

Área: Ciência de Alimentos

ACÚMULO DE LIPÍDIOS E PROTEÍNAS POR *Aspergillus niger* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Cindiele Karen Zen, Kelly Pelc da Silva, Telma Elita Bertolin, Luciane Maria Colla*

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

**E-mail: lmcolla@upf.br*

RESUMO – O acúmulo de lipídios e proteínas em biomassas fúngicas pode ser utilizado na produção de biocombustíveis, lipídios insaturados ou farelo fúngico para a incorporação em rações animais. A produção de lipídios e proteínas por fungos pode ser realizada através de bioprocessos em estado sólido, podendo ser afetada por fatores como pH, temperatura, concentração das fontes de carbono e nitrogênio, entre outros. Objetivou-se o cultivo do fungo *Aspergillus niger* em resíduos agroindustriais para o acúmulo de lipídios e proteínas intracelulares. Preparou-se o meio de cultivo com farelo de trigo e casca de arroz, umidade 60%, sem ajuste de pH. Após esterilização, inoculou-se o meio com suspensão de esporos preparada para obter-se $2 \cdot 10^6$ esporos/g de meio. Adicionou-se nos meios glicose, glicerol e sulfato ferroso de acordo com o Planejamento Fatorial Completo 2^3 , para a indução da síntese de lipídios e proteínas, através do uso de soluções estoque, adicionados nos tempos inicial e 4 d em modo batelada alimentada. As fermentações foram realizadas durante 8 dias a 30°C, coletando-se amostras nos tempos inicial e 8 d para a determinação de lipídios, proteínas e umidade. Observou-se maior acúmulo de lipídios nos experimentos com sulfato ferroso ou glicose + sulfato ferroso, obtendo-se respectivamente 4,2 e 3,8 vezes em relação aos conteúdos iniciais. O maior acúmulo de proteínas foi obtido no experimento que continha glicose, de 2,8 vezes em comparação com o experimento sem indutores. A indução da síntese de lipídios e proteínas pode ser afetada pelas condições do meio de cultivo, dependendo da aplicação almejada.

Palavras-chave: Biocomposto. Bioprocessos. Fungos filamentosos.

1 INTRODUÇÃO

A produção de lipídios e proteínas pode ser realizada por bioprocessos em estado sólido. O acúmulo destes pode ser utilizado na produção de biocombustíveis, lipídios insaturados, ou bioemulsificantes, já que os lipídios microbianos podem apresentar características polares e apolares em uma mesma molécula. O *Aspergillus niger* é um fungo promissor para fermentações em estado sólido devido à variedade de produtos de seu

metabolismo (RODRIGUES et al., 2009) e por ser um microrganismo considerado seguro (GRAS). A fermentação em estado sólido, por sua vez, consiste em uma boa alternativa para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais (PANDEY et al., 2003), o que contribui para a diminuição dos custos de produção e para a valoração de resíduos com a obtenção de bioprodutos de mais alto valor agregado. Objetivou-se o acúmulo de lipídios e proteínas em fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e preparo do inóculo

Utilizou-se o fungo *Aspergillus niger*, considerado GRAS (Generally Recognized as Safe). O fungo *Aspergillus niger* foi mantido em tubos com PDA (ágar batata dextrose) em refrigerador a 4°C. O inóculo foi preparado em erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de PDA solidificado durante 7 dias a 30°C. Após, adicionou-se Tween 80 a 0,1% para formação da suspensão de esporos, que foi utilizada para a inoculação do meio de cultivo.

2.2 Preparo do meio de cultivo

Preparou-se o meio de cultivo com farelo de trigo (85%) e casca de arroz (15%), adicionados de água destilada estéril até atingir 60% de umidade. Autoclavou-se o meio e adicionou-se em béqueres estéreis. Inoculou-se o meio com a suspensão de esporos de forma a obter-se 2.10^6 esporos/g no tempo inicial de fermentação. Os béqueres foram tampados com mata acrílica e incubados em estufa a 30°C. A indução da síntese de lipídios foi realizada com a adição de soluções de glicose, glicerol e sulfato ferroso em modo batelada alimentada nos tempos inicial e 4 d. A Tabela 1 apresenta os volumes das soluções adicionados, calculados de modo a atingir-se as concentrações definidas pelo Planejamento Fatorial Completo 2^3 .

Tabela 1- Planejamento Fatorial Completo 2^3 utilizado para avaliar a influência dos indutores sobre o acúmulo de lipídios e proteínas

Exp.	Glicose (%)		Glicerol (%)		Sulfato ferroso (%)	
1	0,0	(-1)	0,00	(-1)	0,000	(-1)
2	0,5	(+1)	0,00	(-1)	0,000	(-1)
3	0,0	(-1)	0,25	(+1)	0,000	(-1)
4	0,5	(+1)	0,25	(+1)	0,000	(-1)
5	0,0	(-1)	0,00	(-1)	0,021	(+1)
6	0,5	(+1)	0,00	(-1)	0,021	(+1)
7	0,0	(-1)	0,25	(+1)	0,021	(+1)
8	0,5	(+1)	0,25	(+1)	0,021	(+1)

Exp. 1 sem indutores; exp. 2 glicose; exp. 3 glicerol; exp. 4 glicose + glicerol; exp. 5 sulfato ferroso; exp. 6 glicose + sulfato ferroso; exp. 7 glicerol + sulfato ferroso; exp. 8 glicose + glicerol + sulfato ferroso.

As amostragens foram realizadas nos tempos inicial e em 8 d para a realização das determinações de lipídios, proteínas e umidade através dos métodos da AOAC (1995).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os teores de umidade nos tempos inicial e 8 d dos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2³, na qual verifica-se que a umidade dos meios de cultivo diminuiu no decorrer do tempo, em função da evaporação ou condensação de água em virtude das temperaturas de cultivo. Nem todos os ensaios apresentaram 60% de umidade no tempo inicial, o que pode ter sido devido a perdas por evaporação durante a autoclavagem do meio ou devido a dificuldades de amostragem em função da pouca homogeneidade do meio, inerentes do modo de cultivo em fermentação em estado sólido.

Tabela 2 - Umidade (%) nos experimentos em função do tempo

Exp.	Tempo de cultivo	
	0 d	8 d
1	57,40±3,25	50,62±3,83
2	61,27±2,12	55,92±2,13
3	61,34±1,53	55,04±1,09
4	60,30±1,82	57,26±4,84
5	63,74±1,78	56,12±5,02
6	58,89±1,82	58,73±5,76
7	61,33±2,30	55,01±1,50
8	64,75±0,04	57,53±5,53

Resultados em média±dp

Exp. 1 sem indutores; exp. 2 glicose; exp. 3 glicerol; exp. 4 glicose + glicerol; exp. 5 sulfato ferroso; exp. 6 glicose + sulfato ferroso; exp. 7 glicerol + sulfato ferroso; exp. 8 glicose + glicerol + sulfato ferroso.

A Tabela 3 apresenta a variação dos conteúdos de lipídios e proteínas em base seca nos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2³ utilizado para avaliar a influência dos indutores sobre estas variáveis resposta, além do adimensional para cada variável, calculado dividindo-se o valor obtido no tempo de 8 dias de fermentação pelo obtido no tempo inicial.

Tabela 3 - Lipídios e proteínas (% base seca) nos tempos inicial e final do processo fermentativo para os experimentos do Planejamento Fatorial Completo e adimensionais

Exp	Lipídio (%)			Proteínas (%)		
	0 d	8 d	Adimensional*	0 d	8 d	Adimensional*
1	1,81	1,30	0,72±0,06	10,64	20,72	1,95±0,20
2	1,62	1,80	1,12±0,15	10,69	30,23	2,83±0,03
3	1,17	1,49	1,27±0,03	11,46	20,46	1,78±0,06
4	3,97	2,03	0,51±0,02	9,46	16,50	1,76±0,27
5	1,32	5,56	4,22±0,55	11,85	19,66	1,66±0,04
6	1,43	5,53	3,87±0,44	9,54	14,21	1,49±0,14
7	1,30	1,05	0,81±0,08	10,93	17,72	1,63±0,29
8	2,02	1,81	0,90±0,01	12,09	11,61	0,96±0,09

*Média±dp. Exp. 1 sem indutores; exp. 2 glicose; exp. 3 glicerol; exp. 4 glicose + glicerol; exp. 5 sulfato ferroso; exp. 6 glicose + sulfato ferroso; exp. 7 glicerol + sulfato ferroso; exp. 8 glicose + glicerol + sulfato ferroso.

Os experimentos 5 e 6 apresentaram maior aumento no conteúdo lipídico, de 4,2 e 3,8 vezes em relação aos conteúdos iniciais, continham respectivamente, sulfato ferroso e glicose + sulfato ferroso. Todos os experimentos apresentaram acúmulo de proteína com exceção do experimento 8, o qual continha todos os indutores. O maior acúmulo de proteínas foi obtido no experimento 2, de 2,8 vezes, em comparação com um aumento de 1,9 vezes no experimento 1 realizado sem indutores.

Observou-se que as condições que levaram ao aumento de lipídios nos experimentos foram as que ocasionaram diminuição nos teores de proteínas.

A Tabela 4 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre os adimensionais de lipídios e proteínas e os níveis de significância obtidos para cada variável.

Tabela 4 - Influência sobre o percentual de lipídios e proteínas em base seca em função das variáveis estudadas

Fonte de variação	Lipídio		Proteína	
	Efeitos	p	Efeitos	p
Média	1,68	<0,01	1,76	<0,01
(1) Glicose	-0,16	0,41	0,01	0,97
(2) Glicerol	-1,61	<0,01	-0,45	<0,01
(3) Sulfato Ferroso	1,54	<0,01	-0,64	<0,01
1 por 2	-0,18	0,34	-0,35	<0,01
1 por 3	0,02	0,89	-0,42	<0,01
2 por 3	-1,58	<0,01	0,17	0,08

ANOVA; Proteína; R-sqr=,93415; Adj:,89024. ANOVA; Lipídio; R-sqr=,96274; Adj:,93789

Verificou-se que a adição de sulfato ferroso foi a condição que influenciou positivamente sobre a síntese de lipídios enquanto que a adição de glicose influenciou positivamente sobre a síntese de proteínas.

As Figuras 1 e 2 apresentam respectivamente a superfície de resposta do Planejamento 2^3 dos dados de lipídios e proteínas adimensionais (tempo 8 d/ tempo inicial) em função das variáveis estudadas.

Figura 1 – Superfície de resposta do Planejamento 2^3 dos dados de lipídio adimensional em função das variáveis glicerol e sulfato ferroso

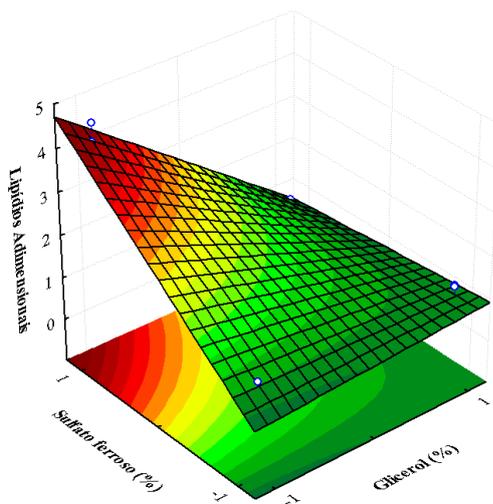
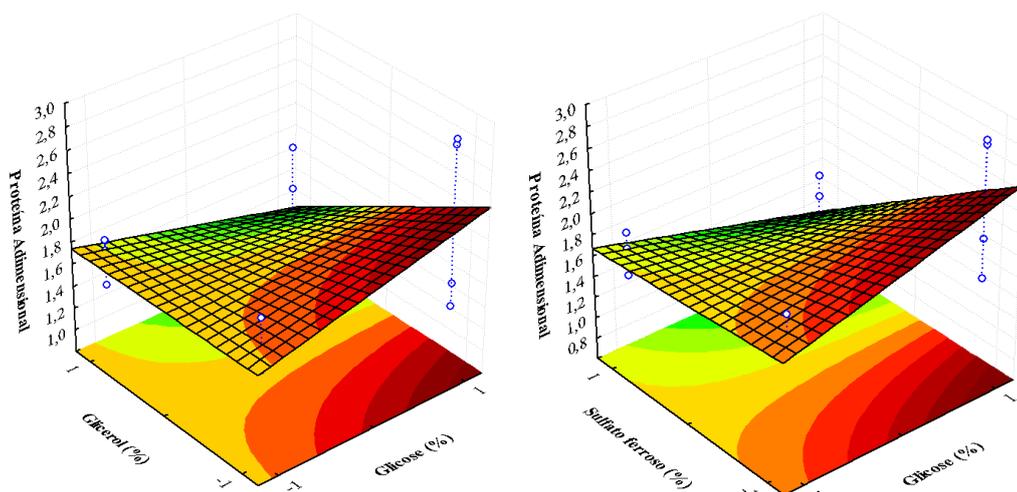


Figura 2 – Superfície de resposta do Planejamento 2^3 dos dados de proteína adimensional em função das variáveis glicose, glicerol e glicose, sulfato ferroso, respectivamente



Observa-se nos intervalos estudados que o maior acúmulo de lipídios ocorreu em níveis baixos de glicerol e níveis altos de sulfato ferroso. O maior acúmulo de lipídios foi decorrente da adição de sulfato ferroso.

A adição de glicose resultou em maior acúmulo de proteína. Quanto maior a concentração de glicose em relação ao glicerol ou sulfato ferroso, mais irá favorecer ao aumento de proteína. Logo, dentro do intervalo de estudo pré-estabelecido, o maior acúmulo de proteína foi encontrado nos níveis máximos para a glicose e nos níveis mínimos tanto para o glicerol quanto para o sulfato ferroso.

4 CONCLUSÃO

A fermentação em estado sólido mostrou-se uma alternativa para o acúmulo de lipídios em fungos filamentosos, agregando valor a resíduos agroindustriais e contribuindo para a produção de compostos que podem ser aproveitados para a síntese de biodiesel.

A síntese de lipídios em fermentação em estado em sólido foi estimulada pela adição de sulfato ferroso e inibida pela adição de glicose e glicerol, enquanto que a síntese de proteínas foi estimulada pela adição de glicose.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ e ao PIBIC/UPF.

6 REFERÊNCIAS

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC International.** 16th ed. Arlington, 1995.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** Trivandrum, India V.13, p.81–84, 2003.

RODRIGUES, A. A. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats.** Dissertação (Mestrado em Concentração de Microbiologia) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009. 2 p.