamento Composto Central (DCC), com oito pontos fatoriais, seis pontos axiais e seis repetições no

ponto central, totalizando 20 ensaios (Tabela 5). A resposta estudada foi a produção de biomassa. O Minitab 17 foi usado também para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos à Análise de Variância (ANOVA). A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar as condições do CFL e fornecer um modelo matemático adequado para a produção de biomassa do processo.

Tabela 4 - Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento 2^3 .

Variável	Símbolo	Níveis		
	Codificado	-1	0	1
Temperatura (°C)	x_1	23	28	33
pH	x_2	4,5	6	7,5
Tempo (dias)	x_3	4	8	12

Tabela 5 - Combinação de variáveis originadas a partir do planejamento completo 2^3 utilizando Delineamento Composto Central.

Experimento	x_1	x_2	x_3
1	1	1	-1
2	-1	1	-1
3	0	0	0
4	0	0	1
5	-1	1	1
6	0	0	0
7	-1	-1	-1
8	0	-1	0
9	1	1	1
10	1	0	0
11	-1	-1	1
12	0	0	0
13	-1	0	0
14	1	-1	-1
15	1	-1	1
16	0	0	0

17	0	0	-1
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	1	0

4.7 Cultivo em fase sólida (CFS)

Inicialmente, realizou-se o cultivo de *Agaricus bisporus* em placas de Petri contendo apenas o resíduo triturado de mandarina verde (*Citrus reticulata*), com ajuste de pH, ajustado para 4,5 através da adição de CaCO₃ a 1% (m/m) e não ajustado, pH inicial em 3,2. Todo material foi esterilizado a 121 °C, pressão de 1 atm, durante 20 minutos, em autoclave vertical. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi realizada a inoculação em bancada com um disco de 8 mm de cultura pura de *A. bisporus* por placa.

Placas de petri de 90 mm de diâmetro contendo 20 g de resíduo sólido de mandarina verde foram inoculadas com um disco de 8 mm de cultura pura de *A. bisporus* (BDA, 7 dias 28°C) por placa e incubadas em estufa bacteriológica, a 28°C, sendo realizado o registro fotográfico diário, a partir de 72 horas do início da incubação, até que o micélio colonizasse toda a superfície do substrato na placa.

O experimento de produção foi realizado em frascos erlenmeyers (triplicatas de 125 mL) contendo 25 g de resíduo de mandarina ou de laranja pH 4,5 (corrigidos com CaCO₃) estéril (121°C, 15 min) foram inoculados com suspensão de micélio (inóculo) de 4% (v/m). A incubação foi realizada a 28°C por 14 dias. O controle foi realizado sem adição de inóculo e acompanhou cada triplicata.

4.8 Métodos analíticos

A seguir, é descrita a metodologia utilizada na determinação dos principais componentes do resíduo de *Citrus* sp. e aqueles resultantes dos processos fermentativos.

4.8.1 Caracterização dos resíduos de *Citrus* sp.

As análises das características físico-químicas realizadas nos resíduos de *Citrus* sp. foram umidade, cinzas, proteínas, fibras e lipídeos conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo LUTZ (2008). Umidade foi determinada por desidratação em estufa a 105°C por 3 horas; lipídeos totais (teores de óleo residual) por extração em Soxhlet; cinzas por queima em mufla a 550°C; fibras bruta pelo método de Weender e proteínas totais pelo método Kjeldahl (valor de correção de 6,25). O carboidrato foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteína, lipídios totais, fibras e cinzas.

4.8.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada diretamente nas amostras com o auxílio de pHâmetro da marca Quimis (Q400rs) devidamente calibrado com soluções tampão de 4 e 7, ambas da marca Quimis.

4.8.3 Determinação da biomassa de *Agaricus bisporus* em CFL

Após o período de incubação, o meio de cultivo líquido contendo o micélio foi filtrado em papel filtro Whatmann N° 1 previamente pesado, lavado com água destilada estéril por três vezes e seco a 45°C até peso constante em estufa de secagem. Em seguida, a biomassa retida no papel filtro foi disposta em vidros relógio e pesada em balança analítica de precisão.

4.8.4 Determinação de glicose e frutose por CLAE

Foi realizada a análise quantitativa de glicose e frutose do cultivo em fase líquida. As soluções foram preparadas em concentrações de 1 a 100 mg L⁻¹ e determinadas por CLAE. A análise foi conduzida em um equipamento Shimadzu com bomba em modo isocrático modelo LC-20AT e Detector de arranjo de diodos modelo SPD – M 20A, com uma coluna *Rezex™ RHM monosaccharide H⁺* de 30

cm, temperatura de 85°C, vazão de 0,6 mL.min⁻¹ de fase móvel água milli Q, volume de amostra injetada de 20 µL.

4.8.5 Determinação do conteúdo de açúcares redutores (AR)

O método de determinação da concentração de açúcares redutores usado neste trabalho foi adaptado do método proposto por MILLER (1959), o qual utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), que possui a sensibilidade na faixa de 0,1 a 1,0 g.L⁻¹ de açúcares redutores expresso como glicose.

A análise foi realizada misturando-se 0,3 mL da amostra de extrato bruto, convenientemente diluída, com 0,2 mL do reagente DNS e levando ao banho aquecido a 100°C por 5 min. O branco foi preparado pela adição de 0,3 mL de água deionizada substituindo a amostra. A absorbância em espectrofotômetro (UV-Vis) foi feita em um comprimento de onda de 540 nanômetros. A curva padrão de glicose, na faixa de 0,1 a 1,0 g/L, foi construída nas mesmas condições da amostra, gerando um modelo de regressão linear, bem como coeficiente de determinação da glicose em função da absorbância medida.

Para análise de açúcares redutores a partir de amostras do CFS, as mesmas amostras foram submetidas ao processo de extração dos seus componentes, utilizando-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 (DEUTSCHER, 1990) na proporção 1:17 (g de sólido.mL⁻¹ de solução-tampão), a 25°C e 130 rpm, durante 1h em incubadora tipo *shaker*. O extrato bruto foi filtrado e centrifugado a 2500 rpm, para a remoção dos sólidos suspensos.

4.8.6 Determinação da atividade pectinolítica

Para determinação das atividades enzimáticas, foram utilizados 100 µL de cada amostra, suspenso em 900 µL de uma solução contendo extratos de pectina, á 5 mg.mL⁻¹ em tampão de McIlvaine de pH 5,0, incubados por 4 horas em estufa a 37°C para posterior análise (MORITA; ASSUMPÇÃO, 1972). As atividades enzimáticas foram determinadas a partir açúcar redutor liberado, através do método do Ácido Dinitrossalicílico (DNS) para a análise de açúcares redutores.

Uma unidade de pectinase (U) é definida como a quantidade de micromoles de açúcares redutores liberados por minuto por mL da amostra, sob condições de ensaio descritas ($U = \mu\text{mol AR}/\text{min}$).

4.8.7 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais no cultivo submerso foi realizada pelo método do Biureto (Labtest Diagnóstica S.A.).

4.8.8 Análise por FT-IR do cultivo submerso

Triplicatas contendo 10 μL das amostras diluídas na proporção 1:5 (substrato bruto:água deionizada) foram acrescidas de 10 μL de ferricianeto de potássio 10 g/L e espalhadas em probes de inox de modo a cobrir toda sua superfície de maneira uniforme. Em seguida, as amostras foram desidratadas (60-65°C, 15 min) e então analisados por espectroscopia de reflectância especular no infravermelho com Transformada de Fourier na faixa de 4000-450 cm^{-1} , com 8 pulsos de varredura e 4 cm^{-1} de resolução em espectrômetro Espectrofotômetro no Infravermelho Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer Perkin Elmer com laser de HeNe de 633nm equipado com acessório de reflectância difusa (Pike Technologies, Madison USA). Os espectros foram normalizados pela amplitude por νCN , pré-processados por amostra via espalhamento multiplicativo de luz, pré-processados por variável via centragem na média e analisados por regressão via mínimos quadrados parciais (PLS) juntamente com os respectivos valores de AR, AP e PT, com validação cruzada de mútua exclusão de 1 por vez em software Pirouette 4.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização dos resíduos sólidos de *Citrus* sp.

Os resultados da caracterização das amostras trituradas e *in natura* dos resíduos de mandarina e laranja estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da caracterização das amostras *in natura* dos resíduos de mandarina e de laranja.

Determinações (%)	Amostra de mandarina	Amostra de laranja
Umidade	88,25 ± 0,68	78,99 ± 1,78
Cinzas	0,54 ± 0,01	0,58 ± 0,98
Lipídeos	0,55 ± 0,10	0,17 ± 0,05
Fibras	3,48 ± 0,66	5,06 ± 1,89
Proteínas	7,18 ± 0,69	2,82 ± 0,40
Carboidratos	3,48	17,44

De maneira geral, os resultados da caracterização das amostras *in natura* dos resíduos de mandarina e laranja, apresentados na Tabela 6, foram semelhantes aos resultados encontrados para tangerina variedade Ponkã (*Citrus reticulata*) e laranja variedade Pêra (*Citrus sinensis*) analisados em outros estudos (AHMED et al.; STEFANELLO; ROSA, 2012), com algumas exceções. Entre elas, destaca-se o baixo valor de carboidratos para o resíduo de mandarina (3,48%), que pode estar associado à origem desse resíduo, proveniente do raleio manual (curto período de maturação), e à remoção de parte da casca para extração de óleos essenciais na agroindústria.

Quanto aos valores de umidade encontrados, 88% para o resíduo de mandarina e de 79% para o resíduo de laranja observa-se que esses resíduos encontram-se entre na faixa em que ocorre a maioria dos processos de FES, entre 30 e 85%, demonstrando sua aplicabilidade nesse ponto (PANDEY, 2003).

5.2 Isolamento de *Agaricus bisporus*

Foi possível isolar o fungo *Agaricus bisporus* a partir de fragmentos do basidiocarpo com desinfecção com NaClO a 2%. Dessa forma, obteve-se uma cultura pura (Figura 1) que foi mantida viável através reinoculações quinzenais sob cultivo a 28°C em meio BDA. Culturas puras de *A. bisporus* também foram conservadas em glicerol (20%), sob refrigeração, no laboratório de microbiologia industrial da UNISC.



Figura 1 - *Agaricus bisporus* isolado a partir de fragmento de corpo de frutificação em meio BDA.

5.3 Avaliação dos parâmetros operacionais do CFL com *Agaricus bisporus*

Foram definidos os pontos centrais (0,0,0) para CFL, objetivando a maximização da produção de biomassa utilizando o extrato líquido do resíduo de mandarina verde. Através do planejamento fatorial completo 2^3 , utilizando o Delineamento Composto Central (DCC), obteve-se uma matriz com 20 ensaios. Os parâmetros fixos deste planejamento foram a concentração do inóculo (5% v/v) e a agitação do meio (150 rpm). Conforme as variáveis estudadas de tempo (4, 8 e 12 dias), temperatura (23, 28 e 33°C) e pH (4,5, 6 e 7,5) as quantidades de biomassa obtidas podem ser visualizadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Combinação de variáveis originadas a partir do planejamento completo 2^3 utilizando Delineamento Composto Central com a resposta da quantidade de biomassa obtida em cada experimento.

Experimento	Temperatura (T) (°C)	pH	Tempo (t) (dias)	Biomassa (Bm) (g.L ⁻¹)
1	1	1	-1	5,80
2	-1	1	-1	3,85
3	0	0	0	34,56
4	0	0	1	37,19
5	-1	1	1	21,71
6	0	0	0	44,95
7	-1	-1	-1	35,30
8	0	-1	0	44,39
9	1	1	1	28,91
10	1	0	0	31,44
11	-1	-1	1	29,07
12	0	0	0	45,85
13	-1	0	0	29,05
14	1	-1	-1	31,18
15	1	-1	1	23,53
16	0	0	0	34,38
17	0	0	-1	18,15
18	0	0	0	47,06
19	0	0	0	40,19
20	0	1	0	28,13

Pode ser observado que os resultados mais elevados para produção de biomassa fúngica foram obtidos no ponto central, que corresponde a 8 dias de processo fermentativo, pH 6 e temperatura de 28°C. O maior valor de biomassa encontrado foi de 47,06 g.L⁻¹ e o menor valor foi de 3,85 g.L⁻¹. Algumas exceções foram identificadas, entre elas, destaca-se o experimento 4 onde foi obtido uma biomassa de 37,19 g.L⁻¹, fato que pode ser relacionado ao maior tempo de cultivo (12 dias), sendo as demais variáveis correspondentes ao ponto central. O experimento 8, que teve alterado apenas o pH (4,5), teve como resultado o valor de

44,39 g.L⁻¹ de biomassa, sugerindo que o meio mais ácido pode favorecer o desenvolvimento de biomassa.

A produção de biomassa nos pontos centrais (experimentos 3, 6, 12, 16, 18 e 19), alcançou um valor médio de 42,57 g.L⁻¹. Esse valor é maior do que o obtido por KIM et al. (2011) que utilizaram extrato de cana de açúcar como fonte de carboidratos, na concentração de 30 g.L⁻¹, resultando em 15,0 g.L⁻¹ (peso seco) de biomassa de *A. bisporus*.

A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento é apresentada na tabela 8, onde (L) representa a parte linear e (Q) a parte quadrática do modelo. Observou-se, também, os valores obtidos para o erro padrão, p-valor e os valores dos coeficientes das variáveis do modelo. Estes resultados foram obtidos pelo software Minitab (versão17).

Tabela 8 - Estimativa dos efeitos para produção de biomassa no extrato líquido de mandarina verde para o planejamento DCC.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coeficiente
Constante		1,69	>0,001	160,43
T(L)	0,38	1,59	0,908	16,78
T(Q)	-14,95	2,81	0,020	0,29
t(L)	9,23	1,59	0,012	4,34
t(Q)	-20,09	2,81	0,003	0,63
pH(L)	-15,01	1,59	>0,001	14,15
pH(L) x t(L)	13,71	1,78	0,002	1,14

R², 0,879 ; R²-ajustado, 0,823

Nota-se que a temperatura e o tempo quadrático, o tempo e pH lineares e a interação entre pH e tempo foram significativos para produção de biomassa considerando um intervalo de confiança de 95% (p<0,05). A temperatura e tempo quadráticos e o pH linear influenciam a produção de biomassa negativamente, ou seja, se o valor dessa variáveis aumentar haverá uma diminuição no valor da resposta (biomassa).

O modelo obtido para a produção de biomassa (Bm) é apresentado na equação 1. Os coeficientes em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

$$Bm(g.L^{-1}) = -160,43 + 16,78 T - 14,15 \text{ pH} + 4,34 t - 0,29 T*T - 0,63 t*t + 1,14 \text{ pH}*t \quad (1)$$

O ajuste do modelo é indicado pelo coeficiente de determinação ou explicação (R^2). Quanto mais próximo de 1, maior a correlação entre os dados experimentais e preditos. Neste caso, o modelo apresentado na equação 1 foi de 0,879, sugerindo que 87,9% das variações obtidas são explicadas pelo modelo. O valor de R^2 -ajustado (0,823) sugere que 82,3% das variações de biomassa são atribuídas às variáveis independentes e que 17,7% do total das variações não podem ser explicadas pelo modelo.

A análise de variância para a resposta de biomassa é apresentada na Tabela 9. Para um nível de confiança de 95%, tem-se o valor tabelado de F, com os respectivos graus de liberdade: $F_{\text{tab}} (6;13;0,05)=2,92$.

Tabela 9 - Análise da variância obtida para o planejamento DCC para produção de biomassa no extrato líquido de mandarina.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{calc}
Regressão	2387,2	6	397,96	15,73
Resíduos	324,84	13	25,29	
Total	2712	19	423,25	

Dessa forma, $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, logo, o modelo é válido para prever o comportamento do processo. Sempre que essa relação for maior que um a regressão é estatisticamente significativa havendo a relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que 4 (BARROS, 1996; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). O valor da razão de F_{calc} por F_{tab} foi de 5,38 indicando, portanto, que o modelo é significativo e, ainda, útil para fins preditivos.

A Figura 2 demonstra a interação entre o pH e a temperatura (superfície de contorno) no cultivo submerso após 8 dias de processo. Conforme pode ser observado, a região de maior concentração de biomassa ($\geq 45 \text{ g.L}^{-1}$) ocorreu em meio mais ácido, com variações (aproximadas) de pH entre 4,5 e 5,0 e temperatura

entre 26 e 30°C. À medida que houve o aumento do pH a concentração de biomassa reduziu. Isso se confirma ao se obter o valor de biomassa de 57,35 g.L⁻¹ (valor predito) utilizando a equação 1, mantendo o tempo em 8 dias e temperatura em 28°C, alterando apenas o valor do pH para 4,5. Ao produzirem biomassa para posterior isolamento da enzima quitina sintase contida na parede celular de *A. bisporus*, HÄNSELER et al. (1983) realizaram CFL durante 6 dias, correspondente a fase log do microrganismo, à temperatura de 28°C, com ajuste de pH em 5,3. KIM et al. (2011) obtiveram os melhores resultados de crescimento de *A. bisporus*, em fase líquida, à temperatura de 28°C e pH inicial igual a 6,0. Entretanto, esses autores utilizaram *A. bisporus Suksung*, uma cepa adaptada para CFL que produz alto rendimento de biomassa em meio específico.

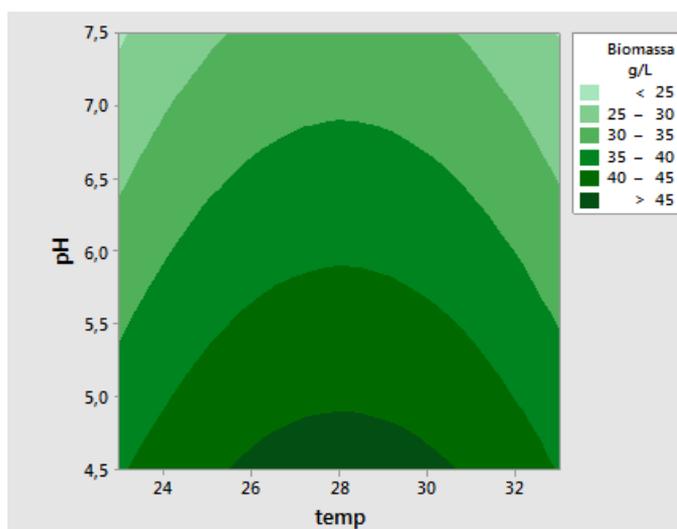


Figura 2 - Superfície de contorno da produção de biomassa em função da temperatura e pH no CFL, com tempo fixado em 8 dias.

Na Figura 3, é possível verificar a influência do pH em função do tempo no crescimento de *A. bisporus* no CFL nos tempos de 4, 8 e 12 dias. Na análise a partir de 4 dias processo, observa-se um decréscimo mais expressivo na produção de biomassa frente ao aumento do pH do meio. Os valores mais elevados de biomassa deram-se a partir de 8 dias de processo. Em 12 dias, nota-se que a influência do pH na produção de biomassa diminuiu consideravelmente. Isso se deve, possivelmente, pela adaptação de *A. bisporus* às condições do meio de cultivo e pelo longo tempo (12 dias) de processo. Porém, essa condição apresentou o pior rendimento na produção de biomassa da fermentação submersa.

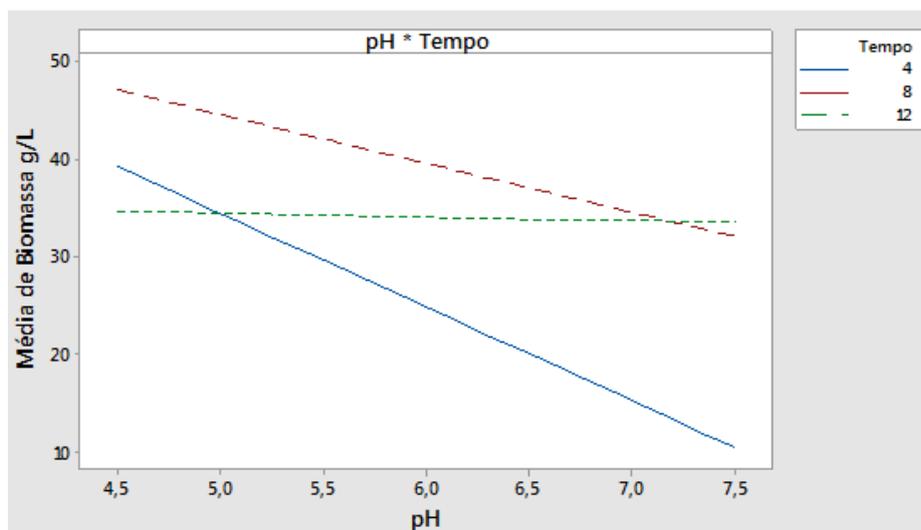


Figura 3 – Produção de biomassa de *A. bisporus* em função do pH e tempo.

As superfícies de respostas para produção de biomassa são apresentadas na Figura 4. Estas superfícies fornecem uma interpretação visual da interação entre duas variáveis com uma variável mantida no ponto central facilitando a localização das condições ótimas do experimento. A Figura 4(A) mostra o efeito da temperatura e tempo para produção de biomassa. É possível observar o efeito quadrático da temperatura e tempo na superfície de resposta, indicando que uma maior produção de biomassa é obtida nos pontos centrais analisados. A Figura 4(B) mostra o efeito do pH e tempo na produção de biomassa, demonstrando a diminuição de biomassa com o aumento do pH. Os efeitos quadrático e linear podem ser observados simultaneamente. A Figura 4(C) mostra o efeito da temperatura e pH frente a resposta de biomassa. O efeito quadrático gerado pela temperatura e pH foi observado.

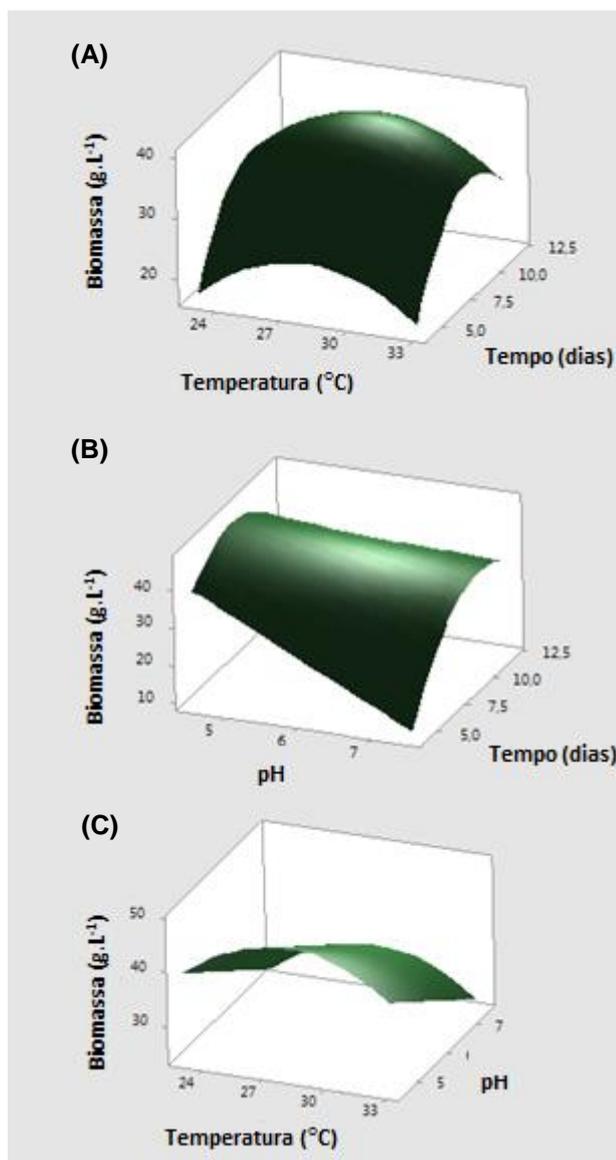


Figura 4 – Superfícies de resposta da produção de biomassa por fermentação submersa por *A. bisporus* em função da (A) temperatura e tempo, (B) pH e tempo e (C) temperatura e pH. Os fatores que não foram incluídos nos eixos foram fixados em seus respectivos níveis ótimos.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) vem sendo cada vez mais utilizada para entendimento e otimização de processos fermentativos (MAO, X.-B. et al., 2005; PRAPULLA et al., 1992). É uma técnica poderosa para o teste com múltiplas variáveis, pois menos ensaios experimentais são necessários em comparação ao estudo com uma variável de cada vez. Além disso, as interações entre variáveis podem ser identificadas e quantificadas por essa técnica (LIU; WANG, 2007).

5.3.2 Análise de consumo de glicose e frutose no CFL para o extrato líquido de mandarina

As concentrações de glicose e frutose no CFL de *Agaricus bisporus*, analisadas através da técnica de cromatografia líquida (HPLC), podem ser observada na Tabela 10. Os valores para glicose e frutose foram obtidos através da correlação linear das curvas padrão dos mesmos açúcares, sendo o coeficiente de determinação (R^2) de 0,9978 para glicose e 0,9998 para frutose.

Tabela 10 - Concentração dos açúcares no CFL analisadas por HPLC

Experimento	Glicose (g.L⁻¹)	Frutose (g.L⁻¹)	Biomassa (g.L⁻¹)
Controle	31,69	37,33	0,00
1	11,07	39,73	5,80
2	28,27	40,48	3,85
3	0	31,35	34,56
4	0	29,24	37,19
5	0	28,42	21,71
6	0	28,28	44,95
7	0	28,12	35,30
8	0	28,46	44,39
9	0	26,91	28,91
10	6,59	32,82	31,44
11	0	24,95	29,07
12	0	42,01	45,85
13	0	42,18	29,05
14	0	3,41	31,18
15	0	33,65	23,53
16	0	34,04	34,38
17	0	51,62	18,15
18	0	38,35	47,06
19	0	35,55	40,19
20	0	31,89	28,13

A concentração inicial de glicose na amostra controle foi de 31,69 g.L⁻¹. Para frutose, o valor obtido foi de 37,33 g.L⁻¹. De maneira geral, houve a utilização preferencial da glicose durante o CFL, sendo esta consumida na totalidade em praticamente todos os experimentos. Já para frutose, o consumo médio por *A. bisporus* durante o processo submerso foi de, apenas, 13%.

A glicose é considerada a melhor fonte de carboidrato para produção de biomassa por fungos no CFL (LIN; SUNG, 2006; XIAO, J., 2008). Entretanto, para *A. brasiliensis*, a sacarose é mais efetiva na produção de exopolissacarídeos (FAN et al., 2007). A partir dessas considerações, sugere-se que o consumo preferencial de glicose por *A. bisporus* possa estar associado à influência da composição química do meio de cultura do inóculo (item 4.3), no qual se utilizou glicose como fonte preferencial de fonte de carbono. A adição de frutose no inoculante pode induzir o consumo desse açúcar no processo fermentativo, aproveitando ainda mais essa fonte de carbono e, possivelmente, aumentando o rendimento de biomassa.

O valor inicial de $31,69 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose no início do cultivo submerso, utilizando o extrato líquido de mandarina, foi próximo ao usado por CARVAJAL et al. (2012) (40 g.L^{-1}) no cultivo de *A. brasiliense*, obtendo $10,2 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa fúngica. LIU et al. (2007) avaliaram a produção de biomassa de *A. blazei* em função de diferentes concentrações de glicose, extrato de levedura e peptona através da metodologia de superfície de resposta (MSR). O melhor resultado de biomassa obtido foi de $10,86 \text{ g.L}^{-1}$ com o consumo de $26,30 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose.

Dessa forma, a disponibilidade de glicose e frutose no extrato líquido de mandarina demonstra o potencial de aproveitamento desse resíduo como fonte de carboidratos, facilmente assimiláveis, para conversão biológica por *A. bisporus* e que não necessitam de tratamento prévio para disponibilização desses açúcares.

5.3.3 Monitoramento do CFL para extrato líquido de mandarina

O objetivo desta etapa do trabalho foi propor um método inovador baseado em FT-IR para quantificação açúcares redutores (AR), atividade pectinolítica (AP) e proteínas totais (PT) em virtude da simplicidade, rapidez, baixa geração de resíduos e baixo custo da análise espectrométrica. Esta proposta se justifica pelo método referência utilizado (UV-VIS) ser demorado e, principalmente, gerar grande volume de resíduos líquidos.

5.3.3.1 Quantificação de AR, AP e PT: método de referência

Foram realizadas as análises de AR, AP e PT dos experimentos do CFL. A concentração de AR é apresentada na Figura 5.

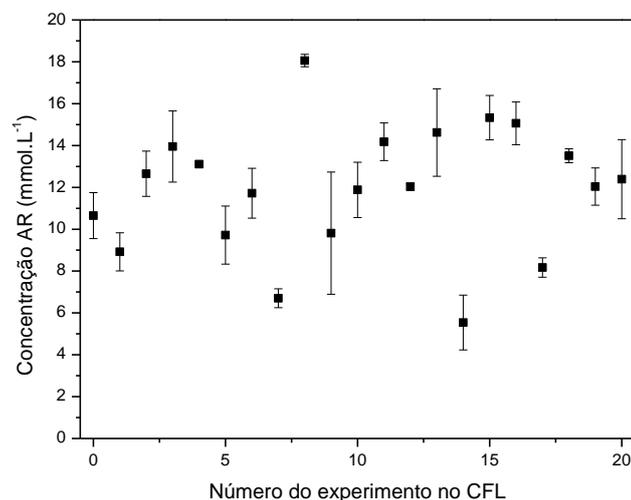


Figura 5 - Concentração de açúcares redutores (AR) em um conjunto de 21 experimentos realizados no CFL em meio contendo extrato líquido do resíduo de mandarina.

A concentração de AR no início do processo (experimento 0) foi de 10,65 ($\pm 1,10$) mmol.L⁻¹. O maior valor de AR alcançado foi no experimento 8, resultando em 18,06 ($\pm 0,30$) mmol.L⁻¹. De maneira geral, observa-se variações na concentração de AR no CFL, que pode estar associada tanto ao consumo ou a atividade enzimática de *A. bisporus* no processo.

A atividade pectinolítica nos experimentos do CFL é apresentada na Figura 6. Verificou-se a atividade pectinolítica em todos os experimentos do CFL. O maior valor encontrado ocorreu no experimento 14, resultando em 0,025 U.mL⁻¹. Esse resultado não acompanhou o valor máximo de concentração de AR (experimento 8 da figura 5), sugerindo que a atividade pectinolítica não está diretamente relacionada ao aumento desses açúcares no meio de cultivo. O valor máximo alcançado no processo submerso (0,025 U.mL⁻¹) é bastante inferior ao obtido por PATIL; DAYANAND (2006), que alcançaram a máxima produção de pectinases de 12,6 U.mL⁻¹ utilizando *Aspergillus niger*, cepa comumente usada quando se objetiva a produção dessas enzimas no CFL.

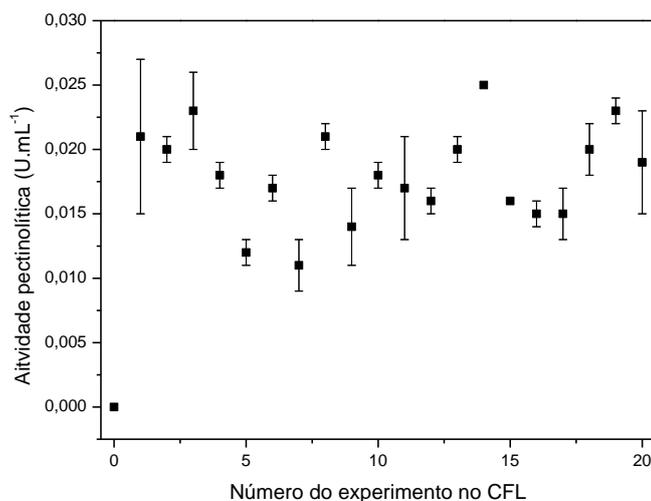


Figura 6 - Atividade pectinolítica em um conjunto de 21 experimentos realizados no CFL em meio de cultivo contendo extrato líquido do resíduo de mandarina.

A análise de proteínas totais no CFL é mostrada na Figura 7.

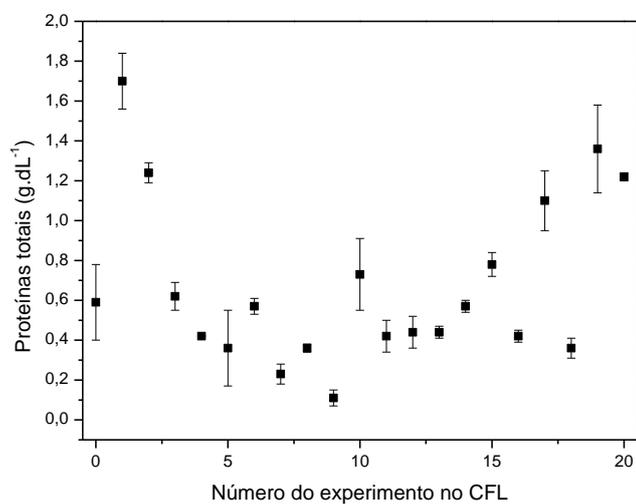


Figura 7 - Teor de proteínas totais em um conjunto de 21 experimentos realizados no CFL em meio contendo extrato líquido do resíduo de mandarina.

A concentração de proteínas totais no início do processo foi de $0,59 (\pm 0,19)$ g.dL^{-1} , resultado próximo ao esperado em função das fontes de proteínas utilizadas na síntese do meio de cultivo submerso, que foram extrato de levedura ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$) e

peptona ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$). Esse resultado mostra que o extrato líquido do resíduo de mandarina teve mínima ou nenhuma contribuição como fonte proteica.

5.3.3.2 Análise por FT-IR

As mesmas amostras dos extratos líquidos dosados em UV-VIS foram usadas para quantificações por FT-IR, para o CFL. Por se tratar de extratos aquosos de matrizes biológicas complexas, é necessário conhecer as principais bandas de absorção na região do infravermelho médio que podem caracterizar grupos funcionais de biomoléculas ou modificações químicas em matriz desta natureza. A Tabela 11 apresenta um resumo destas absorções.

Tabela 11 - Bandas do espectro de infravermelho médio atribuídas a grupos funcionais.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Atribuição
3000-2800	ν C-H da saturação CH e ácidos graxos
3300-2500	OH provenientes de ácidos carboxílicos
~1740	ν C=O de grupo éster, essencialmente a partir de lipídios de ácidos graxos
~1650	ν C=O de amidas (proteínas), quitina
~1600	ν_{as} (COO-) carboximetil
~1540	δ N-H de amidas (proteínas), quitina
~1455	δ_{as} CH ₃ e δ_{as} CH ₂ de proteínas
~1398	δ_{s} CH ₃ e δ_{s} CH ₂ de proteínas, e ν_{s} C-O do grupo COO-
~1250-1230	ν_{as} P=O de grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos e fosfolipídios
~1200-900	ν C-O-C de polissacarídeos
~1160	ν (COC), ν (CC) β Glc
~1150	ν (COC), ν (CC) α Glc
890	δ CH (C-1-H), β Glc
850	δ CH (C-1-H), α Glc

ν_{as} estiramento assimétrico; ν_s estiramento simétrico; δ_{as} deformação assimétrica; δ_s deformação simétrica

Fonte: GIORDANO et al. (2001).

Na Figura 8 encontram-se dois espectros FT-IR do meio de cultivo submerso com ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), como padrão interno.

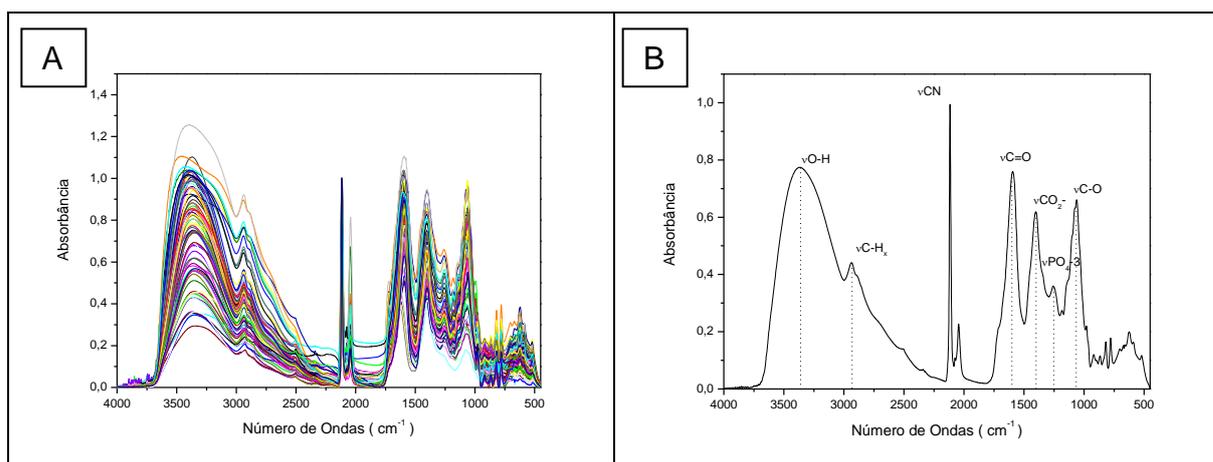


Figura 8 - Espectro normalizado Reflectância Especular do cultivo submerso contendo o conjunto de espectros (A) e (B) o espectro médio do CFL, ambos com padrão interno de ferricianeto de potássio na região 4000 a 450 cm^{-1} .

No primeiro espectro é possível visualizar o conjunto de espectros obtidos para o CFL. Já o segundo espectro, demonstra o valor médio de todos esses espectros analisados. O espectro de extrato líquido do cultivo submerso se caracteriza pela presença de duas bandas de proteínas, uma em 1650 cm^{-1} ($\nu C=O$, denominada banda de amida I) e a outra em 1398 cm^{-1} ($\nu C-O$, característico de grupos pépticos em proteínas), uma banda de fosfolípidos em 1250 cm^{-1} ($\nu_{as} P=O$), uma banda de polissacarídeos em 1200 cm^{-1} ($\nu C-O-C$), sendo possível caracterizar a presença das bandas de açúcares, que se apresentam nas regiões entre 2500 cm^{-1} e 3300 cm^{-1} ($\nu C-H$ e $\nu C-OH$) (GIORDANO et al., 2001).

A região entre 2000 e 2200 cm^{-1} é atribuída ao estiramento CN presente no ferricianeto de potássio, apresentando um complexo de bandas sendo duas (2000 e 2200 cm^{-1}) mais intensas. Os espectros de FT-IR refletem uma mistura complexa de comprimentos de onda e de intensidades de absorção. Sendo muitas vezes difícil de encontrar uma única banda de absorção que pode servir como base para quantificar um único componente.

Com base nos espectros obtidos, foram desenvolvidos os modelos PLS-DRIFTS para a quantificação de atividade pectinolítica (AP), açúcares redutores (AR) e proteínas totais (PT) presentes no meio de cultivo submerso utilizando o extrato líquido do resíduo de mandarina, cujas figuras de mérito encontram-se na Tabela 12.

Analisando a Tabela 12, pode-se observar que foi possível obter modelos de previsão da concentração AP, AR e PT por FT-IR com boa qualidade estatística. Os valores obtidos de erro quadráticos médios de previsão (RMSEP) e coeficientes de determinação (R^2) para AP, AR e PT foram de 0,0012 U.mL⁻¹ e 0,9760, 0,23 mmol.L⁻¹ e 0,9956 e 0,03 g.dL⁻¹ e 0,9957, respectivamente. Estes valores estão dentro do critério de aceitação quando comparados aos obtidos em outros estudos de sistemas biológicos (BURGESS; DEUTSCHER, 2009; DAHLBACKA et al., 2013; KOCH et al., 2014).

Tabela 12 - Figuras de mérito de modelos PLS/FT-IR de parâmetros de cultivo submerso.

Parâmetro	Faixa	RMSECV/REP	R^2
AP			
Cal	0,001-0,032	0,0025	0,9122
Val	0,002-0,031	0,0012	0,9760
AR*			
Cal	1,21-18,89	0,11	0,9997
Val	2,48-15,38	0,23	0,9956
PT*			
Cal	0,06-5,65	0,08	0,9979
Val	0,08-1,51	0,03	0,9957

RMSECV = erro médio quadrático de validação cruzada, R^2 = coeficiente de correlação de calibração e validação cruzada.

*: com correção de linha de base

Na Figura 9, são apresentadas as curva de correlação entre as amostras de calibração e validação externa para os valores de AR (A), AP (B) e PT (C) tabelados com os valores preditos pelo modelo PLS e, também, com seus respectivos vetores de regressão.

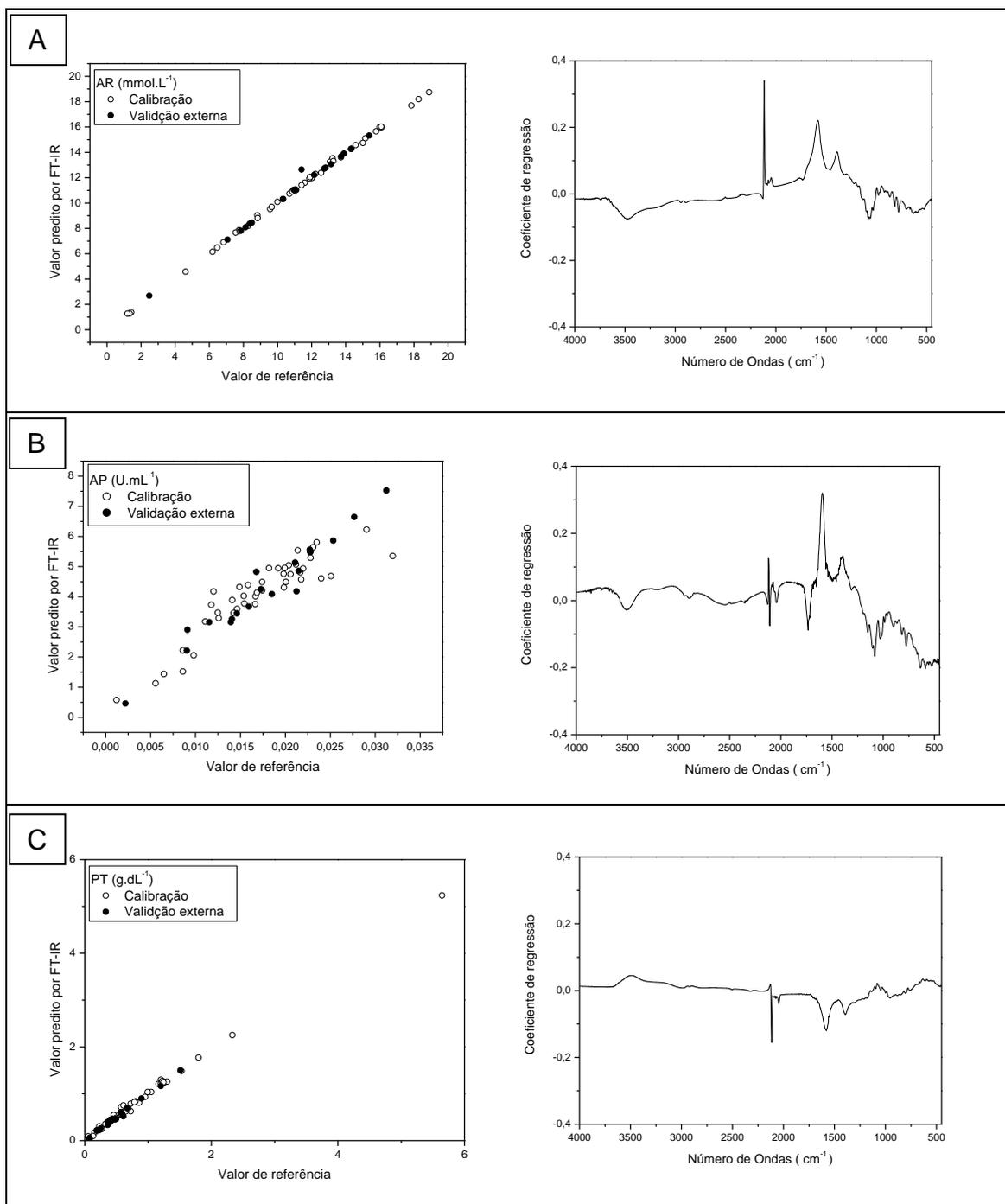


Figura 9 - Curva de correlação entre as amostras de calibração e validação externa dos valores de AR (A), AP (B) e PT (C) tabelados com os valores preditos pelo modelo PLS e seus respectivos vetores de regressão.

Apesar do monitoramento de processos fermentativos por FT-IR utilizando bactérias ou fungos filamentosos ser mais difícil analiticamente quando comparado ao monitoramento de microrganismos unicelulares, em função de que estes processos são submetidos a forte agitação e aeração e, ainda, possuem um meio de

cultivo altamente viscoso, com um fluido que apresenta comportamento reológico não-newtoniano, os mesmos vem sendo cada vez mais estudados (SCARFF et al., 2006). A análise de parâmetros que podem ser consumidos (fontes de carboidratos, como glicose, frutose, lactato, entre outros) ou produzidos (fontes proteicas, como amônia, glutamato, aminoácidos, enzimas, entre outros) durante o CFL é utilizada em bioprocessos a nível industrial, principalmente quando se objetiva o monitoramento em tempo real (SCARFF et al., 2006).

5.4 Cultivo em fase sólida (CFS)

5.4.1 CFS: ensaio preliminar

Preliminarmente, foi realizado CFS utilizando-se o resíduo sólido triturado de mandarina, disposto em placas de petri, a fim de verificar o crescimento de *A. bisporus* e a influência do pH no desenvolvimento do micélio (Figura 10).

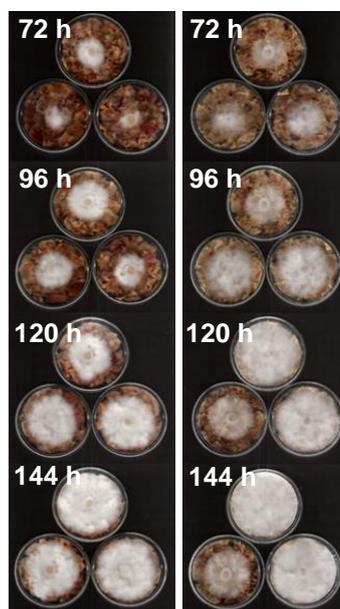


Figura 10 - Sequência de desenvolvimento de *A. bisporus* em teste preliminar de CFS sobre resíduo de mandarina. À esquerda: sem correção de pH. À direita: pH 4,5.

Notou-se que, para valores de pH inferiores a 3,0, não houve desenvolvimento do fungo. Conforme pode ser observado na figura 10, o crescimento de *A. bisporus* ocorreu nas duas condições avaliadas, com e sem ajuste de pH. Ainda, nota-se que o crescimento micelial se deu de forma mais rápida no

meio com pH ajustado para 4,5. A partir dessa análise, procedeu-se a correção do valor de pH para 4,5 dos resíduos sólidos triturados utilizados nos experimento de CFS.

5.4.2 Cultivo em fase sólida (CFS)

Após a determinação e ajuste de pH inicial para 4,5 dos resíduos sólidos de mandarina e laranja, realizou-se o CFS. Foi possível observar que *A. bisporus* desenvolveu-se tanto no resíduo de mandarina, como previsto no ensaio preliminar, quanto no resíduo de laranja. A Figura 11 mostra o desenvolvimento do fungo no resíduo de mandarina em 6 e 14 dias de incubação. Da mesma forma, o crescimento do fungo no resíduo de laranja pode ser observado na Figura 12.

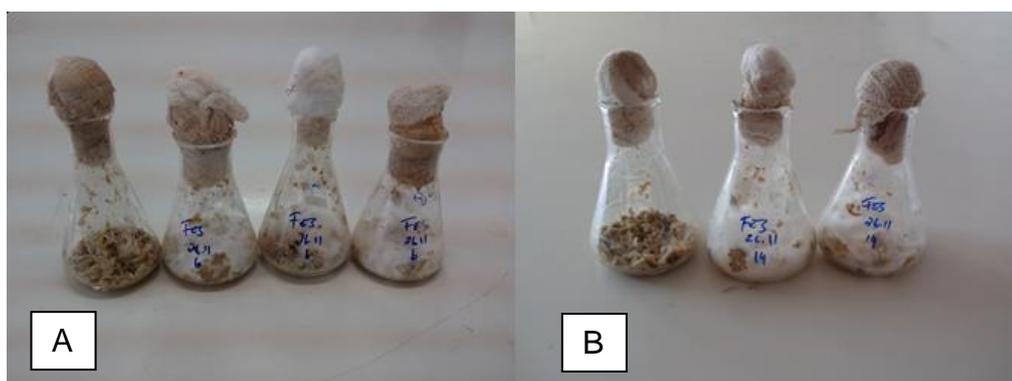


Figura 11 - Crescimento de *A. bisporus* em 6 (A) e 14 (B) dias de incubação no resíduo de mandarina CFS.

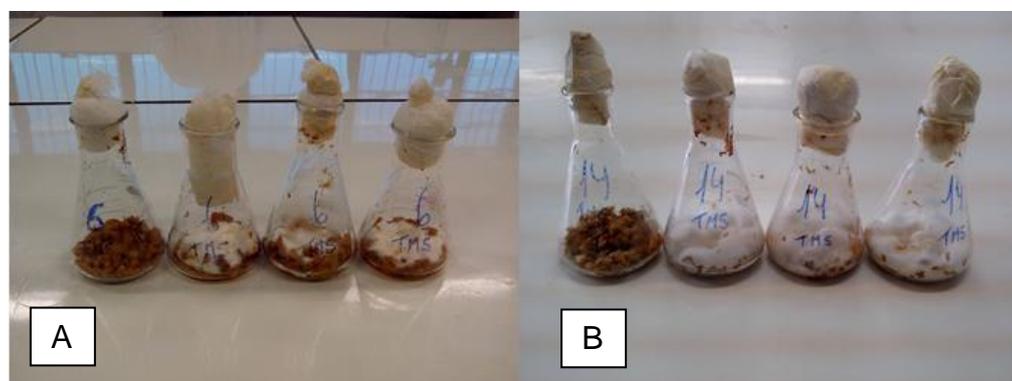


Figura 12 - Crescimento de *A. bisporus* em 6 (A) e 14 (B) dias de incubação no resíduo de laranja no CFS.

Realizou-se a análise de AR nos dois CFS após 14 dias de incubação. Na Figura 13 é apresentado o perfil de consumo de AR contido no resíduo de mandarina. O valor de AR no início do cultivo (tempo 0) foi de $46,04 (\pm 6,11) \text{ g.kg}^{-1}$, sendo o valor mais alto obtido no quinto dia de incubação, obtendo-se $74,96 (\pm 5,26) \text{ g.kg}^{-1}$. A partir do sexto dia, verifica-se a redução gradual de AR até o final do processo, o que representou um consumo de 76% da quantidade total de AR quantificados no quinto dia.

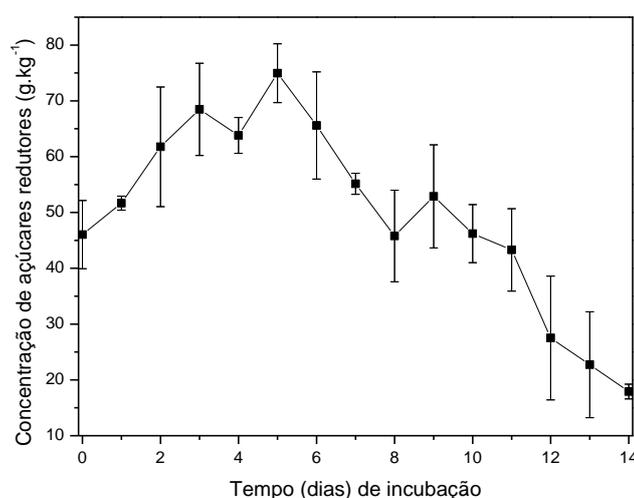


Figura 13 - Perfil do consumo AR por *A. bisporus* no resíduo de mandarina no CFS.

O perfil de consumo de AR referente ao resíduo de laranja por *A. bisporus* é apresentado na figura 14. O valor inicial de AR (controle) foi de $100,77 (\pm 14,78) \text{ g.kg}^{-1}$, sendo o valor mais alto obtido no segundo dia de incubação, obtendo-se $144,20 (\pm 19,04) \text{ g.kg}^{-1}$. Diferentemente do que ocorreu no CFS da mandarina, a partir do terceiro dia verificou-se o consumo gradual de AR até o fim do processo, o que representou uma diminuição de 81% da quantidade total de AR analisada.

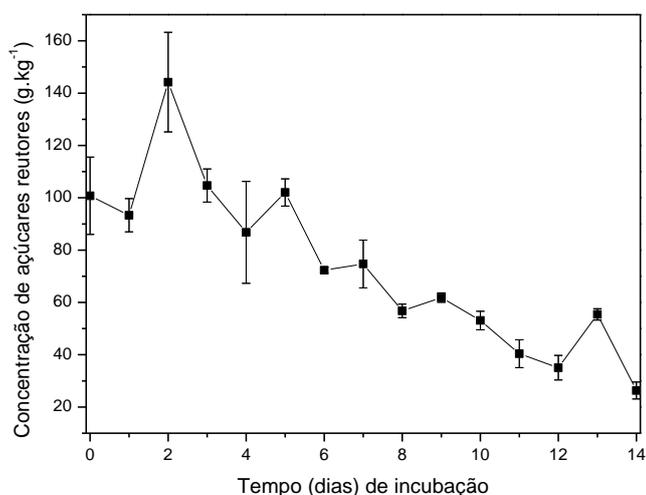


Figura 14 - Perfil do consumo de AR por *A. bisporus* no resíduo de laranja no CFS.

O valor de AR obtido no tempo zero para o resíduo de laranja foi semelhante ao alcançado por AHMED et al. (2013) que, ao caracterizar esse resíduo, obteve 107 g.kg^{-1} de AR e $140,08 \text{ g.kg}^{-1}$ para ART. Os autores atribuíram o valor de ART à atividade pectinolítica de *A. niger* no CFL, após 24 horas de processo.

Dessa forma, entende-se que os resíduos sólidos de *Citrus* sp. estudados, além de servirem como suporte para o desenvolvimento de *A. bisporus*, fornecem condições nutricionais para o crescimento do fungo no CFS, não sendo necessária adição suplementar de fonte de carbono ou nitrogênio, produzindo biomassa em tempos relativamente curtos. Mesmo assim, entende-se que mais estudos são necessários visando quantificar essa bioconversão (análise do rendimento da biomassa, por exemplo) e otimizar esse processo.

Outro ponto que favorece a utilização desses resíduos no CFS está na forma em que as fontes de nutrientes (fontes de carbono, principalmente) estão disponíveis à ação microbiana. No CFS realizado, houve apenas a trituração e ajuste de pH dos resíduos sólidos, sem a necessidade de realizar outras etapas de pré-tratamento, comumente utilizadas para obtenção de AR e ART de biomassas lignocelulósicas, como hidrólises ácida ou básica (RABELO, 2010). Isso pode conferir certa vantagem na utilização desse tipo de resíduo no CFS, pois essa etapa é considerada uma das que mais contribui em termos de custo direto em processos fermentativos (CHAUDHARY; SINGH; GHOSH, 2012).

6 CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos no presente trabalho, nas condições estudadas, permite concluir que:

- Os resíduos de *Citrus* sp. contém elevados teores açúcares solúveis passíveis de conversão biológica.
- Foi possível isolar e manter pura a cultura de *A. bisporus* utilizada durante o período de atividades.
- A utilização do extrato líquido do resíduo de mandarina, através do CFL, demonstrou ser uma fonte de carbono excelente para produção de biomassa de *A. bisporus*, obtendo-se o valor máximo de 47,06 g.L⁻¹.
- A otimização do CFL utilizando o extrato líquido do resíduo de mandarina foi validada estatisticamente para fins preditivos e as superfícies de resposta indicaram que a utilização de pH 4,5 pode ser realizado sem perdas no rendimento de biomassa.
- Verificou-se que a técnica DRIFTS associada ao método de calibração PLS, foi adequada para a construção de modelos de calibração e validação para a quantificação de AP, AR e PT.
- A aplicação de espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) associada à regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) possibilitou quantificar, simultaneamente, os parâmetros de CFL (AP, AR e PT) com erro quadráticos médios de previsão (RMSEP) e coeficientes de determinação (R²) de 0,0012 U.L⁻¹ e 0,9760, 0,23 mmol.L⁻¹ e 0,9956 e 0,03 g.dL⁻¹ e 0,9957, respectivamente.
- Foi possível observar o desenvolvimento de *A. bisporus* nos resíduos sólidos triturados de mandarina e laranja, através da técnica de CFS, com ajuste de pH para 4,5, sem a necessidade de adição de nutrientes.

REFERÊNCIAS

AHMED, I. et al. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, 2013.

ALEGRE, A. C. P. et al. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 612-622, 2009.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, 2// 2012.

BARROS, N. B. de SCARMINIO IS; BRUNS RE Planejamento e otimização de experimentos. **Campinas: Universidade de Campinas**, 1996.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 881-896, 1/31/ 2003.

BHATNAGAR, A.; SILLANPÄÄ, M.; WITEK-KROWIAK, A. Agricultural waste peels as versatile biomass for water purification – A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 270, n. 0, p. 244-271, 6/15/ 2015.

BOUKROUFA, M. et al. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 24, p. 72-79, 5// 2015.

BURGESS, R. R.; DEUTSCHER, M. P. **Guide to protein purification**. Academic Press, 2009. ISBN 0080923178.

CAMARGO, L. A. et al. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *aspergillus* sp. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, p. 153-156, 2009.

CARVAJAL, A. E. S. S. et al. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 493-499, 5// 2012.

CHAUDHARY, G.; SINGH, L. K.; GHOSH, S. Alkaline pretreatment methods followed by acid hydrolysis of *Saccharum spontaneum* for bioethanol production. **Bioresource technology**, v. 124, p. 111-118, 2012.

CHOI, I. S. et al. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. **Applied Energy**, v. 140, n. 0, p. 65-74, 2/15/ 2015.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 10// 2006.

CREMADES, O. et al. Preparation and characterisation of selenium-enriched mushroom aqueous enzymatic extracts (MAEE) obtained from the white button mushroom (*Agaricus bisporus*). **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1538-1543, 8/15/ 2012.

DAHLBACKA, J. et al. Monitoring of *Streptomyces peucetius* cultivations using FTIR/ATR spectroscopy and quantitative models based on library type data. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 3, p. 337-343, 2013.

DE ANDRADE, M. C. N. **Crescimento micelial, produção e características bromatológicas do shiitake em função de linhagens e de propriedades físicas e químicas de espécies e clones de eucalipto**. 2007. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO

DE GROOT, P. W. J. et al. Biochemical and molecular aspects of growth and fruiting of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, v. 102, n. 11, p. 1297-1308, 11// 1998.

DE JESUS, J. P. F. **Desenvolvimento de cinco linhagens de *Agaricus Bisporus* Lange (Imbach) (“champignon de Paris”) em diferentes formulações de composto e meios de cultura**. 2011. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO

DE MELO BARBOSA, A. et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

DEUTSCHER, M. P. **Guide to protein purification**. Gulf Professional Publishing, 1990. ISBN 0121820831.

DHILLON, G. S. et al. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 2, p. 83-92, 4/15/ 2011.

DÍAZ-GODÍNEZ, G. et al. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: A comparative study. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 271-275, 2001.

EIRA, A. F. Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente). **Anais da III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**, p. 83-95, 2000.

ELINBAUM, S. et al. Production of *Aspergillus terreus* α -L-rhamnosidase by solid state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 67-71, 2002.

FAN, L. et al. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 30-35, 2007.

FAVELA-TORRES, E.; VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 221, 2006.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. Universidade Federal do Paraná

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 5, n. 1, p. 3-15, 03/27 07/07/received 01/10/accepted 2008.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 64, p. 149-154, 2005.

GERHARDT, C. et al. Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. **Braz J Food Technol IV SSA**, p. 11-17, 2012.

GIORDANO, M. et al. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 271-279, 2001.

GONZÁLEZ-FIGUEREDO, C. et al. Optimal Temperature Tracking of a Solid State Fermentation Reactor. In: E.N. PISTIKOPOULOS, M. C. G. e KOKOSSIS, A. C. (Ed.). **Computer Aided Chemical Engineering**: Elsevier, v. Volume 29, 2011. p.839-843. ISBN 1570-7946.

GROHMANN, K.; CAMERON, R. G.; BUSLIG, B. S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 2, p. 129-141, // 1995.

GUERRERO, C. C. et al. Re-use of industrial orange wastes as organic fertilizers. **Bioresource Technology**, v. 53, n. 1, p. 43-51, // 1995.

HADAR, Y.; COHEN-ARAZI, E. Chemical Composition of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* Produced by Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1352-1354, 1986.

HÄNSELER, E.; NYHLÉN, L. E.; RAST, D. M. Isolation and properties of chitin synthetase from *Agaricus bisporus* mycelium. **Experimental Mycology**, v. 7, n. 1, p. 17-30, 1983/03/01 1983.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004/04/01 2004.

HU, T. et al. Enhanced cellulase production by solid state fermentation with polyurethane foam as inert supports. **Procedia Engineering**, v. 18, n. 0, p. 335-340, // 2011.

KERRIGAN, R. W.; CHALLEN, M. P.; BURTON, K. S. Agaricus bisporus genome sequence: A commentary. **Fungal Genetics and Biology**, v. 55, n. 0, p. 2-5, 6// 2013.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. Agronômica Ceres, 1985.

KIM, K. et al. Bioproduction of mushroom mycelium of Agaricus bisporus by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1561-1568, 2011.

KOCH, C. et al. Multi-analyte quantification in bioprocesses by Fourier-transform-infrared spectroscopy by partial least squares regression and multivariate curve resolution. **Analytica Chimica Acta**, v. 807, p. 103-110, 1// 2014.

KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Rigel Porto Alegre, Brazil, 1994. ISBN 8585186593.

KURBANOGLU, E. B.; ALGUR, O. F.; ZULKADIR, A. Submerged production of edible mushroom Agaricus bisporus mycelium in ram horn hydrolysate. **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 3, p. 225-230, 5// 2004.

LEIVA, F. J. et al. Environmental impact of Agaricus bisporus mycelium production. **Agricultural Systems**, v. 138, n. 0, p. 38-45, 9// 2015.

LIN, E.-S.; SUNG, S.-C. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete Antrodia cinnamomea in submerged culture. **International journal of food microbiology**, v. 108, n. 2, p. 182-187, 2006.

LIU, G. Q.; WANG, X. L. Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by Agaricus blazei. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 1, p. 78-83, 2007.

LUTZ, I. A. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **São Paulo: ANVISA**, 2008.

MACHADO, A. M. B. et al. Composto exaurido do cogumelo Agaricus blazei na dieta de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1113-1118, 2007.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2373-2383, 5// 2008.

MANZI, P. et al. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. **Food Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 201-206, 2// 2004.

MAO, X.-B. et al. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1667-1672, 2005.

MAO, Y.; MAO, J.; MENG, X. Extraction optimization and bioactivity of exopolysaccharides from *Agaricus bisporus*. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1602-1607, 2013.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-373, 5// 2011.

MILLER, G. Determination of reducing sugar by DNS method. **Anal chem**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MIZUNO, M. et al. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. **IUBMB Life**, v. 47, n. 4, p. 707-714, 1999.

MOKOCHINSKI, J. B. et al. Biomass and Sterol Production from Vegetal Substrate Fermentation Using *Agaricus brasiliensis*. **Journal of Food Quality**, 2015.

MOLENA, O. **O moderno cultivo de cogumelos**. Liv. Nobel, 1986. ISBN 8521303777.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, M. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação**. Edgard Blucher, 1972.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. **Unicamp, Campinas**, 2001.

NEVES, M. F. et al. O retrato da citricultura brasileira. **Ribeirão Preto: CitrusBR**, 2010.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, 2012.

ORZUA, M. C. et al. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 1, p. 24-27, 7// 2009.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Influência das condições de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus Awamori***. 1997. Universidade de São Paulo

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109-117, 3// 1992.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 7// 2000.

PARIS, L. D. D. Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. **Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná**, 2008.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2340-2344, 12// 2006.

PETRE, M.; TEODORESCU, A. **Biotechnology of agricultural wastes recycling through controlled cultivation of mushrooms**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9533078200.

PINHEIRO, T. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como micro-organismo. **Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões–Rio Grande do Sul**, 2006.

PITOL, L. O. et al. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 1009-1018, 1/1/ 2016.

PRAPULLA, S. et al. Maximization of lipid production by *Rhodotorula gracilis* CFR-1 using response surface methodology. **Biotechnology and bioengineering**, v. 40, n. 8, p. 965-970, 1992.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L.; KÖHLER, A. Notas sobre os fungos agaricaceae (agaricales–basidiomycota) comestíveis encontrados em área em regeneração natural em santa cruz do sul–rs, brasil. **Caderno de Pesquisa**, v. 26, n. 3, p. 44-53, 2015.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010.

REDA, S. Y. et al. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 25, n. 4, p. 672-6, 2005.

RIVAS, B. et al. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2380-2387, 2008.

SANCHEZ, J. E.; MEJIA, L.; ROYSE, D. J. Pangola grass colonized with *Scytalidium thermophilum* for production of *Agaricus bisporus*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 655-662, 2// 2008.

SARTORI, I. A. et al. Efeito da poda, raleio de frutos e uso de fitorreguladores na produção de tangerinas (*Citrus deliciosa* Tenore) cv. montenegrina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 5-10, 2007.

SCARFF, M. et al. Near infrared spectroscopy for bioprocess monitoring and control: current status and future trends. *Critical Reviews in Biotechnology* 26(1): 17-39, 2006.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 11, p. 401-413, 11// 2001.

SCHMIDELL, W. et al. Biotecnologia industrial. **Biotecnologia industrial**, v. 2, 2001.

SCHWARZ, S. F.; KOLLER, O. C.; NIENOW, A. A. Intensidades e épocas de raleio manual em tangerineira'montenegrina'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 1161-1165, 1992.

SMIDERLE, F. R. et al. Agaricus bisporus and Agaricus brasiliensis (1 → 6)-β-d-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 91-99, 4/15/ 2013.

SONG, T.-T. et al. Comparison of microbial communities and histological changes in Phase I rice straw-based Agaricus bisporus compost prepared using two composting methods. **Scientia Horticulturae**, v. 174, n. 0, p. 96-104, 7/22/ 2014.

STEFANELLO, C. L.; ROSA, C. S. Composición aproximada de las cáscaras de diferentes frutas. **Revista de Ciencia y Tecnología**, p. 0-0, 2012.

TAVARES, V. B. et al. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de Penicillium citrinum: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21, p. 722-725, 1998.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

TORRADO, A. M. et al. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 394-409, 2011.

TRIPODO, M. M. et al. Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 2, p. 111-115, 1// 2004.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; DE ANDRADE, C. J. Aspecto da produção industrial de enzimas. **Rev. Citino (Hestia)**, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2011.

WILKINS, M. R. et al. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1596-1601, 5// 2007.

XIAO, J.-H. et al. Nutritional requirements for the hyperproduction of bioactive exopolysaccharides by submerged fermentation of the edible medicinal fungus *Cordyceps taii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 241-249, 2010.

XIAO, J. A rapid and modified phenol-sulfuric acid assay for measurement of polysaccharide from *Cordyceps jiangxiensis* using universal microplate spectrophotometer. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 31, p. 689-692, 2008.