



SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

Produção de fitase em fermentação sólida por *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* utilizando resíduos de frutas

Larissa Lorrane Rodrigues Borges^{*1}; Alécia Daila Barros Guimarães¹; Flávia Échila Ribeiro Batista²; Vinicius de Oliveira Vasconcelos¹; Alisson Felipe Lima Martins¹; William James Nogueira Lima³

¹Graduandos em Engenharia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias/UFMG

²Servidora Técnica Administrativa do Instituto de Ciências Agrárias/UFMG

³Docente do Instituto de Ciências Agrárias/UFMG

*larissalrb@hotmail.com

RESUMO: Fitase é uma enzima que catalisa a liberação do fosfato de fitato, o qual é a principal forma de fósforo predominantemente ocorrendo em grãos cereais, legumes e sementes oleaginosas. A digestão e o aproveitamento do alimento podem ser aumentados pela adição de fitase microbiana, que hidrolisa o fitato para mio-inositol e ácido ortofosfórico, necessário ao processo metabólico de biossíntese celular. A fitase pode ser produzida industrialmente por processos biotecnológicos, sendo a síntese de fitase efetuada pela membrana celular de microrganismos a forma mais promissora de produção da enzima. Dessa forma, este trabalho objetivou realizar a produção da enzima fitase em laboratório e avaliar o resíduo agrícola com maior produção de fitases para as linhagens fúngicas de *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* por fermentação no estado sólido. Observou-se produção de fitase pelas duas linhagens fúngicas em estudo, porém a produção de fitase por *Penicillium roqueforti* não diferiu significativamente para nenhum dos resíduos em estudo e por *Aspergillus awamori*, o único resíduo que diferiu significativamente foi o de Siriguela. Concluiu-se assim que as espécies fúngicas podem ser utilizadas como fontes para produção de fitase e os resíduos de frutas também se apresentam como alternativa de meio fermentativo para produção da enzima.

Palavras-chave: Maracujá. Siriguela. Umbu. Atividade fitásica.

INTRODUÇÃO

Ácido fítico ou fitato (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato de inositol fosfato) é a principal forma de armazenamento de fosfato e de inositol em plantas, o qual constitui 3-5% do peso seco das sementes de grãos de cereais e legumes (ZHANG, 2010). Fitase (mio-inositol-hexaqui-fosfatofosfohidrolase) é uma enzima que catalisa a liberação do fosfato de fitato (mio-inositolhexaqui-fosfato), o qual é a principal forma de fósforo predominantemente ocorrendo em grãos cereais, legumes e sementes oleaginosas (PANDEY, A., 2001).

Os animais monogástricos, como as aves e suínos, não produzem esta enzima, ou não a produzem em quantidades suficientes para transformar este fitato em fósforo inorgânico (SILVA et al., 2005). Sendo assim a digestão e o aproveitamento do alimento podem ser aumentados pela adição de fitase microbiana, que hidrolisa o fitato para mio-inositol e ácido ortofosfórico, necessário ao processo metabólico de biossíntese celular. Desta forma, parte do fósforo, antes não disponível, passa a ser aproveitado pelo organismo, tornando possível reduzir em até 30% o fósforo suplementado na alimentação (KUMAR et al., 2010).

A fitase pode ser produzida industrialmente por processos biotecnológicos, sendo a síntese de fitase efetuada pela membrana celular de microrganismos a forma mais promissora de produção



SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

da enzima. Apesar da habilidade de produção das bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados (PANDEY et al. 2001).

A preocupação com a utilização de resíduos da agroindústria é crescente, pois estes, quando indevidamente descartados ou utilizados, tornam-se fontes adicionais de poluição ambiental (SAIDELLES et al., 2012). A fermentação em estado sólido (FES) é considerada uma alternativa econômica para produção da enzima e apresenta ainda a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como substrato (GREINER et al., 2009).

Dessa forma, este trabalho objetivou realizar a produção da enzima fitase em laboratório e avaliar o resíduo agrícola com maior produção de fitases para as linhagens fúngicas de *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* por fermentação no estado sólido.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.

Microrganismos

Utilizou-se as espécies fúngicas *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* mantidos em meio Agar BDA. Para o preparo do inóculo, o fungo foi cultivado utilizando o mesmo meio de cultura, sendo incubado em estufa BOD durante sete dias a 28°C.

Preparo do inóculo

O inóculo fúngico foi realizado na forma de disco micelial para avaliar a produção da enzima fitase por meio da fermentação sólida. Das placas cultivadas com os fungos foram cortados discos miceliais de 1,0 cm de diâmetro, os quais foram retirados e macerados em 1,0 mL de solução salina 0,9% cada um.

Fermentação

Para a realização dos ensaios de produção de fitase foram realizadas fermentações sólidas a 70% de umidade em erlenmeyers de 500 mL utilizando resíduos de siriguela, umbu e maracujá. O meio de cultivo composto de 25 g do resíduo da fruta e de uma solução de uréia a 3% como fonte de nitrogênio, foi previamente umidificado com 8 mL de água destilada, e esterilizado a 121°C por 15 min. Em seguida, adicionou-se 1 mL do inóculo no meio de cultivo sólido e incubou-se os frascos a 30° C por 48 horas. O experimento foi feito em duplicata.

Extração das enzimas

A extração das enzimas foi realizada com adição de 100 mL de água destilada, com posterior agitação a 150 rpm por 30 minutos. O extrato cru foi filtrado e o permeado foi utilizado para os ensaios de atividade enzimática de fitase.

Análise da atividade enzimática

A atividade enzimática de fitase foi determinada de acordo com o método de FISKE e SUBBAROW (1925), medindo o fosfato inorgânico liberado. Todas as análises de atividade enzimática foram realizadas em duplicata, considerando como sendo uma unidade enzimática, a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 µmol de fosfato inorgânico por min., sob as condições de ensaio.



- Em um tubo de ensaio de 20 mL adicionou-se 400 μL do substrato fitato de sódio 3,0 mM, em tampão acetato de sódio, em pH 4,0 e 100 μL de extrato enzimático.
- A reação foi conduzida em banho-maria a 45 °C durante 30 min;
- Adicionou-se 500 μL da solução de ácido tricloroacético 5% (para parar a reação);
- Foram adicionados aos tubos de reação, 500 μL do reativo colorimétrico, que consiste de uma solução de ácido sulfúrico, molibdato de amônio e sulfato ferroso.
- Adicionou-se água destilada até completar um volume de 4mL ;
- As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 700 nm;
- Os valores obtidos foram correlacionados com uma curva padrão confeccionada com KH_2PO_4 .

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade, com auxílio do programa SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das atividades enzimáticas para fitases (U mL^{-1}) de ambos os microrganismos em cada resíduo de fruta estão apresentados na Tabela 1. De acordo com os resultados a produção de fitase pela espécie fúngica *Penicillium roqueforti* não diferiu significativamente para nenhum dos resíduos em estudo. Em contrapartida verificou-se diferenças na produção de fitase por *Aspergillus awamori*, sendo que o único resíduo que diferiu significativamente foi o de Siriguela, apresentando a maior média de atividade fitásica de 0,152 U mL^{-1} .

Tabela 1 – Atividade de fitase em U mL^{-1} utilizando diferentes resíduos de frutas como meio de cultivo por 48 horas de fermentação.

Fungo	Resíduo de fruta		
	Maracujá	Siriguela	Umbu
<i>Aspergillus awamori</i>	0,027 ^{aa}	0,152 ^{ba}	0,106 ^{abA}
<i>Penicillium roqueforti</i>	0,021 ^{aa}	0,044 ^{ab}	0,021 ^{aa}

Legenda: Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se também que houve diferença significativa na produção de fitase entre as espécies fúngicas de *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* para o resíduo de Siriguela, sendo verificada maior produção pelo *Aspergillus awamori*.

De acordo com Awad et al. (2014) o gênero *Aspergillus* é um dos principais gêneros produtores de fitases, sendo o principal representante a espécie *Aspergillus niger*. Nascimento (2011) obteve pela realização de fermentação submersa com o fungo *Aspergillus Níger*, atividade fitásica de 6,02 U mL^{-1} , valor esse superior ao obtido nesse trabalho, porém utilizando-se um tempo de fermentação superior de 72 horas.



SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

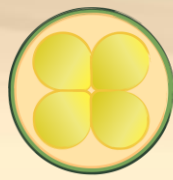
Valores semelhantes aos de atividade fitásica obtidos nesse trabalho foram encontrados por Pires (2016) que obteve atividade fitásica superior a $0,10 \text{ U mL}^{-1}$ na produção de fitase com o fungo *Acremonium zeae* utilizando farelo de milho após 120 h de fermentação. E por Monteiro (2011) que obteve em estudo de produção de fitase de *Rhizopus stolonifer* em fermentação em meio líquido, valores de atividade enzimática de fitase de $0,03 \text{ U mL}^{-1}$ e $0,07 \text{ U mL}^{-1}$, com tempos de 36 e 48 horas respectivamente.

CONCLUSÃO

As atividades enzimáticas obtidas pelas fermentações utilizando as espécies fúngicas *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* indicam a possibilidade de utilização desses como fontes para produção de fitase. Os resíduos de frutas também se apresentam como alternativa de meio fermentativo para produção da enzima, ocasionando em redução dos custos de produção, uma vez que estes substratos apresentam menores custos e também em uma alternativa de destinação desses resíduos, que seriam descartados. Trabalhos futuros devem ser feitos aumentando-se o tempo de fermentação e modificando a composição do meio de fermentação no intuito de elevar a produtividade.

REFERÊNCIAS

- AWAD, G. E. A. et al. Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box-Behnken design. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 81–88, 2014.
- FISKE, E. H.; SUBBBAROW, Y. V. The colorimetric determination of phosphorus. **Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.
- GREINER, R.; ALMINGER, M. L. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphatedephosphorylation by phytate-degrading enzymes of cereals. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 229-248, June 2001.
- KUMAR, V. et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: a review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945-959, June 2010.
- MONTEIRO, P. S. **Produção e caracterização bioquímica de fitases de *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus Níger* UFV-1 e suas aplicações em ração em animal**. 2011. 79 f. Tese (Programa de pós graduação em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011. Disponível em: <<http://locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/305/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 08 jun. 2017.
- NASCIMENTO, J. C. S. **Produção, caracterização bioquímica e purificação de fitase produzida por *Aspergillusniger* var. *phoenicis* URM 4924**. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011. Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/4637/2/Julio%20Cesar%20dos%20Santos%20Nascimento.pdf>>. Acesso em: 08 jun. 2017.
- PANDEY, A. et. Al. Production purification and properties of microbial phytases. **Bioresourcetchnology**. v.77, p.203 – 214, 2001.
- PIRES, E. B. E. **Produção e caracterização parcial de fitasesfúngicas utilizando resíduos agroindustriais**. 2016. 66 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçoca, Viçosa, 2010. Disponível em: <<http://locus.ufv.br/b>



SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



*Uma nova perspectiva na
produção de alimentos*

itstream/handle/123456789/9892/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 08 jun. 2017.

SAIDELLES, A. P. F. et al. Gestão de resíduos sólidos na indústria de beneficiamento de arroz. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 5, n. 5, p. 904-916, 2012.

SILVA, H. O. Efeito da fitase sobre a excreção e teor de minerais nos ossos de suínos na fase de crescimento. **Agropecuária Técnica**, v. 26, n.1, p.54-59, 2005.