QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Tayna Cris Silva (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Nelci Catarina Chiquetto, Mareci Mendes de Almeida, (Orientadora), e-mail: mareci@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Engenharia de Alimentos
Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia

Ciência e Tecnologia de Alimentos e Ciência de Alimentos

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*, micélio, fermentação no estado sólido.

Resumo

A concentração do ergosterol em fungo é dependente do estágio de seu desenvolvimento. Esse é um componente celular que pode ser utilizado para a determinação indireta de biomassa fúngica. Para quantificar o ergosterol é necessário extrair do micélio. O objetivo deste trabalho foi produzir micélio, extrair o ergosterol e correlacionar a sua quantificação com o crescimento microbiano. O resíduo oriundo do despolpamento do fruto da palmeira juçara foi utilizado como substrato. Foi feita uma cinética de crescimento do fungo. Para extrair o ergosterol, a biomassa foi seca e saponificada e em seguida foi aquecida, adicionado hexano e colocado em evaporador. O ergosterol foi ressuspenso e foi realizada a leitura em espectrofotômetro. O método adaptado para extração do ergosterol do micro-organismo foi eficiente, possibilitou a quantificação da biomassa, de forma indireta, pela determinação do teor de ergosterol e permitiu elaborar a curva de crescimento do fungo cultivado por fermentação no estado sólido.

Introdução

O ergosterol é o mais importante esterol, constituinte natural das células ou membranas miceliais (DEACON, 1998). A concentração do ergosterol numa massa fúngica é dependente do estágio de seu desenvolvimento, e em consequência da umidade, temperatura e tempo de crescimento (SCHRODER, 2015).

Este é um componente celular que pode ser vantajosamente utilizado para a determinação indireta de biomassa fúngica. A determinação do ergosterol na biomassa fúngica pode ser realizada por espectrofotometria ultravioleta (REGNER et al., 1994). Para quantificar o ergosterol é necessário extrair do micélio, a literatura relata diferentes métodos de extração (SEITZ, 1979; GUTAROWSKA e ZAKOVSKA, 2002). É importante estudar e estabelecer um método adequado de extração, pois diferentes formas de extrair o mesmo componente podem levar a resultados discordantes (COELHO, 2009).

A fermentação no estado sólido (FES) pode ser definida como uma técnica de crescimento de micro-organismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas, onde o conteúdo de líquido contido nesta matriz deve ser mantido a um nível correspondente à atividade de água. O suporte sólido pode ser constituído por um substrato naturalmente úmido ou por uma matriz inerte capaz de absorver os

nutrientes que se encontram em solução reproduzindo as condições de baixa atividade de água e alta transferência de oxigênio (SCHRODER, 2015).

Materiais e Métodos

Fermentação em estado sólido e preparo da biomassa

Inicialmente foi feito o crescimento e manutenção celular da cepa do fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 11488. Para a fermentação no estado sólido foi utilizado o método descrito por Schroder (2015) onde 25g do resíduo do despolpamento do fruto da palmeira juçara foram utilizados como substrato e meio de cultivo. Como fermentadores foram utilizados frascos de Erlenmeyer, o meio foi esterilizado a 121 º C por 20 minutos.

No resíduo foi inoculado o fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 11488. Também foram feitos frascos enriquecendo o substrato com 10% de azeite de oliva extra virgem (Gallo). Após inoculados os frascos foram levados a estufa e incubados a 28 ± 2 °C, por 120 horas, foram retiradas amostras a cada 24 horas, sendo adicionados 62,5 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7). Em seguida o material foi agitado durante 1 hora, filtrado em tecido cirúrgico, onde ocorreu a separação da biomassa do filtrado.

Para o preparo da biomassa separada por filtração foi utilizada a metodologia modificada descrita por Mokochiski et al. (2015) na qual a biomassa obtida foi colocada em placas de petri e congeladas a -20°C. A biomassa passou por uma etapa de secagem em estufa de ar a 45ºC. As amostras foram retiradas da estufa e trituradas sendo em seguida peneiradas (20 mesh).

Cinética de crescimento e extração do ergosterol

Para a cinética de crescimento foram preparados 16 frascos, sendo que em 8 deles o meio foi enriquecido com 10% de azeite de oliva. A cada 24 horas foram retirados dois frascos da estufa, um com enriquecimento e outro sem enriquecimento, nas quais foi realizada a extração do ergosterol.

Para a extração do ergosterol foi utilizada a metodologia descrita por Mokochiski et al. (2015) com modificações. Foi pesado 0,25g da biomassa, que foi saponificada com 2mL de metanol e 0,5mL de NaOH (2N). A amostra foi aquecida em banho-maria durante uma hora a 60 ºC. Logo após, elas foram resfriadas e foi adicionado 2mL de hexano, sendo o conteúdo transferido um balão de fundo redondo, o processo foi repetido por mais duas vezes. O balão então foi colocado em evaporador rotativo durante 5 minutos. Após a evaporação dos solventes o ergosterol foi ressuspenso com 5 mL de hexano e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro a 282nm.

Curva de calibração do ergosterol, biomassa padrão e recuperação do ergosterol

Para a curva de calibração do ergosterol foi utilizado o método modificado descrito por Gutarowska et. al (2002), onde foi preparada uma solução mãe de ergosterol que foi diluída para obter diferentes concentrações de ergosterol em 1 mL de hexano. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro em comprimento de onda 282nm. Sendo obtida a equação da reta y=0,0185x.

Para a determinação da biomassa padrão foi inoculado o fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 11488 em caldo *Sabouraud*, onde os frascos foram levados para o shaker a 28 ± 2°C, por 120 horas e procedeu-se a extração conforme já descrito.

Foram feitas análises para verificar a recuperação de ergosterol, onde em 0,25 g do resíduo do despolpamento do fruto da palmeira juçara foi adicionado 10µg de ergosterol e foi realizada a extração, utilizando o mesmo método aplicado as demais amostras.

Resultados e Discussão

Recuperação do ergosterol

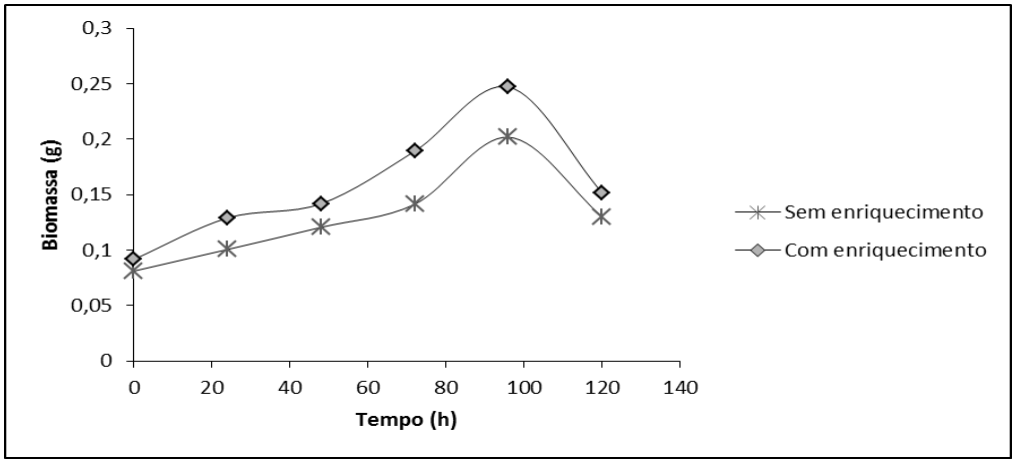
A recuperação de ergosterol para o método estudado foi estimada em 66%, este valor foi considerado um bom resultado de recuperação, comparando outro método utilizado por Carvalho (2004) que obteve um valor de 10% de recuperação de ergosterol, que segundo o autor foi considerado um baixo valor.

Extração de ergosterol das amostras da cinética de crescimento e biomassa padrão

Após a análise da biomassa padrão com o valor da absorbância obtido foi encontrada a concentração do ergosterol de 603µg. Após correção do cálculo da recuperação do ergosterol para 100% de 909µg foi determinada a proporção de ergosterol (biomassa de 909µg:0,25g=3637µg de ergosterol/g de biomassa seca), sendo possível fazer a determinação indireta de biomassa fúngica.

Para determinar a curva de crescimento do fungo foi correlacionada a biomassa obtida em cada análise com o tempo de crescimento (Figura 2).

Figura 2: Curva de crescimento



Fonte: o autor

O maior valor de biomassa encontrado no experimento, tanto no meio enriquecido quanto no meio não enriquecido foi em 96 horas de cultivo. Também foi constatado que o crescimento decaiu após 110 horas de fermentação. Comparando o crescimento no meio com enriquecido e no meio sem enriquecimento, foi observado que o meio enriquecido apresentou uma melhor resposta para o desenvolvimento do fungo, houve aproximadamente o dobro da biomassa inicial em um período de 72 horas e o crescimento foi em torno e 20% maior que o cultivo sem enriquecimento.

Conclusões

O método adaptado para extração do ergosterol do micro-organismo foi eficiente, possibilitou a quantificação da biomassa, de forma indireta, pela determinação do teor de ergosterol e permitiu elaborar a curva de crescimento do fungo cultivado por fermentação no estado sólido.

Agradecimentos

Agradeço a professora Dra. Mareci Mendes de Almeida e a professora Dra. Nelci Catarina Chiquetto Silva pela orientação e a Fundação Araucária pelo auxílio financeiro concedido a este projeto.

Referências

CARVALHO, J.C. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de Monascus por fermentação em substrato sólido**. 2004. 101 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

COELHO, C.D., **Análise dos contaminantes biológicos presentes no material particulado ($PM_{2,5}$) de amostras da região metropolitana de São Paulo**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, p.34, 2009.

DEACON, J. W. **Structure and ultrastructure: modern mycology**. Cambridge: [s.n.], 1998. 35 p. 8

GUTAROWSKA, B.; ZAKOWSKA, Z. **Elaboration and application of mathematical model for estimation of mould contamination of some building materials based on ergosterol content determination**. International Biodeterioration & Biodegradation, v.49, 2002.

MOKOCHINSKI, J. B.; et. al. Biomass and sterol production from vegetal substrate fermatation using *Agaricus brasiliensis*. **Journal of Food Quality**, p.221 – 229, 2015.

REGNÉR, S.; SCHNÜRER, J.; JONSSON, A. Ergosterol content in relation to grain kernel weight. **Cereal Chemistry Journal**. v. 71, n. 1, p. 55-58, 1994.

SCHRODER, M. A. **Produção de lipase a partir dos resíduos de processamento dos frutos de palmeira juçara por fermentação no estão sólido**. 2015. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

SEITZ, L.M., SAUER, D.B., BURROUGHS, R., MOHR, H.E., HUBBARD, I.D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**. v.69, p.1202–1203, 1979.