

# Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido

*Characterization of nitrogenated compounds in solid state fermented bran*

Cristina Moreira da SILVEIRA<sup>1\*</sup>, Eliana Badiale FURLONG<sup>1</sup>

## Resumo

Farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo foram submetidos à fermentação em estado sólido pelos fungos *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae*, visando a obtenção de um produto enriquecido em proteínas, reaproveitando um subproduto da indústria beneficiadora de cereais. Os farelos fermentados obtidos foram caracterizados quanto aos seus compostos nitrogenados. Foi determinado o conteúdo protéico, de aminoácidos totais e digeríveis e de metionina disponível. Os maiores aumentos nos teores protéicos dos farelos foram observados com o microrganismo *Rhizopus* sp.. Os teores de aminoácidos totais, aminoácidos digeríveis e metionina disponíveis foram aumentados nos farelos fermentados por ambos os fungos, sendo que o escore químico, após 72 horas, variou entre 37,5 e 54,3%.

**Palavras-chave:** reaproveitamento de subprodutos; disponibilização de nutrientes; biomassa fúngica.

## Abstract

Defatted rice bran and wheat bran were subjected to solid-state fermentation by the fungi *Rhizopus* sp. and *Aspergillus oryzae* to increase their nutritional value, especially their protein content. The fermented bran was analyzed to determine the protein, total amino acids, digestible amino acids and disposable methionine content. The highest increase in protein content in fermented bran occurred with the use of *Rhizopus* sp., while total amino acids, digestible amino acids and available methionine increased with both fungi. After 72 hours of fermentation the chemical score varied from 37.5 to 54.3%.

**Keywords:** reuse of by-products; biological availability of nutrients; fungal biomass.

## 1 Introdução

Biomassa fúngica (*single cell protein*) é produzida pelo cultivo de fungos micro ou macroscópicos, sendo constituída pelas suas estruturas separadas ou não do substrato empregado no processo fermentativo. A produção de biomassa pode ser interessante para aumentar o teor protéico do substrato ou para agregar valores a rejeitos agroindustriais. Ainda é possível que os microrganismos, ao produzirem enzimas exocelulares para a obtenção de nutrientes do meio, aumentem a biodisponibilidade de compostos químicos essenciais no substrato, produzindo substâncias específicas tais como pigmentos, enzimas, biosurfactantes e outros<sup>1,5,7,14,17,19</sup>.

Para a obtenção de biomassa podem ser utilizados processos fermentativos, classificados em função da quantidade de água no meio. Denomina-se fermentação em estado sólido aquela em que o desenvolvimento microbiano se dá em condições de atividade de água baixa (menor que 60%). Sendo assim, apresenta uma série de vantagens, tais como: obtenção de produtos concentrados, necessitando de menor quantidade de solvente para extração; possibilidade da exclusão das etapas de concentração e/ou extração; redução dos problemas de contaminação; substratos simples e de baixo custo; a esterilização do meio é muitas vezes desnecessária; ausência de espuma; eliminação da necessidade de solubilização do substrato; eli-

minação da necessidade de rigoroso controle sobre diversos parâmetros durante a fermentação<sup>7,10,16,17</sup>.

Os fungos filamentosos *Rhizopus* e *Aspergillus* encontram-se entre os mais promissores na produção de biomassa, uma vez que além de elevarem o teor protéico, produzem proteínas com atividade catalítica específica. O gênero *Rhizopus* é especialmente importante, pela produção de proteínas com elevada digestibilidade e ausência de substâncias tóxicas<sup>1,15,18</sup>.

Os farelos de arroz e de trigo são freqüentemente utilizados como substrato para a fermentação em estado sólido visando a produção de insumos para a indústria de alimentos, devido à sua abundância<sup>5</sup>. No entanto, as porções mais externas dos grãos são ricas em nutrientes como proteínas, lipídios, vitaminas e compostos funcionais, que são pouco utilizados na alimentação humana pela indisponibilidade biológica e características organolépticas pouco agradáveis.

No Estado do Rio Grande do Sul, no ano de 2005, foram produzidas cerca de 5 milhões de toneladas de arroz, das quais 8% foram farelos, que após a extração do óleo, foram comercializados a baixo preço para ração animal ou mesmo descartados<sup>6,11</sup>. Situação semelhante ocorre com o trigo, embora a produção não atinja as mesmas proporções que para o arroz e parte dele seja comercializado para produtos destinados ao consumo humano.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar os compostos nitrogenados presentes na biomassa fúngica produzida por *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae*, tendo como substratos farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo, visando identificar o efeito do processo fermentativo nestes nutrientes. Os resultados podem contribuir com a agroindústria, oferecendo alternativas de agregar valores a estes subprodutos.

Recebido para publicação em 8/12/2006

Aceito para publicação em 19/7/2007 (002139)

<sup>1</sup> Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rua Engenheiro Alfredo Huck, 475, CP 474, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil, E-mail: crismsilveira@zipmail.com.br

\*A quem a correspondência deve ser enviada

## 2 Material e métodos

### 2.1 Caracterização da matéria-prima

Os farelos foram obtidos junto às indústrias locais e homogeneizados, estabelecendo-se uma granulometria entre 0,35 e 0,59 mm, para emprego destes como substratos nos processos fermentativos. As composições centesimais dos farelos foram determinadas segundo métodos da AOAC<sup>2</sup>. Os farelos também foram submetidos à análise micotoxicológica, determinando-se a ocorrência de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, ocratoxina A e zearalenona, segundo método descrito por SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA<sup>24</sup>.

### 2.2 Produção de biomassa

As condições para a geração de biomassa foram adaptadas do trabalho de SILVEIRA et al.<sup>23</sup>. Aos farelos homogeneizados foi adicionada uma solução de nutrientes contendo 2 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> e 1,8 g.L<sup>-1</sup> de uréia em HCl 800 mM (0,81 mg de uréia.g<sup>-1</sup> de meio), e água destilada estéril, a fim de corrigir a umidade do meio para aproximadamente 50%. Após, foram inoculados com soluções de esporos de *Rhizopus* sp. e de *Aspergillus oryzae*, de modo a obter uma concentração de 4 x 10<sup>6</sup> esporos.g<sup>-1</sup> meio. O substrato e o inóculo foram distribuídos em bandejas, de modo a constituírem uma camada uniforme de 1 cm de espessura. As bandejas foram mantidas em estufa a 30 °C durante 72 horas. Amostras foram coletadas no tempo zero e em intervalos de 24, 48 e 72 horas de fermentação. A umidade dos farelos foi determinada em todos os intervalos, diminuindo para 40% após 72 horas de fermentação.

### 2.3 Determinação de nitrogênio total

O teor de nitrogênio total dos farelos fermentados e não fermentados foi determinado pelo método de microKjeldahl, AOAC<sup>2</sup>, e convertido em porcentagem de proteína em base seca, empregando-se o fator de conversão 6,25.

### 2.4 Determinação de aminoácidos totais

Os aminoácidos totais foram determinados após hidrólise ácida de 0,1 g de amostra seca com 2 mL de ácido clorídrico concentrado e 8 mL de água destilada e autoclavagem a 121 °C por 30 minutos. O resíduo sólido foi separado por centrifugação a 4000 g e os aminoácidos liberados foram determinados, após neutralização, com 2 mL de solução 0,1% de ninidrina em tampão fosfato de sódio 200 mM pH 7,0. O complexo foi quantificado por espectrofotometria (570 nm), empregando uma curva padrão de tirosina que variava entre 0,05 e 0,15 mg.mL<sup>-1</sup> 23,13.

### 2.5 Determinação de aminoácidos digeríveis

Os aminoácidos digeríveis foram determinados após hidrólise enzimática com pepsina e pancreatina. 1 g de amostra foi submetida à hidrólise com 10 mL de suspensão de pepsina (atividade específica de 0,8 mg tirosina/min/mg proteína) por 3 horas em banho a 37 °C. O pH foi elevado a 7,0, a amostra foi centrifugada e, após a separação do sobrenadante, foram

adicionados 10 mL de uma suspensão de pancreatina (atividade específica 23,8 mg tirosina/min/mg proteína) ao precipitado, para continuidade da hidrólise por 24 horas em banho a 37 °C, com agitação. Os hidrolisados foram centrifugados e os sobrenadantes mantidos sob refrigeração a 4 °C, até o momento do uso. A quantificação dos aminoácidos liberados nos sobrenadantes provenientes da hidrólise com pepsina e pancreatina empregou o mesmo procedimento descrito para o hidrolisado ácido<sup>13,23</sup>.

### 2.6 Determinação de metionina disponível

O conteúdo de metionina disponível foi determinado no hidrolisado enzimático obtido para a determinação dos aminoácidos digeríveis. 2 mL de hidrolisado foram complexados com 1 mL de nitroprussiato de sódio 2,5%, em meio ácido, seguindo-se leitura em espectrofotômetro (510 nm) do complexo formado, tendo como padrão uma curva de metionina na faixa de linearidade entre 0,02 e 0,2 mg.mL<sup>-3</sup>.

### 2.7 Escore químico

O escore químico foi calculado a partir da relação entre a quantidade de metionina disponível contida na proteína teste e a quantidade da mesma contida na proteína padrão usada como referência, de acordo com o método descrito por HENLEY e KUSTER<sup>9</sup>. A equação utilizada foi a seguinte:

$$E. Q. = \frac{\text{mg de metionina/g de proteína teste}}{\text{mg de metionina/g de proteína padrão}} \quad (1)$$

### 2.8 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi realizada e a diferença entre as médias de quatro repetições experimentais foi determinada através do Teste de Tukey ao nível de significância de  $p < 0,05$ . O software utilizado foi o STATISTICA v. 5.0.

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Caracterização da matéria-prima

A composição centesimal do farelo de arroz desengordurado e do farelo de trigo pode ser vista na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição do farelo de arroz desengordurado e do farelo de trigo.

(%)	Farelo de arroz desengordurado	Farelo de trigo
Umidade	9,2	9,4
Proteínas	19,2	13,8
Lipídios	5,7	5,2
Carboidratos	47,1	60,1
Cinzas	11,7	6,3
Fibras	7,1	5,2

A composição centesimal dos farelos é condizente com a apresentada por SILVA, SANCHES e AMANTE<sup>21</sup>, levando-se em conta as diferenças decorrentes do tipo de solo, da cultivar, do beneficiamento e da forma de estabilização dos mesmos.

A triagem de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, ocratoxina A e zearalenona foi realizada em virtude dos relatos de contaminação de farelos<sup>4,5</sup> e da possibilidade de interferência das toxinas no desenvolvimento fúngico. Os métodos empregados para a determinação de micotoxinas tinham como limite de detecção 2,5 ppb para aflatoxinas, 6,7 ppb para ocratoxina e 47,0 ppb para zearalenona e uma recuperação média de 87% para cada micotoxina.

### 3.2 Conteúdo protéico

Os fungos, por sua versatilidade de desenvolvimento, podem ser uma alternativa para enriquecimento e/ou disponibilização de nutrientes presentes em farelos provenientes da indústria de cereais. Neste caso específico, foram escolhidos os farelos de arroz e de trigo que, apesar de sua abundância, geram controvérsias no seu uso para consumo animal e humano, tanto por sua composição (rica em fibras insolúveis e pobre em proteínas digeríveis e balanceadas), como pelas suas características sensoriais. A transformação de carboidratos em proteínas por espécies fúngicas é bastante mencionada na literatura<sup>12,114</sup>. Tal possibilidade pode ser comprovada na Tabela 2, que apresenta os valores médios do teor protéico em farelos não fermentados e fermentados por *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae*, nas condições do presente trabalho.

**Tabela 2.** Conteúdo de proteína para farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo.

Tempo de fermentação (horas)	FAD <i>Rhizopus</i> sp. (%)	FT <i>Rhizopus</i> sp. (%)	FAD <i>A. oryzae</i> (%)	FT <i>A. oryzae</i> (%)
NF	19,2	13,8	19,2	13,8
0	21,0	15,6	17,8	12,7
24	22,8	16,8	18,4	14,9
48	25,8	18,9	21,3	14,3
72	32,4	21,6	20,6	15,8

NF = não fermentado; FAD = farelo de arroz desengordurado; e FT = farelo de trigo.

Os valores apresentados na Tabela 2 confirmam o esperado aumento na porcentagem de proteína, para os farelos fermentados por ambos os fungos.

O teor médio de aumento no teor protéico no farelo de arroz desengordurado fermentado por *Rhizopus* sp. foi de 33% e ao final de 72 horas foi de 69%, considerando-se o farelo não fermentado. MORAES<sup>14</sup> obteve cerca de 40% de aumento nas proteínas de farelo de arroz, fermentado em biorreator de coluna por *Rhizopus* sp.. Tal diferença pode ter sido decorrente do sistema utilizado neste trabalho, que propiciou maior desenvolvimento do fungo no meio. Com o *Aspergillus oryzae* o aumento médio do teor protéico no farelo de arroz desengordurado foi de 7% e o máximo aumento ocorrido foi de 11% após 48 horas de fermentação. O mesmo perfil foi observado quando o substrato foi o farelo de trigo. Também neste caso os resultados diferem dos relatados por MORAES<sup>14</sup>, mas são semelhantes aos demonstrados por SILVEIRA et al.<sup>23</sup>.

O efeito da granulometria, da transferência de calor e de outros parâmetros de processo foi estudado por COSTA et al.<sup>7</sup> e

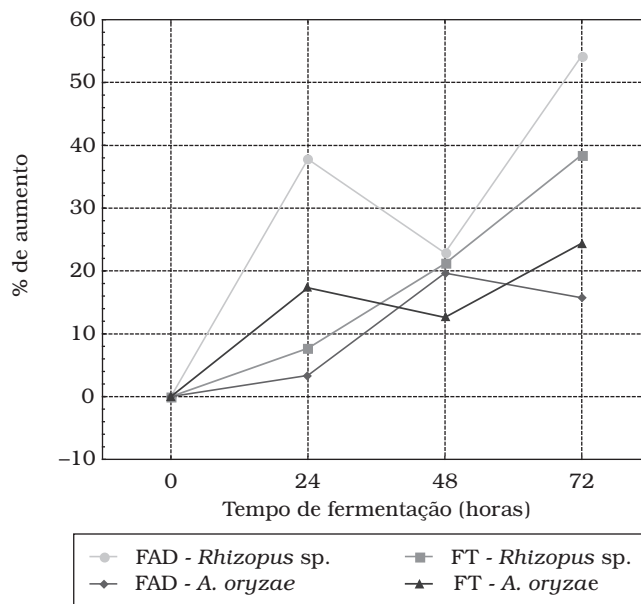
corroboram com as justificativas para as diferenças observadas nos resultados obtidos neste trabalho e no de MORAES<sup>14</sup>.

O teste de Tukey comprovou a significância dos teores aumentados de proteína para ambos os farelos ( $p = 0,0002$  para farelo de arroz e  $p = 0,0004$  para farelo de trigo).

Para os farelos não fermentados e o tempo zero de fermentação, pode ser observada uma variação de aproximadamente 2% no teor protéico. Tal diferença pode ser atribuída à solução de nutrientes, adicionada aos farelos para a composição do meio, que garantiu uma concentração de 0,81 mg de uréia.g<sup>-1</sup> de meio, à adição de casca de arroz para garantir a aeração do meio, e à diferente capacidade de retenção de água dos farelos não fermentados em relação aos farelos fermentados, valores estes determinados experimentalmente<sup>22</sup>.

É importante salientar que a conversão da quantidade de nitrogênio em porcentagem de proteína foi realizada utilizando-se o fator de conversão 6,25, pela inexistência de um fator específico para este tipo de produto fermentado. Alguns estudos para a determinação deste fator foram realizados por SILVEIRA et al.<sup>23</sup>, sendo de 6,2 e 6,7 para farelos fermentados por *Rhizopus* e *Aspergillus*, respectivamente; entretanto os resultados obtidos não foram conclusivos e ainda estão sendo estabelecidos. O mesmo fator geral (6,25) foi adotado para os farelos não fermentados, mesmo com a possibilidade de se empregar fatores específicos para arroz e trigo, pois a comparação de alteração acarretaria menores erros de estimativa de proteína.

A Figura 1 mostra o percentual de aumento no teor protéico durante o processo fermentativo e corrobora com os informes da literatura sobre a maior velocidade de crescimento característica do gênero *Rhizopus* em relação ao *Aspergillus*. Ainda este comportamento mostra que os microrganismos possuem necessidades metabólicas semelhantes<sup>18,8</sup>.



**Figura 1.** Aumento no teor protéico durante a fermentação; FAD = farelo de arroz desengordurado; e FT = farelo de trigo.

### 3.3 Aminoácidos totais

A determinação de aminoácidos totais foi realizada porque, além ser um indicativo do valor nutritivo de uma proteína, poderia refletir o nitrogênio protéico, principalmente neste caso, onde o fator de conversão de nitrogênio para proteína não é específico para o produto formado no processo fermentativo. Embora o método para determinação de aminoácidos totais por hidrólise total preconize 24 horas a 110 °C<sup>13</sup>, neste trabalho foi empregado o procedimento adaptado no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Furg, que propõe o emprego de autoclavagem. A exatidão neste caso foi de 98% e, portanto, adequada para a determinação<sup>23</sup>.

Para a quantificação de aminoácidos pode-se utilizar uma variedade de reagentes, que formam produtos coloridos com os diferentes aminoácidos. A reação com ninidrina é utilizada para determinar os  $\alpha$ -aminoácidos, quando o complexo é lido espectrofotometricamente em 570 nm, e para prolina e hidróxi-prolina, quando a leitura é realizada em 400 nm<sup>13</sup>. Neste trabalho, os valores da leitura em 400 nm da absorvância das aminas secundárias, prolina e hidroxiprolina, foram desprezíveis e, portanto, desconsiderados.

Na Tabela 3 estão apresentados os teores de aminoácidos totais por grama de amostra e em porcentagem de aminoácidos em relação ao teor protéico estimado, permitindo visualizar um comportamento semelhante ao verificado para os níveis de proteína ao longo da fermentação. No entanto, o aumento ocorreu as 48 horas de processo, estabilizando ou diminuindo até as 72 horas. A tendência de estabilizar ou mesmo diminuir o teor de aminoácidos totais pode ser decorrente do processo de esporulação do fungo ou então do emprego dos aminoácidos para a síntese de compostos não protéicos, que são característicos do ciclo biológico do fungo<sup>8,18</sup>.

Analisando os valores de aminoácidos totais e os teores protéicos pôde-se observar que quando o substrato foi farelo de arroz desengordurado, a relação foi menor para os dois microrganismos, indicando que a formação de compostos protéicos é função do substrato empregado. Ainda do ponto de vista de conversão de nitrogênio total em proteína, o fator para a biomassa fermentada será sempre superior ao do substrato e ao geral. A estimativa do fator mostra que para a biomassa produzida por *Rhizopus* está em torno de 7,5 e para *Aspergillus oryzae* em torno de 8,9. Este aspecto é interessante, pois mostra que os fungos utilizam o nitrogênio do meio para conversão em proteína.

Cabe salientar que nenhuma condição de hidrólise reflete exatamente o conteúdo aminoacídico de uma proteína. É praticamente impossível, a partir de um único procedimento, garantir a hidrólise completa de todas as ligações peptídicas sem destruir algum dos aminoácidos presentes. Neste caso, a hidrólise ácida realizada poderia ter ocasionado perdas dos aminoácidos sulfurados, uma vez que o tempo de hidrólise interfere na sua taxa de liberação e pode também destruí-los. O triptofano é totalmente destruído durante a hidrólise ácida, e sua quantificação deve ser feita por outro método<sup>13,20,25</sup>.

Na Tabela 4 estão expressos os valores de aminoácidos totais médios em gramas de aminoácidos por 16 gramas de nitrogênio. Nela também aparece a mesma relação para o isolado protéico de soja. O farelo fermentado que apresentou os valores mais próximos foi o de trigo fermentado por *Aspergillus oryzae*.

**Tabela 4.** Aminoácidos totais para farelos não fermentados, fermentados por 72 horas, e isolado protéico de soja.

	Aminoácidos totais (g.16g <sup>-1</sup> N)
FAD não fermentado	19,55
FT não fermentado	20,35
FAD fermentado por <i>Rhizopus</i> sp.	9,78
FT fermentado por <i>Rhizopus</i> sp.	22,01
FAD fermentado por <i>Aspergillus oryzae</i>	20,15
FT fermentado por <i>Aspergillus oryzae</i>	31,36
Isolado protéico de soja <sup>20</sup>	35,80

Considerando-se que a determinação de triptofano não foi realizada separadamente, por outro método que não utilizasse a hidrólise ácida, pode-se estimar um erro mínimo de 4% no valor encontrado para aminoácidos totais nos produtos fermentados. Ainda assim, embora os resultados sejam inferiores aos apresentados por SGARBIERI<sup>20</sup> para o isolado protéico de soja, a fermentação em estado sólido parece promissora para aumentar o teor protéico de farelos.

### 3.4 Aminoácidos digeríveis

O teor de aminoácidos digeríveis foi avaliado para estimar o aporte de aminoácidos para o uso metabólico dos produtos fermentados. A Tabela 5 mostra as quantidades de aminoácidos digeríveis para os farelos, expressas em mg.g<sup>-1</sup> de amostra.

**Tabela 3.** Aminoácidos totais e relação entre aminoácidos totais e proteína estimada para farelos fermentados e não fermentados.

Tempo (horas)	FAD <i>Rhizopus</i> sp.		FT <i>Rhizopus</i> sp.		FAD <i>A. oryzae</i>		FT <i>A. oryzae</i>	
	AT (mg.g <sup>-1</sup> )	AT.prot <sup>-1</sup> (%)	AT (mg.g <sup>-1</sup> )	AT.prot <sup>-1</sup> (%)	AT (mg.g <sup>-1</sup> )	AT.prot <sup>-1</sup> (%)	AT (mg.g <sup>-1</sup> )	AT.prot <sup>-1</sup> (%)
NF	37,55	19,0	28,09	21,0	37,55	19,8	28,09	20,2
0	34,03	16,0	32,34	20,7	34,27	19,1	32,65	26,0
24	34,86	15,0	35,69	21,4	39,12	21,1	37,33	24,8
48	52,79	21,0	43,00	22,7	51,44	23,9	44,17	30,8
72	26,52	8,0	44,09	20,3	37,19	18,0	43,53	27,2

NF = não fermentado; FAD = farelo de arroz desengordurado; FT = farelo de trigo; AT = aminoácidos totais; e AT.prot<sup>-1</sup> = relação entre aminoácidos totais e proteína estimada.

**Tabela 5.** Aminoácidos digeríveis para farelos fermentados e não fermentados.

Tempo de fermentação (horas)	FAD <i>Rhizopus</i> sp. (mg.g <sup>-1</sup> )	FT <i>Rhizopus</i> sp. (mg.g <sup>-1</sup> )	FAD <i>A. oryzae</i> (mg.g <sup>-1</sup> )	FT <i>A. oryzae</i> (mg.g <sup>-1</sup> )
NF	5,80	4,68	5,80	4,68
0	18,50	17,81	18,03	19,26
24	23,21	21,78	35,06	36,09
48	27,41	14,65	15,60	35,35
72	29,84	39,68	31,30	36,60

NF = não fermentado; FAD = farelo de arroz desengordurado; e FT = farelo de trigo.

De acordo com a mesma é possível observar que o conteúdo de aminoácidos digeríveis apresenta um aumento ao longo da fermentação, alcançando seu máximo em 72 horas.

Para os farelos fermentados por *Rhizopus* sp., o aumento no teor de aminoácidos digeríveis foi considerado significativo pelo teste de Tukey para ambos os farelos ( $p = 0,0001$  para farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo), correspondendo a cerca de 5 vezes para o farelo de arroz e 8 vezes para o farelo de trigo. O teor de aminoácidos digeríveis representa mais de 100% do conteúdo de aminoácidos totais para o farelo de arroz desengordurado, entretanto o valor de aminoácidos totais de 26,52 mg.g<sup>-1</sup> de amostra (Tabela 3) é decorrente de erro experimental na sua determinação, uma vez que foi consideravelmente inferior aos valores encontrados para os outros farelos. Tal erro pode ser devido à falta de uniformidade no desenvolvimento da biomassa no substrato, o que dificilmente pode ser solucionado com cuidados analíticos. Para o farelo de trigo, o teor de aminoácidos digeríveis representa aproximadamente 90% dos aminoácidos determinados por hidrólise ácida.

Quando o microrganismo produtor de biomassa foi *Aspergillus oryzae*, o aumento no teor de aminoácidos digeríveis do farelo de arroz desengordurado foi de aproximadamente 5 vezes, contra 7 vezes do farelo de trigo. O teste de Tukey comprovou a significância no aumento para ambos os farelos ( $p = 0,0001$  para o farelo de arroz desengordurado e  $p = 0,026$  para farelo de trigo). Para ambos os farelos, os aminoácidos digeríveis representam cerca de 84% do total de aminoácidos. Este fato sugere que a fermentação melhora a disponibilidade de aminoácidos no substrato.

### 3.5 Metionina disponível

Aminoácidos sulfurados, como a metionina, são importantes na alimentação humana e animal. Estes aminoácidos são instáveis em condições oxidantes, havendo necessidade de desenvolvimento de procedimentos para sua detecção e quantificação, especialmente para processos onde a possibilidade de oxidação seja acentuada, como é o caso do desenvolvimento de biomassa fúngica antes da fase lag<sup>8,18</sup>.

A hidrólise ácida, utilizada como metodologia clássica na análise de aminoácidos, converte metionina na forma reduzida a sulfóxido de metionina, portanto não aproveitável para o metabolismo. Uma alternativa de hidrólise, que visa a minimização da destruição da estrutura dos aminoácidos, é o emprego

da hidrólise enzimática da amostra e sua determinação com reação específica<sup>25</sup>.

Geralmente, proteínas fúngicas apresentam uma composição rica em aminoácidos, exceto em aminoácidos sulfurados, sendo a metionina e a lisina os aminoácidos limitantes<sup>1</sup>. Neste sentido, a determinação de metionina disponível é bastante interessante, pois estima a disponibilidade da metionina na biomassa, principalmente considerando-se que os substratos foram farelos de cereais, que não se caracterizam pela deficiência de metionina.

A quantidade de metionina disponível em mg.g<sup>-1</sup> de amostra esta apresentada na Tabela 6, para farelos não fermentados e fermentados.

**Tabela 6.** Teores de metionina disponível para os farelos.

Tempo de fermentação (horas)	FAD <i>Rhizopus</i> sp. (mg.g <sup>-1</sup> )	FT <i>Rhizopus</i> sp. (mg.g <sup>-1</sup> )	FAD <i>A. oryzae</i> (mg.g <sup>-1</sup> )	FT <i>A. oryzae</i> (mg.g <sup>-1</sup> )
NF	2,57	2,02	2,57	2,02
0	3,29	2,92	4,83	3,73
24	3,67	2,59	5,48	3,17
48	3,36	2,73	6,24	3,84
72	5,09	3,51	4,25	4,00

NF = não fermentado; FAD = farelo de arroz desengordurado; e FT = farelo de trigo.

O teste de Tukey (95% de significância) aplicado aos resultados da Tabela 6 confirmou que os farelos fermentados por *Rhizopus* sp. apresentaram um aumento significativo nos níveis de metionina disponível após 72 horas de fermentação ( $p = 0,001$  para farelo de arroz desengordurado e  $p = 0,0008$  para farelo de trigo) e correspondendo a cerca de 98% para farelo de arroz desengordurado e 74% para farelo de trigo.

Em relação ao conteúdo de aminoácidos digeríveis, o teor de metionina disponível representou cerca de 17% para farelo de arroz desengordurado e 9% para farelo de trigo fermentado por *Rhizopus* sp., enquanto para *Aspergillus oryzae* foi de 14% para farelo de arroz desengordurado e 11% para farelo de trigo.

Em relação à quantidade de aminoácidos totais, o teor de metionina foi de 8,8% para farelo de trigo fermentado por *Rhizopus* sp. Quando o fungo foi *Aspergillus oryzae*, o teor de metionina representou cerca de 8,0% para o farelo de arroz desengordurado e de 9,2% para o farelo de trigo. Tais resultados são bastante superiores aos apresentados por ANUPAMA e RAVINDRA<sup>1</sup>, para proteínas produzidas por *Aspergillus niger*, onde foi encontrado um teor de 0,35% de metionina.

Os níveis de metionina foram expressos em gramas de metionina por 16 gramas de nitrogênio e os resultados foram de 1,6 g de metionina.16 g<sup>-1</sup> de N para farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo fermentado por *Rhizopus* sp. e de 2,1 g<sup>-1</sup> de metionina.16 g<sup>-1</sup> de N para farelo de arroz desengordurado e de 2,5 g de metionina.16 g<sup>-1</sup> de N para farelo de trigo fermentado por *Aspergillus oryzae*. Tais resultados são superiores às quantidades de metionina apresentadas por isolado protéico de soja (1,3 g de metionina.16 g<sup>-1</sup> de N) e isolado protéico de feijão (1,31 g de metionina.16 g<sup>-1</sup> de N). Quando comparados

com farinha de soja desengordurada (1,6 g de metionina.16 g<sup>-1</sup> de N), os teores de metionina são semelhantes para os farelos fermentados por *Rhizopus* sp. e superiores para os farelos fermentados por *Aspergillus oryzae*.

### 3.6 Escore químico

Os valores obtidos para o escore químico dos farelos fermentados estão na Tabela 7.

**Tabela 7.** Escore químico para farelos fermentados durante 72 horas.

Farelo	E. Q. (%)
FAD fermentado por <i>Rhizopus</i> sp.	54,3
FT fermentado por <i>Rhizopus</i> sp.	37,5
FAD fermentado por <i>Aspergillus oryzae</i>	45,3
FT fermentado por <i>Aspergillus oryzae</i>	42,7

FAD = farelo de arroz desengordurado; FT = farelo de trigo; e E. Q. = escore químico.

Não foram encontradas na literatura referências dos valores para produtos fermentados, bem como o escore químico de outras fontes protéicas convencionais que tivessem a metionina como o aminoácido mais limitante. A literatura traz o escore químico de trigo, equivalente a 47%, e de arroz polido, que equivale a 65,5%, mas neste caso foram estimados pelos valores de lisina.

## 4 Conclusões

O conteúdo protéico de farelo de arroz desengordurado e de farelo de trigo foi aumentado pelo processo fermentativo, entretanto, pelo teste de Tukey, o aumento é significativo apenas quando o fungo utilizado é o *Rhizopus* sp. e o substrato o farelo de arroz desengordurado.

A determinação da quantidade de aminoácidos totais mostrou que os farelos apresentaram comportamentos semelhantes, mesmo se fermentados por fungos diferentes.

O farelo de arroz desengordurado, quando fermentado por ambos os fungos, apresentou um aumento no teor de aminoácidos digeríveis de cerca de 5 vezes em relação ao farelo não fermentado, e o farelo de trigo mostrou aumento de 8 e 7 vezes, respectivamente, para *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae*.

O conteúdo de metionina disponível também foi influenciado positivamente pelo processo fermentativo, indicado pelo aumento médio de 1,8 vezes em relação aos farelos não fermentados. O escore químico dos farelos fermentados durante 72 horas, calculado em função da metionina, variou entre 37,5 e 54,3%.

## Referências bibliográficas

- ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, v. 6, p. 459-479, 2000.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis International**. 17 th ed., CD - ROM, William Horwitz., 2000.
- BADIALE, E. **Varição de Metionina Disponível em Grãos de Feijão**. Campinas, 1979, 80 p. Dissertação (Mestrado em
- Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
- BADIALE-FURLONG, E. et al. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, n. 58, v. 2, p. 105-111, 1999.
- COELHO, C. S. P.; ALMEIDA, T. L.; FURLONG, E. B. Migração de Micotoxinas durante o Processo de Parboilização do Arroz. **Brazilian Food Technology**, n. 2 v. 1, p. 43-50, 1999.
- CONAB. Conselho Nacional de Abastecimento. Disponível em <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 20 nov. 2006.
- COSTA, J. A. V. **Estudo da produção de amiloglucosidase por fermentação semi-sólida em biorreator em coluna**. Campinas, 1996, 203 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2ª edição. New York: Wiley-Liss, 1994.
- HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility – corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v. 48, n. 4, p. 74-77, 1994.
- HUERTA, S. et al. Absorbed substrate fermentation for pectinase production with *Aspergillus niger*. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 11, p. 837-842, 1994.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 20 nov. 2006.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.
- LITWACK, G. **Experimental Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1978.
- MORAES, A. F. **Enriquecimento Protéico do Farelo de Arroz empregando Fermentação semi-sólida em Biorreator de Coluna com Leito Fixo**. Rio Grande, 1999, 102 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande – FURG.
- PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109-117, 1992.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.
- PARASKEVOPOULOU, A. et al. Functional properties of single cell protein produced by *kefir* microflora. **Food Research International**, v. 36, n. 5, p. 431-438, 2003.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2ª edição. London: Blackie Academic & Professional, 1997.
- RODGER, G. Mycoprotein – a meat alternative new to U.S. **Food Technology**, v. 55, n. 7, p. 36-50, 2001.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, degradações, modificações**. São Paulo, SP: Livraria Varela, 1996.
- SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Farelo de arroz – composição e propriedades. **Revista Óleos & Grãos**, jul-ago, p. 34-42, 2001.
- SILVEIRA, C. M. **Biomassa fúngica obtida por fermentação em estado sólido: compostos nitrogenados, propriedades funcionais das proteínas e perfil em ácidos graxos**. Rio Grande, 2005, 121 p.

- Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).  
Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG.
23. SILVEIRA, S. T. et al. Solubilidade, Digestibilidade, Capacidade de Emulsificação e suas Relações em Farelos Fermentados e não Fermentados. **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações** – SINAFERM. Florianópolis, 2003.
24. SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.
25. WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry**. 5ª edição. Cambridge: University Press, 2000.