

INDUÇÃO DA SÍNTESE DE LIPÍDIOS E PROTEÍNAS POR *Aspergillus niger*

INDUCTION OF LIPIDS AND PROTEINS SYNTHESIS BY *Aspergillus niger*

Cindiele Karen Zen¹, Kelly Pelc da Silva¹, Telma Elita Bertolin², Christian Oliveira Reinehr²,
Luciane Maria Colla^{*2}

¹Acadêmicas do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo.

E-mail: kellypelc@hotmail.com; cindielekarenzen@hotmail.com

²Docentes do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. Campus I, Prédio L1, BR 285, Bairro São José Passo Fundo-RS. CEP: 99052-900 – Cx. Postal 611. E-mail: telma@upf.br, reinehr@upf.br, lmcolla@upf.br

Resumo

A produção de lipídios e de proteínas em biomassas fúngicas pode apresentar aplicações, por exemplo, o seu uso para a produção de biocombustíveis como o biodiesel, para a extração de lipídios insaturados ou ainda pela incorporação da biomassa em rações animais. O crescimento fúngico pode ser realizado por meio de bioprocessos em estado sólido, consistindo um método de produção que permite a reutilização de resíduos agroindustriais, agregando valor a esses. Objetivou-se o cultivo do fungo *Aspergillus niger* em resíduos agroindustriais para o acúmulo de lipídios e proteínas intracelulares. O crescimento fúngico foi realizado em fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo com umidade de 60% ao qual se adicionou indutores para a síntese de lipídios. Observou-se maior acúmulo de lipídios nos experimentos adicionados de sulfato ferroso ou glicose/ sulfato ferroso, obtendo-se respectivamente 4,2 e 3,8 vezes de aumento no teor de lipídios em relação ao tempo inicial de fermentação. 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: Fermentação em estado sólido. Glicerol. Glicose. Indutores. Sulfato ferroso.

Abstract

The production of lipids and proteins in fungal biomass may submit applications such as their use for the production of biofuels such as biodiesel, for the extraction of unsaturated lipids or by the incorporation of biomass into animal feed. Fungal growth can be performed by solid state fermentation, consisting of a production method that allows reuse of agroindustrial waste, adding value to it. We aimed the cultivation of the fungus *Aspergillus niger* in agroindustrial residual for intracellular accumulation of lipids and proteins. Fungal growth was carried out in solid state fermentation using wheat bran with 60% humidity and added to induce lipid synthesis. We observed higher lipids accumulation in the experiments with the addition of ferrous sulfate or glucose/ ferrous sulfate, yielding respectively 4.2 and 3.8 fold increase in lipid content in the initial fermentation time. The greater accumulation of protein was obtained in the experiment that contained glucose, of 2.8 times compared to the experiment without inducers. The induction of lipid synthesis and proteins can be affected by the conditions of the medium, depending on the desired application.

Keywords: glycerol, glucose, inductors, ferrous sulfate, solid state fermentation.

1. Introdução

O cultivo de microrganismos em bioprocessos sólidos ou submersos tem sido realizado com o objetivo de produção de biocompostos aplicáveis em inúmeros setores industriais. Nesse sentido, são crescentes os estudos que objetivam a obtenção de lipídios e proteínas, a partir de células microbianas, com enfoque no uso de fungos filamentosos, pela diversificação de produtos obtidos e rendimentos econômicos consideravelmente altos (SOARES et al., 2010).

A produção de lipídios e proteínas pode ser realizada por intermédio da produção de biomassa fúngica, após crescimento em resíduos agroindustriais (ALBUQUERQUE, 2003; DE PARIS et al., 2010, AMORIN, 2011), com posterior incorporação em rações animais. Ainda, pode ser realizada a

extração dos lipídios da biomassa, para posterior uso na produção de biodiesel, ou lipídios insaturados (CAMPOS et al., 2008; SILVA; FREITAS, 2008).

O processo pode ser realizado em fermentação em estado sólido (FES), que consiste em uma boa alternativa para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais, por utilizar materiais simples e de baixo custo, necessitando, na maioria dos casos, apenas da adição de água e de micronutrientes, sendo uma técnica renovável que agrega a sua possibilidade do uso de resíduos, diminuindo o impacto sobre o meio ambiente. (SCHMIDELL et al., 2001; PANDEY, 2003).

Os fatores importantes para o controle da fermentação em estado sólido envolvem o tamanho da partícula, umidade inicial, pH, pré-tratamento do substrato, umidade, temperatura de incubação, agitação, aeração, idade do inóculo, adição de indutores, entre outros. Esses fatores podem acarretar o crescimento celular do microrganismo e também a formação de produtos (DEL BIANCHI et al., 2001; PANDEY, 2003; SPIER, 2005).

Esse processo restringe-se àqueles microrganismos capazes de crescer em baixas atividades de água como os fungos e leveduras. Os fungos filamentosos são os que mais se adaptam à fermentação em estado sólido devido às propriedades fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas. São capazes de crescer em umidades relativas muito baixas que ficam entre 12% e 80 % e pressão osmótica alta. Os fungos colonizam o meio com maior facilidade por meio das hifas, pois podem crescer dentro da matriz ou sobre a superfície do substrato onde o fungo irá consumir o substrato e secretar os metabólitos, como as enzimas. Há uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis devido à geração de novas hifas (DURAND, 2003; PINTO, 2003; RAHARDJO et al., 2005; MITCHELL et al., 2006).

O gênero *Aspergillus* é um dos mais comuns entre os fungos filamentosos. O fungo *Aspergillus niger* é promissor para fermentações em estado sólido por ser considerado um microrganismo GRAS (Generally Recognized as Safe), reconhecido como de uso seguro para a aplicação na área de alimentos e devido à variedade de produtos de seu metabolismo, é capaz de produzir 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato. A utilização de *Aspergillus niger* em fermentações tem algumas vantagens em relação a outros fungos, como a facilidade de manipulação, a habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo além de produzir rendimentos elevados de bioprodutos (SPIER, 2005; SANTOS, 2007; RODRIGUES et al., 2009).

Objetivou-se avaliar a influência de indutores sobre o acúmulo de lipídios e de proteínas no fungo *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido, utilizando resíduos agroindustriais.

2. Material e métodos

2.1. Microrganismo e preparo do inóculo

O fungo *Aspergillus niger* utilizado neste estudo foi cedido pelo Laboratório de Fermentações da Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo (UPF).

O fungo 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 sete 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 e condução do bioprocesso

O meio de cultivo foi preparado com farelo de trigo (85 %) e casca de arroz (15 %), adicionados de água destilada estéril até atingir 60% de umidade, sem ajuste de pH. O meio foi

autoclavado e adicionado a béqueres de 500 mL estéreis. O meio foi inoculado com a suspensão de esporos, de forma a obter-se 2.10^6 esporos/g de meio no tempo inicial de fermentação. Os béqueres foram tampados com manta acrílica e incubados em estufa a 30 °C.

A indução da síntese de lipídios e de proteínas foi realizada com a adição de soluções de glicose, de glicerol e de sulfato ferroso, em modo batelada alimentada, na fase inicial e quando transcorridos quatro dias de cultivo. A adição dos indutores em modo batelada alimentada evita os processos de repressão ao crescimento celular que podem ser ocasionados pelos indutores, possibilitando maiores rendimentos de biomassa e biocompostos (SCHMIDEL et al., 2001).

A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 utilizado no estudo do acúmulo de lipídios e proteínas por fungos filamentosos. As amostragens foram realizadas na fase inicial e quando transcorridos oito dias para que, assim, se procedesse à realização das determinações de umidade, de lipídios e de proteínas por meio dos métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (1995).

Tabela 1: Níveis reais e codificados das variáveis do Planejamento Fatorial Completo 2^3 utilizado no estudo de acúmulo de lipídios e de proteínas em fungos filamentosos.

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.

2.3. Tratamento dos dados e análise estatística

Os percentuais de lipídios e proteínas no início e no fim do processo foram utilizados para o cálculo de valores de referência adimensionais, conforme as Equações 1 e 2.

$$Lipídios_{adm} = \frac{\%Lipídios_{8\text{ dias}}}{\%Lipídios_{0\text{ dias}}} \quad (1)$$

$$Proteínas_{adm} = \frac{\%Proteínas_{8\text{ dias}}}{\%Proteínas_{0\text{ dias}}} \quad (2)$$

Os resultados adimensionais de lipídios e proteínas de cada experimento do planejamento fatorial completo foram utilizados como respostas para a análise de variância e dos efeitos estimados dos indutores, utilizando-se o Software Statística 6.0.

3. Resultados e discussão

A Tabela 2 apresenta os teores de umidade na fase inicial e transcorridos oito dias para os farelos obtidos nos experimentos do planejamento fatorial completo 2³.

Tabela 2: Teor de umidade (%) nos experimentos em função do tempo.

Exp.	Tempo de cultivo (dias)	
	0	8
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 umidade dos meios de cultivo apresentou tendência à diminuição no decorrer do tempo, em função da evaporação ou da condensação de água em virtude das altas 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, inerente do modo de cultivo em fermentação em estado sólido.

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 essas variáveis-resposta, além do adimensional para cada variável.

Tabela 3: Teor de lipídios e proteínas (% base seca) no tempo inicial e no tempo final do processo fermentativo para os experimentos do planejamento fatorial completo e adimensionais.

Exp	Lipídios (%)			Proteínas (%)		
	0 d	8 d	Lipídio _{adm}	0 d	8 d	Proteína _{adm}
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.

A adição de sulfato ferroso e a adição de glicose + sulfato ferroso ocasionaram acúmulo de lipídios nos farelos fermentados de 4,2 e 3,8 vezes em relação aos conteúdos iniciais. Portanto, a

adição desses indutores interferiu no acúmulo de lipídios pelo fungo *Aspergillus niger*. A adição de glicose induziu ao acúmulo de proteínas, aumentando os valores em 2,83 vezes em comparação com um aumento de 1,95 vezes no experimento sem a adição da glicose. Entretanto, as condições que levaram ao aumento do conteúdo de lipídios foram as que ocasionaram a diminuição nos conteúdos de proteínas.

A Tabela 4 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre os adimensionais de lipídios e proteínas, bem como os níveis de significância obtidos para cada variável. Os indutores glicerol e o sulfato ferroso foram significativos sobre o acúmulo de lipídios, considerando que o sulfato ferroso apresentou expressivo efeito positivo. Para proteínas, o glicerol e o sulfato ferroso apresentaram efeitos negativos, o que significa que, aumentando as concentrações de glicerol e de sulfato ferroso, as concentrações de proteínas diminuem.

Tabela 4: Efeitos estimados das variáveis estudadas sobre os adimensionais dos percentuais de lipídios e proteínas em base seca

Fonte de variação	Lipídios		Proteínas	
	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; $R^2=0,93415$; R^2 ajustado: 0,89024

Anova; lipídio; $R^2=0,96274$; R^2 ajustado: 0,93789

Os resultados da Tabela 4 estão de acordo com o que foi observado no experimento 5, em que se obteve o maior acúmulo de lipídios e no qual o fungo foi cultivado com sulfato ferroso. O efeito isolado da glicose sobre o acúmulo de proteínas não apresentou efeito significativo ($p>0,05$). Entretanto, a interação das variáveis glicose e glicerol, glicose e sulfato ferroso foram significativas sobre o acúmulo de proteínas, bem como a interação glicerol e sulfato ferroso mostrou-se expressiva sobre o acúmulo de lipídios, devendo essas interações serem analisadas em detrimento dos fatores individuais. As Figuras 1 e 2 apresentam as superfícies de resposta das interações significativas entre as variáveis do planejamento fatorial completo 2^3 sobre as respostas.

Observa-se na Figura 1 que o maior acúmulo de lipídios ocorreu em níveis inferiores de glicerol e superiores de sulfato ferroso. Na Figura 2, verifica-se que a adição de glicose resultou em maior acúmulo de proteína, na ausência dos demais indutores. A glicose é uma fonte de carbono simples, de fácil assimilação para o metabolismo microbiano em aerobiose e que estimula, em primeira instância, o crescimento do microrganismo. Como o teor de proteínas é diretamente proporcional ao crescimento microbiano, isso explica porque houve influência positiva da glicose no teor proteico (FANG; ZHONG, 2002).

A adição de fontes de carbono diferentes de carboidratos como o glicerol poderia estimular o metabolismo de síntese de lipídios, visto que o glicerol pode ser convertido em gliceraldeído-3P no metabolismo microbiano, o qual pode ser convertido em acetil-COA, seguindo a rota de síntese de lipídios (LEHNINGER, 2000). Entretanto, sabe-se que o glicerol pode apresentar toxicidade, dependendo das concentrações utilizadas.

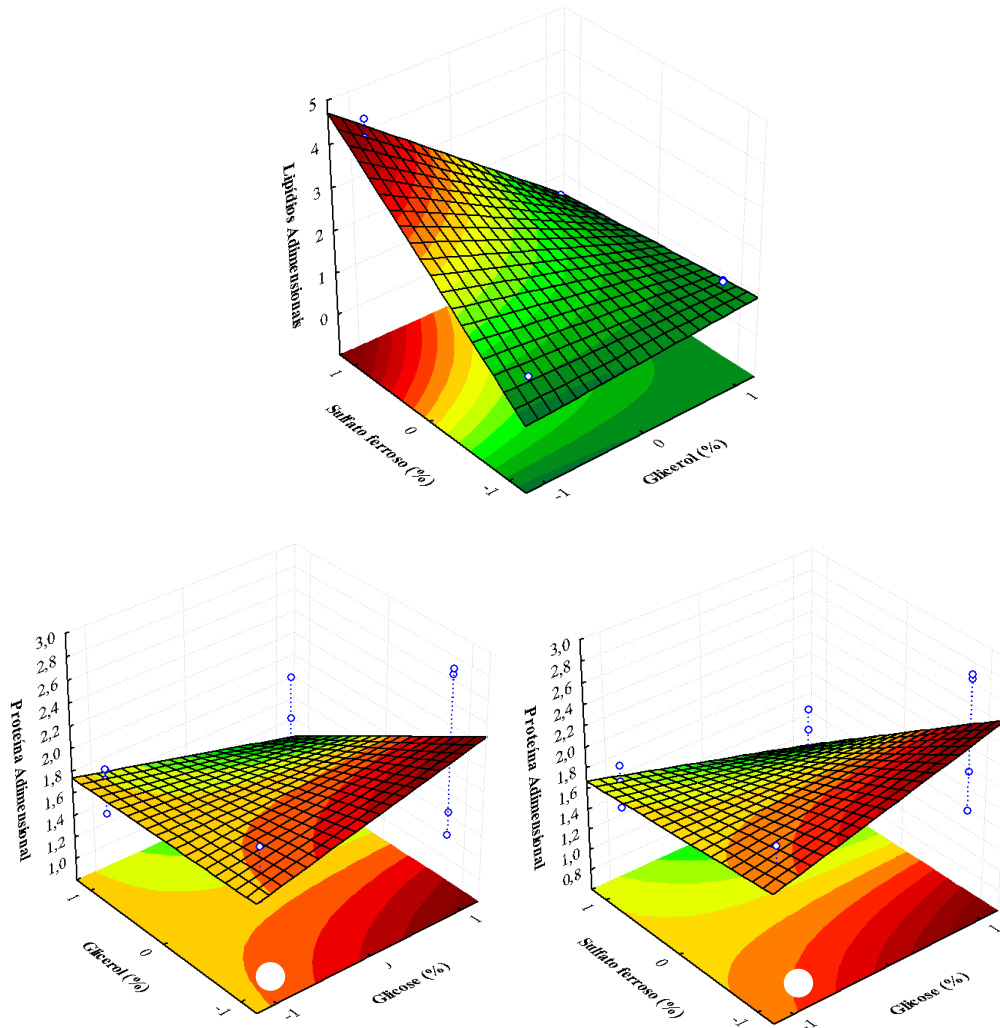


Figura 1: Influência das variáveis glicerol e sulfato ferroso sobre o acúmulo de lipídios.

O ferro é um importante cofator nos processos bioquímicos. O aumento da concentração do ferro pode aumentar a quantidade de lipídios totais, porém, os microrganismos na forma iônica não possuem a capacidade de assimilar, o que somente se estiverem ligados a agentes quelantes que os tornam biodisponíveis (KUDO et al., 2001; LOURENÇO, 2006; LIU; WANG; ZHOU, 2008).

Na literatura, o único trabalho relacionado ao conteúdo de lipídios com concentração de ferro foi de Liu, Wang e Zhou (2008) que utilizaram microalgas. A adição de ferro prolongou a fase exponencial, causou, no início do cultivo, uma diminuição do crescimento celular e estimulou a produção de lipídios neutros.

4. Conclusões

A fermentação em estado sólido mostrou-se uma alternativa para o acúmulo de lipídios e de proteínas 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 sólido foi estimulada pela adição de sulfato ferroso e inibida pela adição de glicose e de glicerol, enquanto que a síntese de proteínas foi

estimulada pela adição de glicose. A indução da síntese de lipídios e de proteínas pode ser afetada pelas condições do meio de cultivo, dependendo da aplicação almejada.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Curso de Engenharia de Alimentos e à Universidade de Passo Fundo pela concessão das bolsas de iniciação científica Pibic-UPF.

5. Referências

ALBUQUERQUE, P. M. *Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã*. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

AMORIM, G. M. *Fermentação de farelo de cacau por Aspergillus niger para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal*. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), 2011.

AOAC. *Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis*.

CAMPOS, A. N. R.; COSTA, M. D.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Total lipid and fatty acid accumulation during basidiospore formation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n.4, p. 1531-1540, 2008.

DE PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; TEIXEIRA JÚNIOR, A.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M. Estudo do crescimento de *A. asiellus* em farelo de soja convencional para produção de enzimas. *Estudos tecnológicos*, v. 6, n. 1, p. 22-35,, 2010.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. *Fermentação em estado sólido*. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher, , cap. 13, v. 3, 2001, p. 247-276.

DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n. 2 e 3, p.113-125, 2003.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, v.10, n. 1, p. 61-65, 2002.

KUDO, I.; MIYAMOTO, M.; NOIRI, Y.; MAITA, Y. Combined effects of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, v. 36, n. 6, p. 1096–1102,, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. Trad. de W. R. Loddi e A. A. Simões. Trad. de Principles of biochemistry. São Paulo: Sarvier, 2000.

LIU, Z.; WANG, G.; ZHOU, B. Efect or iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 11, p. 4717–4722,, 2008.

LOURENÇO, Sergio O. *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. *Solid-State Fermentation Bioreactors*. Fundamentals of Design and Operation. Verlag Berlin Heidelberg: Ed. Springer, 2006, p. 13-32. of the AOAC International. 16th ed. Arlington, 1995.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. v.13, n. 2, p.81–84, 2003.

PINTO, G. A. S. *Produção de tanase por Aspergillus niger*. 2003. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 161-179, 2005.

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

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

SCHMIDELL, W. et al. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: E. Blücher, v. 2, 2001, p. 254.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 843-851. 2008.

SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimento*, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705. 2010.

SPIER, M. R. *Produção de enzimas Amilolíticas Fúngicas A-Amilase e Amiloglucosidase por Fermentação no Estado Sólido*. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 2005.