

74919 - ESTUDO DO ENRIQUECIMENTO PROTEICO DA ALGAROBA (*Prosopis juliflora*) UTILIZANDO *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 VISANDO A PRODUÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL

José Marreiro de Sales Neto¹, Ana Carla da Fonseca Ferreira², Kamila Katiane Sotero
Silva³, Glauciane Danusa Coelho^{4*}

¹Doutorando do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

²Graduanda em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

³Graduanda em Engenharia de Biosistemas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

⁴Professora Adjunta da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG),
*glauciane.coelho.pb@gmail.com

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo estudar o enriquecimento proteico da algaroba (*Prosopis juliflora*) utilizando *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 visando a produção de ração animal. O efeito da temperatura (28, 34 e 40 °C) e da suplementação com farinha de soja (0, 5 e 10 %) e do tempo de fermentação (0, 7 e 14 dias) foram avaliados utilizando um planejamento fatorial 2³ em duplicata e com 4 pontos centrais, considerando significativos $p < 0,05$. A fermentação foi conduzida em potes fechados contendo 30 g do substrato com ou sem farinha de soja, 75 mL de água destilada e inóculo. A temperatura e o tempo de fermentação não apresentaram efeito e a melhor condição para o enriquecimento proteico foi utilizando 10 % de farinha de soja. O modelo estatístico gerado, $P = 7,44 - 0,54X_1 + 3,17X_2 - 0,73X_3 - 0,79X_{23} \pm 0,81$, foi significativo e preditivo, com $R^2 = 0,9290$ e erro puro = 0,8106.

Palavras chave: Farinha de soja. Nutrição animal. Planejamento fatorial. Semiárido Brasileiro.

STUDY OF PROTEIN ENRICHMENT OF ALGAROBA (*Prosopis juliflora*) BY *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 AIMING TO PRODUCE ANIMAL FEED

ABSTRACT: Our purpose was study of protein enrichment of algaroba (*Prosopis juliflora*) by *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 aiming to produce animal feed. The effects of temperature (28, 34, and 40 °C), soybean flour supplementation (0, 5, and 10 %), and fermentation time (0, 7, and 14 days) on protein enrichment was evaluated by a 2³ central composite design in duplicate with four central points, considering significant $p < 0,05$. The fermentation was carried out in closed pots containing 30 g of substrate with or without soybean flour, 75 ml of distilled water, and inoculum. The temperature and fermentation time did not show effect and the best condition for protein enrichment was using 10 % of soybean flour. The model obtained, $P = 7,44 - 0,54X_1 + 3,17X_2 - 0,73X_3 - 0,79X_{23} \pm 0,81$, was significant and predictive, with $R^2 = 0.9290$ and pure error = 0.8106.

Keywords: Animal nutrition. Brazilian semiarid. Factorial design. Soybean flour.

1. INTRODUÇÃO

Diversos países por todo o mundo demandam ração animal com especificações que refletem a diversidade social e política da região (1). Para suprir as demandas, muitos países importam a matéria prima ou a própria ração, como a União Europeia, que possui alta demanda de ração animal rica em proteínas (1,2). No Nordeste Brasileiro, as especificações podem ser divididas em dois períodos distintos, um compreende a época chuvosa e o outro a época de estiagem. Na época chuvosa, os produtores ofertam predominantemente aos animais as forrageiras que crescem em pastagens nativas. Por outro lado, na época de estiagem, o volume demandado e as especificações se modificam devido à escassez de forrageiras crescendo em pastagens nativas, levando ao aumento da demanda por ração animal proveniente de outras regiões do país ou de outros países (3).

Para que a ração animal possua as substâncias necessárias para atender às necessidades nutricionais dos animais, diferentes quantidades de diferentes ingredientes são combinadas de forma que o produto final apresente digestibilidade, baixo custo, qualidade e textura e apresentação adequadas. As formulações de rações para animais podem incluir cereais, açúcares, frutas, gorduras, raízes, tubérculos,

leguminosas, oleaginosas, aminoácidos e minerais (4). Na produção industrial de rações baseadas em cereais, as formulações chegam a conter 40 tipos de componentes, incluindo macro nutrientes e micronutrientes (5). Nesse contexto, a utilização de fontes alternativas para a formulação da ração animal pode gerar rações com qualidade comparável ou até mesmo superior às com formulações triviais. Diversas formulações têm sido propostas visando melhorar qualitativamente e quantitativamente a ração animal, como a utilização de insetos como fonte de proteínas e o aproveitamento de rejeitos industriais (6).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o enriquecimento proteico da algaroba (*Prosopis juliflora*) utilizando *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 visando a produção de ração animal, no qual a fermentação tem o papel de melhorar qualitativamente e quantitativamente a ração animal. O enriquecimento proteico das vagens da algaroba foi utilizado para agregar valor ao produto, sendo uma atividade de convivência com o Semiárido Brasileiro, visando o desenvolvimento socioeconômico e sustentável.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo do substrato

Os frutos maduros da algarobeira (*Prosopis juliflora*) foram coletados em expedições no município de Serra Branca, Paraíba, Brasil. Os frutos foram picotados em máquina forrageira com peneira de 13 mm de diâmetro e secados em estufa de secagem à temperatura de 60 °C até massa constante.

Preparação do inoculo

O *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCIBt 2611 (antes identificado por CCB 274), depositado na Coleção de Cultura de Basidiomicetos do Instituto de Botânica de São Paulo (CCIBt), foi utilizado para o enriquecimento proteico dos frutos da algarobeira. O repique do fungo foi realizado em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Extrato de Malte Ágar (1,5 % de ágar, 2 % de extrato de malte e 0,1 % de peptona), sendo incubado em *biochemical oxygen demand* (BOD) por 12 dias à temperatura de 28 °C.

Fermentação da algaroba

A fermentação foi conduzida em potes de vidro fechados, com tampa e gaze entre a tampa e o pote, contendo 30 g do substrato com ou sem a farinha de soja e 75 mL de água destilada, para a obtenção de aproximadamente 70 % de umidade após a esterilização. O conjunto foi esterilizado em autoclave (1 atm por 20 min) e, após frio, 1/4 de placa de inóculo foi acrescido. O material foi incubado em BOD nas condições estabelecidas no planejamento fatorial.

Determinação de umidade

Placas de Petri foram secas em estufa de secagem à temperatura de 100 °C por 30 min e pesadas. Então, elas receberam as amostras úmidas de 2 g, foram novamente pesadas e levadas para a estufa de secagem à temperatura de 100 °C até não ser observada mudança na massa. Após a secagem da amostra, as placas de Petri contendo as amostras secas foram pesadas. Após cada retirada das placas de Petri da estufa de secagem, elas foram transferidas para um dessecador, permanecendo por 30 min para que esfriassem antes das pesagens (7).

Determinação de pH

As amostras de 3 g secas e 50 mL de água destilada foram adicionados em Becker de 100 mL. O conjunto foi deixado em repouso por 30 min, com agitações ocasionais, e o valor do pH foi aferido com pHmetro digital (7).

Determinação de proteínas

A quantificação das proteínas utilizou 4 mL da solução reagente Biureto (0,15 % sulfato de cobre; 0,6 % tartarato de sódio e potássio; 3 % hidróxido de sódio; 0,1 % iodeto de potássio) e 1 g da amostra, diluída de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração. A mistura foi agitada em agitador tipo vórtex por 30 s, permanecendo em repouso por 10 min após a agitação. As leituras foram realizadas utilizando espectrofotômetro em 540 nm e a curva padrão foi construída com soro albumina bovina diluída em solução salina (0,9 %). O

espectrofotômetro foi previamente zerado com uma amostra em branco contendo: 4 mL da solução reagente Biureto e 1 mL de água destilada (8).

Determinação de açúcares redutores

A quantificação dos açúcares redutores (AR) foi realizada adicionando 0,5 mL da solução reagente DNS (1 % 3,5-dinitrossalicílico; 1,6 % hidróxido de sódio; 30 % tartarato de sódio e potássio) e 0,5 g da amostra, diluída de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração. A mistura foi aquecida por 5 min em água destilada sob ebulição e resfriada para temperatura ambiente. Após resfriada, 5 mL de água destilada foram adicionados à mistura. A intensidade da cor foi mensurada utilizando espectrofotômetro em 540 nm e a curva padrão foi construída com glicose diluída em água destilada. O espectrofotômetro foi previamente zerado com uma amostra em branco contendo: 0,5 mL da solução reagente DNS e 0,5 mL de água destilada (9).

Planejamento experimental

O efeito da temperatura (T) (28, 34 e 40 °C), da suplementação com farinha de soja (SFS) (0, 5 e 10 %) e do tempo de fermentação (TF) (0, 7 e 14 dias) no enriquecimento proteico da algaroba (*Prosopis juliflora*) utilizando *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 foram avaliados utilizando um planejamento fatorial 2^3 em duplicata com 4 pontos centrais. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e a análise estatística foi performada utilizando o software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc., 2004), considerando significativos $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a caracterização de cada ensaio do enriquecimento proteico da algaroba (*Prosopis juliflora*) utilizando *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

Ensaio	Variável dependente			
	Proteínas (%)	Açúcares redutores (%)	Umidade (%)	pH
1	5,41	5,11	71,65	5,10
2	4,61	5,38	72,52	5,11
3	13,32	4,36	72,08	5,24
4	10,56	4,51	72,28	5,20
5	4,93	7,00	73,08	4,72
6	4,64	15,55	72,41	4,76
7	11,25	7,13	73,30	4,96
8	9,03	14,04	73,38	4,84
9	4,17	5,22	73,48	5,12
10	3,77	5,12	72,46	5,11
11	12,84	4,11	72,29	5,25
12	12,63	4,29	72,41	5,24
13	4,64	7,83	72,90	4,75
14	4,21	15,94	73,22	4,78
15	9,22	7,13	72,32	4,95
16	7,73	14,22	73,13	4,96
17	6,82	7,60	73,94	4,94
18	6,46	8,45	72,80	4,92
19	7,33	6,80	73,12	4,90
20	5,19	6,88	72,48	4,89

Figura 1. Resultado da caracterização de cada ensaio do planejamento fatorial da fermentação dos frutos da *Prosopis juliflora* por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

A análise de variância (Figura 2) apresentou coeficiente de determinação (R^2) = 0,9290 e erro puro = 0,8106 e mostra que as interações entre a temperatura (T) e a suplementação com farinha de soja e entre a temperatura e o tempo de fermentação não são significativas.

Fator	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
T ^L (°C)*	4,62	1	4,62	5,70	0,04
SFS ^L (%)*	157,39	1	157,39	194,17	0,00
TF ^L (dias)*	8,48	1	8,48	10,46	0,01
1 ^L by 2 ^L	1,41	1	1,41	1,74	0,21
1 ^L by 3 ^L	0,00	1	0,00	0,01	0,95
2 ^L by 3 ^L *	9,91	1	9,91	12,22	0,01
Falta de ajuste	4,98	2	2,49	3,07	0,09
Erro puro	8,92	11	0,81		
Total	195,70	19			

Figura 2. Análise de variância para o teor de proteína do planejamento fatorial da fermentação dos frutos da *Prosopis juliflora* por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

Notas: * – Significativo considerando $p < 0,05$; by – Interação; ^L – Linear.

O comportamento geralmente apresentado pelos micro-organismos para a variação da temperatura reforça a normalidade do crescimento fúngico ou ausência do crescimento fúngico neste processo fermentativo. Dessa forma, a contribuição negativa da temperatura (T), -1,07 %, no teor proteico do fermentado mostra que a temperatura é um fator limitante e que análises posteriores envolvendo o estudo de temperaturas acima de 40 °C são desnecessárias. Também foi observada uma contribuição negativa para o tempo de fermentação (TF), -1,46 %, mantendo-se quase que constante para o limite inferior na variável suplementação com farinha de soja (SFS). Entretanto, entre as variáveis avaliadas, a variável suplementação com farinha de soja (SFS) apresentou efeito positivo de 6,27 % para o teor de proteína (Figura 3).

O efeito da suplementação com farinha de soja coincidiu com as expectativas para este trabalho no que tange essa variável, pois a farinha de soja possui alto teor de proteínas, como relatado por outros autores [10, 11, 12]. Além disso, a interação entre a suplementação com farinha de soja (SFS) e o tempo de fermentação (TF) foi significativa, como ilustrado nas linhas não paralelas do Figura 4, pois linhas não paralelas indicam uma interação significativa entre as variáveis independentes (13).

Fator	Efeito	Erro padrão/Erro puro	t (11)	p	Coefficiente
Interceptação*	7,44	0,20	36,95	0,00	7,44
(1) T ^L (°C)*	-1,07	0,45	-2,39	0,04	-0,54
(2) SFS ^L (%)*	6,27	0,45	13,93	0,00	3,14
(3) TF ^L (dias)*	-1,46	0,45	-3,23	0,01	-0,73
1 ^L by 2 ^L	-0,59	0,45	-1,32	0,21	-0,30
1 ^L by 3 ^L	-0,03	0,45	-0,07	0,95	-0,02
2 ^L by 3 ^L *	-1,57	0,45	-3,50	0,01	-0,79

Figura 3. Estimativa dos efeitos para o teor de proteína do planejamento fatorial da fermentação dos frutos da *Prosopis juliflora* por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

Notas: * – Significativo considerando $p < 0,05$; by – Interação; ^L – Linear.

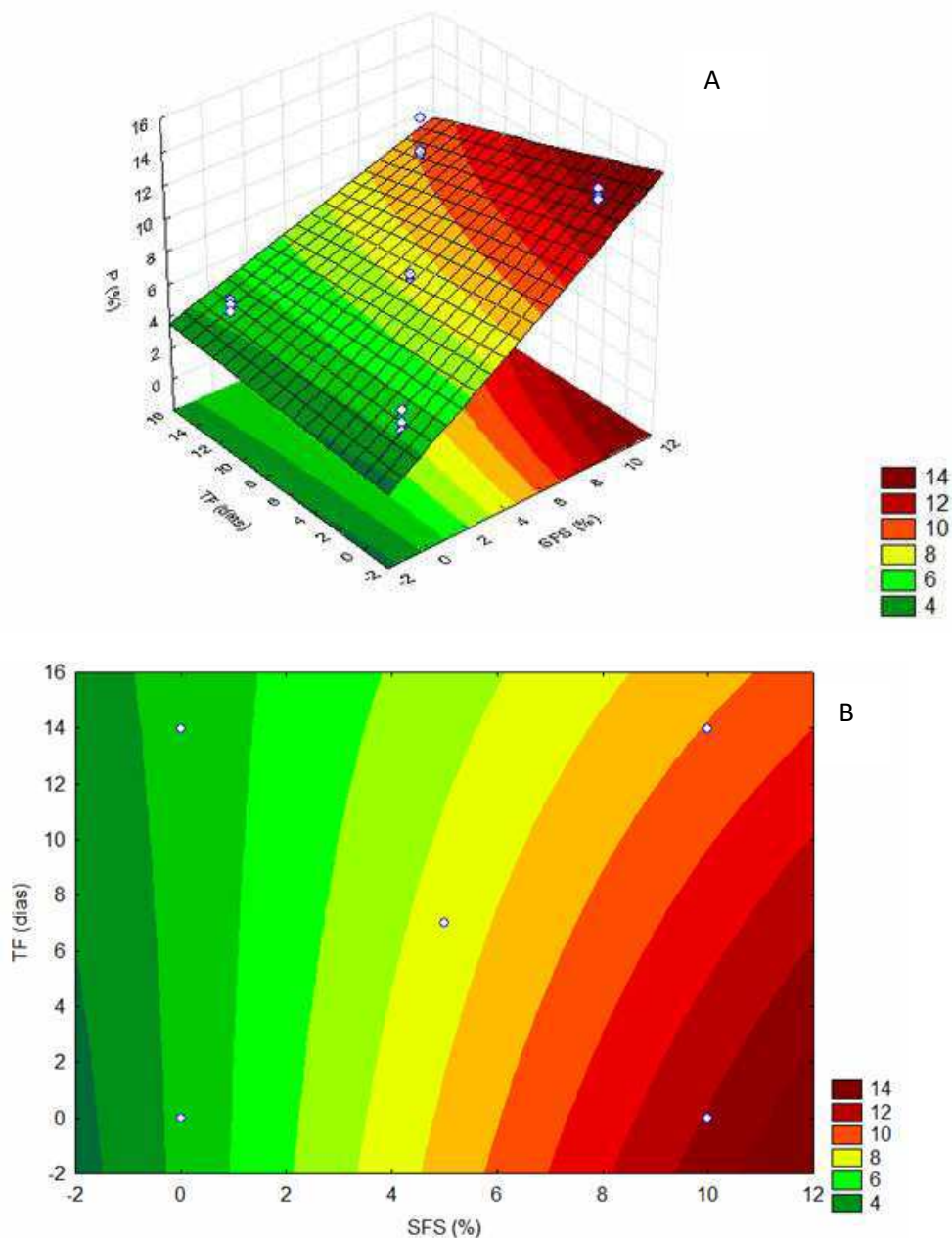


Figura 4. Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) das variáveis independentes tempo de fermentação e suplementação com farinha de soja.

Por outro lado, o comportamento da variável tempo de fermentação (TP) não coincidiu com as expectativas, uma vez que o incremento no teor proteico da biomassa fúngica deve acompanhar o crescimento fúngico, ou seja, quanto maior a produção de biomassa, maior a quantidade total de proteína produzida (14,15). Logo, o crescimento do *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 não foi suficiente para elevar o teor de proteínas.

O modelo linear padrão para o tipo de planejamento proposto neste trabalho, $y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + \varepsilon$ (16), foi utilizado para

construir o modelo estatístico do comportamento da variável dependente teor de proteína P (%) (Equação 1). O modelo apresentado na Equação 1, que recebe as variáveis independentes codificadas, oferece um modelo que retorna o valor do enriquecimento proteico (P) dos frutos da *Prosopis juliflora* em função das variáveis independentes temperatura (T), suplementação com farinha de soja (SFS) e tempo de fermentação (TF).

$$P = 7,44 - 0,54X_1 + 3,17X_2 - 0,73X_3 - 0,79X_{23} \pm 0,81 \quad (1)$$

Onde:

P = Proteínas, %;

X₁ = Variável temperatura codificada;

X₂₃ = Coeficiente da interação entre X₂ e X₃;

X₃ = Variável tempo de fermentação codificada;

X₂ = Variável suplementação com farinha de soja codificada.

A redução da porosidade do substrato em um processo fermentativo pode ser ocasionada pelo excesso de umidade. Essa diminuição da porosidade pode reduzir a difusão de oxigênio e trocas gasosas entre o micro-organismo e o ambiente, prejudicando o desenvolvimento do micro-organismo (17). Muitos fatores podem afetar a variação da umidade, como a ação dos microrganismos sobre o substrato, a oxidação dos carboidratos que libera água e o aumento do calor liberado pelo processo metabólico capaz de elevar a temperatura do substrato, provocando um decréscimo no teor de umidade devido à evaporação (18). Em suma, o teor da umidade do substrato é um fator muito importante quando o objetivo é otimizar o processo fermentativo, pois esse componente afeta o crescimento microbiano e a formação de produto, pelo fato de determinar a quantidade de água inicial disponível para o micro-organismo e por fazer com que o substrato se dilate, facilitando, a penetração de micélio para a utilização do substrato (19). A umidade verificada nos ensaios experimentais mostra que não houve declínio em função do tempo no valor desse componente durante o decorrer do processo fermentativo (Figura 1).

Esse fato indica que o baixo enriquecimento proteico obtido para os frutos da algarobeira não foi devido à quedas ou à elevações no teor de umidade, o valor médio da umidade dos ensaios experimentais foi de 72,76 %. O comportamento do teor de umidade neste trabalho foi o oposto ao obtido por Viccini (20), que, trabalhando com fermentação sólida usando fungos filamentosos em cinéticas de 30 dias, observou a

variação na disponibilidade da água, sendo que, em todos os tratamentos, o teor de umidade do substrato diminuiu com o aumento do tempo de fermentação.

O pH pode estimular, atenuar ou inibir o crescimento do micro-organismo e pode ser utilizado para avaliar o desenvolvimento do processo fermentativo (21). Como foi visto na Figura 1, o pH dos ensaios experimentais iniciou e finalizou em valores ácidos. Como o pH é um importante fator inerente ao meio de cultura, investigações posteriores para esse componente devem ser realizadas.

4. CONCLUSÕES

Os testes realizados indicaram que a suplementação da algaroba com farinha de soja influenciou o teor proteico, sendo que a melhor condição do enriquecimento proteico da algaroba (*Prosopis juliflora*) utilizando *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 é utilizando 10 % de suplementação com farinha de soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. European Feed Manufacturers' Federation. The challenge of securing the long term feed material supply in Europe. Bruxelles: 2013.
2. Gatel F. Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. *Animal Feed Science and Technology*. 1994 Feb 28;45(3):317-48.
3. Cavalcante ACR, Barros NN. Sistema de produção de caprinos e ovinos de corte para o Nordeste Brasileiro. *Sistemas de Produção*. 2005: 1.
4. Borràs S, Companyo R, Granados M, Guiteras J, Perez-Vendrell AM, Brufau J, Medina M, Bosch J. Analysis of antimicrobial agents in animal feed. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011 Aug 31;30(7):1042-64.
5. Kirchner A, Feil A, Colovic R, Vukmirovic D, Levic J. Discontinuous addition of small volumes of liquids in an intensive mixer to animal supplement feed with different particle size distributions. *Powder technology*. 2013 May 31;239:358-65.
6. Sánchez-Muros MJ, Barroso FG, Manzano-Agugliaro F. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production*. 2014 Feb 15;65:16-27.
7. Helrich K. *Official Method of Analysis of the AOAC*. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Va, USA,. 1990.
8. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of biological chemistry*. 1949 Feb 1;177(2):751-66.

9. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 1959 Mar 1;31(3):426-8.
10. Laining A, Ahmad T, Williams K. Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Aquaculture*. 2003 Mar 27;218(1):529-38.
11. Tsukahara T, Ushida K. Effects of animal or plant protein diets on cecal fermentation in guinea pigs (*Cavia porcellus*), rats (*Rattus norvegicus*) and chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2000 Oct 31;127(2):139-46.
12. Jezierny D, Mosenthin R, Bauer E. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 2010 May 11;157(3):111-28.
13. Calado V. Planejamento de experimentos usando o Statistica. Editora E-papers; 2003.
14. Dijksterhuis J, Samson RA, editors. Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food. CRC Press; 2007 Jun 26.
15. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. Introduction to food-and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS); 2004.
16. Antony J. Design of experiments for engineers and scientists. Elsevier; 2014 Feb 22.
17. Hölker U, Höfer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004 Apr 1;64(2):175-86.
18. Doelle HW, Mitchell DA, Rolz CE, editors. Solid substrate cultivation. Springer; 1992 Nov 30.
19. Laskin AI, Bennett JW, Gadd GM. Advances in applied microbiology. Academic Press; 2003 Dec 18.
20. Viccini G. Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rosea*.
21. Scmidell W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. Edgard Blücher, São Paulo. 2001.