

SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

Produção de fitase por fermentação em estado sólido utilizando resíduos de frutas e *Aspergillus awamori*

Alécia Daila Barros Guimarães*¹; Larissa Lorrane Rodrigues Borges¹; Flávia Échila Ribeiro Batista²; Vinícius de Oliveira Vasconcelos¹; Alisson Felipe Lima Martins¹; William James Nogueira Lima³

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

² Servidora Técnica Administrativa do Instituto de Ciências Agrárias/UFMG

³ Docente do Instituto de Ciências Agrárias/UFMG

*aleciabarros@live.com

RESUMO: O fitato é a principal forma de armazenamento de fósforo em plantas e cereais usados na formulação de rações e limita a eficiência de utilização do fósforo e outros nutrientes nesses alimentos. A adição de fitases em ração animal tem sido usada para minimizar os efeitos antinutricionais do fitato além de diminuir os impactos ambientais e a adição de fósforo na ração. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a produção da fitase por fermentação em estado sólido pelo *Aspergillus awamori* em diferentes tempos, utilizando resíduos de frutas como substrato de fermentação. A cepa utilizada foi *Aspergillus awamori*, e os substratos utilizados para a fermentação foram resíduos de coquinho azedo e maracujá. As análises da atividade da fitase foram realizadas nos tempos de 24, 36 e 48 h. Foi possível observar que o *A. awamori* foi capaz de produzir a fitase nos dois resíduos de frutas utilizados como substratos de fermentação, e tempo de fermentação não influenciou significativamente na produção de fitase. Dessa forma, conclui-se que o *A. awamori* é capaz de produzir fitase utilizando os resíduos de coquinho azedo e maracujá e que a variação de tempo de fermentação avaliada não influenciou na produção de fitase.

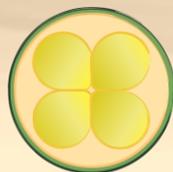
Palavras-chave: Atividade de fitase. Coquinho azedo. Maracujá. Fungo.

INTRODUÇÃO

O fitato ou ácido fítico é a maior forma de estocagem de fósforo na maioria das plantas, grãos de cereais e sementes oleaginosas. Porém, o ácido fítico não é uma fonte de fósforo para humanos e animais monogástricos, agindo como fator antinutricional, devido a sua capacidade de formar complexos com cátions bivalentes. Assim, além da necessidade de suplementação das rações animais com fósforo, são geradas grandes quantidades de poluição ambiental pelo excesso de minerais excretado no meio ambiente (PANDEY et al., 2001).

Dentre as formas de aumentar o aproveitamento do ácido fítico está o uso da enzima fitase que permite melhor aproveitamento da dieta oferecida por animais monogástricos, aumentando a biodisponibilidade do fósforo pela hidrólise do ácido fítico, o que diminui a necessidade de suplementação com fontes inorgânicas de fósforo (SATO, JORGE e GUIMARÃES, 2016).

As fitases podem ser obtidas por processos biotecnológicos a partir de fontes de origem animal e vegetal. No entanto, as fitases de origem microbiana representam a forma mais promissora de produção destas enzimas, as quais têm sido utilizadas em rações animais. Apesar da capacidade de produção de bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados devido às suas fitases apresentarem maior estabilidade térmica, maior estabilidade em faixas mais amplas de pH, elevada



SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

especificidade catalítica e maior resistência à proteólise, quando comparadas com as fitases de plantas (KIM et al., 2006),

A produção de fitases fúngicas se mostra mais vantajosa pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial. Os fungos podem ser cultivados utilizando diferentes métodos de cultivo, como a fermentação em meio líquido, em estado sólido e fermentação submersa. (SALMON, et al., 2012).

A fermentação em estado sólido é considerada uma alternativa econômica para produção da enzima e apresenta ainda outras vantagens, tais como a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como substrato e o menor risco de contaminação microbiológica (GREINER, SILVA e COURI, 2009).

Diante disso, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a produção de fitase por fermentação em estado sólido pelo *Aspergillus awamori* em diferentes tempos, utilizando resíduos de frutas como substrato da fermentação.

MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.

Microrganismo

A cepa utilizada nesse estudo foi *Aspergillus awamori*. Para o preparo do inóculo, o fungo foi cultivado utilizando o mesmo meio de cultura BDA (Ágar Batata Dextrose), 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

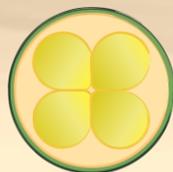
Para a realização dos ensaios de produção de fitase foram realizadas fermentações em meio sólido a 70% de umidade em erlenmeyers de 500 mL utilizando resíduos de maracujá e coquinho azedo. O meio de cultivo composto de 25 g do resíduo da fruta e de uma solução de uréia a 3% como fonte de nitrogênio, 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 24, 36 e 48 h. O experimento foi conduzido em duplicata.

Extração das enzimas

A extração das enzimas foi realizada com adição de 100 mL de água destilada, nos tempos de 24, 36 e 48 h, com posterior agitação em *shaker* a 150 rpm por 30 min. O conteúdo de cada frasco foi filtrado e o permeado obtido foi utilizado para posterior dosagem da atividade enzimática de fitase.

Análise da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada, medindo –se o fosfato inorgânico liberado (FISKE e SUBBAROW, 1925), utilizando-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., sendo paralisada pela adição de 500 µL da solução de ácido tricloroacético 5%. 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. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro em 700 nm e os valores obtidos foram correlacionados com uma curva padrão confeccionada com KH₂PO₄. 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.

Análise estatística

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a atividade fitásica estão apresentados na Tabela 1. Foi possível observar que a espécie fúngica *Aspergillus awamori* foi capaz de produzir a fitase nos dois resíduos de frutas utilizados como substratos para fermentação. A seleção de substratos adequados para a produção de enzimas é um fator fundamental, uma vez que eles têm o papel de fornecer energia e nutrientes para o crescimento do microrganismo e podem induzir ou reprimir a produção de metabólitos (PANDEY et al., 2001).

Verifica-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na produção de fitase nos tempos de 24, 36, e 48 h (Tabela 1). Percebe-se ainda, que também não houve diferença ($P > 0,05$) da atividade da enzima nos resíduos de coquinho azedo e maracujá, utilizados como meio de fermentação.

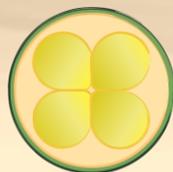
Tabela 1 - Atividade de fitase em U/g utilizando resíduos de frutas como meio de cultivo de fermentação em diferentes tempos.

Resíduo	Tempo		
	24 h	36 h	48 h
Coquinho azedo	0,031 ^{Aa}	0,039 ^{Aa}	0,035 ^{Aa}
Maracujá	0,084 ^{Aa}	0,033 ^{Aa}	0,027 ^{Aa}

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Fungos do gênero *Aspergillus* são um dos principais produtores de fitases, sendo que o principal representante é o *Aspergillus niger* (AWAD et al., 2014). Em um estudo realizado por Cunha, Monteiro e Mendes (2015), encontram atividade fitásica de 0,89 U/mL após 216 h de cultivo em meio líquido utilizado isolado de *Aspergillus niger*, sendo que este mesmo fungo não apresentou atividade significativa na fermentação em estado sólido. No entanto, esses mesmos autores, constataram que o isolado de *Xylaria* sp. apresentou atividade enzimática de 2,88 U/g após 264 h de fermentação em estado sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato.

Monteiro et al. (2012) avaliaram a produção de fitase por *Rhizopus stolonifer* em fermentação em meio líquido, sendo que a máxima atividade enzimática encontrada foi de 0,14 U/mL após 24 h de fermentação. As fermentações utilizando-se resíduos de coquinho azedo e maracujá obtiveram valores abaixo do observado por Monteiro et al.



SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

Nascimento (2011) observou melhor produção de fitase por fermentação submersa com *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 após 84 horas de incubação.

CONCLUSÃO

Foi possível observar que houve produção de fitase pelo *Aspergillus awamori* utilizando os resíduos de coquinho e maracujá como substratos para a fermentação, dessa forma, esses resíduos podem ser utilizados como substrato de fermentação para a produção dessa enzima.

Percebe-se também que a variação de tempo de fermentação avaliada não influenciou na produção de fitase, entretanto, é necessária a realização de novos estudos utilizando um tempo maior de fermentação e variando a composição do meio de fermentação para conduzir um aumento da produtividade da enzima pelo *A. awamori*.

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.
- CUNHA, M. C.; MONTEIRO, P. S.; MENDES, F. Q. Caracterização bioquímica de fitases produzidas por fungos isolados na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Revista acadêmica Ciência Animal**, v. 12, n. 3, p. 59-67, set. 2015.
- FISKE, E. H.; SUBBAROW, Y. V. The colorimetric determination of phosphorus. **Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.
- GREINER, R.; SILVA, L. G.; COURI, S. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus Níger* 11T53A9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 795-807, 2009.
- KIM, T. et al. Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4397–4403, Jun. 2006.
- MONTEIRO, P. S. Otimização da produção, caracterização e avaliação da fitase de *Rhizopus stolonifer* na hidrólise de fitato em ração animal. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 18, n. 2-4, p. 117-132, abr.-jun., Pelotas, 2012.
- NASCIMENTO, J. C. S. **Produção, caracterização bioquímica e purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924**. 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.
- PANDEY, A., SZACAKS, G., SOCCOL, C. R., RODRIGUEZ-LEON, J. A., SOCCOL, V. T. Production purification and properties of microbial phytases. **Bioresource technology**, v.77, p. 203–214, 2001.
- SALMON, D. N. X. et al. A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 7, p. 1067-1079, set. 2012.
- SATO, V. S.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a Thermotolerant Phytase Produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* Biofilm on an Inert Support Using Sugarcane Bagasse as Carbon Source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 4, p. 610-24, jun. 2016.