

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Fermentação em estado sólido como estratégia para produção de lipase visando o aproveitamento de coprodutos agroindustriais na alimentação de ruminantes

Ana C. Oliveira¹, Graziella M. Amorim¹, Mateus G. de Godoy² e Denise M. G. Freire¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Química, Rio de Janeiro - RJ

² Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Rio de Janeiro - RJ E-mail: anacarolina_uesb@hotmail.com

RESUMO

*Na nutrição de ruminantes, há um crescente interesse para o uso de coprodutos agroindustriais que não competem com a nutrição humana. A torta da amêndoa e polpa da cadeia da palma foram submetidos à fermentação em estado sólido (FES), utilizando os fungos *A. niger*, *A. oryzae* e *A. awamori* para produção de lipase e redução do teor de lipídeo, visando a sua aplicação nas dietas de ruminantes. O processo de FES foi capaz de promover a redução dos teores de lipídeos, sendo a maior redução obtida pelo cultivo com *A. oryzae*. Em contrapartida, o fungo *A. niger* mostrou ser o melhor produtor da enzima lipase.*

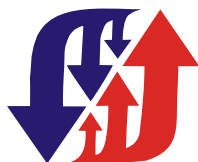
Palavras-chave: Reaproveitamento de resíduos, enzima, alimentação animal.

INTRODUÇÃO

A gestão de resíduos industriais é um problema mundial. O aumento dos custos de eliminação desses resíduos e as rigorosas normas ambientais têm levado a esforços para seu melhor aproveitamento (Haslenda e Jamaludin, 2011). O setor agroindustrial brasileiro gera uma grande quantidade de resíduos e o aproveitamento destes assume um papel economicamente importante, devido ao grande volume disponível e a versatilidade de sua utilização (Silva *et al.*, 2005). O Brasil produziu em 2012 cerca de 260 mil toneladas de óleo de palma. A indústria do óleo de palma produz quantidades significativas de resíduos sólidos e subprodutos (Revista Dinheiro Rural, 2013).

Da palma se extrai dois tipos de óleos: o óleo de dendê e o de palmiste. Do beneficiamento do óleo de palmiste obtém-se a torta da amêndoa, subproduto que pode ser amplamente utilizado na alimentação animal, participando da composição de rações (Rosa *et al.*, 2011). A torta da polpa resulta após a moagem e extração do óleo de dendê e este subproduto também poderia ser usado como ingrediente de ração animal, segundo o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (1998), mas é pouco utilizada. São necessários mais estudos sobre a torta da polpa do dendê, em relação as suas características como alimento, a fim de viabilizar a utilização dessa fonte alternativa (Bringel, 2009).

Neste contexto, as tortas da amêndoa e da polpa destacam-se na utilização como substratos para fermentação em estado sólido (FES), podendo ser utilizado pelo microorganismo fermentador visando melhorar o seu valor nutricional. A FES pode ser definida como um processo que possibilita o crescimento de micro-organismos em materiais sólidos com ausência total ou parcial de água livre visível (Pandey *et al.*, 2001). Os fungos filamentosos são mais adaptáveis a esse tipo de processo devido a sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (Durand, 2003). A FES se destaca como uma técnica capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, utilizando-os como fonte de nutrientes para o desenvolvimento de microrganismos para produção de enzimas, como lipase, e de biomassa para ração animal. As lipases são glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3) classicamente definidas como enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em triacilgliceróis, liberando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos (Godoy, 2013), e têm sido utilizadas como aditivos na ração animal (Pandey, 2003). *A. niger*, *A. oryzae* (Blumenthal, 2004), e *A. awamori* (Castro *et al.*, 2010) são três microrganismos importantes usados em fermentações industriais para a produção de vários produtos, incluindo lipases. Objetivou-se, com este trabalho, estudar a aplicação dos fungos *A. niger*, *A. oryzae*, e *A. awamori* como produtores de lipase, através da FES da torta da amêndoa e da polpa visando melhorar sua composição nutricional para ser utilizado posteriormente como uma fonte alimentar alternativa para ruminantes.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS Preparo do inóculo para FES

A obtenção de esporos foi realizada através do crescimento dos fungos a 30°C por 7 dias em meio PDA (MERCK). Os esporos foram raspados e suspensos em solução de Tween 80 (VETEC) 0,01 % estéril. A concentração de esporos foi determinada através de contagem ao microscópio óptico em câmara de Neubauer. Foi utilizada inicialmente uma concentração de esporos de 10^7 esporos/g de resíduo (Gutarra *et al.*, 2007).

Fermentação em estado sólido (FES)

As tortas da amêndoa e da polpa foram cedidas pela AGROPALMA localizada em Tailândia, Pará. Foram secas ao ar ambiente até teor de umidade inferior a 10% e triturados em moinho de facas tipo Wiley (SM300) na granulometria de 2 mm a 1500 rpm. Os microrganismos utilizados para as fermentações foram os fungos filamentosos *A. niger*, *A. oryzae*, e *A. awamori* proveniente do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, (LaBiM IQ/UFRJ). Foram empregados biorreatores, do tipo bandeja com 15 g de resíduo, na razão de 60/40 (polpa/amêndoa), a este foi adicionando a suspensão de 10^7 esporos/g de resíduo, na umidade final ajustada a 50%. Os cultivos foram conduzidos a 30°C em câmaras de fermentação, com um tempo de fermentação de até 120 horas (adaptado Gutarra *et al.*, 2007).

Atividade de Lipase

Foi utilizado como substrato o óleo de oliva (5% m/v) de acordo com Gutarra *et al.* (2009). Foi adicionado 0,2g do fermentado seco (Aguieiras *et al.*, 2014) a 19 mL de emulsão e incubado a 35°C por 15 minutos e 200 rpm. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução 0,04 N de NaOH em titulador automático até um valor de pH final de 11,0. Os brancos reacionais foram obtidos adicionando-se o preparado enzimático após a solução acetona-etanol. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio (Freire *et al.*, 1997).

Determinação da composição

As análises químicas umidade, lipídeo, proteína, cinzas, fibras foram determinadas segundo a AOAC (2002).

Análise estatística

Os dados obtidos das cinéticas da fermentação dos fungos *A. niger*, *A. oryzae*, e *A. awamori*, para produção de lipase em função do tempo, foram submetidos à análise de regressão.

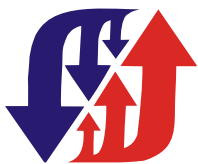
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos dos teores dos componentes nutricionais nas amostras não fermentadas (controle) e das amostras fermentadas para cada microrganismo estão apresentados na Tabela 1. As análises de composição nutricional das tortas foram realizadas no tempo de 48 horas de fermentação. **Tabela 1:** Composições nutricionais da amostra controle e fermentadas.

| Composição (%) | Amostras | | | |
|-----------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | Tortas (60/40) NF | <i>A. oryzae</i> | <i>A. awamori</i> | <i>A. niger</i> |
| Matéria Seca | 92,25 \pm 0,29 | 93,69 \pm 0,6 | 94,26 \pm 0,19 | 92,96 \pm 0,62 |
| Matéria Mineral | 3,15 \pm 0,08 | 3,38 \pm 0,05 | 3,42 \pm 0,04 | 3,23 \pm 0,13 |
| Proteína Bruta | 8,10 \pm 0,96 | 9,16 \pm 0,19 | 8,49 \pm 0,68 | 9,37 \pm 0,37 |
| Lídeo | 7,49 \pm 0,31 | 2,72 \pm 0,07 | 2,99 \pm 0,2 | 3,4 \pm 0,11 |
| Hemicelulose | 14,96 \pm 2,67 | 10,83 \pm 1,74 | 11,17 \pm 1,24 | 10,31 \pm 0,96 |
| Celulose | 40,52 \pm 1,99 | 35,81 \pm 0,82 | 37,63 \pm 1,60 | 40,09 \pm 1,20 |
| Lignina | 31,41 \pm 1,06 | 35,69 \pm 1,35 | 33,69 \pm 2,66 | 34,85 \pm 2,30 |

NF – Não fermentada (amostra controle); fermentadas pelos fungos *A. niger*, *A. oryzae*, e *A. awamori* no tempo de 48h.

Os resultados encontrados são semelhantes com o que a literatura cita para a torta da amêndoa (Silva *et al.*, 2005) e torta da polpa, que na razão 60/40 tem bons teores de proteína, 8,10%, mas apresenta valores



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

elevados de lipídeos, 7,49%, o que limitaria seu uso para ruminantes. A partir de 5% os lipídeos podem afetar negativamente o consumo de nutrientes, seja por mecanismos regulatórios que controlam o consumo de alimentos, seja pela capacidade limitada dos ruminantes de oxidar os ácidos graxos (Bringel, 2009). Os resultados encontrados evidenciam que existe a necessidade de melhorar o valor nutricional dos resíduos *in natura*, principalmente para lipídeo, a fim de se tornarem um alimento alternativo em dietas de ruminantes (Castillo-González *et al.*, 2014).

O Gráfico 1, e a tabela 1, mostram a redução de lipídeos para as tortas fermentados em 48h para cada microrganismo estudado comparado com os resíduos *in natura*, não fermentado na proporção 60/40(polpa/amêndoa).

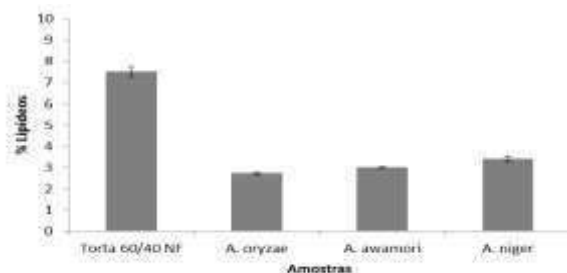
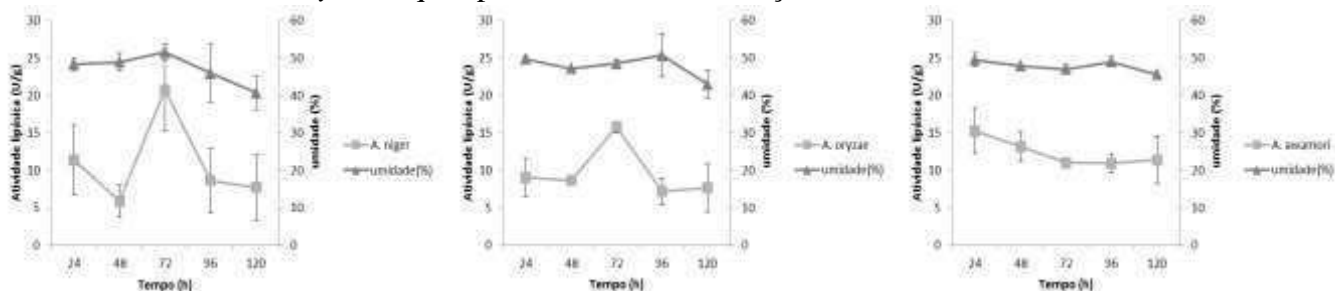


Gráfico 1: Redução dos lipídeos na torta fermentada, para cada microrganismo, comparado com a torta não fermentada.

Houve redução nos teores de lipídeos para todos os microrganismos empregados na FES, sendo o fermentado com *A. oryzae* o que apresentou a maior redução.



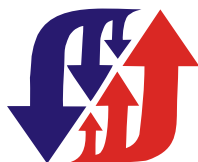
A Figura 2 (a, b e c) mostra a cinética de produção de lipase pelos fungos *A. niger*, *A. oryzae* e *A. awamori* cultivados com as tortas 60/40 (amêndoa/polpa).

Gráfico 2: Cinéticas das fermentações dos fungos *A. niger*, *A. oryzae*, e *A. awamori* em com as tortas 60/40 (amêndoa/polpa) e 50% de umidade inicial.

As fermentações, em 48h, com *A. oryzae* e *A. awamori* tiveram as maiores reduções dos teores de lipídios, 2,72% e 2,99%, quando comparado com o *A. niger*. E tiveram as maiores atividades lipásicas em 48h, 8,65U/g e 13,81U/g. Em 48h a menor atividade lipásica encontrada foi do *A. niger*, 5,85 U/g, e apresentou também a menor redução do teor de lipídios, 3,40%, da amostra fermentada nesse tempo.

A maior atividade lipásica, verificadas neste experimento no cultivo em FES foi de 20,72 U/g para o microrganismo *A. niger* no tempo de 72h. As fermentações foram conduzidas até ser observada a redução da atividade lipásica (a partir de 72 horas). Mala *et al.*, (2007) utilizando o fungo *A. niger* e uma mistura dos resíduos farelo de trigo e torta de gergelim, como substrato, obtiveram máxima atividade lipásica de 384,3 U/g após 72 horas. Enquanto que a encontrada por Falony *et al.*, (2006), foi de 9,14 U/g utilizando o mesmo fungo e somente farelo de trigo como substrato, no mesmo tempo de fermentação.

As umidades dos meios fermentados, apresentaram poucas alterações durante as fermentações. Segundo Mahanta *et al.*, (2008) o teor de água é um fator bastante significativo nas propriedades físicas do substrato. Elevado teor de água causa a diminuição da porosidade do substrato, diminuindo assim a troca de



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

gases. Por outro lado, baixo teor de água pode acarretar na diminuição do crescimento microbiano e consequente menor produção de enzima.

CONCLUSÕES

*Todos os microrganismos cultivados no resíduo in natura por FES foram capazes de promover uma diminuição no teor de lipídeos em 48 h de cultivo para valores inferiores ao requerido para alimentação de ruminantes. Ademais, *A. oryzae* apresentou a maior redução do teor de lipídeos enquanto *A. niger* mostrou ser o melhor produtor da enzima lipase.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiaras, E. C.G.; Cavalcanti-Oliveira, E. D.; Castro, A. M.; Marta A. P. L.; Freire, D. M.G. Biodiesel production from acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel*, 315–321, 2014.
- AOAC (1984) - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC, 14th ed. Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Blumenthal, C. Z.; Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. / *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 214–228, 2004.
- Bringel, L. M. L. Avaliação nutricional da torta de dendê (*Elaeis guineensis*, Jacq) em substituição à silagem de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) na alimentação de ruminantes. -Araguaína, 2009.
- Castillo-González, A. R.; Burrola-Barrazab, M. E.; Domínguez-Viveros, J.; Chávez-Martínez, A. Rumen microorganisms and fermentation. *Arch Med Vet* 46, 349-361 (2014).
- Castro, A. M.; Carvalho, D. F.; Freire D. M. G.; Castilho, L. R. Economic Analysis of the Production of Amylases and Other Hydrolases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake. *Enzyme Research*, 2010.
- Durand, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2/3, p.113125, 2003. Falony, G. et al. 2006. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*. v.44, n.2, p. 235–240.
- Freire, D. M. G. *et al.* Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter - Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 63-5, p. 409-421, Spr 1997.
- Godoy, M. G. Valoração e biodestoxificação das tortas de mamona (*Ricinus communis*) e pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) por fermentação em estado sólido. Tese (Doutorado em Ciências)– Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Rio de Janeiro, 2013.
- Gutarra MLE, Godoy MG, Castilho LR, Freire DMG. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid state fermentation using a residue of the babassu oil industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 313 – 318, 2007.
- Gutarra MLE, Godoy MG, Maugeri F, Rodrigues MI, Freire DMG, Castilho LR. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresour Technol*. 5249–54, 2009.
- Haslenda, H.; Jamaludin, M.Z.; Industry to Industry By-products Exchange Network towards zero waste in palm oil refining processes. *Resources, Conservation and Recycling* 55, 713–718, 2011.
- Mahanta, N.; Gupta, A.; Khare, S. K. 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*, v. 99, p.1729–1735.
- Mala, J.G.S. et al. 2007. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *The Journal of General and Applied Microbiology*. v. 53, n.4, p.247-253, 2007.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 81-84.
- RevistaDinheiro Rural. 2013. Disponível em: <<http://revistadinheiro rural.terra.com.br/noticia/agronegocios/oleode-palma-derivados-no-para-geram-inclusao-social>> Acesso em: Março 2014.
- Rosa, M. F.; Souza Filho, M S. M.; Figueiredo, M. C. B.; Morais, J. P. S.; Santaella, S.T.; Leitão, R.C. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA, 2011.
- Silva, H.G.O. et al. Farelo de Cacau (*Theobroma cacao* L.) e Torta de Dendê (*Elaeis guineensis*, Jacq) na Alimentação de Cabras em Lactação: Consumo e Produção de Leite. *R. Bras. Zootec.*, v.34, n.5, p.1786-1794, 2005.