



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### **Produção de Fitase Através de Diferentes Linhagens de Fungos Filamentosos por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Resíduos Agroindustriais**

**Larissa do Valle Marçal<sup>1</sup>, Sonia Couri<sup>2</sup>, José Ricardo Hassel Lopes<sup>3</sup>, Lucinéia Gomes da Silva<sup>3</sup>, e Verônica Ferreira Melo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Aluna do Técnico em Alimentos do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Rio de Janeiro – Engenharia Química

CEP - Rio de Janeiro– RJ

<sup>3</sup>Docentes 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**

*O ácido fítico, molécula encontrada em sementes oleaginosas e cereais integrais, é conhecido por ser um não nutriente com propriedades antinutricionais e para minimizar este efeito a enzima fitase é largamente empregada para hidrólise desta molécula. São diversas as fontes desta enzima, uma das mais exploradas é a produção por fermentação em estado sólido utilizando fungos filamentosos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de fitase a partir de diferentes linhagens fungos filamentosos em fermentação em estado sólido, variando fonte de carbono - farelo de okara e farelo de trigo - e tamanho de inóculo ( $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  esporos/mL), a 30°C. Os melhores resultados obtidos foram com a linhagem de *Aspergillus niger* INCQS 40018, tendo farelo de trigo como fonte de carbono e inóculo inicial de  $10^5$  esporos/mL, obtendo 1,758U/mg de proteína contida no extrato enzimático.*

Palavras-chave: Fitase; Fermentação em estado sólido; *Aspergillus niger*; *Penicillium funiculosum*; farelo de okara.

#### **INTRODUÇÃO**

Com a crescente busca por melhor qualidade de vida, se tornou comum o consumo de produtos à base de cereais integrais e sementes oleaginosas. Porém, já é estudado que, esses alimentos têm alto teor de ácido fítico, substância esta que, além de ser uma importante fonte de fósforo inorgânico, tem a propriedade de quelar cátions bivalentes de grande importância nutricional e algumas proteínas, tornando-os insolúveis e impossibilitando a absorção dos mesmos. <sup>[1,6]</sup>

Existem várias formas de minimizar os efeitos do ácido fítico no organismo, a mais conhecida e estudada é o uso das fitases. Essas enzimas atuam hidrolisando o ácido fítico e liberando fosfato em forma de fósforo inorgânico (Pi) e assim diminuindo ou inibindo a formação dos complexos ácido fítico-cátions bivalentes, tornando tanto esses cátions quanto o fósforo mais biodisponíveis. <sup>[1,3,5]</sup>

As fitases podem ser sintetizadas por vegetais ou microrganismos, sendo a fermentação de fungos filamentosos a mais promissora já que produzem uma enzima que suporta uma grande variação de pH e temperatura, características que são necessárias para aplicação industrial. <sup>[2,3]</sup>



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Além dos benefícios enzimáticos, a fermentação de fungos filamentosos possibilita uso de diferentes formas de condução. Uma delas é a fermentação em estado sólido, que é caracterizada pela baixa atividade de água no meio e a possibilidade de se utilizar resíduos agroindustriais sólidos como substrato. Este tipo de fermentação possibilita uma maior concentração do produto final e melhor recuperação do mesmo, equipamento simples e de baixo custo e o extrato bruto pode ser utilizado diretamente como enzima fonte.<sup>[1,2]</sup>

Este trabalho objetivou a avaliação da produção extrato enzimático com atividade fitásica de três linhagens de fungos filamentosos - *Aspergillus niger* INCQS 40018<sup>[3,4,6]</sup>, *Aspergillus niger* INCQS 40067<sup>[3,4,6]</sup> e *Penicillium funiculosum* INCQS 40081<sup>[3,5]</sup> – em fermentação em estado sólido utilizando duas fontes diferentes de carbono ricas em ácido fítico: farelo de trigo e farinha de Okara, umidificados a 70%, variando a concentração inicial de células –  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  esporos/mL – em cada um dos experimentos.

### MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, as células foram ativadas em meio PDA (Potato Dextrose Ágar) e mantidas em meio sólido de sabugo de milho enriquecido com peptona acidificada. A partir desse meio de manutenção, uma suspensão de conídios foi extraída por meio de uma solução de Tween 80 (0,3% v/v).

O inóculo foi realizado em meios contendo 20g de fonte de carbono, farelo de trigo ou farinha de Okara, umidificados a 70% com solução de sulfato de amônio (0,91% m/v) em ácido clorídrico 0,1N.

O processo fermentativo foi conduzido por quatro dias à 30°C, ao final, o extrato enzimático bruto foi obtido com a adição de 50 mL de solução tampão de acetato de sódio (10mM pH 5,0) ao meio fermentado, que ficou sob agitação orbital por uma hora. Ao término, o extrato bruto foi filtrado em membrana Millipore e direcionado a diálise em solução tampão de acetato de sódio (1mM pH 5) com trocas de três em três horas, totalizando quatro trocas.

Com o extrato já dialisado, foram feitas as reações de quantificação enzimática e protéica. O método utilizado para determinação de atividade enzimática seguiu metodologia descrita por Heinonen e Lahti (1981)<sup>[7]</sup>, em que cada unidade de atividade fitásica corresponde a 1  $\mu$ mol de fosfato liberado por minuto, nas condições de ensaio: 30°C por 20 minutos. Já a reação de quantificação protéica foi baseada na metodologia descrita por Bradford (1976)<sup>[8]</sup>.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

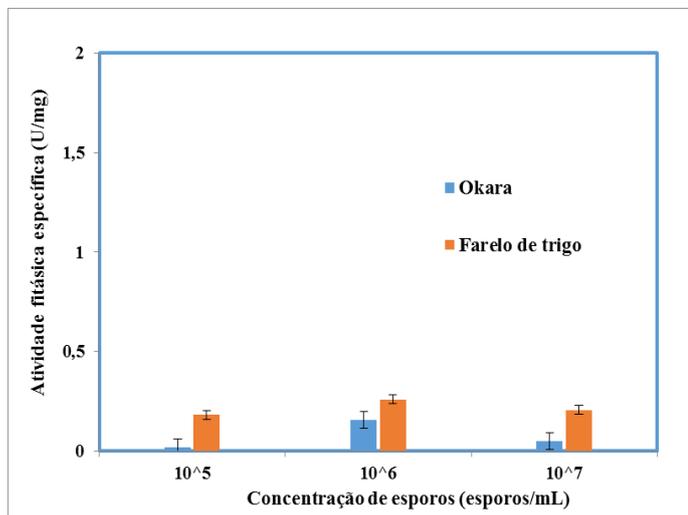
A figura 1 apresenta os resultados de produção de fitase por *Penicillium funiculosum* INCQS 40081, ao analisá-los pode-se perceber que o farelo de trigo forneceu os maiores valores de atividade específica para as concentrações de inóculo  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  esporos/mL, 0,181 U/mg, 0,259 U/mg e 0,207 U/mg, respectivamente. Não houve diferença considerável entre farelo de trigo e farinha de okara como fonte de carbono, as quais forneceram as atividades específicas 0,259 U/mg em farelo de trigo e 0,156 U/mg em farinha de okara.

Já na fermentação utilizando *Aspergillus niger* INCQS 40067 (Figura 2), os experimentos com farinha de Okara forneceram os melhores valores de atividade fitásica específica: 0,578 U/mg em  $10^5$  esporos/mL; 0,378 U/mg em  $10^6$  esporos/mL e 0,384 U/mg em  $10^7$  esporos/mL. Ao avaliar a produção utilizando farelo de trigo, obtiveram-se os seguintes valores de atividade fitásica específica: 0,525 U/mg em  $10^5$  esporos/mL; 0,274 U/mg em  $10^6$  esporos/mL e 0,312 U/mg em  $10^7$  esporos/mL. Ao comparar os valores de atividade específica

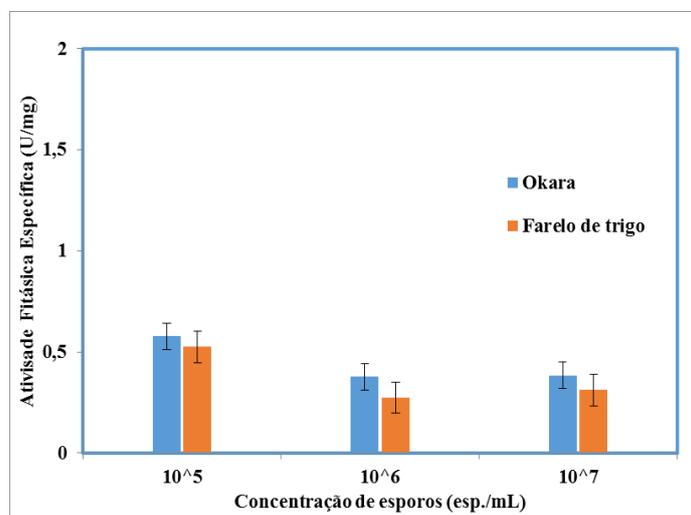


## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

obtidos, a partir das duas fontes de carbono acima mencionadas, observou-se que não houve grande variação entre as atividades alcançadas.



**Figura 1:** Atividade específica de *Penicillium funiculosus* INCQS 40081 cultivado por 4 dias a 30°C, em diferentes concentrações de inoculo inicial e de fonte de carbono – okara e farelo de trigo.



**Figura 2:** Atividade específica de *Aspergillus niger* INCQS 40067 cultivado por 4 dias a 30°C, em diferentes concentrações de inoculo inicial e de fonte de carbono – okara e farelo de trigo.

Ao analisar a Figura 3 que apresenta os resultados da linhagem de *A. niger* INCQS 40018, pode-se perceber que o farelo de trigo favoreceu a produção da enzima de interesse, onde a maior atividade fitásica específica (1,758 U/mg) se deu na concentração de inoculo 10<sup>5</sup> esporos/mL. Ainda analisando farelo de trigo como fonte de carbono, as concentrações de inoculo inicial 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> esporos/mL não apresentaram diferentes valores de atividade específica, 1,261 U/mg e 1,247 U/mg, respectivamente. No caso da Okara como fonte de



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

carbono, as concentrações  $10^5$  e  $10^6$  geraram resultados desprezíveis, enquanto na concentração de  $10^7$  obteve-se uma resposta de 0,899 U/mg.

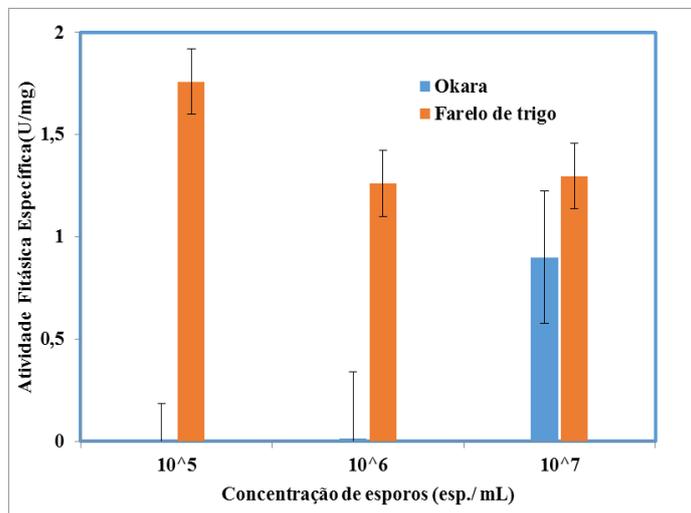


Figura 3: Atividade específica de *Aspergillus niger* INCQS 40018 cultivado por 4 dias a 30°C, em diferentes concentrações de inoculo inicial e farelo de trigo e farinha de okara como fonte de carbono.

### CONCLUSÕES

Conclui-se que, nas condições analisadas, a linhagem mais apropriada para produção fitásica é a de *Aspergillus niger* INCQS 40018, bem como o farelo de trigo como fonte de carbono e a concentração inicial de esporos de  $10^5$  esporos/mL.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Derya Berikten, Merih Kivanc. 2014. OPTIMIZATION OF SOLID-STATE FERMENTATION FOR PHYTASE PRODUCTION BY *Thermomyces lanuginosus* USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44:8, 834-848.
- [2] Richa Rani, Sanjoy Ghosh. 2011. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization, *Bioresource Technology*, 102, 10641–10649.
- [3] OCAMPO BETANCUR, Maritza et al . Isolation and Characterization of Potential Phytase-Producing Fungi from Environmental Samples of Antioquia (Colombia). *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín, Medellín* , v. 65, n. 1, June 2012 .
- [4] Luis Henrique S. Guimarães, Simone C. Peixoto-Nogueira. 2006. SCREENING OF FILAMENTOUS FUNGI FOR PRODUCTION OF ENZYMES OF BIOTECHNOLOGICAL INTEREST. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 474-480.
- [5] Ghada E.A. Awad, Magdy M.M. Elnashar, Enas N. Danial. 2011. Optimization of Phytase Production by *Penicillium funiculosum* NRC467 under Solid State Fermentation by Using Full Factorial Design. *World Applied Sciences Journal*, 15, 1635-1644.
- [6] Kavita Bhavsara, Priyank Buddhivanta. 2013. Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: Biochemical characterization and the correlation with submerged phytases. *Process Biochemistry*, 48, 1618–1625
- [7] Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *University of Georgia, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 72, 248-254
- [8] Heinonen, J K, Lahti R J. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochem.* 15;113(2):313-7.