

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação da Produção de Extrato Enzimático com Atividade Fitásica por *Penicillium funiculosum* INCQS 40081 utilizando Planejamento Experimental

**Isabel Hilda de Souza¹, Jean Dereck Magalhães Martins¹, Bruno Jefferson¹, Walber
Carvalho Melo², Lucinéia Gomes da Silva³, e Verônica Ferreira Melo³**

¹ Aluno do Curso Técnico em Química e Biotecnologia Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do
Rio de Janeiro

² Professor do Colégio Pedro II – Unidade Niterói - CEP 24110-256 – Niterói - RJ

³ Professor do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
CEP 20270-020 - Rio de Janeiro - RJ - E-mail: veronica.melo@ifrj.edu.br

RESUMO

*A inserção de fitase na alimentação animal possui importante valor comercial, pois a enzima é capaz de reduzir os fatores antinutricionais do ácido fítico ou fitato. Apesar de ser considerado como a maior reserva de fosfato, o fitato torna este nutriente indisponível, assim como cátions bivalentes como ferro, cálcio e magnésio, devido à formação de complexos. A produção da enzima foi averiguada segundo a fermentação submersa da linhagem do fungo *Penicillium funiculosum* INCQS 40081.*

Palavras-chave: *Penicillium funiculosum*, planejamento fatorial, fitase, fermentação submersa

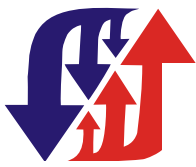
INTRODUÇÃO

As fitases expressam grande relevância ambiental, reduzindo consideravelmente o percentual de fosfato inorgânico excretado junto às fezes animais, bem como reduzindo a formação de quelatos entre fitato e nutrientes minerais encontrados no solo. Além disso, apresentam potencial à indústria alimentícia, uma vez que sua utilização no processamento e fabricação de alimentos, que visam consumo humano, proporciona um enriquecimento na qualidade nutricional de alimentos ricos em fosfato (Casey & Walsh, 2004).

Essas enzimas, da classe das fosfatases, são capazes de hidrolisar o ácido fítico a inositol, monofosfato de inositol e fosfato inorgânico (Singh & Satyanarayana, 2008). Estão presentes em animais ruminantes, que são capazes de digerir o fitato por intermédio da fitase resultante de suas respectivas microbiotas anaeróbicas. No entanto, os animais monogástricos apresentam carência de fitase em seus tratos gastrointestinais, sendo necessária a inserção desta enzima em sua dieta (Haefner et al., 2005).

O ácido fítico ou fitato consiste na maior reserva de fosfato presente em grãos de cereais, em sementes oleaginosas e em legumes, chegando a representar mais da metade do total de fosfato destas sementes em seu estado de maturação. O fitato é capaz de ligar-se a proteínas e a cátions bivalentes como cálcio, ferro e magnésio, formando quelatos. Estes aspectos conferem ao ácido características antinutricionais (Awad et al., 2014; Poulsen, 2007).

A ação do fitato resulta na indisponibilidade de fosfato à dieta animal sendo, inúmeras vezes, necessário o acréscimo de fósforo inorgânico a essas dietas. Entretanto, a adição de fósforo favorece a eutrofização da água ao ser excretado juntamente às fezes destes animais no solo (Mittal et al. 2011). Deste modo, a utilização da enzima fitase no processamento alimentício tem sido pesquisada, a fim de minimizar o fator antinutricional do fitato e desta forma, aumentar a biodisponibilidade de minerais em grãos e sementes que contenham alto teor de ácido fítico.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de fitase através da linhagem de *Penicillium funiculosum* INCQS 40081 por fermentação submersa, utilizando o planejamento experimental 2^3 tendo como parâmetros: tamanho de inóculo, temperatura e concentração de farelo de okara.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo utilizado: *Penicillium funiculosum* INCQS 40081, gentilmente cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fio Cruz).

Meio de Manutenção: A linhagem deste fungo filamentososo foi mantida inicialmente em meio PDA pH 4,5 a 4°C.

Produção da enzima: Foi realizado um planejamento experimental 2^3 tendo como parâmetros: tamanho de inóculo, temperatura e concentração de farinha de okara (resíduo rico em ácido fítico), mantidos sob agitação orbital de 150 rpm por 6 dias. Os meios foram preparados adicionando a massa de farelo correspondente para se obter a concentração desejada (0,0625, 0,1563 e 0,25 % (m/v)) em 30mL de solução de sais minerais contendo NaNO_3 0,3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, KCl 0,05% e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002%, CaCl_2 0,05%, ZnSO_4 0,002%, em (%m/V). Os frascos foram autoclavados e inoculados com suspensão de esporos de 10^4 , 10^5 e 10^7 esporos/mL, em seguida, foram colocados em um agitador orbital por 6 dias a 1500 rpm/min com temperatura variáveis: 24°C, 27°C e 30°C.

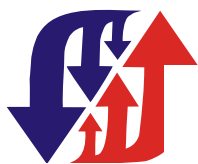
Purificação da enzima: Depois do fim da fermentação, a amostra bruta foi transferida para tubos falcon de 50 mL, os quais foram centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm/min. Após, foi realizada filtração a vácuo do sobrenadante, transferindo alíquotas de 3 mL do filtrado para membranas semipermeáveis, a fim de realizar a diálise em tampão acetato 0,1M pH 5,0. Foram realizadas 4 trocas do tampão de 3 em 3 horas.

Quantificação da enzima: Finalizando a diálise, a atividade fitásica foi determinada conforme descrito por Heinonen & Lahti (1981). Cada unidade de atividade fitásica foi definida por 1 μmol de fosfato liberado por minuto, por 20 minutos a 50°C.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizados experimentos utilizando planejamento experimental fatorial com três variáveis em dois níveis e três pontos centrais, como valores médios para ajuste do erro experimental e validação do modelo experimental, tendo três variáveis independentes: substrato, concentração de inóculo e temperatura para obtenção da variável dependente: atividade fitásica. Os resultados das atividades enzimáticas estão presentes na tabela 1, o maior valor de atividade fitásica obtido foi de 20,81 U/L, tendo como condições 0,25 % (m/V) de farinha de okara, 10^4 esporos/ mL e 30°C.

O gráfico de Pareto (Figura 1) demonstra o efeito positivo da temperatura em níveis mais elevados. Isso sugere a avaliação de experimentos utilizando planejamentos em faixas de temperatura acima da média utilizada neste planejamento. A obtenção de influência negativa para a correlação temperatura e concentração de inóculo sugere uma relação inversa entre essas variáveis, ou seja, a avaliação de temperaturas maiores pode ser feita sem a necessidade de aumento dos níveis da variável concentração de inóculo. A outra variável com influência positiva é a concentração de substrato, que, se utilizada em maiores concentrações, aponta para maiores atividades fitásicas.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial 2^3 da avaliação da produção de fitase por *Penicillium funiculosum* tendo como parâmetros: tamanho de inóculo, temperatura e concentração de farinha de okara, mantidos sob agitação orbital de 150 rpm por 6 dias.

Experimentos	Concentração de substrato (% m/v)	Concentração de inóculo (esporos/mL)	Temperatura (C°)	Atividade Fitásica (U/L)
1	0,0625	10^4	24	1,003
2	0,25	10^4	24	2,478
3	0,0625	10^6	24	2,556
4	0,25	10^6	24	20,77
5	0,0625	10^4	30	12,55
6	0,25	10^4	30	20,81
7	0,0625	10^6	30	13,04
8	0,25	10^6	30	11,64
9	0,1563	10^5	27	17,05
10	0,1563	10^5	27	14,81
11	0,1563	10^5	27	13,88

Pela análise topográfica da Curva de Nível (Figura 2 (a) e (b)), o processo avaliado se mostra promissor para a obtenção de valores de atividades maiores em estudos subsequentes realizados em planejamentos que avaliem a atividade fitásica em regiões de valores experimentais de temperaturas mais elevadas e concentração de inóculo em nível de concentração menor.

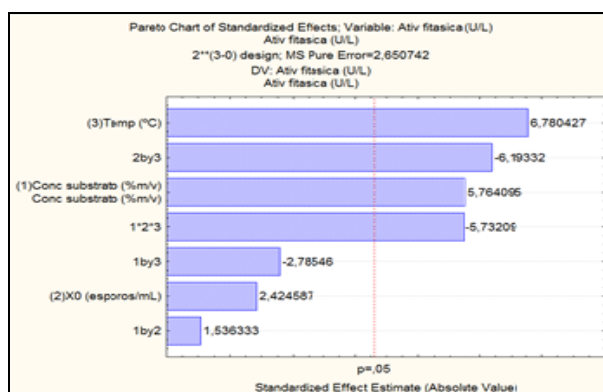
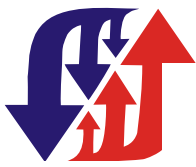


Figura 1: Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial 2^3 da avaliação da produção de fitase por *Penicillium funiculosum* tendo como parâmetros: tamanho de inóculo, temperatura e concentração de farinha de okara, mantidos sob agitação orbital de 150 rpm por 6 dias.

Nas curvas de nível que apontam as prováveis regiões de máximo de atividade (Figura 2 (c) e (d)), observa-se a tendência de que os maiores valores de atividade dependam de avaliação, tanto de temperatura quanto de concentração de substrato em faixas dentro dos valores de nível máximo avaliados nestes experimentos. Quanto à concentração de inóculo, sugere-se manter nos níveis estudados nessa avaliação.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

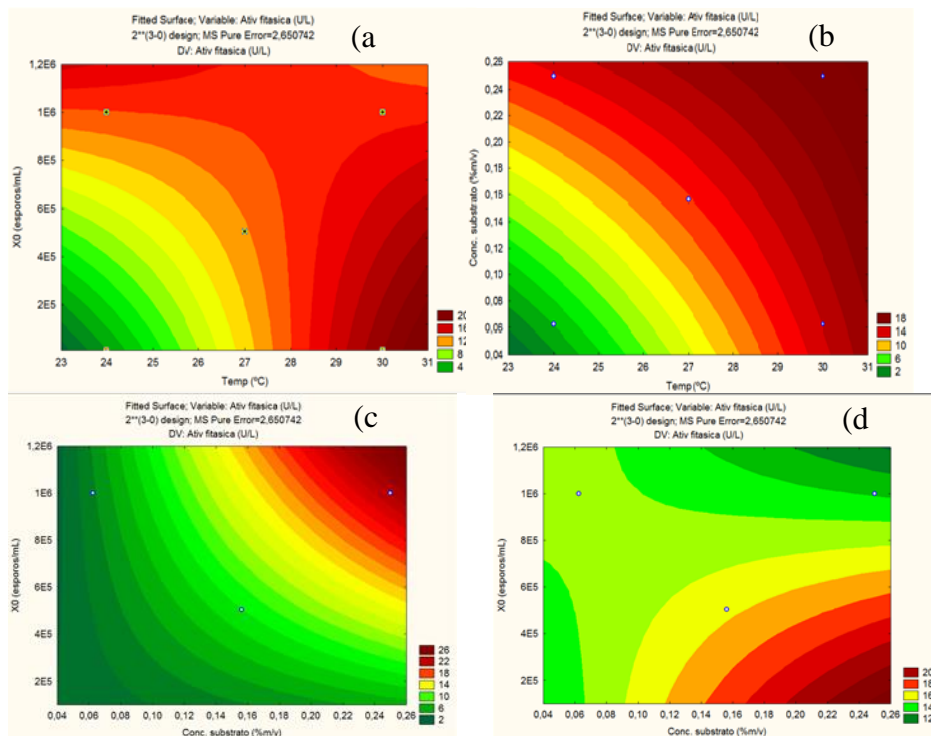


Figura 2- Curvas de nível para o planejamento fatorial 2^3 da avaliação da produção de fitase por *Penicillium funiculosum* tendo como parâmetros: tamanho de inoculo, temperatura e concentração de farinha de okara, mantidos sob agitação orbital de 150 rpm por 6 dias. (a) interação entre Temperatura e concentração de inoculo; (b) interação entre concentração de substrato e temperatura; (c) interação entre concentração de substrato e concentração de inoculo a 24°C; (d) interação entre concentração de substrato e concentração de inoculo a 30°C.

Os resultados obtidos nestes experimentos sugerem que sejam exploradas faixas mais amplas de para temperatura e níveis superiores para a concentração de substrato tendem, pelos perfis das curvas anteriormente comentadas, a apresentar valores de respostas mais elevados.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, foi possível concluir que as faixas de valores selecionados foram adequadas, pois permitiram a geração de valores confiáveis e dentro de um resultado que permitiu inferir novos valores para planejamentos mais voltados à produção em níveis ótimos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Awad G.E.A., Helal M.M.I., Danial E.N., Esawy.M.A. 2014. Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box Behnken design. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21:81–88.
- Casey A, Walsh. G. 2004. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology* 110:313–322.
- Haefner S, Knietsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O. 2005. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 588–597.
- Heinonen J.K, Lahti R.J., 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of pyrophosphatase. *Anal Biochem* 113:313-317.
- Mittal, A, Singh, G, Goyal, V, A, Aneja, K.R, Gautam, S.K, Aggarwal, N.K, 2011. Isolation and biochemical characterization of acido-thermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. *Jundishapur J. Microbiol.* 4:273-282.
- Singh, B, Satyanarayana T, 2008. Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged fermentation due to statistical optimization. *Bioresource Technology* 99:824–8.