

ANDREA REGINA ZACARIAS SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE FITASE POR  
*ASPERGILLUS NIGER* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO  
SUBPRODUTOS AGRÍCOLAS PARA APLICAÇÃO COMO ADITIVO NA  
ALIMENTAÇÃO DE AVES E SUÍNOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos R. Socol**  
**Co-orientadores: Prof. Dr. José A. R. León**  
**Prof. Dr. Sandro Germano**

CURITIBA  
2002

ANDREA REGINA ZACARIAS SILVA

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE FITASE POR  
*ASPERGILLUS NIGER* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO  
SUBPRODUTOS AGRÍCOLAS PARA APLICAÇÃO COMO ADITIVO NA  
ALIMENTAÇÃO DE AVES E SUÍNOS

**Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol  
PPGTA/TC/UFPR

Co-orientadores: Prof. Dr. José A. R. León  
ICDCA/Havana-Cuba

Prof. Dr. Sandro Germano  
Universidade Tuiuti/PR

Luciana P. de S. Vandenberghe (membro)  
DEQ/TC/UFPR

Adenise Lorenci Woiciechowski (membro)  
DEQ/TC/UFPR

Ida Chapaval Pimentel (suplente)  
DPB/BL/UFPR

CURITIBA, 30 de outubro de 2002

**“Aos verdadeiros amigos pelo**

**Apoio, Compreensão e Carinho.”**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor e orientador Carlos Ricardo Soccol pela oportunidade a concedida de realização deste trabalho, e pela seriedade e dedicação dispensados.

Aos professores e co-orientadores José Angel R. León e Sandro Germano pelo acompanhamento e apoio durante a realização deste trabalho.

Às professoras Luciana Vandenberghe, Adenise Woiciechowski e Ida C. Pimentel pela aceitação do convite para julgamento do presente trabalho.

Aos estagiários e técnicos do Laboratório de Bioprocessos, que muito contribuíram para a realização do presente trabalho: Juliana, Saul, Pêrsio e Mitiyo.

Aos professores: Nina Wazczynskij, Renato Sossela, Sônia Stertz e Paulo pelo apoio e presteza quando solicitados.

Aos funcionários do curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos: Lidice e Paulo.

Aos colegas do curso de mestrado e do Laboratório de Bioprocessos pelas experiências compartilhadas, em especial: Radjis, Robson, Adriane, Cristiane, Cristina, Débora, Rômulo, Marcos, Joana.

A minha família, em especial ao meu irmão Arley pelo interesse e pela presteza.

A minha mãe Maria Teresa (*in memoriam*), cuja presença foi constante, principalmente nos momentos de dificuldade.

Aos verdadeiros e eternos amigos Guilherme, Cinthia e Rodrigo, simplesmente por existirem.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3.1 ENZIMAS.....	4
3.1.1 Fitase.....	6
3.1.1.1 Reação catalisada pela fitase.....	10
3.2 ÁCIDO FÍTICO .....	11
3.3 FÓSFORO.....	15
3.4 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	17
3.4.1 Características da Fermentação no Estado Sólido.....	17
3.4.2 Fatores que Influenciam na Fermentação no Estado Sólido.....	19
3.4.2.1 Umidade e atividade de água .....	19
3.4.2.2 Temperatura.....	20
3.4.2.3 Microrganismos .....	20
3.4.2.4 Aeração.....	21
3.4.2.5 pH .....	21
3.4.3 Vantagens e Desvantagens da FES .....	22
3.5 FUNGOS.....	23
3.5.1 Fungos Filamentosos.....	24
3.5.2 Nutrição.....	26
3.6 POLPA CÍTRICA.....	26
3.7 ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS MONOGÁSTRICOS.....	31
3.7.1 Produção de Aves e Suínos.....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 MICRORGANISMOS.....	36

4.1.2 Manutenção das Cepas.2 .....	37
4.1.2. Preparo da Solução de Esporos .....	37
4.1.3 Contagem da Solução de Esporos .....	37
4.2 SUBSTRATOS.....	39
4.2.1 Preparo dos Substratos.....	39
4.2.2 Análises Físico-Químicas do Substrato.....	40
4.2.3 Determinação da Capacidade de Absorção Máxima de Água.....	41
4.3 SELEÇÃO DE CEPAS E SUBSTRATOS.....	42
4.3.1 Esterilização dos Meios de Cultura e Materias.....	42
4.3.2 Fermentação em Frascos.....	42
4.3.3 Extração da Enzima.....	43
4.3.4 Determinação da Atividade Catalítica da Fitase.....	43
4.3.4.1 Atividade enzimática.....	45
4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FITASE .....	45
4.4.1 Otimização dos Parâmetros.....	46
4.5 ESTUDO DA PRODUÇÃO DA FITASE EM RELAÇÃO AO TEMPO DE FERMENTAÇÃO.....	47
4.6 ESTUDO DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA .....	47
4.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS - BRADFORD.....	48
4.8 ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE.....	49
4.8.1 Temperatura Ótima para a Atividade Enzimática.....	49
4.8.2 pH Ótimo para a Atividade Enzimática.....	50
4.8.3 Influência dos íons.....	50
4.8.4 Estabilidade Térmica da Fitase.....	50
4.8.5 Estabilidade do Extrato Cru Durante o Armazenamento.....	51
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
5.1 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DA FITASE.....	52
5.2 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO .....	53
5.3 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS .....	54
5.4 PRODUÇÃO DA FITASE EM RELAÇÃO AO TEMPO DE FERMENTAÇÃO.....	60
5.5 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA .....	62
5.6 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA FITASE .....	65

5.6.1 Estabilidade em Diferentes Valores de pH.....	65
5.6.2 Efeito dos íons.....	66
5.6.3 Estabilidade em Diferentes Temperaturas e Temperatura Ótima.....	68
5.6.4 Estabilidade Durante o Armazenamento.....	71
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>73</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS

ANOVA:	Análise de variância
ATP:	Adenosina trifosfato
FES:	Fermentação no estado sólido
FIT:	Unidade de atividade catalítica da fitase
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NRRL:	Northern Regional Research Laboratory
P:	Fósforo
PDA:	Ágar batata dextrose
rpm:	Rotação por minuto

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Pesquisas efetuadas por diferentes autores sobre a produção de fitase por diferentes microrganismos.....	09
QUADRO 2. Conteúdo de fitato em diferentes ingredientes para rações.....	14
QUADRO 3. Análise qualitativa da produção de fitase em polpa cítrica por diferentes cepas de <i>Aspergillus niger</i> .....	52
QUADRO 4. Análise qualitativa da produção de fitase em diferentes substratos.....	53

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição química e conteúdo de energia bruta de PCS de origem brasileira.....	30
TABELA 2. Exportação brasileira de polpa cítrica.....	31
TABELA 3. Produção mundial de carnes.....	33
TABELA 4. Maiores exportadores de carne suína.....	34
TABELA 5. Exportações brasileiras de carne suína.....	35
TABELA 6. Parâmetros da otimização.....	46
TABELA 7. Parâmetros da extração da fitase.....	46
TABELA 8. Composição centesimal da polpa cítrica.....	54
TABELA 9. Otimização das variáveis para a produção de fitase.....	55

TABELA 10. Análise de variância da otimização.....	56
TABELA 11. Estudo da extração com água deionizada.....	62
TABELA 12. Estudo da extração com NaCl a 1% .....	63
TABELA 13. Estabilidade térmica da fitase em 40 e 50 °C .....	69
TABELA 13. Estabilidade térmica da fitase em 70 e 80 °C .....	70

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura da fitase .....	07
FIGURA 2. Reação catalítica da fitase.....	11
FIGURA 3. Estrutura do ácido fítico.....	12
FIGURA 4. Rendimento da laranja.....	28
FIGURA 5. Fluxograma de obtenção da polpa cítrica.....	29
FIGURA 6. Polpa cítrica peletizada.....	30
FIGURA 7. Preparo da solução de esporos.....	38
FIGURA 8. Fluxograma do preparo dos diferentes substratos.....	40
FIGURA 9. Diagrama de Pareto.....	56
FIGURA 10. Gráficos de superfície de resposta (A) e projeção de superfície de resposta (B) da otimização realizada em função dos fatores experimentais: umidade e temperatura.....	58
FIGURA 11. Gráficos de superfície de resposta (A) e projeção de superfície de resposta (B) da otimização realizada em função dos fatores experimentais: pH e temperatura.....	59
FIGURA 12. Produção de fitase em relação ao tempo de fermentação.....	60
FIGURA 13. Gráficos da projeção de superfície de resposta para o experimento da extração com água (A) e NaCl a 1% (B).....	64
FIGURA 14. pH ótimo para a atividade enzimática.....	66

FIGURA 15. Efeito dos cátions e ânions sobre a atividade catalítica da fitase.....	67
FIGURA 16. Temperatura ótima da atividade da fitase.....	68
FIGURA 17. Gráfico da estabilidade térmica da fitase em 40 e 50 °C .....	69
FIGURA 18. Gráfico da estabilidade térmica da fitase em 70 e 80 °C .....	70

## RESUMO

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Processos Biotecnológicos e no Laboratório de Química Analítica Aplicada do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná - Brasil, no período de 2000 a 2002. Teve por objetivo a produção da enzima fitase em escala laboratorial por fermentação no estado sólido (FES) utilizando produtos, subprodutos ou resíduos da agricultura e/ou da agroindústria nacional e fungo *Aspergillus niger*. Grande parte das matérias-primas de origem vegetal utilizadas na alimentação animal, contém fósforo mineral armazenado na forma de ácido fítico que não é degradado pelos animais monogástricos. As fitases hidrolisam o fitato em inositol e fosfato inorgânico, fazendo com que o fósforo antes não disponível, possa ser aproveitado pelo organismo. Em rações onde a enzima fitase é adicionada como aditivo, há maior absorção do fosfato pelos animais que aproveitam melhor o alimento. Além de proporcionar acréscimo na digestibilidade do fósforo, as fitases produzem um benefício ambiental, pois reduzem a taxa de fósforo eliminada nos excrementos dos animais, trazendo benefícios, aos produtores e ao meio ambiente. No presente trabalho foi possível: produzir a enzima fitase utilizando-se a polpa cítrica como substrato; realizar estudos complementares de otimização que permitiram definir a temperatura, pH e suplementação de alguns minerais para a obtenção de produtividade máxima de enzima.

**PALAVRAS-CHAVE:** fitase, fitatos, ácido fítico, fermentação no estado sólido, alimentação animal, bioresíduos agrícolas.

## ABSTRACT

Studies were carried out with the objective to produce phytase by solid state fermentation in flasks, using agro-industrial residues and strains of *Aspergillus niger*. A lot of plants, like seeds, roots and tubers storage phytate in their cells. Phytate is an antinutricional factor for some animals. Monogastric animals, like pigs and poultry not digest efficiently the phytate in their feeds. These animals excrete large amounts of phosphorus into environment. Phytases catalyse the release of phosphate from phytate. These enzymes increase the bio-availability of phosphate from the feeds of monogastric animals and decrease the amount of phosphorus excrete by animals. Optimization assays were conduced using factorial design and the optimal production achieved was of 7,74 FIT, using as substrate the pulp citrus pellets and strain of *Aspergillus niger* W2, at the ideal conditions of fermentation: temperature – 28°C; pH –5,0 and moisture – 61%.

PALAVRAS-CHAVE: phytase, phytato, solid state fermentation, animal feed, agro-industrial residues.

## 1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é uma área muito ampla que vem contribuindo para a melhoria da qualidade de vida. A produção e a utilização de novas enzimas, por exemplo, pode auxiliar na diminuição da poluição ambiental, pois elas são provenientes de sistemas naturais, e quando estes se degradam, os aminoácidos dos quais elas são formadas podem ser facilmente absorvidos pela natureza (NOVO NORDISK, 1992).

Atualmente, os estudos sobre a obtenção de enzimas por processos biotecnológicos têm sido intensivos, cujas possibilidades de uso apresentarão acentuado crescimento nas próximas décadas, pela necessidade de maximização dos processos biológicos industriais, paralelamente à importância que elas apresentam quando consideradas as suas aplicações na redução de impactos causados pela ação nociva do homem sobre o meio ambiente.

PANDEY *et al.* (2001), mencionam que o uso de enzimas alimentares representa um mercado mundial em expansão, cujos valores atuais giram em torno do US\$ 5 bilhões por ano. Os mesmos autores relatam que dos produtos industriais usados na alimentação animal 6% contêm enzimas, ao passo que 80% contêm vitaminas. É importante ressaltar, entretanto, que as vitaminas foram citadas a primeira vez por Casimir Funk, em 1912 (NUNES, 1998), ou seja, quase na mesma época da primeira utilização industrial das enzimas, e o seu processo de evolução foi significativamente maior. Isso deve-se ao fato de que a produção e a purificação das enzimas envolve inúmeras variáveis que devem ser mantidas sob controle, com custos relativamente mais altos. Contudo, existem possibilidades da busca de alternativas industriais para a obtenção de diferentes enzimas, com relação custo-benefício mais favorável.

A técnica de fermentação no estado sólido (FES) caracteriza-se pelo crescimento microbiano sobre um material orgânico sólido que funciona como substrato e/ou suporte. Esse tipo de fermentação apresenta inúmeras vantagens em relação a fermentação em meio líquido, especialmente na produção de enzimas fúngicas extracelulares (BATAGLINO *et al.*, 1991).

Diversos autores têm destacado as vantagens e desvantagens da FES em relação a fermentação em meio líquido (AIDDO *et al.*, 1982; MUDGET, 1986; SOCCOL, 1994; SOCCOL, 1996). Em geral as vantagens estão associadas aos baixos custos e a alta produtividade dos processos da FES.

Nos últimos anos tem-se observado um aumento na utilização de preparados enzimáticos na criação de animais de granja destinados ao consumo humano visando uma maior produtividade e competitividade no mercado.

Atualmente há também uma preocupação crescente das indústrias em relação a poluição ambiental, as quais estão buscando a cada dia, melhores maneiras de reduzir os custos de produção sem interferir na qualidade do produto e sem prejudicar o meio ambiente. A poluição ambiental tornou-se um problema e uma ameaça mundial.

Desde o início da década de 90, dentre as distintas enzimas a serem utilizadas na alimentação de animais monogástricos tem-se destacado a utilização da fitase, principalmente na criação de aves e suínos devido aos seguintes fatores (PANDEY *et al.*, 2001):

- as fitases catalisam a liberação do fosfato contido no fitato, que é a principal forma de fósforo que ocorre predominantemente nos grãos de cereais, legumes e sementes oleaginosas;
- são consideradas de valor significativo no acréscimo da qualidade nutricional de alimentos ricos em fitato.

Pesquisas mostram que o uso da enzima fitase tem proporcionado acréscimo na digestibilidade do fósforo não disponível na alimentação de animais monogástricos, produzindo um significativo benefício econômico e ambiental. Econômico porque a fitase além de aumentar o aproveitamento do fósforo, também pode aumentar a disponibilidade de aminoácidos, proteínas e cálcio nas dietas de suínos e aves. A adição de fitase pode reduzir o custo com alimentação em aproximadamente \$4,00/tonelada. Em rações para aves o decréscimo é de aproximadamente \$2,00/tonelada, e em rações para suínos a redução de custos é maior que \$1,45/tonelada. E benefício ambiental, porque hidrolisando o fitato e produzindo mais fósforo aproveitável para a digestão, há diminuição nos níveis de fósforo eliminados pelos animais (BASF, 2001a).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Produção e caracterização da enzima fitase em laboratório por *Aspergillus niger* utilizando produtos, subprodutos e/ou resíduos agrícolas ou agroindustriais por fermentação no estado sólido.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições de cultivo através de estudos dos parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, umidade e tempo de fermentação) relacionados com a produção da enzima fitase;
- Caracterizar a atividade enzimática através dos estudos de: verificação do efeito do pH do meio de incubação; verificação do efeito da temperatura de incubação; efeito dos íons; estabilidade durante armazenamento (“shelf life”).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ENZIMAS

Na década de 1850, Louis Pasteur chegou a conclusão que a fermentação do açúcar em álcool pelo lêvedo era catalisada por “fermentos”, os quais posteriormente foram chamados de enzimas, que é uma palavra proveniente do grego e que significa “no lêvedo” (LEHNINGER *et al.* 1993).

Os primeiros estudos das enzimas como biocatalisadores de processos biológicos datam de 1878, tendo sido registrados por Khune (GUTIERREZ,1993).

Em 1897 Eduard Büchner extraiu do lêvedo, na forma solúvel ativa, o conjunto de enzimas que faziam a transformação do açúcar em álcool, provando dessa forma que as aquelas enzimas continuavam funcionando mesmo depois de serem retiradas das células vivas (LEHNINGER *et al.* 1993).

A primeira enzima isolada na sua forma cristalina pura foi a urease obtida de extratos do feijão de soja por James Summer em 1926 (LEHNINGER *et al.* 1993; GUTIERREZ,1993).

Predominantemente, as enzimas são classificadas como proteínas globulares. Têm como função básica atuar como catalisadores biológicos, diminuindo a energia de ativação e acelerando a velocidade das reações sem serem consumidas durante o processo.

As enzimas são catalisadores muito potentes levando-se em consideração alguns aspectos (WISEMAN, 1991):

- são muito eficazes, catalisando reações que variam de  $10^8$  a  $10^{11}$  vezes mais rápidas que os catalisadores não-enzimáticos correspondentes em condições mais amenas de temperatura, pH e pressão;
- a variedade das reações catalisadas por enzimas é bastante ampla, podendo catalisar muitos tipos de reações quando comparadas aos catalisadores químicos;
- as enzimas são muito específicas quanto ao tipo de reação catalisada;

Segundo LEHNINGER *et al.* (1993), alguns fatores interferem na atividade catalítica de uma enzima, ou seja, provocam um efeito na velocidade da reação enzimática, como por exemplo:

- *pH*: toda enzima possui um pH ótimo característico, no qual a sua atividade será máxima;
- *temperatura*: as enzimas possuem uma temperatura ótima característica na qual a atividade catalítica é máxima;
- *concentração do substrato*: a velocidade da reação enzimática aumenta com o aumento da concentração do substrato, porém até uma determinada concentração, na qual ocorre a ocupação total dos sítios catalíticos da enzima, onde esta atinge a velocidade máxima.

As enzimas são classificadas em seis grupos diferentes dependendo do tipo de reação que catalisam: óxido-redutases; transferases; hidrolases; liases; isomerases e ligases (WISEMAN, 1991).

As reações catalisadas pelas enzimas podem ser acompanhadas por métodos espectrométricos, pois muitos dos substratos ou produtos das enzimas absorvem a luz visível ou invisível. Esta é a forma mais sensível para analisar as reações enzimáticas, e baseia-se na obtenção de curvas completas mediante controle direto e contínuo da reação (WISEMAN, 1991).

As enzimas extraídas de diferentes fontes e que catalisam a mesma reação (enzimas homólogas), não precisam ser quimicamente idênticas. As estruturas terciárias da área crítica do sítio ativo são suficientemente parecidas para ligarem-se ao mesmo substrato e catalisar a mesma reação, porém as estruturas primárias do restante da molécula podem ser diferentes para produzir uma sutil diferença na estrutura terciária global alterando as condições ótimas do processo catalítico (WISEMAN, 1991).

Nas últimas décadas o conhecimento adquirido em relação a capacidade biocatalítica das enzimas e dos microrganismos tornou possível a criação de uma nova geração de produtos.

Segundo WISEMAN (1991), a maioria das enzimas utilizadas na indústria são de origem microbiana e produzidas por fermentação submersa aeróbia

convencional, que permite um maior controle das condições de crescimento que na fermentação no estado sólido. Com frequência essas enzimas são extracelulares, o que facilita o isolamento e a purificação das mesmas (WISEMAN, 1991; MADIGAN *et al.*, 2000).

No Japão e em outros países orientais a produção de enzimas é realizada por FES, enquanto que na Europa e nos países ocidentais, a produção ocorre por processos de fermentação submersa (RAIMBAULT *et al.*, 1997)

PANDEY *et al.* (2001), mencionam que o uso de enzimas alimentares representa um mercado mundial em expansão, cujos valores atuais giram em torno de US\$ 5 bilhões por ano.

Neste sentido, o uso dessas substâncias tem sido ampliado a inúmeras aplicações, incluindo-se as relacionadas a produção de animais de interesse econômico e social, através de diferentes enzimas exógenas que exercem ação digestiva complementar (ou isolada) às existentes no trato gastrintestinal (TGI) dos animais, face a sua atuação sobre substratos alimentares, favorecendo à maior incorporação de nutrientes ao metabolismo celular.

### 3.1.1 Fitase

Vários autores relatam que métodos químicos e físicos, tais como: extração, precipitação, tostagem e autoclavagem podem ser utilizados para reduzir o ácido fítico presente em alguns produtos, porém a aplicação destes métodos provoca perda parcial de alguns nutrientes, como as proteínas e minerais (AL-ASHEH, 1995).

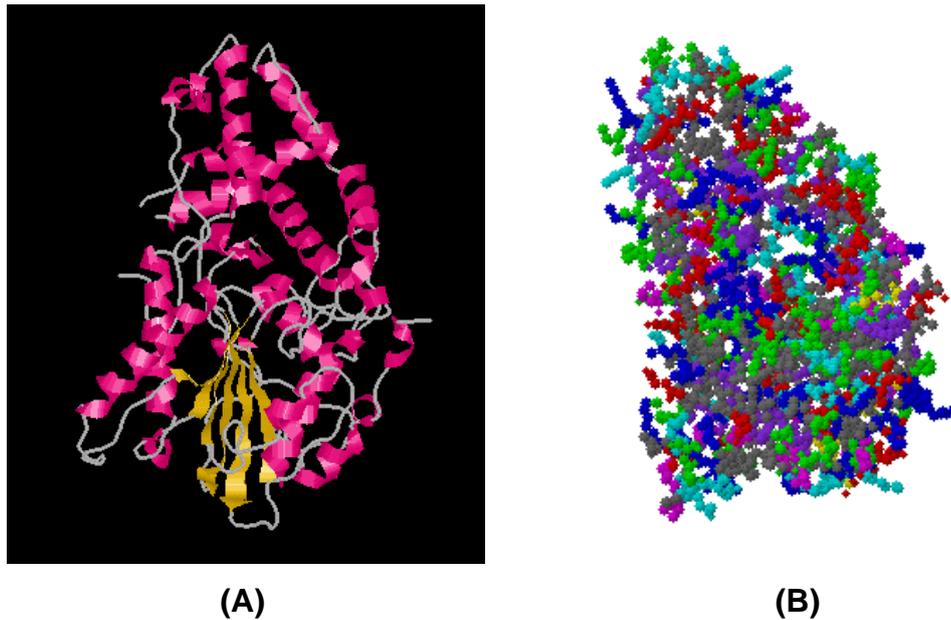
A hidrólise do fitato ocorre naturalmente em sementes de plantas que contêm a fitase endógena (AL-ASHEH, 1995). Tem-se proposto controlar a ação da fitase endógena manipulando-se a temperatura e a atividade de água dos tecidos vegetais (FENNEMA, 1993).

No intestino de vários animais a enzima fitase está presente, porém sua atividade não é suficiente para promover a utilização do ácido fítico provindo da dieta (HAN, 1988).

A fitase (mio-inositol hexafosfato fosfohidrolase) (figura 1a e 1b), também está amplamente distribuída nos tecidos animais e vegetais, em várias espécies de fungos e em algumas bactérias. Essa enzima hidrolisa o ácido fítico em inositol e

fosfato inorgânico (SILVA e TRUGO, 1996). Ao hidrolisar os resíduos de fosfato do ácido fítico diminui a sua forte afinidade por certos minerais (FENNEMA, 1993).

FIGURA 1- ESTRUTURA DA FITASE



FONTE: Phytase.net

**Figura 1.** Estrutura secundária da fitase produzida por *Aspergillus ficuum* (A); Estrutura terciária da fitase produzida por *Aspergillus ficuum* (B).

A digestão e o aproveitamento do alimento podem ser aumentados pela adição de enzimas na alimentação, como por exemplo, pela adição da fitase microbiana. A função das fitases é realizar a hidrólise do fitato (inositol hexafosfato) em inositol e fosfato inorgânico. Desta forma, parte do fósforo, antes não disponível, passa a ser aproveitado pelo organismo, tornando possível reduzir em até 30% o fósforo contido na alimentação (NOVOZYMES, 2000; CHRISTENSEN, 1995).

Desde o início da década de 90, dentre as distintas enzimas a serem utilizadas na alimentação de animais monogástricos tem-se destacado a utilização da fitase, principalmente na criação de aves e suínos devido aos seguintes fatores:

- Hidrolisa e solubiliza o fósforo fítico que não é assimilado e está presente na alimentação do animal;
- Diminui a quantidade de fósforo adicionado à ração;
- Diminui o efeito antinutricional dos fitatos, que agem com complexantes do cálcio, magnésio, cobre, zinco e muitos outros minerais importantes para o metabolismo, sendo assim;
- Favorece a utilização das proteínas presentes na dieta;
- Favorece a proteção do meio ambiente devido a diminuição do fósforo excretado pelo animal.

A fitase pode ser produzida industrialmente por processos biotecnológicos sendo derivada de diferentes fontes de origem animal e vegetal (os grãos de trigo, triticale e cevada contêm fitase, apresentando maior disponibilidade de fósforo). Mas, a síntese de fitase efetuada pela membrana celular de microrganismos é comercialmente a forma mais promissora de produção da enzima, e apesar da habilidade de produção das bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados (PANDEY *et al.* 2001).

Inicialmente, os processos de produção utilizavam o método de fermentação submersa, mas, atualmente, a fermentação no estado sólido (FES) tem despertado maior interesse, em função dos bons rendimentos apresentados.

No processo de produção da fitase, de acordo com PANDEY *et al.* (2001), devem ser considerados alguns fatores críticos:

- a escolha da linhagem microbiana mais produtiva;
- a definição das condições adequadas de cultivo, tais como: pH, temperatura, umidade, fontes nutricionais suplementares ao meio de cultivo;
- a natureza dos substratos utilizados;
- a disponibilidade dos nutrientes para os microrganismos.

Estudos relatados por PANDEY *et al.* (2001), evidenciam que diversos autores têm pesquisado a produção de fitase através do uso de diferentes microrganismos (Quadro 1). Contudo, em termos de utilização industrial, os fungos do gênero *Aspergillus*, basicamente representado por três espécies (*Aspergillus sp.*; *A. niger* e *A. ficuum*) apresentam-se como os mais promissores, sendo cultivados através de FES em biorreatores.

QUADRO 1- PESQUISAS EFETUADAS POR DIFERENTES AUTORES SOBRE A PRODUÇÃO DE FITASE POR DIFERENTES MICRORGANISMOS (MO)

REFERÊNCIAS	Estudo com MO – fitase
LISSITISKAYA et al. (1999)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Amostras de solo: diferentes MO</li> </ul>
CHEN (1998)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Corinebacterium glutamicum</i></li> </ul>
GARGOVA et al. (1997)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Aproximadamente 200 fungos</li> </ul>
VOLFOVA et al. (1994)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 132 MO. A maior parte fungos</li> </ul>
SANO et al. (1999)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1200 linhagens de leveduras (coleção CBS) para crescimento em meio com fitato como fonte de Carbono e P – detectou <i>Arxula adenivorans</i></li> </ul>
LAMBRECHTS et al. (1992)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 21 linhagens de leveduras em bioreator Batch – <i>Schwanniomyces castelli</i> (CBS – 2863) maior atividade</li> </ul>
YANKE et al. (1998)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 334 linhagens de 22 espécies de bactérias ruminais – <i>Selenomonas ruminantium</i>; <i>Megasphaera elsdenii</i>; <i>Prevotella ruminicola</i>; <i>Mitsuokella multiacidus</i> e <i>Treponema sp.</i> (maior atividade)</li> </ul>

FONTE: PANDEY *et al.* (2001)

### 3.1.1.1 Reação catalisada pela fitase

Há duas fitases classificadas pelo “Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (NC-IUBMB) em consulta com a IUPAC-IUBMB “Joint Commission on Biochemical Nomenclature” (JCBN):

#### EC 3.1.3.8

Nome recomendado: *3-phytase*

Nome sistemático: *myo-inositol-hexakisphosphate 3-phosphohydrolase*

Outros nome(s): *phytase; phytate 3-phosphatase*

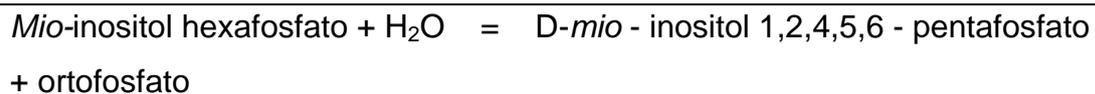
#### EC 3.1.3.26

Nome recomendado: *6-phytase*

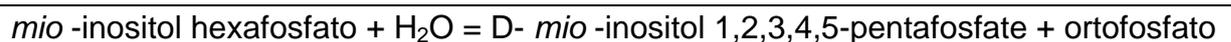
Nome sistemático: *myo-inositol-hexakisphosphate 6-phosphohydrolase*

Outros nome(s): *phytase; phytate 6-phosphatase*

A 3-fitase (EC 3.1.3.8) primeiramente age sobre o fitato na posição 3 e a reação pode ser descrita como segue abaixo:

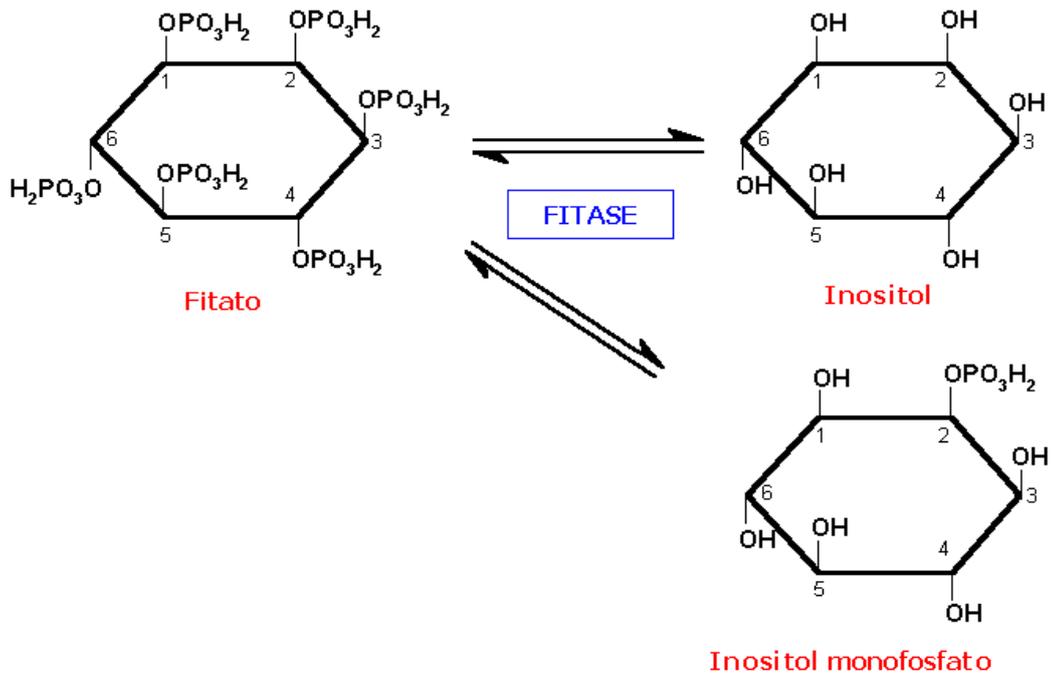


A 6-fitase (EC 3.1.3.26) primeiramente age sobre o fitato na posição 6 e a reação pode ser descrita como segue abaixo:



A reação de catalítica da fitase é mostrada na figura 2.

FIGURA 2 - REAÇÃO CATLÍTICA DA FITASE



FONTE: PHYTASE.NET

### 3.2 ÁCIDO FÍTICO

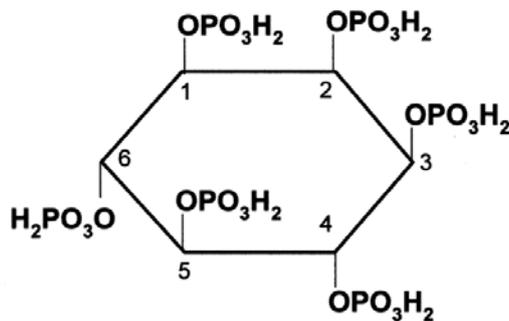
O ácido fítico ( $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ) ou *mio*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfato (figura 3), encontra-se muito difundido entre as plantas como reserva de fósforo existindo também no sangue de aves, anfíbios e répteis (FENNEMA, 1993).

Segundo LEHRFELD e MORRIS (1992), o ácido fítico, que é um componente comum nos cereais, provoca uma diminuição da biodisponibilidade de alguns elementos minerais e, também, interfere na atividade de algumas enzimas digestivas.

Geralmente, nos alimentos de origem vegetal apenas uma pequena parcela do fósforo total não é fítico ou disponível. O ácido fítico é um componente natural

das sementes, constituindo cerca de 1 a 3% do peso das leguminosas e cereais, o que corresponde por 60 a 90% do fósforo total (CÚNEO *et. al.*, 2000; HARLAND e HARLAND, 1980).

FIGURA 3- ESTRUTURA DO ÁCIDO FÍTICO



FONTE: PHYTASE.NET

Os fitatos têm várias funções fisiológicas importantes para as plantas durante o seu ciclo de vida, incluindo o armazenamento de fósforo e cátions os quais fornecem matéria-prima para a formação das paredes celulares após a germinação das sementes (CÚNEO *et. al.*, 2000).

A presença de ésteres do ácido hexafosfórico com o inositol nos alimentos, denominados de fitatos, promove a redução da disponibilidade do fósforo. O nível de aproveitamento do fósforo alimentar varia também com a espécie, mantendo relação direta com as particularidades anatômicas e fisiológicas do trato gastrointestinal (TGI) dos animais. Pode-se assim dizer que, em ordem decrescente de aproveitamento do fósforo alimentar, encontram-se os ruminantes, herbívoros monogátricos (lagomorfos e equídeos), e, finalmente, os suínos e as aves. Pode-se considerar, em termos médios, para as aves e suínos, valores de biodisponibilidade do fósforo alimentar em torno de 30% e 20 a 60%, respectivamente. Os animais mais jovens são menos aptos a utilizarem o fósforo fítico, sendo ainda mais susceptíveis à redução da digestibilidade da dieta como um todo.

Nos ruminantes, o fósforo fítico é disponibilizado pelos microrganismos fermentadores, que secretam a enzima fitase que tem ação intensiva sobre os fitatos (DVORAKOVÁ *et al.*, 1997). Entretanto, o fósforo que porventura não foi disponibilizado pelos microrganismos do rúmen, passa para outros compartimentos gástricos mantendo-se sob a forma indisponível, sendo excretado.

Além dos efeitos diretos sobre a biodisponibilidade do fósforo, relatos de diferentes autores evidenciam a influência dos fitatos alimentares sobre a digestibilidade da dieta como um todo.

De acordo com COUSINS (1999) e AL-ASHEH (1995), os fitatos são encontrados nos alimentos sob a forma de sais de Cálcio, Magnésio e outros íons como o Zinco e o Ferro.

O cálcio presente nos grãos dos cereais não é facilmente absorvido, porque muito dele está fortemente ligado ao inositol hexafosfatado, também chamado de fitato, formando a fitina, um sal de cálcio e magnésio do fitato (LEHNINGER, 1992).

CALDWELL (1992), demonstrou a inibição da atividade de tripsina, *in-vitro*, pelo ácido fítico. Da mesma forma, MROZ (1995), evidenciou o mesmo, *in-vivo*, com fêmeas suínas em lactação.

Diversos relatos de pesquisas indicam ainda que os fitatos formam complexos com proteínas, aminoácidos ou enzimas endógenas, através de ligações iônicas. Segundo RAVINDRAN *et al.* (1999), proteínas da soja, milho, trigo, colza, farelo de girassol ou de arroz, formam complexos com fitatos, tendo reduzida a sua digestibilidade intestinal.

A complexação de proteínas depende do potencial hidrogênio iônico (pH) do meio, de tal forma que:

- com pH baixo, formam-se ligações eletrostáticas com resíduos de aminoácidos básicos como arginina (ARG), lisina (LIS) e histidina (HIS);
- com pH próximo do ponto isoelétrico, a carga da proteína é neutra e não há ligação com fitato;
- quando o pH é básico, forma-se um complexo com proteínas na presença de cátions divalentes, como Ca, Mg e Zn, que agem como pontes entre o grupo carbonila (COOH<sup>-</sup>) e o fitato.

No Quadro 2, observa-se o conteúdo de fitato fosfórico (Fitato-P em g/100 g) e a ocorrência de fitato sobre o total de fósforo (% TP) em diferentes ingredientes utilizados para a formulação de rações:

QUADRO 2 - CONTEÚDO DE FITATO EM DIFERENTES INGREDIENTES PARA RAÇÕES

Ingrediente	Fitato-P (g/100g MS)	Fitato-P (% TP) <sup>(*)</sup>
Milho	0,24	72
Cevada	0,27	64
Trigo	0,27	69
Aveia	0,29	67
Sorgo	0,24	66
Milheto	0,19	70
Arroz	0,27	77
Arroz polido	0,09	51
Farinha de arroz	10,31	80
Farinha de trigo	0,92	71
Polimentos de arroz	20,42	89
Farelo de batata doce	0,05	24

(\*) Participação do fitato sobre o total de fósforo do ingrediente

**FONTE:** adaptado de COUSINS (1999).

Pode-se evidenciar que alguns alimentos com amplas possibilidades de uso alternativo para aves, como por exemplo os polimentos de arroz e a farinha de arroz, apresentam altas quantidades de fitato e elevadas porcentagens de fósforo fítico, o que se traduz num problema que pode ser amenizado com o uso da enzima fitase exógena (produzida em escala industrial), de acordo com relatos de LÓPEZ *et al.*, (1997), que recomendam a inclusão de até 15% de farelo desengordurado de arroz na dieta de frangos de corte, juntamente com a enzima.

NEWKIRK e CLASSEN (2001), aplicaram a enzima fitase sobre farelo de canola utilizado na alimentação de frangos a qual hidrolisou de 72-73% do fitato presente no farelo.

### 3.3 FÓSFORO

Os elementos minerais, de forma geral, são de extrema importância para o organismo animal, cujas deficiências têm marcante interferência nos indicadores de produção e produtividade dos rebanhos.

Os sais minerais de maior importância para a alimentação animal podem ser classificados em dois grupos (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982):

- a) macrossais: cálcio, fósforo, sódio, cloro, potássio, magnésio e enxofre;
- b) microssais: ferro, iodo, cobre, flúor, manganês, molibdênio, zinco, cobalto, selênio, cromo, estanho, níquel, vanádio e silício.

Os sais minerais estão presentes nos alimentos sob formas variadas, conseqüentemente, a ação digestiva ocorre de maneiras diferentes. De acordo com a sua velocidade de absorção podem ser classificados em (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982):

- a) mais rapidamente absorvidos: os cloretos, brometos, iodetos e acetatos;
- b) menos rapidamente absorvidos: nitratos, lactatos, silicatos, sulfatos, fosfatos, citratos e carbonatos;
- c) não absorvíveis: oxalatos, fitatos, etc.

O fósforo (P), particularmente, apresenta alta demanda pelo organismo. Por esse motivo, é classificado como um macrossal, sendo encontrado em níveis variáveis em diferentes alimentos. Entretanto, a biodisponibilidade do fósforo, ou a proporção do nutriente presente no alimento que é absorvida e utilizada nas funções biológicas, também é variável entre os diferentes ingredientes alimentares, evidenciando-se a necessidade de estratégias para a sua suplementação nas dietas.

Algumas funções do fósforo no organismo animal são as seguintes (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982):

- é constituinte dos ácidos nucléicos DNA e RNA que controlam a hereditariedade e o crescimento;

- participa na transferência e utilização da energia necessária ao metabolismo celular, como componente do ATP, ADP e AMP;
- é componente das membranas, como constituinte lipídico, sob a forma de fosfolipídios;
- participa da construção do esqueleto animal, suporte do crescimento dos órgãos e dos músculos;
- nos animais poligástricos (ruminantes), exerce papel fundamental no metabolismo de manutenção e crescimento dos microrganismos ruminais;
- participa no metabolismo das proteínas e de outros elementos;
- faz parte das produções animais (leite, ovos, carne).

As fontes de fósforo são diversas, mas as alimentares ou orgânicas propriamente ditas, atendem a apenas 30% da demanda, tanto pela sua baixa concentração nos alimentos de origem vegetal (NRC, 1984), de maneira geral, quanto pela indisponibilidade parcial biológica do elemento para a absorção intestinal. As principais fontes de fósforo inorgânico são: fosfato bicálcico (23% de Ca e 18% de P); farinha de ossos e farinha de carne, que apresentam aproximadamente 80% ou mais do elemento em disponibilidade, além do fosfato de rocha, que contém 60% a 80% de fósforo disponível. Utiliza-se normalmente o fosfato bicálcico como suplemento na formulação de dietas, cujo custo é relativamente alto (LÓPEZ *et al.*, 1997).

Para aves e suínos a utilização do fósforo depende da forma como este encontra-se na dieta, em virtude da disponibilidade dos fitatos (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

As alternativas de baixo custo, no entanto, devem ser avaliadas quanto aos seus benefícios. Da mesma forma, deve-se avaliar o uso de coadjuvantes digestivos importantes como as enzimas, buscando-se a melhoria do aproveitamento do fósforo e de outros nutrientes dietéticos importantes.

Após a ingestão de nutrientes como o fósforo, por exemplo, uma parte pode permanecer sem ser absorvida, podendo ser eliminada nos excrementos (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

O excesso de fósforo no solo e nas águas produz um efeito negativo nos ecossistemas, resultando na eutrofização dos mananciais, com crescimento de

algas, redução de oxigênio da água e morte de peixes e outros organismos. O impacto ambiental é tão negativo que resultou em rigorosa legislação ambiental restritiva à pecuária, havendo redução do rebanho suinícola na Holanda e fechamento ou transferência para outros estados de dezenas de produtores da Flórida, EUA.

### 3.4 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

São inúmeros os processos tanto de produção como de preservação de alimentos por fermentação que datam há centenas de anos e que ainda são utilizados nos dias de hoje (LIMA, 1987; GERMANO, 2000). O uso da fabricação do molho de soja através do processo “koji” no Japão e sudeste da Ásia foi desenvolvido há mil anos a.C. e há três mil anos a.C. anos na China (SOCCOL, 1994a; PANDEY, 1992; RAIMBAULT, 1997).

A fermentação no estado sólido foi provavelmente o método mais antigo que o homem utilizou para obter benefícios dos microrganismos (HESSELTINE, 1997).

O termo fermentação no estado sólido (FES), tradução do inglês “solid state fermentation” ou “solid state culture” é objeto de numerosas definições: RAIMBAULT (1980 e 1997), LONSANE *et al.* (1985), MUDGETT (1986); ORIOL (1987) e PANDEY *et al.* (2001); definiram como a fermentação na qual o crescimento do microrganismo em substratos sólidos ocorre na ausência de líquido na forma livre.

Segundo ROUSSOS *et al.* (1997) a FES é um processo microbiano que geralmente ocorre na superfície de materiais sólidos os quais possuem a capacidade de absorver água, podendo ou não conter nutrientes solúveis e ser ou não biodegradáveis.

#### 3.4.1 Características da Fermentação no Estado Sólido

Os substratos-suportes empregados na FES na maioria das vezes são produtos de origem agrícola ou agroindustrial de características estruturais e nutricionais complexas (RAIMBAULT, 1997). Essa heterogeneidade dificulta a

caracterização da FES e interfere na reprodutibilidade das determinações analíticas dos diferentes parâmetros (MUDGET, 1986; GERMANO, 2000). A presença de misturas de componentes de alto e baixo peso molecular nos substratos podem levar a diversos padrões de indução, repressão e inibição na regulação dos metabólitos microbianos (MUDGET, 1986).

A composição básica dos substratos sólidos está formada por biomoléculas, tais como: carboidratos, proteínas e lipídeos, os quais representam as formas de energia para o desenvolvimento microbiano. A utilização dessas biomoléculas requer a síntese e secreção de enzimas hidrolíticas por parte do microrganismo (RAIMBAULT, 1997; GERMANO, 2000).

O material sólido é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa, o que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade, conferindo porosidade conveniente ao desenvolvimento microbiano (SOCCOL, 1994a). Segundo LONSANE *et al.* (1985) e RAIMBAULT (1997), a metodologia empregada no desenvolvimento de um processo de FES em geral é simples e pode ser resumido nos seguintes pontos:

- *preparação do substrato sólido*: o substrato passa por um pré-tratamento para diminuir o tamanho da partícula ou aumentar a disponibilidade de nutrientes para o microrganismo. Nessa etapa o substrato-suporte pode ser suplementado com nutrientes e ter o pH ajustado;
- *cocção do substrato*: o substrato geralmente é esterilizado, mas pode ser pasteurizado ou ainda utilizado sem qualquer tipo de tratamento térmico. Esse procedimento provoca a absorção de água pelas partículas do substrato-suporte;
- *preparação do inóculo*: pode ser realizado pela técnica de cultivo misto proveniente de uma fermentação anterior ou por técnicas de cultivos puros com cepas selecionadas;
- *inoculação do substrato-suporte*: o material sólido umedecido é inoculado com uma solução de esporos de concentração conhecida;
- *incubação*: o substrato-suporte inoculado é acondicionado em biorreatores com temperatura controlada;

- *recuperação das biomoléculas produzidas*: o material fermentado é retirado do biorreator e pode ser desidratado ou enviado para a etapa de recuperação e purificação das biomoléculas.

### 3.4.2 Fatores que Influenciam na Fermentação no Estado Sólido

A produtividade de um sistema de fermentação em estado sólido é afetada por diversos fatores, como por exemplo: a umidade e atividade de água, a temperatura, o microrganismo, a aeração e o pH.

#### 3.4.2.1 Umidade e atividade de água

Segundo LIMA *et al.* (1987), a água não constitui um nutriente, mas é indispensável para o crescimento microbiano. Com exceção dos protozoários, os microrganismos nutrem-se pela passagem de substâncias em solução através da membrana citoplasmática.

A atividade de água ( $A_w$ ) pode ser definida como a água livre, e seu valor pode ser expresso pela relação entre a pressão de vapor de água em equilíbrio sobre o produto e a pressão de vapor da água pura, à mesma temperatura (BOBBIO, 1992). Os tipos de microrganismos que podem desenvolver-se na FES, geralmente são determinados pelo fator de atividade de água (BRAND, 1999).

A água é um dos fatores de grande importância na FES. A água livre, indispensável ao crescimento dos microrganismos é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (SOCCOL, 1994a).

Na FES a quantidade de água presente no meio é função da capacidade de retenção da fase sólida e este teor de água deve ser suficiente para o desenvolvimento dos microrganismos ( PANDEY, 1992).

A quantidade de água presente varia em função do material utilizado. Os substratos amiláceos são geralmente fermentados com umidade inicial entre 25 e 65%, enquanto que os substratos lignocelulósicos permitem trabalhar com teores mais elevados, entre 60% e 80% (SOCCOL, 1994a).

### 3.4.2.2 Temperatura

Para todos os microrganismos existem três temperaturas cardeais: temperatura mínima, abaixo da qual não há crescimento; temperatura máxima, acima da qual não há crescimento e temperatura ótima, onde o crescimento é máximo (LIMA, 1987).

A temperatura ótima para a fermentação varia de acordo com o microrganismo, mas na maioria das vezes o intervalo de temperatura permanece entre 25 e 35° C (PRESCOTT E DUNN, 1959; SOCCOL, 1998a).

Durante o metabolismo dos microrganismos há a geração de calor. A cada mol de CO<sub>2</sub> produzido durante a oxidação são liberadas 673 Kcal. Muitas vezes o gradiente térmico gerado na FES ultrapassa os limites de transferência de calor pelo substrato, por isso, nos processos de FES em grande escala, a remoção do calor é um fator crucial (RAIMBAULT, 1997).

### 3.4.2.3 Microrganismos

Cerca de 50% dos microrganismos utilizados nos processos de FES pesquisados nos últimos 20 anos pertencem aos fungos filamentosos, sendo que o restante 30% são leveduras, 15% *actinomyces* e 5% bactérias (GUTIÉRREZ – ROJAS, *et al.* 1995).

O estado sólido da matéria na FES oferece grandes condições quando fungos são utilizados nesse tipo de processo (HESSELTINE, 1987). Eles são diferentes de outros microrganismos, pois tipicamente crescem ao natural em substrato sólido, assim como pedaços de madeira, sementes, caules, raízes, frutas e partes secas de animais como couro, ossos e material fecal (AIDOO *et al.*, 1982).

Os fungos filamentosos adaptam-se melhor nos processos de FES e atualmente estão sendo amplamente utilizados nesses processos devido as suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas.

#### 3.4.2.4 Aeração

A aeração promove um maior desenvolvimento da massa dos microrganismos aeróbios e facultativos (LIMA *et al.*, 1987).

Segundo RAIMBAULT (1997) e MACHADO (2000) o gás ambiente pode afetar significativamente os níveis de biomassa e metabólitos produzidos pelo microrganismo. A aeração presta-se a quatro funções principais nos processos de FES: manter condições de anaerobiose; facilitar a dessorção de CO<sub>2</sub>; regular a temperatura e umidade do substrato.

Para a produção de enzimas e metabólitos, não só a aeração, mas também as pressões parciais de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> desempenham um papel importante na FES (SOCCOL, 1994a).

#### 3.4.2.5 pH

Segundo LIMA *et al.* (1987), assim como para a temperatura há um pH ótimo, máximo e mínimo para o desenvolvimento dos microrganismos, sendo que a maioria desenvolve-se melhor em pH neutro e algumas exceções em pH ácido.

O pH da fermentação pode afetar tanto o crescimento do microrganismo quanto a produção e a estabilidade dos metabólitos obtidos (GERMANO, 2000).

RAIMBAULT e ALAZARD (1980) mencionam a utilização de sais minerais para agirem como tampões para o meio de cultivo. Como exemplo pode-se citar a utilização de uma mistura de sulfato de amônio e uréia em proporções adequadas que permite a estabilização do pH tornando-o favorável para o desenvolvimento do *Aspergillus niger*.

Segundo RAIMBAULT e ALAZARD (1980) é possível na FES fixar um valor de pH inicial para obter um rendimento ótimo, porém o pH do meio sofre uma alteração durante o processo fermentativo em razão da atividade metabólica do microrganismo, da fonte de nitrogênio utilizada e do grau de crescimento alcançado pelo cultivo que é de difícil controle.

A produção de metabólitos como ácidos orgânicos, por exemplo, e o consumo dos sais de amônio causam a diminuição do pH, por outro lado, a assimilação de ácidos inorgânicos podem levar ao aumento do pH. Na FES a

dificuldade de homogeneização da massa em fermentação pode dificultar a uniformização do pH do meio (RAIMBAULT, 1997).

RAIMBAULT E ALAZARD (1980) consideram que o bom poder tampão dos substratos sólidos não permite que ocorram variações extremas nos valores de pH durante a FES.

O controle do pH nas fermentações no estado sólido é difícil e na prática não é considerado (SOCCOL,1994a). A forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida satisfatória de pH. Geralmente a medida do pH é feita após fazer uma suspensão de uma parte da amostra sólida em 3 a 4 partes de água. Esse método permite medir o pH global, porém não é totalmente representativo dos valores de micro-pH localizados no filme aquoso (SOCCOL,1994a).

### 3.4.3 Vantagens e Desvantagens da Fermentação no Estado Sólido

Segundo MUDGET (1986), HESSELTINE (1987) e PANDEY *et al.* (2001), as vantagens e desvantagens da FES, em relação a fermentação em meio líquido, podem ser resumidas nos seguinte pontos:

◆ Vantagens:

- podem ser agregados nutrientes suplementares aos substratos sólidos;
- em geral os pré-tratamentos aplicados ao substrato-suporte são simples, de baixo custo e são realizados com o único objetivo de auxiliar o acesso deste ao microrganismo;
- os volumes dos biorreatores são pequenos em relação ao rendimento do produto, em razão de que a água está concentrada no substrato-suporte, o que poderá implicar num menor investimento;
- pode-se utilizar esporos como inóculo e, portanto, não se requer etapas prévias que envolvam grandes volumes e tanques para o seu desenvolvimento;
- a baixa umidade e/ou atividade de água reduz o problema de contaminação especialmente no caso de bactérias. A possibilidade de utilizar inóculos muito mais concentrados que na fermentação em meio

líquido, pelo qual as possíveis contaminações se vêem inibidas, permite que os processos de FES se desenvolvam em condições de menor assepsia que nos processos em meio líquido;

- os processos de purificação dos produtos se vêem simplificados pela maior concentração no líquido de extração.

◆ Desvantagens:

- na FES a produção de calor muitas vezes é indesejável. Em meios muito ricos em substratos carbonados facilmente assimiláveis, há uma liberação de calor importante;
- poucos sensores permitem na FES a medida do pH, umidade, oxigênio dissolvido, dióxido de carbono e atividade de água.
- as modificações físico-químicas do meio de cultura são difíceis de serem acompanhadas e controladas.

### 3.5 FUNGOS

Durante muito tempo, os fungos foram considerados como vegetais e, somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte denominado *Fungi* (TRABULSI *et al.*, 1999).

Os fungos apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; não têm celulose na parede celular, exceto alguns fungos aquáticos; e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais (TRABULSI *et al.*, 1999 e PELCZAR *et al.*, 1996).

Todas as células fúngicas são eucarióticas, isto é, possuem núcleo com membrana nuclear separado do citoplasma (PELCZAR *et al.*, 1996; TRABULSI *et al.*, 1999).

Alguns podem ser microscópicos em tamanho, enquanto outros são muito maiores, como os cogumelos e fungos que crescem em madeira úmida ou no solo. Entre os fungos classificados como microrganismos estão aqueles que são multicelulares, produzem estruturas filamentosas microscópicas e são chamados de bolores, enquanto as leveduras são fungos unicelulares (PELCZAR *et al.*, 1996; RAVEN, 1996; TRABULSI *et al.*, 1999).

As colônias leveduriformes são, de maneira geral, pastosas ou cremosas e caracterizam o grupo das leveduras. As colônias filamentosas, que caracterizam os bolores, podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas e com os mais variados tipos de pigmentação (TRABULSI *et al.*, 1999).

Os fungos não são capazes de ingerir alimentos, mas devem absorver os nutrientes dissolvidos no ambiente (PELCZAR *et al.*, 1996).

Um microrganismo para ser utilizado em fermentações em escala industrial, além de ser capaz de produzir a substância de interesse, deve também ser um organismo geneticamente estável, crescer e produzir o metabólito desejado em grande escala (MADIGAN, *et al.* 2000).

### 3.5.1 Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos são constituídos, fundamentalmente, por elementos multicelulares em forma de tubo – as hifas que podem ser contínuas, não-septadas ou cenocíticas e septadas, e ainda podem conter esporos. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. O micélio que se desenvolve no interior do substrato, funcionando também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado micélio vegetativo. O micélio que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo, onde forma-se as estruturas reprodutoras (TRABULSI *et al.*, 1999 e LIMA *et al.*, 1987).

O modo de reprodução dos fungos assume fundamental importância em sua caracterização morfológica, uma vez que diferentes tipos de reprodução traduzem-se em diferentes tipos morfológicos (TRABULSI *et al.*, 1999). Segundo o mesmo autor, os fungos produzem esporos sexuados e assexuados. Os esporos sexuados são produzidos como um resultado da fusão de duas células reprodutivas

especializadas chamadas gametas em uma célula fertilizada. A formação dos esporos assexuados não envolve fusão de gametas. Os esporos assexuados são normalmente brancos quando recém-produzidos, mas adquirem uma cor característica com a idade. Por exemplo, os esporos de colônias de *Penicillium notatum* são tipicamente azul-esverdeadas, enquanto os dos *Aspergillus niger* na maioria são negros.

A classificação dos fungos baseia-se primariamente nos seguintes critérios (PELCZAR *et al.*, 1996):

- características dos esporos sexuais e corpos de frutificação presentes durante os estágios sexuais dos seus ciclos de vida;
- natureza de seus ciclos de vida;
- características morfológicas de seu micélio vegetativo ou de suas células.

Muitos fungos produzem esporos sexuais e corpos de frutificação somente sob certas condições ambientais. Aqueles que possuem todos os estágios sexuais são denominados fungos perfeitos, e os que não possuem, fungos imperfeitos. Os fungos imperfeitos são classificados arbitrariamente e são colocados provisoriamente em uma classe especial denominada *Deuteromycetes*. Quando seu ciclo sexual é descoberto posteriormente, são reclassificados entre as outras classes e recebem novos nomes (PELCZAR *et al.*, 1996).

Embora o micélio vegetativo não tenha especificamente funções de reprodução, alguns fragmentos de hifa podem se desprender do micélio e cumprir funções de propagação, uma vez que as células fúngicas são autônomas. Esses elementos são denominados blastoconídios, artroconídios, clamidoconídios e esclerotos (TRABULSI *et al.*, 1999).

O micélio vegetativo dos fungos filamentosos sofre transformações em determinados pontos, formando uma estrutura de reprodução, o micélio reprodutivo, de importância fundamental na identificação morfológica de muitas espécies. Os propágulos formados no micélio reprodutivo podem ter origem assexuada ou sexuada (TRABULSI *et al.*, 1999).

### 3.5.2 Nutrição

As necessidades nutritivas dos microrganismos são as mesmas que as de todos os seres vivos e precisam de fontes de energia e fontes de material plástico para a sua sobrevivência. Para a renovação da matéria viva, os elementos quantitativamente mais importantes são o carbono, o hidrogênio, o nitrogênio, o enxofre e o fósforo (LIMA *et al.* 1987).

Os protozoários, os fungos e a maioria das bactérias são quimiossintéticos, obtendo energia por meio de reações químicas onde os substratos são oxidados havendo o desprendimento de energia (LIMA *et al.* 1987).

## 3.6 POLPA CÍTRICA

Brasil é um grande gerador de produtos agrícolas industrializados. A agroindústria brasileira teve um crescimento de 2,5% em 2001. Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) o resultado da agroindústria ficou 1 ponto percentual acima do crescimento médio da indústria nacional (1,5%) em 2001.

Portanto, no cenário nacional existem inúmeras oportunidades para o estabelecimento de atividades industriais voltadas ao beneficiamento e/ou reprocessamento de biorresíduos, entre os quais podem ser citados como exemplo o bagaço de cana e de mandioca, a casca do coco de babaçu, a palha de cereais, o bagaço da laranja, a polpa da maçã, farelo de trigo, soja e arroz, o caule e o sabugo do milho, a serragem, diversos tipos de papéis recicláveis e outros resíduos de atividades florestais.

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos dá origem a substratos alternativos e também auxilia na resolução de problemas de poluição ambiental. Foram desenvolvidos muitos processos com a utilização de produtos químicos e produtos de alto valor comercial como etanol, cogumelos comestíveis, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários e outros (PANDEY *et al.*, 1999; SOCCOL, C. R., 2000).

Segundo a Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos (ABECITRUS, 1998) os cítricos teriam surgido no leste asiático, nas regiões que hoje incluem Índia, China, Butão, Birmânia e Malásia. Ela foi levada para o norte da África e de lá para o sul da Europa, onde teria chegado na idade média. Da Europa foi trazida para América aproximadamente no século XVI, sendo que no Brasil apareceram as primeiras árvores entre 1530 e 1540.

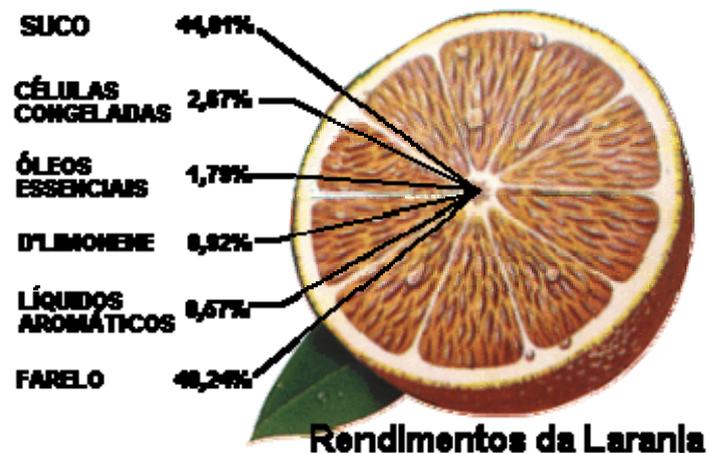
Atualmente, os pomares mais produtivos estão nas regiões de clima tropical e subtropical, destacando-se o Brasil, Estados Unidos, China e África do Sul (MEJÍA e FERREIRA, 2000).

A partir da década de 80 o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de laranjas, superando inclusive os Estados Unidos, concentrando-se no Estado de São Paulo a produção de laranja, sendo responsável por 98% da produção nacional. No Brasil o setor, que emprega cerca de 400 mil pessoas, é a atividade essencial para 204 municípios paulistas e alguns do triângulo mineiro, gera divisas da ordem de US\$ 1,5 bilhões por ano, responde por 53% do suco de laranja produzido no mundo e por 80% do suco concentrado que transita pelo mercado internacional (ABECITRUS, 1998).

O suco é o principal produto da laranja (figura 4), porém vários subprodutos, com valor comercial, são obtidos durante o seu processo de fabricação. Entre esses subprodutos estão os óleos essenciais, o limoneno e o farelo de polpa cítrica. Eles possuem diferentes aplicações no mercado interno e externo, as quais incluem fabricação de produtos químicos e solventes, aromas e fragrâncias, tintas, cosméticos e complemento para ração animal (CARGILL, 2002).

Devido as suas características físicas e químicas e aos resultados das avaliações nutricionais, as polpas de beterraba e de cítricos vêm recebendo grande atenção como recursos alimentícios potenciais a serem incorporados às dietas dos animais domésticos substituindo parcialmente os grãos de cereais.

FIGURA 4 – RENDIMENTOS DA LARANJA

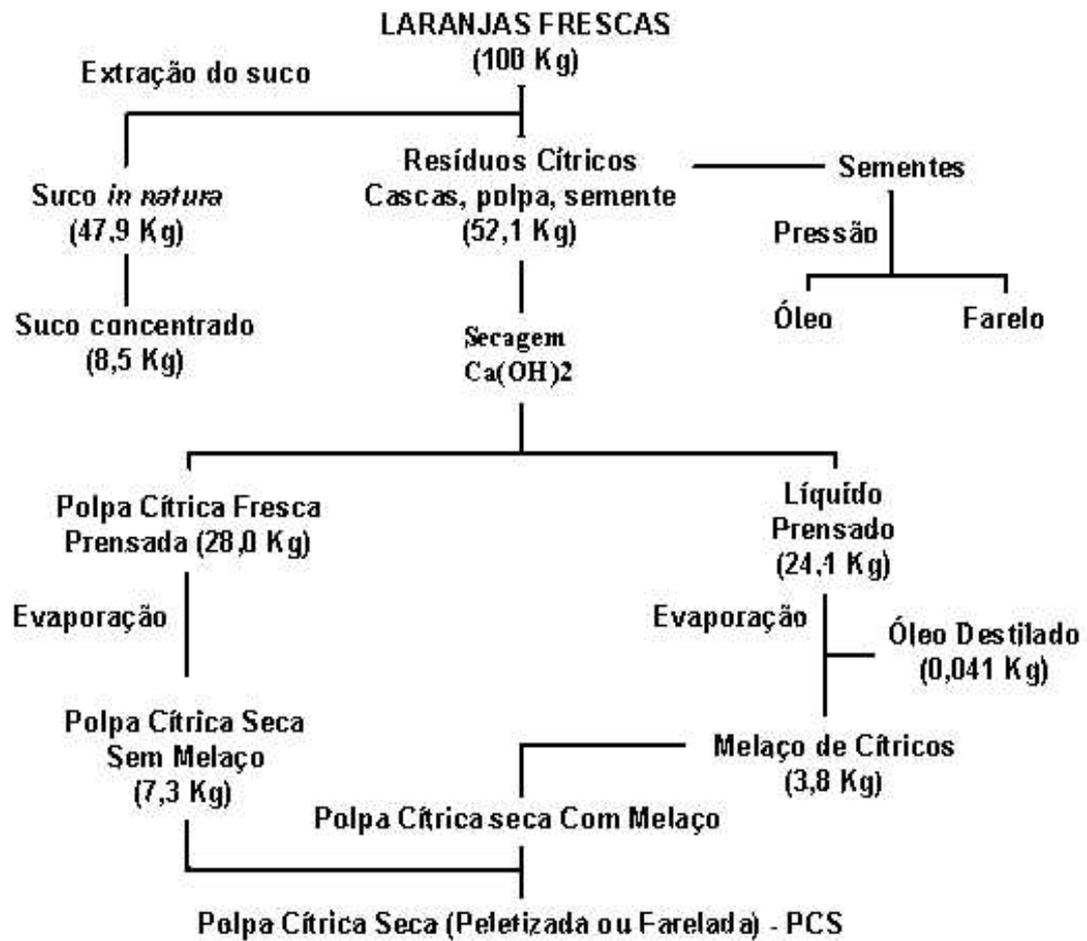


FONTE: ABECITRUS, 2002

A polpa cítrica é o resíduo das fábricas de sucos, conservas ou outros produtos de frutos cítricos destinados ao consumo humano. É composta pela casca, bagaço e sementes (Figura 5). Pode ser utilizada na alimentação animal em condições naturais contendo grande quantidade de água ou pode ser ensilada. Para ser adicionada em rações há a necessidade de passar um processo de secagem sendo então comercializada como polpa cítrica seca (PCS) (Figura 6) (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

A PCS é pobre em proteína e em fósforo, porém é rica em nutrientes digestíveis totais como pode ser visto na Tabela 1 (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DA POLPA CÍTRICA



FONTE: (MEJÍA E FERREIRA, 2000)

FIGURA 6 – POLPA CÍTRICA PELETIZADA



FONTE: CARGILL,2002

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CONTEÚDO DE ENERGIA BRUTA DE PCS DE ORIGEM BRASILEIRA

Componente <sup>1</sup>	PCS (Safra1) Giraldo(1999) <sup>3</sup>	PCS (Safra2) Giraldo(1999) <sup>3</sup>	EMBRAPA(1991)
Matéria Seca	85,840	84,500	82,44
Matéria Orgânica	79,090	79,520	----
Nitrogênio Total	1,062	1,136	----
Nx6,25	6,640	7,100	6,30
Extrato de Etéreo	2,540	2,920	3,93
Fibra Bruta	12,520	11,850	10,86
Fibra em Detergente Neutro	19,920	20,370	----
Fibra em Detergente Ácido	23,690	24,010	----
Lignina	1,120	1,060	----
Celulose	22,400	22,680	----
NIDA (% do Nitrogênio Total)	11,249	10,790	----
Cinzas	6,750	4,980	5,84
Cálcio	1,990	2,050	1,53
Fósforo	0,185	1,907	0,11
Energia Bruta (kcal/kg)	3743,000	3693,230	3654,00

FONTE: MEJÍA E FERREIRA, 2000

(1) Todos os valores estão expressos na matéria natural.

(2) Exceto a Energia Bruta todos os outros componentes estão expressos em percentagem.

(3) Análise realizadas no Lab. de Nutrição Animal do Deptº. de Zootecnia, Escola de Veterinária – UFMG.

Embora o Brasil seja o primeiro produtor mundial de polpa cítrica seca (PCS), o que garante sua disponibilidade no mercado nacional e um fornecimento permanente aos produtores, e que várias pesquisas têm sugerido que é altamente positivo o seu uso controlado na alimentação de ruminantes e em herbívoros não ruminantes, são ainda limitados os estudos realizados em suínos (MEJÍA E FERREIRA, 2000).

Na Tabela 2 são mostrados os valores nacionais exportados de polpa cítrica:

TABELA 2- EXPORTAÇÃO BRASILEIRA DE POLPA CÍTRICA

Farelo de Polpa Cítrica	Exportação (em toneladas)
Safra 1996/97	1.182.396
Safra 1997/98	1.291.705
Safra 1998/99	1.480.053
Safra 1999/00	998.413
Safra 2000/01	769.731
Safra 2001/02	712.031

FONTE: ABECITRUS

As poucas pesquisas desenvolvidas no Brasil com o objetivo de avaliar seu uso na alimentação de suínos datam da década de setenta e mostraram que os suínos em crescimento e terminação podem ser alimentados com até 20% de polpa cítrica do total da dieta sem afetar significativamente o rendimento zootécnico (VELLOSO *et al.*, 1974).

### 3.7 ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS MONOGÁSTRICOS

As décadas posteriores à segunda guerra mundial vieram acompanhadas de aumentos significativos na produção de carnes e ovos procedentes da exploração de suínos e aves atrelada ao uso cada vez maior de grãos de cereais, fontes de proteína vegetal e, recentemente, de origem animal (MEJÍA e FERREIRA, 2000).

Entretanto, nos últimos anos tem-se questionado a sobrevivência destes tipos de sistemas, que dependerão basicamente de duas condições: da capacidade dos animais de consumirem e utilizarem fontes alternativas de nutrientes e energia não aceitáveis pelas sociedades humanas mas que por serem às vezes de baixo custo poderiam constituir parte de suas dietas (POND, 1989) e, por outro lado, do emprego de estratégias de alimentação que visem diminuir o impacto da produção animal sobre o meio ambiente (DURMAD *et al.*, 1995).

A utilização de alimentos alternativos aos grãos de cereais e fontes protéicas vegetais e animais de elevada qualidade é uma opção econômica, ambiental e social. Contudo, as possibilidades de incorporação de qualquer recurso alternativo dentro das estratégias de alimentação nos atuais sistemas de produção dependem de vários fatores: da garantia que tenham os produtores de dispor de quantidades suficientes, regulares e sustentáveis do recurso; dos níveis de produção dos alimentos tradicionalmente empregados na produção animal; da competição com os outros usos alternativos; do nível de segurança que traga sua utilização à saúde humana e animal; dos custos e rendimentos marginais comparativos do recurso e dos alimentos tradicionais e o seu valor nutricional (BOUCQUÉ e FIEMS, 1988).

Existem grandes variações na capacidade de utilização dos diversos tipos de alimentos, em função das diferenças anatômicas e fisiológicas existentes nos tratos digestivos das diferentes espécies animais. As aves e os suínos concorrem diretamente com o homem ou com a demanda das indústrias para grande parte de seu alimento, tornado mais difícil solucionar a alimentação econômica dessas espécies, pois ambas precisam receber uma ração altamente digestível para obterem rendimento ótimo (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

Muitos destes nutrientes presentes nos alimentos para animais não podem ser completamente digeridos e utilizados, especialmente pelos animais monogástricos, pois existem alguns fatores presentes na composição do próprio alimento que impede o seu aproveitamento completo. Por exemplo, em quase todos os materiais de origem vegetal utilizados para a alimentação animal, grande parte do fósforo mineral está limitado na forma de ácido fítico que não pode ser degradado pelos animais monogástricos.

### 3.7.1 Produção de Aves e Suínos

Na década de noventa a produção mundial de carnes cresceu 20,2%, sendo que a carne de frango apresentou o melhor desempenho com 45,4% de aumento, seguida da carne suína com 29,0%. Nesse período, a produção de carne bovina, apresentou um declínio, passando de 51,8 milhões de toneladas para 49,1 milhões de toneladas, como pode ser visto na Tabela 3 (COELHO e BORGES, 1999).

TABELA 3 - PRODUÇÃO MUNDIAL DE CARNES (milhões de toneladas)

CARNES	PERÍODO								
	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
<b>Suína</b>	65,8	67,2	68,9	70,0	71,9	75,8	79,3	80,8	83,6
<b>Bovina</b>	51,6	51,4	50,6	48,0	48,3	48,7	49,5	50,0	49,9
<b>Frango</b>	27,4	29,0	30,3	30,9	32,6	34,7	36,4	38,6	39,2
<b>Total</b>	144,8	147,6	149,8	148,9	152,8	159,2	165,2	169,4	172,7

FONTE: USDA

A produção avícola em escala industrial no Brasil iniciou-se na década de trinta. Antes dessa data a criação de aves restringia-se à criação caseira, com baixos índices de produtividade, basicamente para autoconsumo. Os pequenos excedentes eram vendidos abatidos ou vivos nas feiras ou mercados centrais dos centros urbanos (COELHO e BORGES, 1999).

A partir da década de 50, a produção avícola industrial brasileira evoluiu significativamente, atingindo 217 mil toneladas em 1970, 1,2 milhões de toneladas em 1980, e 4,5 milhões de toneladas em 1998. O consumo *percapita* cresceu mais de 1000% passando de 2,3 kg em 1970 para 23,4kg em 1998. O consumo *percapita* das demais proteínas animais evoluiu mais lentamente. O de carne bovina passou de 12,1 kg para 29,6 kg o que representa um incremento de 147% e o de carne suína ficou praticamente estagnado, passando de 8,1kg para 9,1 kg (COELHO e BORGES, 1999).

No Paraná a indústria de processamento de aves encontra-se em expansão. De acordo com a Associação Brasileira dos Exportadores de Frango (ABEF), os frigoríficos paranaenses abateram 672,0 milhões de cabeças no de 2001, resultado

que representou incremento de 11,1% em comparação a 2000 e que garantiu a primeira posição entre os estados brasileiros, com uma participação de 23,8% do total nacional (SUZUKI, 2002).

Em 2001, as exportações paranaenses de carne de aves totalizaram US\$ 347,0 milhões, valor que correspondeu a um aumento de 52,4% em relação ao ano anterior, quando as receitas somaram US\$ 227,8 milhões. Já no decênio 1991-2000, as vendas estaduais do produto apresentaram elevação da ordem de 160,2%, superando as exportações brasileiras e mundiais, que atingiram variações de, respectivamente, 121,2% e 79,3% no período. O principal mercado da carne de frango produzida no Paraná é a Arábia Saudita, cujas importações somaram US\$ 88,8 milhões no ano passado, seguido Japão, Kuwait e Holanda (SUZUKI, 2002).

A produção mundial de carne suína em 2001 cresceu a taxa de 2,4% sobre o ano anterior. Segundo dados publicados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) foram produzidos 83.220 milhões de toneladas, destacando-se a China como maior produtor de carne suína, com uma participação de mais da metade da produção mundial, 51%. O Brasil, ainda em fase de crescimento, foi responsável por 2,5% da produção mundial (PORKWORLD, 2002)

Na Tabela 4 é possível visualizar os maiores exportadores mundiais de carne suína, sendo que o Brasil ocupou a quarta colocação:

TABELA 4 - MAIORES EXPORTADORES DE CARNE SUÍNA (MIL TONELADAS)

PAÍSES	2000	2001	2002*
<b>União Européia</b>	1.470	1.220	1.320
<b>Canadá</b>	656	710	730
<b>Estados Unidos</b>	592	699	649
<b>Brasil</b>	127	265	350
<b>China</b>	73	110	145
<b>Outros</b>	503	539	568
<b>Total</b>	3.457	3.518	3.762

\*Estimativa

Fonte: USDA-ABIPECS

Na Tabela 5 constam as exportações brasileira, sendo que a Rússia foi o país que mais importou carne suína no ano de 2001.

TABELA 5 - EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE CARNE SUÍNA – POR DESTINO, EM TONELADAS

<b>Exportações Brasileiras de Carne Suína - por Destino em Toneladas</b>			
<b>Países</b>	<b>2001</b>		
<b>Rússia</b>	205.921	151.857	13.356
<b>Hong Kong</b>	57.377	47.642	1.204
<b>Argentina</b>	57.046	38.678	1.475
<b>Uruguai</b>	12.029	8.614	1.397
<b>Países Baixos</b>	6.569	4.654	1.411
<b>Lituânia</b>	4.021	2.706	1.486
<b>Cingapura</b>	3.257	1.787	1.823
<b>Antilhas Holandesas</b>	2.587	2.084	1.241
<b>Alemanha</b>	1.864	1.279	1.458
<b>Outros</b>	8.671	6.200	1.399
<b>Total</b>	<b>359.342</b>	<b>265.500</b>	<b>1.353</b>

FONTE: FNP/SECEX/DECEX

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2001, o Paraná detinha a 3ª posição nacional em rebanho de suínos.

De acordo com a Secretaria de Comércio Exterior (SECEX) a carne suína tornou-se no primeiro semestre de 2002, o produto com maior crescimento na pauta das exportações do estado do Paraná. A quantidade de peças inteiras e meia peças, que representava 0,03% do conjunto das exportações do estado, subiu de 682 mil toneladas para 8,2 milhões de toneladas, passando a ter uma equivalência de 0,4% da pauta das vendas externas paranaenses.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada nos Laboratórios de Processos Biotecnológicos e no Laboratório de Química Analítica Aplicada do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná.

### 4.1 MICRORGANISMOS

Inicialmente foram testadas cinco cepas de *Aspergillus niger* para os estudos da produção de fitases em FES utilizando a polpa cítrica como primeiro substrato. As cepas de *Aspergillus niger* eram provenientes de diferentes bancos e estão disponíveis no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná:

- *Aspergillus niger* W2;
- *Aspergillus niger* LPB 34;
- *Aspergillus niger* LPB 12;
- *Aspergillus niger* LPB 28;
- *Aspergillus niger* NRRL 599.

Após a escolha do microrganismo que melhor produziu a fitase em polpa cítrica, realizou-se um segundo estudo, no qual inoculou-se o *Aspergillus* selecionado sobre diferentes substratos agrícolas. O objetivo era verificar se o fungo escolhido também era capaz de produzir fitase em outros substratos.

#### 4.1.1 Manutenção das Cepas

As cepas *Aspergillus niger* foram repicadas em meio PDA (ágar batata dextrose) em tubos de ensaio fechados com tampão de algodão previamente esterilizados na temperatura de 121°C por 15 minutos. O meio foi solidificado na posição inclinada.

A incubação foi feita em estufa na temperatura de 28°C por um período que variou de 7 a 8 dias.

O armazenamento das cepas foi feito em geladeira a 4°C por um período máximo de 3 meses.

#### 4.1.2 Preparo da Solução de Esporos

As cepas de *Aspergillus* foram cultivadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de PDA estéril e incubados a 28°C em estufa até ocorrer a esporulação. Os esporos foram coletados com adição de 50 mL de água deionizada contendo gotas de Tween-80 previamente esterilizados, fazendo a remoção por agitação com auxílio de pérolas de vidro e barra magnética em agitador magnético por um período de 10 minutos (Figura 7).

A solução de esporos foi armazenada em temperatura de 4°C (geladeira) por um período máximo de 30 dias para garantir a sua viabilidade.

#### 4.1.3 Contagem da Solução de Esporos

Após a coleta, 1mL da solução de esporos foi retirada assepticamente e transferida para tubos de ensaio com água nas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Os esporos contados em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio óptico.

O número de esporos/mL foi calculado através da equação (1) a seguir:

$$\text{N}^{\circ} \text{ Total de Esporos} = \frac{\text{NTE} \times 1/\text{VR} \times \text{FD} \times 10^{-3}}{\text{NRC}} \quad (1)$$

NTE = Número total de esporos contados em 10 quadrículos

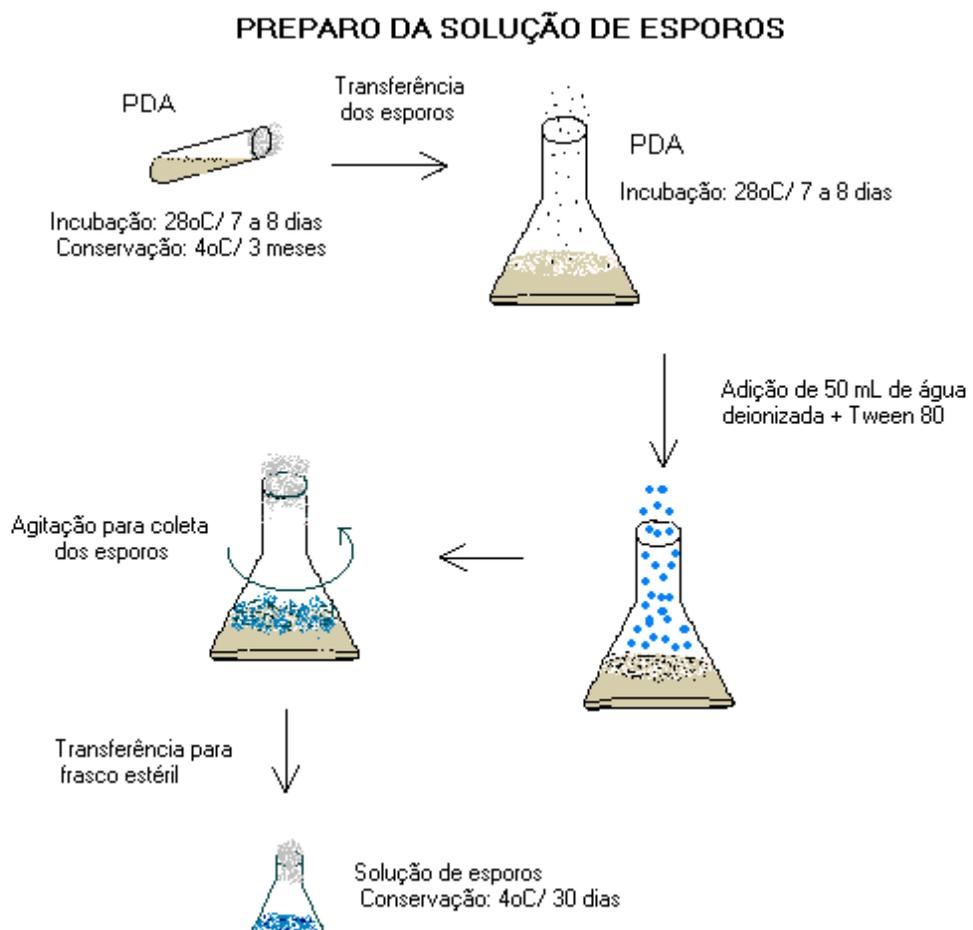
1/VR = Inverso do volume do retículo

FD = Fator de diluição

NRC = Número de retículos contados

As soluções de esporos obtiveram a contagem de  $10^8$  esporos/mL e a taxa de inoculação foi mantida constante para todos os experimentos em  $10^7$  esporos por grama de substrato seco.

FIGURA 7 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE ESPOROS



## 4.2 SUBSTRATOS

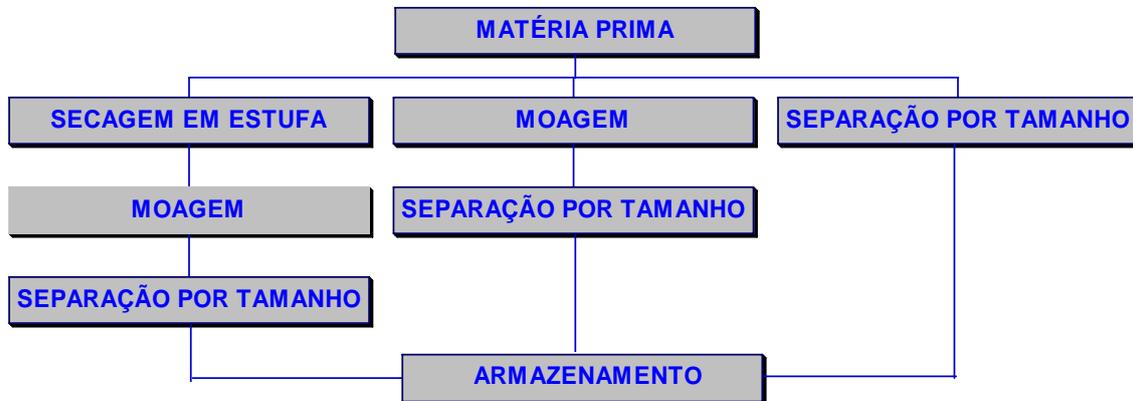
Como substratos da FES, foram testadas matérias-primas da agroindústria nacional:

- Casca de café: cedida pelo Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR (Londrina – PR);
- Bagaço de maçã: cedido pela Agrícola Fraiburgo (Videira – SC);
- Polpa cítrica: cedida pela Cargill – CITROGILL (Uberlândia MG);
- Farelo de mandioca: cedido pela Indústria Lorenz (Quatro Pontes – PR)
- Farelo de trigo: cedido pelo Moinho Guth (Curitiba – PR)
- Farelo de soja: cedido pela Cooperativa Agropecuária Mourãoense – COAMO (Paranaguá – PR);
- Polimento de arroz: cedido por Cerealista Gadotti Ltda ( Rodeio-SC);
- Derivados do milho: Refinazil<sup>®</sup> e Protenose<sup>®</sup> cedidos pela Corn Products Brasil (Balsa Nova – PR);
- Derivados do coco (babaçu): farinha, torta e fibra, cedidos pela Tobasa (Palmas – TO).

### 4.2.1 Preparo dos Substratos

Na figura 8 é mostrado esquematicamente o preparo dos substratos sólidos utilizados nos estudos da FES. A seqüência de preparo depende da umidade inicial e da granulometria do substrato. Assim, substratos com alto teor de umidade passaram inicialmente por um processo de secagem e os substratos com partículas muito grandes foram moídos antes da classificação por tamanho. Substratos já moídos apenas foram peneirados para a classificação por tamanho.

FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO PREPARO DOS DIFERENTES SUBSTRATOS



A granulometria dos substratos utilizada para a realização dos processos de FES foi entre 0,80 e 2,0 mm, valores estes citados na literatura como sendo ideais para o referido processo de fermentação.

#### 4.2.2 Análises Físico-Químicas do Substrato

As análises físico-químicas do substrato relacionadas abaixo foram feitas de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1995). Todas as análises foram feitas em triplicata e expressas em porcentagem.

- Determinação do teor de umidade: foi realizada por método termogravimétrico (100-105°C);
- Determinação do teor de cinzas: foi realizada por método termogravimétrico (500-550°C) de incineração dupla;
- Determinação do teor de lipídeos: foi realizada pelo método de Soxhlet (extração de solvente a quente);
- Determinação do teor de proteínas: foi realizada pelo método de Kjeldahl. O fator de correção utilizado foi 6,25;

- Determinação do teor de fibras: foi realizada pelo método de fibra bruta (gravimetria);
- Determinação do teor de carboidratos: foi realizada pela somatória dos valores dos componentes descritos acima e subtraído de 100.

#### 4.2.2.1 Determinação do pH

Para a determinação dos valores de pH pesou-se 5g do substrato, colocou-se em um béquer de 100 mL e adicionou-se 50 mL de água deionizada e fez-se uma suspensão. Mediu-se o pH do sobrenadante após a decantação com auxílio de potenciômetro (LABSTORE – PL 800) devidamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

#### 4.2.3 Determinação da Capacidade de Absorção Máxima de Água

Como na FES o crescimento dos microrganismos ocorre em substratos sólidos na ausência de líquido na forma livre (RAIMBAULT, 1980 e 1997; LONSANE *et al.*, 1985; MUDGETT, 1986; ORIOL, 1987 e PANDEY *et al.* 2001, torna-se importante conhecer o valor da capacidade de absorção máxima de água do substrato.

A capacidade de absorção máxima foi obtida conforme o método descrito abaixo:

- pesou-se 10 g de substrato com granulometria entre 0,80 e 2,0 mm com umidade conhecida e adicionou-se 100 mL de água, colocou-se a suspensão em uma proveta e anotou-se o volume inicial. Deixou-se em repouso por 12 horas e determinou-se o volume de água que não foi absorvida pelo material sólido. A análise foi feita em duplicata.

A capacidade de absorção máxima de água pelos substratos estudados ficou em torno de 70%.

### 4.3 SELEÇÃO DE CEPAS E SUBSTRATOS PARA FES

Para a escolha da melhor cepa e do melhor substrato para estudo da produção de fitase, foi feito um *screening*, onde a produção da enzima foi avaliada por análise qualitativa dos resultados.

O *screening* é a primeira etapa de uma investigação. Serve para identificar os fatores mais importantes em um determinado experimento, visa reduzir o problema, mostrando quais as variáveis mais importantes e qual a direção a ser tomada nos próximos experimentos (HAALAND, 1989; MACHADO, 2000).

#### 4.3.1 Esterilização dos Meios de Cultura, Materiais e Equipamentos

Visando garantir condições estéreis para o crescimento dos fungos, os meios de cultura, materiais e equipamentos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

#### 4.3.2 Fermentação em Frascos Erlenmeyer

A fermentação foi realizada pelo método de “Fermentação em Estado Sólido” (FES). Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 gramas do substrato com granulometria entre 0,86-2,0 mm, inoculado com a cepa de *Aspergillus* na concentração de  $10^7$  esporos/ grama de substrato, umidade de 70% e adição de uma solução de uréia a 3% como fonte de nitrogênio.

Os fungos precisam de nitrogênio para o seu metabolismo, dentre as fontes mais comuns de nitrogênio encontram-se a uréia, sais de amônio, aminoácidos e peptídeos. Optou-se pelo uso da uréia, porque além de atuar como fonte de nitrogênio esta também tem ação tamponante sobre o meio de cultivo (WAINWRIGHT, 1995; BRAND, 1999; RAIMBAULT, 1997).

A incubação foi feita em estufa a 28°C por 48 horas. O experimento foi feito em duplicata.

Inicialmente tomou-se como substrato a polpa cítrica e fez-se a inoculação com as diferentes cepas de *Aspergillus niger* W2, LPB 34, LPB 12, LPB 28 e NRRL

599. Com a cepa que apresentou o melhor resultado fez-se um segundo experimento, em duplicata, nas mesmas condições descritas acima, onde foram utilizados os diferentes substratos já mencionados anteriormente no item 4.2.

#### 4.3.3 Extração da Enzima

Com os frascos contendo o material fermentado a obtenção do extrato cru da enzima foi realizada como descrito abaixo, conforme sugerido por LEÓN (2000):

- a) Adicionou-se em cada frasco Erlenmeyer contendo o substrato fermentado 50 mL de solução de NaCl a 1% e agitou-se por 1 hora em “Shaker” (agitador rotatório) a 100 rpm em temperatura ambiente;
- b) Os substratos fermentados foram filtrados em tecido e submetidos a pressão mecânica manual;
- c) O filtrado foi centrifugado a 2000 g por 8 minutos;
- d) Envasou-se o sobrenadante, chamado de extrato cru da enzima, o qual foi mantido sob refrigeração (4°C) para posteriores análises de atividade catalítica.

#### 4.3.4 Determinação da Atividade Catalítica da Fitase

A fitase promove a liberação de fosfato inorgânico a partir do seu substrato, o fitato. O fosfato inorgânico reage com o molibdato de amônio formando o complexo “fosfo-molibdato”, o qual é reduzido pelo sulfato ferroso formando um segundo complexo de cor azul chamado de “azul de molibdênio”. A reação pode ser quantificada colorimetricamente, com o auxílio de uma curva-padrão contra concentração de fosfato inorgânico.

O extrato cru obtido no item 4.3.3 foi analisado em relação ao seu poder de hidrólise do fitato. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o extrato cru enzimático e aplicando-o sobre o substrato fitato de sódio, e determinando posteriormente o fósforo inorgânico por espectrometria. A análise foi feita em duplicata.

A determinação da atividade da enzima foi feita de acordo com o método sugerido por LEÓN (2000), apesar de existirem outros métodos descritos por outros pesquisadores, como por exemplo, HARLAND e HARLAND (1980), HAN (1988), WATANABE e OLSEN (1965), DVORÁKOVÁ et al. (1997) e PAPAGIANNI *et al.* (2001).

- a) Em um tubo de ensaio de 20 mL adicionou-se 1 mL de fitato de sódio (Sigma – P-8810) 1,5 mM preparado em tampão acetato 0,2 M (pH=4,8) e 0,5 mL de extrato cru da enzima na diluição 1:10 v/v em água deionizada;
- b) Incubou-se a 60 °C durante 10 minutos em banho-maria;
- c) Adicionou-se 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% (para parar a reação);
- d) Adicionou-se água destilada até completar um volume de 4mL ;
- e) Acrescentou-se 5ml do Reativo Taussky-Schoor (T-S);
- f) Determinou-se a densidade ótica em espectrofotômetro a 660 nm;
- g) Correlacionou-se a concentração de fósforo utilizando-se curva-padrão.

Para todas as medições da atividade catalítica do extrato cru, foi utilizado como “branco” o extrato cru inativo. A inativação foi feita através da temperatura, onde ferveu-se por um minuto uma amostra do extrato cru em forno de microondas.

O procedimento para a utilização do extrato cru inativo ocorreu conforme a técnica descrita acima.

A curva padrão foi feita utilizando-se fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) com intervalo de concentração entre 0,2 – 3,9  $\mu\text{Mol}$  de fosfato/mL

O Reativo de TAUSSKY-SCHOOR (T-S) foi preparado seguindo a metodologia descrita por HARLAND e HARLAND (1980):

- pesou-se 10 gramas de de molibdato de amônio transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com uma solução de ácido sulfúrico 10 N (“solução-mãe”);
- tomou-se 10 mL da “solução-mãe” e colocou-se em balão volumétrico contendo 70 mL de água deionizada, adicionou-se 5 gramas de sulfato ferroso (heptahidratado) e completou-se o volume para 100 mL com água deionizada .

#### 4.3.4.1 Atividade enzimática

A atividade de uma enzima é definida pela quantidade de substrato que é transformado em um intervalo de tempo determinado. Normalmente a atividade é expressa em Unidades Internacionais (UI), onde uma unidade corresponde a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato, por minuto, nas condições definidas da reação. Geralmente utiliza-se temperatura de 30°C, no pH ótimo e nas concentrações ótimas de substratos e ativadores (PETER, *et al.* 1987).

Segundo os mesmos autores, a atividade enzimática pode ser expressa em katal, onde um katal é definido como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 mol por segundo de substrato a 25 °C.

Para se obter um valor da atividade independente da quantidade de enzimas, definiu-se a “atividade específica”, ou seja, a atividade em unidades de enzima por miligrama de proteína. Pode ser obtida dividindo-se a transformação de substrato em micromol por minuto por miligrama de proteína (PETER, *et al.* 1987).

No presente trabalho considerou-se como uma unidade da atividade da fitase (FIT), a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de fosfato inorgânico a partir de um mililitro de ácido fítico na concentração de 1,5mM, por minuto por grama de substrato seco, nas condições de temperatura e pH dados ( ver item 4.3.4).

#### 4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FITASE

Como na FES o número de variáveis é grande, um plano experimental deve ser utilizado. O plano experimental constitui uma metodologia de escolha pela avaliação global de um problema, mas sua utilização implica em restringir um certo número de condições, afim de obter em um mínimo de experiências um grande número de informações válidas ( De MEO *et al.*,1989).

A maior parte dos processos biotecnológicos não possui modelos teóricos que possam ser usados para explicar o desenvolvimento do processo. Sendo assim, uma pesquisa bem sucedida nessa área é caracterizada por resolução do problema

empiricamente. O planejamento e a resolução dos problemas utilizando as ferramentas estatísticas possibilita maximizar a eficiência e produtividade de problemas empíricos (HAALAND, 1989; MACHADO, 2000).

A otimização é a segunda etapa de um experimento, sendo precedida de um *screening*. Consiste na construção de um modelo matemático que possa prever o comportamento do processo investigado, encontrando a região de ótima resposta (HAALAND, 1989; MACHADO, 2000).

Os experimentos com arranjos fatoriais dos tratamentos são aqueles onde o efeito de dois ou mais fatores são investigados ao mesmo tempo. Caracteriza-se um experimento com arranjo fatorial dos tratamentos quando estes representam todas as combinações possíveis de dois ou mais fatores (KOEHLER, 1999).

Os arranjos fatoriais são utilizados em qualquer tipo de delineamento experimental quando deseja-se avaliar o efeito de dois ou mais fatores ao mesmo tempo, o que permite avaliar a interação dos efeitos (KOEHLER, 1999).

#### 4.4.1 Otimização dos Parâmetros para a Produção de Fitase

No presente trabalho, após escolhida a melhor cepa e o substrato que apresentou o melhor resultado para a produção da fitase, foi utilizado um plano fatorial fracionado  $3^{(3-1)}$  (com repetição), com a análise por superfície de resposta, visando verificar a influência de diversos fatores para obter a melhor condição de cultivo. Neste experimento, foram estudados três fatores (umidade, temperatura e pH) e três níveis, conforme mostrado na Tabela 6.

A otimização foi realizada em duplicata nas seguintes condições: por um período de 48 horas, mantendo-se constantes a taxa de concentração de esporos ( $10^7$  esporos/grama de substrato seco) e a adição de solução de uréia a 3%.

TABELA 6 – PARÂMETROS DA OTIMIZAÇÃO

FATORES	NÍVEIS			UNIDADE
	-1	0	+1	
Umidade	60	70	80	%
Temperatura	25	28	31	°C
pH	4,0	4,5	5,0	

Os métodos de extração da enzima e atividade catalítica utilizados constam nos itens 4.3.3 e 4.3.4.

As análises dos resultados foram feitas pela ANOVA (Análise de Variância) utilizando o programa "Statistica" versão 5.0.

#### 4.5 ESTUDO DA PRODUÇÃO DA FITASE EM RELAÇÃO AO TEMPO DE FERMENTAÇÃO

Este estudo teve como objetivo verificar qual o melhor tempo de fermentação para se obter a maior produção da fitase, no qual a enzima deve ser extraída. Realizou-se o experimento em duplicata, utilizando-se as condições otimizadas para a produção da fitase. As amostras para a dosagem da atividade enzimática foram coletadas no tempo zero e, posteriormente, a cada oito horas, perfazendo um total de 72 horas de fermentação. O método para a dosagem enzimática consta no item 4.3.4.

Paralelamente ao estudo da produção da fitase em relação ao tempo de fermentação, foram medidos os valores de pH em cada ponto, conforme descrito no item 4.2.2.1 As análises realizadas foram pH, conforme descrito no item 4.2.2.1.

#### 4.6 ESTUDO DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Uma das dificuldades nos processos de FES é a distribuição irregular das enzimas extracelulares no meio sólido, tornando necessário fazer um estudo da extração da enzima (GERMANO, 1999).

Muitas proteínas são solúveis em água ou em soluções salinas. A solubilidade de uma proteína é muito variável e depende da distribuição e da proporção dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na molécula (UFPR, 1988).

No presente trabalho fez-se um estudo para avaliar as melhores condições para a extração da fitase. Foram feitos dois planejamentos experimentais do tipo arranjo fatorial  $2^2$ , com a análise por superfície de resposta, utilizando-se dois solventes: cloreto de sódio (NaCl) a 1% e água deionizada em quantidades

diferentes (50mL e 100mL ) e foram estudadas duas velocidades de agitação: 100 rpm e 200rpm sendo que o tempo de agitação foi mantido constante sendo igual a 1 hora, conforme mostrado na tabela abaixo:

TABELA 7 – PARÂMETROS PARA A EXTRAÇÃO DA FITASE

FATORES	NÍVEIS		UNIDADE
	-1	+1	
Diluição	50	100	ml
Agitação	100	200	rpm

O programa utilizado para a análise dos resultados da extração foi o “Statistica” versão 5.0.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS - BRADFORD

A determinação de proteínas do substrato fermentado foi feita pelo Método de Bradford, que dosa proteínas solúveis.

As proteínas solúveis são importantes para estudos de purificação enzimática, onde são medidas a atividade da enzima e a atividade específica, que corresponde ao número de unidades por miligrama de proteína. A atividade específica aumenta durante a purificação da enzima (LEHNINGER, 1993).

O método proposto por BRADFORD *et al.* (1976) está baseado na mudança de coloração do *Coomassie Brilliant Blue G-250*, o qual possui duas cores: vermelho e azul. A forma vermelha é convertida em azul, funcionando como um corante para a proteína. O resultado é expresso em miligrama de proteína.

### Reagentes:

- *Solução-mãe*: 100 mg de *Coomassie Brilliant Blue G-250* dissolvido em etanol 95%. Foi adicionado a esta solução 10 ml de ácido fosfórico a 85% e água até completar o volume de 100 mL . A solução foi armazenada em frasco escuro.
- *Solução –padrão de proteína*: albumina bovina 0,1 mg/mL.
- Solução de NaCl (cloreto de sódio) 0,15 M.

### Procedimento:

Tomou-se 0,1 mL de amostra e adicionou-se 1,0 mL da solução-mãe. A mistura foi agitada em vórtex e lida em espectrofotômetro a 595 nm dentro de um período compreendido entre 5 e 10 minutos. O branco foi preparado com NaCl 0,15 M e 1,0 mL da solução-mãe.

## 4.8 ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA FITASE

No presente trabalho foram realizados estudos visando caracterizar a fitase produzida por *Aspergillus niger*, os experimentos estão relacionados abaixo:

### 4.8.1 Temperatura Ótima para a Atividade Enzimática

Para o estudo da temperatura ótima da atividade da fitase, preparou-se o extrato cru enzimático conforme descrito no item 4.3.3 e dosou-se a atividade enzimática de acordo com o item 4.3.4. Porém, foram utilizadas diferentes temperaturas de incubação: 35, 45, 50, 55, 60 e 65°C. O tempo de incubação foi mantido constante (10 minutos).

#### 4.8.2 pH Ótimo para a Atividade Enzimática

Para a verificação do pH ótimo da atividade da fitase fez-se a diluição de 1mL do extrato cru da enzima em 10 mL (1:10 v/v) de soluções tampões com diferentes valores de pH (2,0; 5,0; 7,0 e 9,0), deixou-se em repouso por uma hora em temperatura ambiente e mediu-se a atividade enzimática conforme descrito no item 4.3.4. Como referência, utilizou-se o extrato cru diluído em água deionizada na mesma proporção.

#### 4.8.3 Influência de Cátions e Ânions na Atividade Enzimática

Foram realizados experimentos, onde utilizaram-se soluções 0,2 mM dos seguintes cátions e ânions para verificar a influência destes na atividade da fitase:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ .

O extrato cru enzimático foi diluído 1:10 v/v com as referidas soluções de cátions e ânions, homogeneizado e procedeu-se a dosagem da atividade conforme descrito no item 4.3.4. Como referência, utilizou-se o extrato cru diluído em água deionizada na mesma proporção.

#### 4.8.4 Estabilidade Térmica da Fitase

O estudo da estabilidade térmica da fitase foi realizado incubando-se o extrato cru em diferentes temperaturas (40, 50, 70 e 80°C). Para as temperaturas de 70 e 80 °C foram coletadas amostras no tempo zero e a cada 5 minutos, perfazendo um total de 30 minutos. Para as temperaturas de 40 e 50°C foram coletadas amostras no tempo zero e a cada 1 hora, perfazendo um total de 8 horas.

As amostras coletadas foram mantidas em banho de gelo para posterior dosagem de acordo com a técnica descrita no item 4.3.4.

#### 4.8.5 Estabilidade do Extrato Cru Enzimático em Relação ao tempo de Armazenamento (“shelf life”)

Visando verificar a estabilidade enzimática da fitase em relação ao seu poder de hidrólise, durante o período de armazenamento, foi preparado um extrato cru, conforme descrito no itens 4.3.2 e 4.3.3., e estudos foram feitos em diferentes temperaturas: temperatura ambiente, onde as amostras foram coletadas diariamente e temperatura de refrigeração (4°C), onde as amostras foram coletadas semanalmente. A atividade enzimática foi realizada conforme a técnica descrita no item 4.3.4 do presente trabalho. O término do estudo da estabilidade ocorreu quando iniciava a fase declínio da atividade enzimática.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE FITASE

Para avaliar a produção de fitase, foi escolhido como primeiro substrato a polpa cítrica e realizou-se o processo de FES conforme descrito no item 4.3.2 e utilizando diferentes cepas de *Aspergillus niger*. A análise dos resultados foi realizada de acordo conforme descrito no item 4.3.4. Os resultados (Quadro 3) foram qualitativos e obtidos através da avaliação visual:

QUADRO 3 – ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE FITASE EM POLPA CÍTRICA POR DIFERENTES CEPAS DE *ASPERGILLUS NIGER*

CEPAS	SUBSTRATO	
	POLPA CÍTRICA	
	Crescimento microbiano	Produção de fitase
LBP 34	++	-
LPB12	++	-
LPB 28	++	-
W 2	++	++
NRRL 599	+	+

++ Bom  
 + Regular  
 - Não houve

Conforme os resultados mostrados no Quadro 3, a cepa *Aspergillus niger* W2 mostrou ser mais hábil para produzir a fitase, tendo como substrato a polpa cítrica.

A cepa *Aspergillus niger* W2 foi testada em animais monogástricos (suínos e frangos) no ICIDCA (*Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Açúcar*) e não apresentou problemas de toxicidade, sendo portanto, uma cepa de microrganismo comestível, mostrando-se favorável para a utilização na alimentação animal.

Visando avaliar a capacidade da referida cepa em produzir fitase em outros substratos provenientes da agricultura e/ou agroindústria nacional, procedeu-se a FES como descrito no item 4.3.2. do presente trabalho, utilizando-se como substratos as matérias-primas descritas no item 4.2.

Os resultados obtidos podem ser vistos no Quadro 4.

QUADRO 4 - ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE FITASE EM DIFERENTES SUBSTRATOS

SUBSTRATOS	<i>Aspergillus niger</i> W2	
	Crescimento microbiano	Produção de fitase
Casca de café	-	-
Polpa Cítrica	+++	+++
Bagaço de maçã	+++	-
Bagaço de mandioca	++	+
Farelo de trigo	+++	n.d
Farelo de soja	+	n.d
Refinazil®	++	n.d
Protenose®	+++	n.d
Farinha de coco	+++	n.d
Fibra de coco	-	-
Torta de coco	+++	n.d
Polimento de arroz	+++	n.d

NOTA:  
 + + + Ótimo  
 ++ Bom  
 + Regular  
 - Não houve crescimento  
 n.d. Não determinado (devido a interferência do fósforo presente naturalmente no substrato). O excesso de fósforo no substrato, além de dificultar a quantificação da hidrólise enzimática, serve como inibidor da produção da fitase (AL-ASHEH e DUVNJAK, 1995).

Conforme os resultados mostrados no Quadro 4 observa-se que o melhor substrato para a produção de fitase por *Aspergillus niger* W2 é a polpa cítrica e, ainda, poderia ser feito um *screening* testando as demais cepas de *Aspergillus niger* sobre todos os substratos citados no item 4.2. e também poderia ser feito um estudo do efeito da combinação dos diferentes substratos na produção de fitase.

## 5.2 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

De acordo com os resultados mostrados no item 5.1, a melhor produção de fitase foi obtida utilizando-se como substrato a polpa cítrica. Sendo assim, foram realizadas as análises da composição físico-química do referido substrato conforme os métodos descritos no item 4.2.2.

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 8.

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA POLPA CÍTRICA

COMPOSIÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA POLPA CÍTRICA(%)					
UMIDADE	CINZAS	LIPÍDIOS	FIBRAS	PROTEÍNAS	CARBOIDRATOS
9,5	5,5	1,0	13,0	5,0	66,0 <sup>a</sup>

NOTA: a = valor obtido pela soma dos demais componentes menos 100.

O pH da polpa cítrica foi determinado de acordo com o método descrito no item 4.2.2.1, e apresentou valores entre 4,7- 4,8.

### 5.3 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS FÍSICO QUÍMICAS PARA A PRODUÇÃO DE FITASE EM FES

A otimização foi realizada conforme descrito no item 4.4.1, utilizando-se a polpa cítrica como substrato e a cepa *Aspergillus niger* W2. Os fatores estudados foram pH, temperatura e umidade (variáveis independentes) e atividade enzimática (FIT) (variável dependente).

O experimento utilizado foi do tipo fatorial fracionado  $3^{(3-1)}$  (com repetição, testando-se três fatores experimentais em três níveis), com a análise por superfície de resposta. Experimentos do tipo fatorial fracionado são utilizados, normalmente, para estudo de diversas variáveis ao mesmo tempo. Servem para mostrar quais fatores são mais importantes e como a sua modificação altera o processo.

O plano experimental e os resultados da atividade enzimática podem ser vistos na Tabela 9.

As análises dos resultados foram feitas pela ANOVA (Análise de Variância) utilizando-se o programa *Statistica 5.0* (Tabela 10 e Figura 9).

Na Figura 9 (Diagrama de Pareto), pode ser feita a visualização das influências das variáveis na produção da enzima. No do Diagrama de Pareto são observadas as magnitudes de cada um dos efeitos (HAALAND, 1989 e MACHADO, 2000).

TABELA 9 – OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS PARA A PRODUÇÃO DE FITASE NO PLANO FATORIAL FRACIONADO  $3^{(3-1)}$  COM REPETIÇÃO

EXPERIMENTOS	REPETIÇÃO	UMIDADE (%)	TEMPERATURA (°C)	pH	ATIVIDADE TOTAL <sup>1</sup>	ATIVIDADE (FIT) <sup>2</sup>
1	1	60,0	25,0	4,0	23,0	2,54
2	1	60,0	28,0	4,5	70,0	7,74
3	1	60,0	31,0	5,0	25,0	2,76
4	1	70,0	25,0	5,0	61,5	6,80
5	1	70,0	28,0	4,5	63,5	7,02
6	1	70,0	31,0	4,0	16,0	1,77
7	1	80,0	25,0	4,5	26,0	2,87
8	1	80,0	28,0	4,0	18,5	2,04
9	1	80,0	31,0	5,0	15,5	1,71
10	2	60,0	25,0	4,0	25,0	2,76
11	2	60,0	28,0	4,5	59,5	6,57
12	2	60,0	31,0	5,0	24,5	2,71
13	2	70,0	25,0	5,0	58,0	6,41
14	2	70,0	28,0	4,5	69,5	7,68
15	2	70,0	31,0	4,0	21,0	2,32
16	2	80,0	25,0	4,5	21,5	2,38
17	2	80,0	28,0	4,0	17,0	1,88
18	2	80,0	31,0	5,0	20,5	2,27

NOTA:

(1) atividade enzimática total: expressa em  $\mu\text{mol}$  de fósforo produzido em 50 mL de extrato cru, em 1 minuto.

(2) atividade enzimática (FIT): expressa em  $\mu\text{mol}$  de fósforo produzido em 1,0 (um) grama de substrato seco, em 1 minuto.

TABELA 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA OTIMIZAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE NO PLANO FATORIAL FRACIONADO  $3^{(3-1)}$  COM REPETIÇÃO

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias dos Quadrados	Razão F	Razão p
(1)UMIDADE (L)	11,60*	1*	11,60*	27,29260*	0,000284*
UMIDADE (Q)	18,35*	1*	18,35*	43,17884*	0,000040*
(2)TEMPERATURA (L)	8,19*	1*	8,19*	19,26027*	0,001083*
TEMPERATURA (Q)	16,25*	1*	16,25*	38,23081*	0,000069*
(3)pH (L)	14,51*	1*	14,51*	34,14277*	0,000112*
pH (Q)	5,78*	1*	5,78*	13,60744*	0,003570*

NOTA:

$R^2=0,94912$

Onde:

L = interação linear

Q =interação quadrática

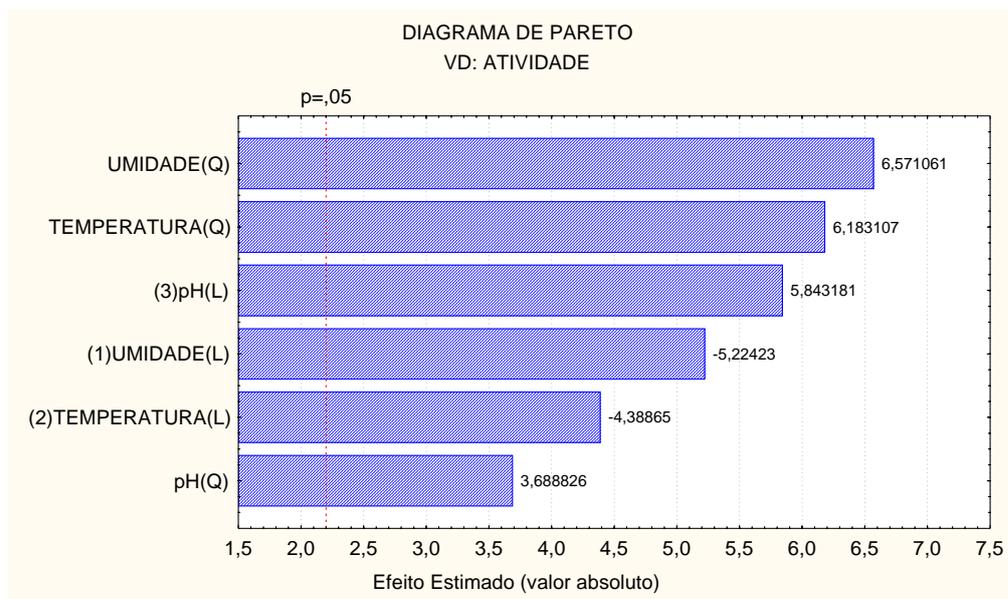
Razão F = razão entre a variabilidade entre as amostras e a variabilidade dentro das amostras

Razão p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5% ou 0,05)

$R^2$  = fator de correlação para o ajuste do modelo a superfície

\* diferença significativa ao nível de 5%.

FIGURA 9 – DIAGRAMA DE PARETO DA OTIMIZAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE NO PLANO FATORIAL FRACIONADO  $3^{(3-1)}$  COM REPETIÇÃO



Se os valores da Razão p (P) forem menores que o nível de significância escolhido, no caso 5% ou 0,05, há diferença significativa em relação ao fator estudado, e quanto menor o valor P, maior a influência desse fator em relação aos demais. Se os valores de P forem negativos no Diagrama de Pareto (Figura 9), significa que o aumento do valor da variável resposta é inversamente proporcional ao aumento daquele fator.

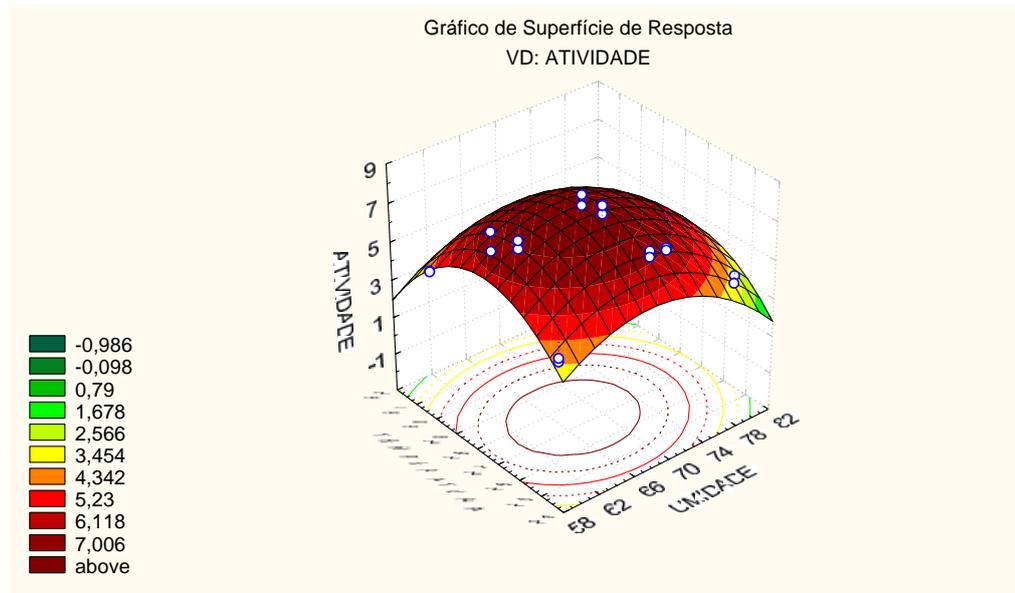
Sendo assim, de acordo com os resultados mostrados na Tabela 10, observou-se que todos os fatores estudados foram significativos ao nível de 5%. No Diagrama de Pareto (Figura 9) foi possível visualizar a influência dos fatores estudados sobre a variável resposta, no caso, a atividade enzimática, onde a umidade e a temperatura apresentaram valores negativos, indicando que o aumento da atividade enzimática é inversamente proporcional ao aumento desses fatores. Em relação ao pH é possível perceber que o seu aumento favorece o aumento da atividade enzimática.

Nas figuras 10 e 11 são mostrados os gráficos de superfície de resposta e projeção de superfície de resposta da otimização realizada em função dos fatores experimentais (pH, umidade e temperatura), tendo como variável dependente (VD) a atividade enzimática da fitase (expressa em FIT), onde foi possível verificar que as melhores condições para a FES para a produção de fitase seriam: temperatura entre 26 e 29°C; pH: entre 4,4 e 5,1 e umidade entre 61 e 73%.

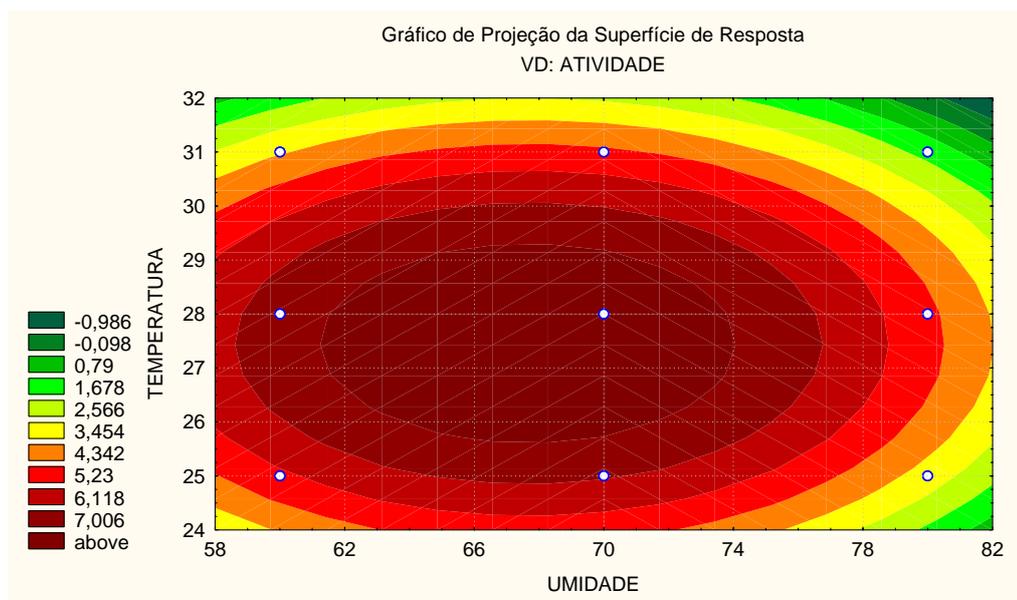
No presente trabalho adotou-se as seguintes condições como sendo as ideais: pH do meio em 5,0; umidade 61% e temperatura de 28°C (por motivos operacionais).

Após otimizadas as condições de cultivo para a produção de fitase verificou-se que nas condições ótimas os valores obtidos para atividade correspondem a valores citados na literatura: LEÓN (2001) obteve atividades de fitase por FES variando entre 4-10 UI/ grama de substrato seco, por minuto; GAUTAM *et al.*, 2002 obtiveram por FES 10,07 UI/ grama de substrato seco, por minuto, porém em ambos estudos o tempo de fermentação foi de 72 horas, ou seja, 24 horas a mais do que o tempo de fermentação adotado no presente trabalho, sendo um fator relevante, pois tempo é um fator econômico importante na produção.

FIGURA 10 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E PROJEÇÃO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (B) DA OTIMIZAÇÃO REALIZADA EM FUÇÃO DOS FATORES EXPERIMENTAIS: UMIDADE E TEMPERATURA

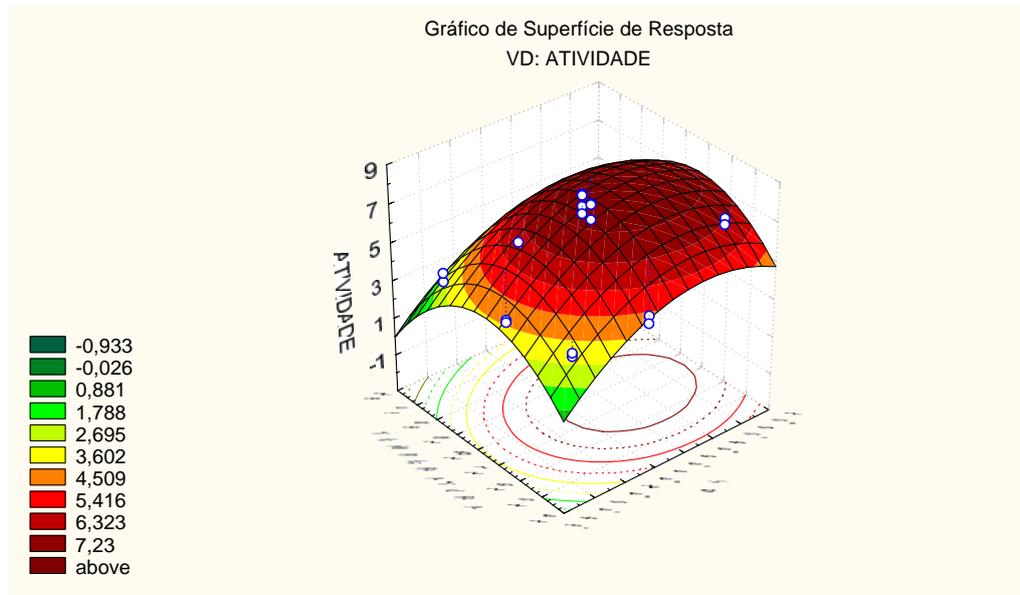


**A**

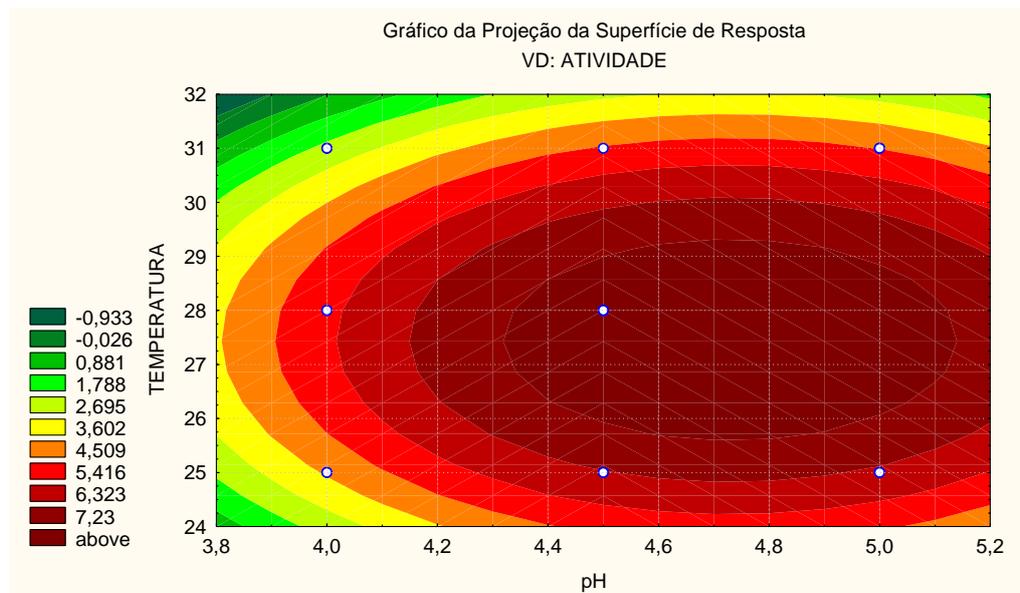


**B**

FIGURA 11 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E PROJEÇÃO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (B) DA OTIMIZAÇÃO REALIZADA EM FUNÇÃO DOS FATORES EXPERIMENTAIS: pH E TEMPERATURA



A



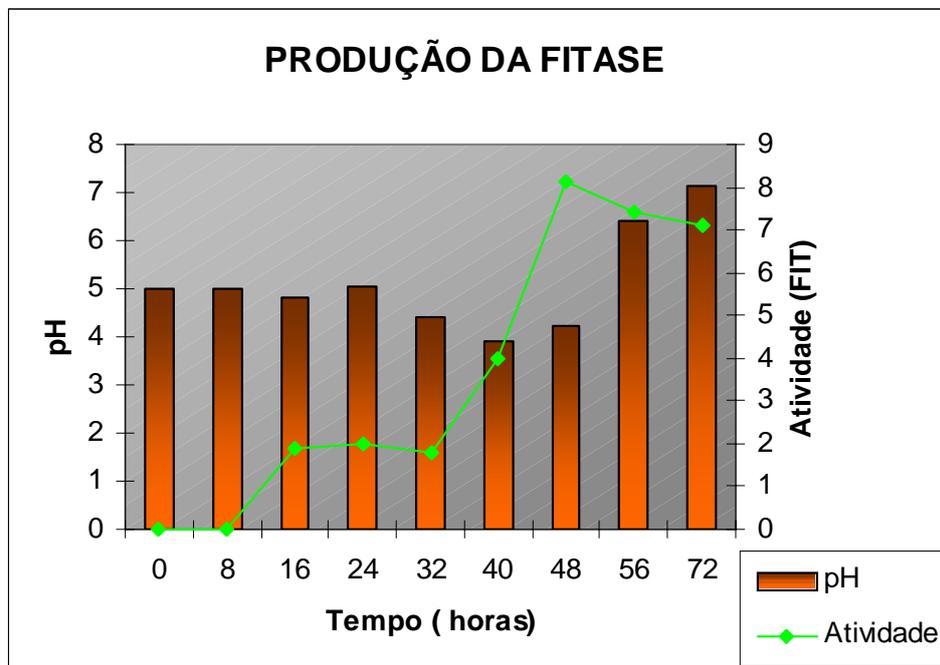
B

#### 5.4 PRODUÇÃO DA FITASE EM RELAÇÃO AO TEMPO DE FERMENTAÇÃO

O estudo da produção de fitase em relação ao tempo de fermentação foi realizado utilizando-se os parâmetros otimizados, seguindo a metodologia descrita no item 4.5 do presente trabalho.

Os resultados de produção da enzima e da variação do pH ao longo do tempo de fermentação podem ser visualizados na Figura 12, onde foi possível verificar que o início da produção de fitase ocorre após oito horas de fermentação, atingindo a produção máxima em aproximadamente 48 horas de fermentação, momento no qual deve ser feita a extração da enzima.

FIGURA 12 – PRODUÇÃO DE FITASE EM RELAÇÃO AO TEMPO DE FERMENTAÇÃO



No gráfico acima é possível observar a variação do pH durante a produção da fitase em 72 horas de fermentação, onde nas primeiras 24 horas o pH do meio permaneceu praticamente constante. Após este tempo, o pH sofre um declínio mais

em 40 horas de fermentação, período onde ocorreu o início da obtenção da atividade da máxima da enzima, que culmina em 48 horas de fermentação.

A partir de 48 horas de fermentação, inicia-se um aumento do valor do pH que atinge o seu ponto mais alto em 72 horas de fermentação.

Segundo RAIMBAULT (1997), a produção de certos metabólitos podem ser associados ao crescimento micelial do microrganismo, como por exemplo a produção de enzimas extracelulares, como por exemplo a  $\alpha$ -amilase produzida por *Aspergillus oryzae*, onde a produção enzimática é diretamente proporcional ao desenvolvimento micelial.

Segundo LIMA et al. (1987), nos processos de fermentação submersa descontínua, dependendo da enzima desejada e do microrganismo utilizado, a produção pode ocorrer em uma das três fases do desenvolvimento microbiano: fase *lag* (fase de latência do microrganismo), fase *log* (fase logarítmica - crescimento exponencial) e fase estacionária.

Tendo em vista os conceitos acima relacionados, pode-se propor uma explicação para as variações nos valores do pH ao longo do tempo de fermentação: a produção máxima de enzimas ocorreu durante a fase logarítmica do crescimento microbiano, onde há maior quantidade de células viáveis.

Durante a fase *lag* há um aumento gradual na produção de gás carbônico pelo metabolismo microbiano, provocando a acidificação do meio, e conseqüentemente, no abaixamento do pH. Esse fenômeno pode ter iniciado no tempo de 32 horas, atingindo o valor mais baixo de pH em 40 horas (Figura 12). O ponto final da a fase logarítmica do crescimento microbiano ocorreria em 48 horas de fermentação, onde observa-se a formação dos primeiros esporos na massa em fermentação, provavelmente, o desenvolvimento microbiano teria atingido a fase estacionária.

Além da produção do gás carbônico, as fitases produzidas pelas células microbianas, estariam hidrolisando o ácido fítico e liberando o inositol e o ácido fósfórico, o qual inicialmente estaria contribuindo para a acidificação do meio. Porém, para o aumento da massa microbiana, faz-se necessário o consumo do fosfato produzido, pois o fósforo é elemento essencial para a formação das moléculas de ATP e da membrana celular, o que acarretaria no aumento gradual do pH.

Na fase estacionária, não ocorre incremento na produção de gás carbônico, o que contribui ainda mais para o aumento do valor de pH, como é mostrado na Figura 12 no tempo de 56 e 72 horas de fermentação.

Resumindo, o aumento do pH ocorreu por três motivos: diminuição do teor de ácido fítico presente no substrato, consumo do ácido fosfórico proveniente da hidrólise da fitase e estabilização do crescimento microbiano acarretando na estabilização da produção de gás carbônico.

## 5.5 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

O estudo da eficiência da extração enzimática foi realizado utilizando planejamentos experimentais do tipo fatorial  $2^2$  descritos no item 4.6.

Os solventes testados foram a água deionizada e a solução de NaCl a 1% em diferentes volumes e diferentes velocidade de agitação.

Os resultados foram obtidos através da análise por superfície de resposta e também pela comparação dos valores obtidos de atividade enzimática (FIT), atividade total enzimática e da atividade específica da fitase.

Nas Tabelas 11 e 12 e na Figura 13 são mostrados os resultados do estudo da extração.

TABELA 11 – ESTUDO DA EXTRAÇÃO COM ÁGUA DEIONIZADA

Volume de solvente (mL)	Agitação (rpm)	Proteína total <sup>(1)</sup>	Atividade total <sup>(2)</sup>	Atividade específica <sup>(3)</sup>	Atividade (FIT) <sup>(4)</sup>
100	200	29,60	65,81	2,22	7,27
100	100	10,18	60,78	5,97	6,72
50	200	17,11	65,57	3,83	7,25
50	100	18,04	62,64	3,47	6,92

NOTA:

(1) Proteína total: determinada pelo método de Bradford descrito no item 4.7 e expressa em miligrama de proteína solúvel.

(2) Atividade total: expressa em  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgânico, a partir de um mililitro de fitato de sódio na concentração de 1,5mM, por minuto, no volume total do solvente utilizado na extração da enzima.

(3) Atividade específica: foi determinada dividindo-se a atividade total pela proteína total.

(4) Atividade: expressa em  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgânico, a partir de um mililitro de fitato de sódio na concentração de 1,5mM, por minuto, por grama de substrato seco.

TABELA 12 – ESTUDO DA EXTRAÇÃO COM NaCl a 1%

Volume de solvente (mL)	Agitação (rpm)	Proteína total <sup>(1)</sup>	Atividade total <sup>(2)</sup>	Atividade específica <sup>(3)</sup>	Atividade (FIT) <sup>(4)</sup>
100	200	33,30	85,91	2,58	9,49
100	100	18,50	59,94	3,24	6,62
50	200	12,95	50,91	3,93	5,63
50	100	12,49	53,01	4,24	5,86

NOTA:

(1) Proteína total: determinada pelo método de Bradford descrito no item 4.7 e expressa em miligrama de proteína solúvel.

(2) Atividade total: expressa em  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgânico, a partir de um mililitro de fitato de sódio na concentração de 1,5mM, por minuto, no volume total do solvente utilizado na extração da enzima.

(3) Atividade específica: foi determinada dividindo-se a atividade total pela proteína total.

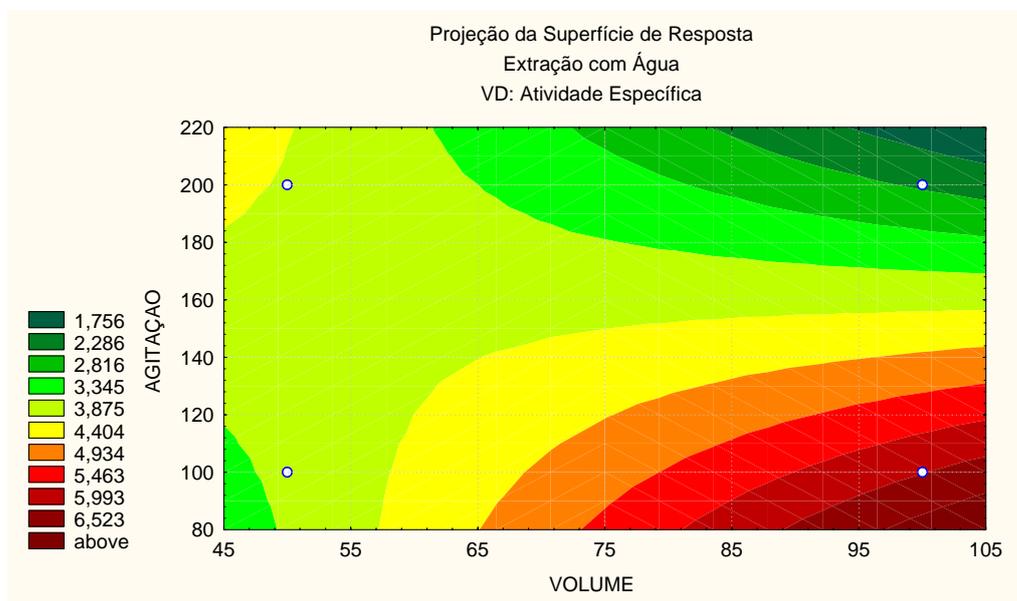
(4) Atividade: expressa em  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgânico, a partir de um mililitro de fitato de sódio na concentração de 1,5mM, por minuto, por grama de substrato seco.

Nas tabelas 11 e 12 é possível observar que o solvente que promoveu a melhor extração enzimática, medida através da atividade enzimática expressa em FIT, foi o NaCl a 1% no volume de 100 mL e na agitação de 200 rpm. Nota-se também que nessas mesmas condições, a quantidade de proteína solúvel extraída é maior, e isso se deve ao fato de algumas proteínas aumentarem a sua solubilidade na presença de sais neutros.

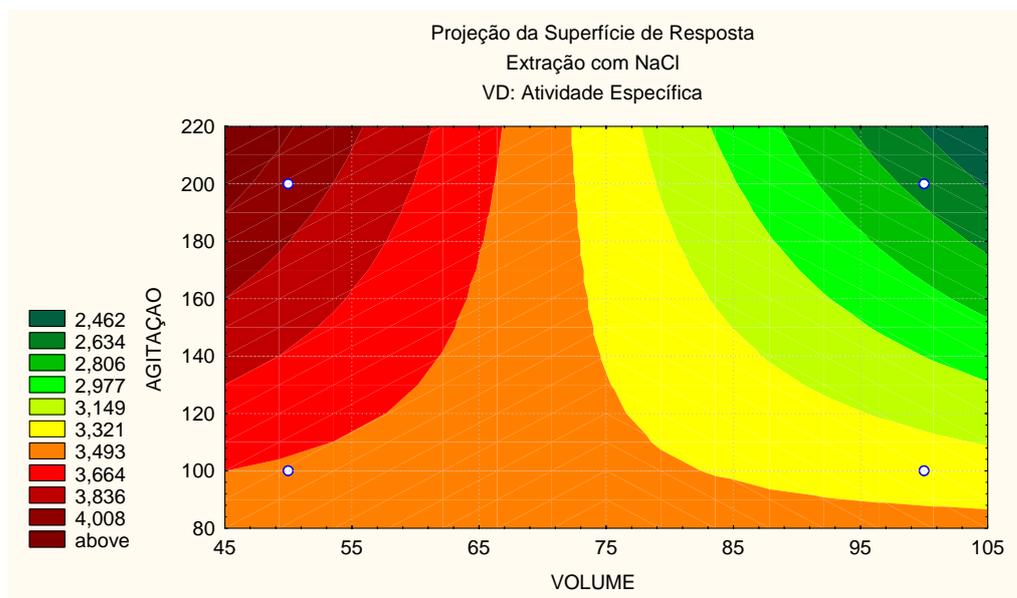
Os sais neutros influenciam na solubilidade das proteínas em função da sua força iônica. Em concentrações reduzidas os sais aumentam a solubilização das proteínas, por diminuírem a interação proteína-proteína, e conseqüentemente, aumentarem a interação proteína-água, fenômeno chamado de *salting-in* (UFPR, 1988).

Os valores de atividade específica mostrados nas tabelas 11 e 12, servem para indicar quais as melhores condições para um processo purificação, pois, quanto maior o valor da atividade específica, maior o grau de pureza de uma determinada enzima (LEHNINGER, 1993). Sendo, assim as melhores condições para desenvolver um processo de purificação, seriam: água como solvente (100mL) em agitação a 100 rpm. Os resultados dos efeitos dos fatores estudados (agitação, tipo de solvente e volume de solvente) podem ser visualizados na Figura 13.

FIGURA 13 – GRÁFICOS DA PROJEÇÃO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O EXPERIMENTO DA EXTRAÇÃO COM ÁGUA (A) E NaCl a 1% (B)



**A**



**B**

Observando-se a Figura 13 (A), nota-se que para a extração feita com água deionizada, a velocidade de agitação não é um fator importante para a obtenção de um extrato enzimático mais puro, o fator de maior relevância seria o volume de água que deve ser superior a 95 mL.

Correlacionando os valores de atividade específica das tabelas 11 e 12 com os resultados da figura 13 (A e B), pode-se concluir que a extração mais eficiente, ou seja, a que resulta em maior valor de atividade enzimática por grama de substrato seco (FIT), é aquela obtida utilizando-se água como solvente 100 mL de NaCl a 1%, a 200 rpm. Em contrapartida, a extração que promoveria uma melhor purificação da enzima, seria obtida utilizando-se água em quantidade próxima de 100 mL e agitação mais baixa igual ou menor que 100 rpm.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA FITASE

Os ensaios para a caracterização da fitase realizados no presente trabalho foram: estabilidade frente a diferentes valores de pH; estabilidade térmica; influência de íons; estabilidade em relação ao tempo de armazenamento (“shelf life”).

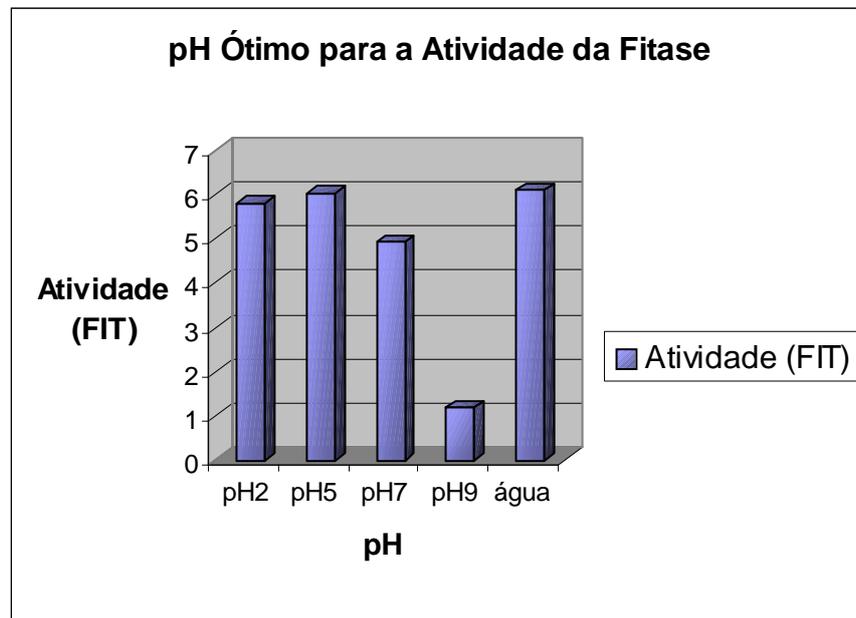
### 5.6.1 Estabilidade Frente a Diferentes Valores de pH

O estudo para a avaliação da atividade enzimática em diferentes valores de pH foi realizado de acordo com o item 4.8, e teve como objetivo verificar o pH ótimo para a atividade enzimática, os resultados obtidos são mostrados na figura 14.

A água deionizada utilizada como controle teve o seu pH medido e variou entre de 5,5-6,0.

Vários estudos foram realizados para verificar o pH ótimo e a estabilidade das fitases. A fitase é estável em pH entre 1,5 a 10,0 (DVORÁKOVÁ, *et al.*, 1997). Em experimentos realizados pelo mesmo autor foram encontrados valores ótimos de pH entre 2,0 –7,0. ULLAH e GIBSON (1987) descrevem pH entre 2,5 e 5,0, como sendo ótimo para fitase produzida por *A. ficcum*.

FIGURA 14 – pH ÓTIMO PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA



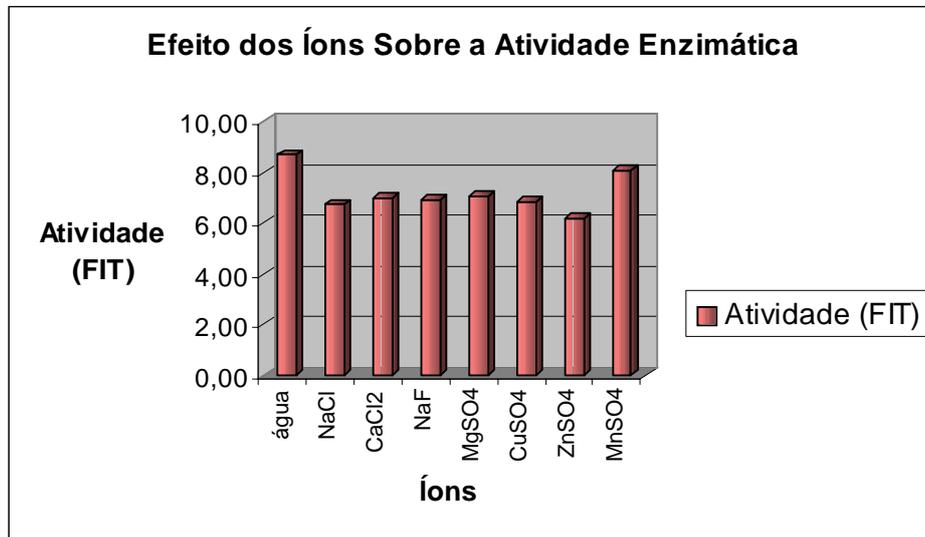
Na Figura 14 é possível verificar que a enzima fitase possui melhor atividade catalítica em valores de pH entre 5,0 e 6,0, porém demonstra também estabilidade em pH mais baixo, próximo de 2,0. Valores de pH muito alcalinos provocam significativa diminuição da atividade da fitase.

#### 5.6.2 Efeito de Cátions e Ânions Sobre a Atividade da Fitase

Os estudos realizados para a avaliação da influência dos íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ) atividade catalítica da fitase foram descritos anteriormente no item 4.10, como atividade padrão (FIT), utilizou-se o extrato cru diluído em água deionizada.

Os resultados são mostrados na Figura 15.

FIGURA 15 – EFEITO DOS CÁTIONS E ÂNIONS SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA DA FITASE



Os resultados mostrados na Figura 15 indicam que de todos íons estudados no presente trabalho na concentração de 0,2mM, atuaram negativamente sobre a atividade da fitase, futuramente esse estudo pode ser complementado, realizando experimentos com diferentes concentrações de íons.

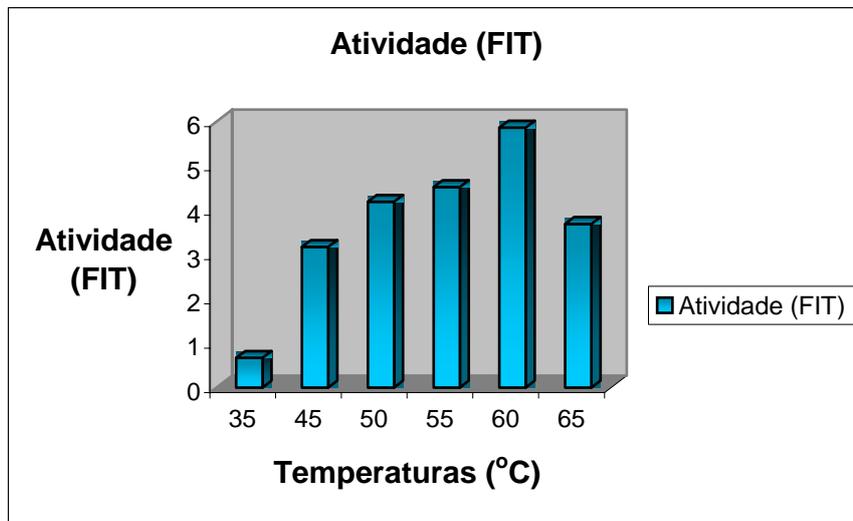
Estudos semelhantes foram realizados por DVORAKOVÁ *et al.* (1997), nos quais avaliou-se a influências dos íons Ca<sup>++</sup>, F<sup>-</sup>, Mg<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Sn<sup>++</sup> e Cd<sup>++</sup> sobre a atividade catalítica da fitase produzida por *Aspergillus niger*, em fermentação submersa. Os resultados obtidos pelos referidos autores foram: o Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> e o Mn<sup>++</sup>, demonstraram efeito positivo, proporcionando aumento da atividade catalítica; o Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Sn<sup>++</sup>, F<sup>-</sup> e Cd<sup>++</sup> demonstraram efeito negativo, proporcionando diminuição da atividade catalítica.

### 5.6.3 Estabilidade catalítica da enzima em diferentes temperaturas e temperatura ótima

DVORÁKOVÁ, *et al.* (1997) estudaram a estabilidade da fitase produzida por fermentação submersa pelo *A. niger*, e a enzima demonstrou atividade catalítica máxima em 55°C, portanto sendo termoestável. Porém após 10 minutos de incubação a 60, 70 e 80°C, a fitase perdeu 5, 10 e 25% da sua atividade, respectivamente.

No presente trabalho, o estudo da temperatura ótima para a atividade catalítica da fitase foi 60° C, por um período de incubação de 10 minutos, portanto pode ser considerada uma enzima termoestável (Figura 16).

FIGURA 16 – TEMPERATURA ÓTIMA DA ATIVIDADE DA FITASE



Visando verificar a estabilidade térmica da enzima obtida no presente trabalho, incubou-se o extrato cru enzimático em diferentes temperaturas, e foram retiradas amostras, que foram dosadas de acordo com a técnica descrita no item 4.3.4 conforme. Os intervalos de tempo da retirada da amostra e os resultados obtidos podem ser vistos nas tabelas 13 e 14 e nas figuras 17 e 18.

TABELA 13 – ESTABILIDADE TÉRMICA DA FITASE EM 40 E 50°C

Intervalo de Coleta de Amostra (horas)	Atividade (FIT)	
	Temperatura	
	40°C	50°C
0	6,80	7,37
1	7,80	8,04
2	7,71	7,99
3	6,66	7,90
4	7,52	6,71
5	7,09	7,85
6	6,61	6,56
7	7,09	6,28
8	6,80	6,28

FIGURA 17 – GRÁFICO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA FITASE EM 40 E 50 °C

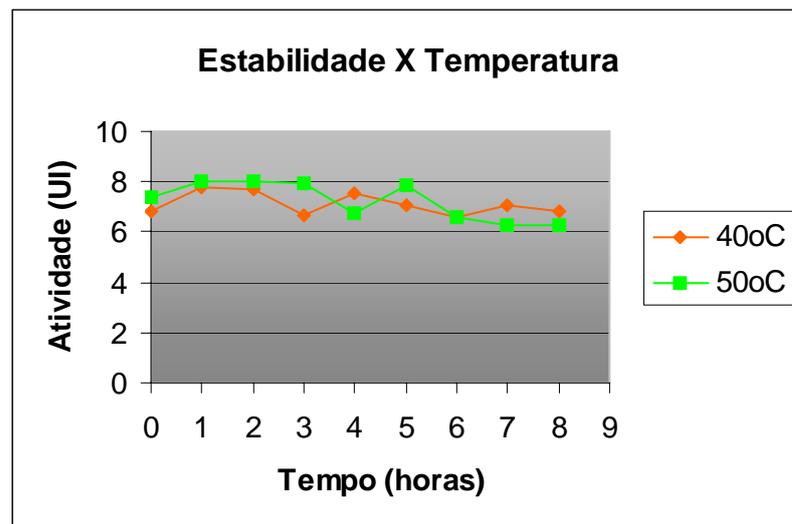
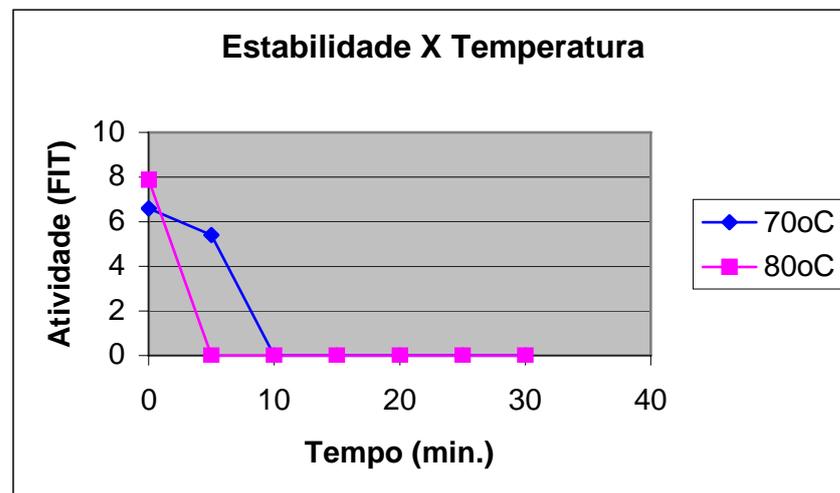


TABELA 14 – ESTABILIDADE TÉRMICA DA FITASE EM 70 E 80 °C

Intervalo de Coleta de Amostra (min.)	Atividade (FIT)	
	Temperatura	
	70°C	80°C
0	6,59	7,87
5	5,40	0
10	0	0
15	0	0
20	0	0
25	0	0
30	0	0

FIGURA 18 – GRÁFICO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA FITASE EM 70 E 80 °C



Analisando os gráficos das figuras 17 e 18 foi possível verificar que nas temperaturas de 40 e 50°C a partir de 6 horas de incubação ocorreu um leve declínio na atividade catalítica da fitase, que se manteve constante até o tempo final do experimento (8 horas). Entretanto, na temperatura de 70°C houve um declínio nos

primeiros 5 minutos de incubação, que se tornou mais acentuado nos próximos 5 minutos de incubação, culminando com a perda total da atividade catalítica em 10 minutos de incubação.

Na temperatura de 80°C, a inativação enzimática ocorre nos primeiros 5 minutos. Segundo BOBBIO e BOBBIO (1989), a maioria das enzimas pode ser inativada por aquecimento durante entre 70 e 80°C, durante um intervalo que varia de dois a cinco minutos.

#### 5.6.4 Estabilidade da Enzima Durante o Armazenamento (“shelf life”)

Os estudos realizados para a verificação da estabilidade catalítica durante o período de armazenamento, mostraram que a fitase produzida por *Aspergillus niger* W2, manteve a sua estabilidade em temperatura ambiente, por um período que variou de 4 a 5 dias, sem a adição de conservantes. Também manteve a sua estabilidade por um período que variou 60 a 75 dias, em temperatura de refrigeração (4°C) e sem o auxílio de conservantes químicos.

## 6.0 CONCLUSÃO

- ◆ Os estudos do presente trabalho mostram que é possível produzir a enzima fitase utilizando como substrato a polpa cítrica, sendo que a cepa que apresentou melhor resultado foi a do *Aspergillus niger* W2;
- ◆ Após os estudos de otimização dos fatores para a produção da fitase em FES na polpa cítrica, conclui-se que as condições ótimas de cultivo são: umidade inicial entre 61 e 73%; temperatura de incubação entre 26 e 29°C; pH do meio entre 4,4 e 5,1; tempo de fermentação de 48 horas. Utilizando-se os fatores otimizados foi possível obter uma atividade catalítica próxima de 7,74 FIT;
- ◆ A obtenção do extrato cru utilizando solução de NaCl a 1%, proporciona a obtenção de valores de atividade catalítica (expressas em FIT) melhores, quando comparadas com os valores obtidos na extração em água deionizada. Porém, a extração com água deionizada, mostra-se melhor, no que diz respeito a purificação enzimática;
- ◆ A fitase produzida em polpa cítrica com a cepa de *Aspergillus niger* W2 por FES, possui as seguintes características:
  - é uma enzima termoestável, pois apresenta temperatura ótima igual a 60°C por 10 minutos;
  - é estável em temperaturas de 40 e 50°C por um período de 8 horas;
  - apresenta pH entre 5,0 e 6,0 como ótimos para a atividade catalítica, demonstrando também, estabilidade em pH ácido (2,0);
  - os íons de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, F<sup>-</sup>, Mg<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, na concentração de 0,2 mM, promovem efeito negativo na atividade catalítica.

## 7.0 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- ◆ Avaliação da citotoxicidade da enzima;
- ◆ Aplicação da enzima na alimentação animal;
- ◆ Estudo da suplementação da polpa cítrica com outros substratos que possam servir como indutores na produção da enzima;
- ◆ Estudos da cinética da produção enzimática ( $K_m$  e  $V_m$ );
- ◆ Comparação da atividade catalítica da fitase obtida no presente trabalho com um padrão enzimático comercial;
- ◆ Estudo de escalonamento da produção de fitase;
- ◆ Otimização das variáveis em processos de maior escala;
- ◆ Estudo da extração da enzima em diferentes solventes, visando a melhores rendimentos na purificação;
- ◆ Estudo de diferentes metodologias para a concentração do extrato cru enzimático: ultrafiltração, secagem em *spray dryer*, liofilização;
- ◆ Estudos das cepas de *Aspergillus niger* citadas no presente trabalho (*screening*), sobre todos os substratos listados no item 4.2;
- ◆ Estudos de outras cepas de diferentes gêneros: *Rhizopus*, *Penicillium*, etc.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS. Disponível em:  
<<http://www.abecitrus.com.br>>  
Acesso em: 1998

ABECITRUS. Disponível em:  
<<http://www.abecitrus.com.br>>  
Acesso em: 2002

AIDDO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J.B. **Solid substrate fermentations.** Advances in applied microbiology. v.28, p.201-237. 1982.

AL-ASHEH S.; DUVNJAK Z. The effect of phosphate concentration on phytase production and the reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid-state fermentation process. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, p. 25-30. 1995

ANDRIGUETTO J. P.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL A.; FLEMMING J.S.; SOUZA, G.A.; BONA, A. **Nutrição animal.** Livraria Nobel: São Paulo, 1982. 385p. V.1.

BASF. Disponível em:  
<<http://www.basf.com/business/consumer/animalnutrition/html/pr981001.html>>  
Acesso em: janeiro de 2001a.

BATTAGLINO, R. A. et al. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. **Appl. Microbiol. And Biotechnol.** V.35, p.292-296, 1991.

BOBBIO, Paulo A.; BOBBIO, Florinda. **Química dos alimentos.** 2ª ed. São Paulo: Varela, 1989.151p.

BOBBIO, Paulo A.; BOBBIO, Florinda. **Química do processamento de alimentos**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.

BOUCQUÉ C.V.; FIEMS, L.O. Vegetable by-products of agro-industrial origin. **Livestock Production Science**. V19, p. 97-135, 1988.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, D. **Detoxificação biológica da casca de café por fungos filamentosos em fermentação no estado sólido**. Curitiba, 1999. 102 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) -Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

CALDWELL, R.A. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. **J. Agric. Food Chem.** v.40, p. 43-46, 1992.

CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid state fermentation systems. **Proc. Biochem.**, p. 152-157, 1980.

CARGILL . Disponível em:  
<<http://www.cargill.com.br>>  
Acesso em: 2002

CHRISTENSEN, L. Phytase reduz em 30% o fósforo no esterco. **BioTimes**, p. 8-9, 1995.

COELHO C. N.; BORGES, M. O complexo agro-industrial (CAI) da avicultura. **Revista de Política Agrícola**. n. 3, 1999

CÚNEO F.; FARFAN, J.; CRRARO, F. Distribuição dos fitatos em farelo de arroz estabilizado e tratado com fitase exógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 20, p.84-98, 2000

COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. In: Simpósio Internacional ACAV – Embrapa sobre Nutrição de Aves, I. Concórdia, 17 e 18 nov., 1999. **Anais**. Concórdia. p.118 – 132, 1999.

DVORAKOVÁ, J. *et al.* Characterization of Phytase Produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiol.** 42 (4), p. 349-352, 1997.

FENNEMA, Owen. **Química de los alimentos**. 1<sup>a</sup> ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

GAUTAM, P.; SABU,A.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene as inert solid support. **Bioresource Technol.** P. 229-233. 2002.

GERMANO, S.; LIMA, V.; SOCCOL, C.R.; RAMOS, L.; KRIEGER, N. Studies on extraction of extra-cellular protease from solid culture of *Penicillium citrinum*. In: 2<sup>nd</sup>. IUPAC INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIODIVERSITY. Belo Horizonte-Brasil, 1999.

GERMANO, S. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção, caracterização e purificação de proteases de *Penicillium sp*, por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 2000. 142 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos, Agroindustriais)-Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

GUTIERREZ, L.E. **Enzimas**. USP – ESALQ, Departamento de Química e Centro de Biotecnologia Agrícola, Piracicaba, 1993. 30p. (apostila)

GUTIÉRREZ-ROJAS, M; AURIA, R.; BENET, J.C.; REVAH, S. A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert **support**. **The Chemical Engineering Journal**, v. 60, p.189-198, 1995

HAALAND, P.D. **Experimental design in biotechnology**. Marcel Dekker: New York. 1989.

HAN, Y.W. Removal of phytic acid from soybean and cottonseed meals. **J. Agric. Food Chem.** p. 1181-1183. 1988

HARLAND, B.F.; HARLAND, J. Fermentative reduction of phytate in rye, white, and whole wheat breads. **Cereal Chemistry**. p. 226-229. 1980

HESELTIME, C. W. Solid fermentation. **International Biodeterioration**, v.23, p. 79-89, 1987.

KOEHLER, H.S. **Estatística experimental**. UFPR: Curitiba. 1999. (apostila)

LEÓN, J.A.R. **Determinação da atividade enzimática**. Mensagem recebida por: <rodleon@icidca.edu.cu> em: 13/07/2000.

LEÓN, J.A.R. **Valores da atividade enzimática**. Mensagem recebida por: <rodleon@icidca.edu.cu> em: 02/07/2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1993.

LEHRFELD, J.; MORRIS, E.R. Overstimulation of phytic acid in foods by the AOAC anion-exchange method. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p. 2208-2210, 1992.

LIMA, U. et al. **Biotecnologia: tecnologia das fermentações**. 4<sup>a</sup> Reimpressão. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1987, 285p.

LONSANE et. al. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, 1985.

LÓPEZ, S.E., LÓPEZ, J e TEICHMANN, H.F. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo em dietas com farelo de arroz desengordurado para frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA (34 : 1997: Juiz de Fora). **Anais**. Juiz de Fora : SBZ, 1997. p.51-53, 1997.

MACHADO, C.M.M. **Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em bio-resíduos da agroindústria do café**. Curitiba, 2000. 73 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) -Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MADIGAN, M.T.; MRTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 9 ed. Prentice Hall: Illinois, 1993.

MEJÍA A. M.; FERREIRA, W.M. Produção e caracterização bromatológica da polpa cítrica seca. **Revista CMV**. n. 19. p. 23-33. 2000.

MROZ, Z., KRUSSUKI, W. AND GRELA, E. **Physiological response of lactating sows to feeding rapeseed meal “00” and microbial phytase**. In: Manipulating Pig Production V – Australian Pig Science Association. p.185, 1995.

MUDGETT, R. E. **Solid state fermentation** In: DEMAIN A. L., SOLOMON N. A. (Eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington, American Society for Microbiology, 1986.

NELSON, T.S. *et al.* The utilization of phytase phosphorus by poultry – a review. **Poultry Science**. v.46, p. 862-871, 1968.

NEWKIRK, R. W.; CLASSEN, H.L. The non-mineral nutritional impact of phytase in canola meal fed to broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*. p. 115-128, 2001.

NOVO NORDISK. **A ação das enzimas**. Bagsvaerd: Askbo,1992.

NOVOZYMES. Disponível em:

<(http://novozymes.com.)>

Acesso em: 2000

NUNES, I.J. **Nutrição Animal Básica**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, Ed. 1998. 338p.

ORIOLE, E. *et al.* Water and water activity in solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.498-503, 1987.

PANDEY, A. Recent process development in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, p. 109-117.1992.

PANDEY, A., SZAKACS, 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.

PAPAGIANNI, M. NOKES, S.; FILER, K. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. **Food Technol. Biotechnol.** p. 319-326. 2001

PETER,H.W.; AHLERS, J.; MOREIRA, R.A. **Cinética enzimática**. EUFC: Fortaleza, 1987.

PELCZAR, M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R.;EDWARDS; PELCZAR, M. F. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996. V. 1.

PHYTASE.NET. Disponível em:

< <http://enzymes.co.uk/phytase/introphytase.htm>>

Acesso em: 2002

POND, W.G. Plant fibre utilization by pigs. **Pigs New and Information**. v. 10, p. 1-15, 1989.

PORKWORLD. Disponível em:

<( <http://www.porkworld.com.br/estatisticas/brasil.html#6> >

Acesso em: 13/08/02.

PRESCOTT S. C.; DUNN C. G. **Industrial Microbiology**. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1959.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid state fermentation. In: INTERNATIONAL TRAINING COURSE SOLID STATE FERMENTATION. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1997.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. **Culture method to study fungal growth in solid state fermentation**. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, v. 9, p.199-209, 1980.

RAVINDRAN *et al.* Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broiler. **Poultry Science**. v.78, p.699-706, 1999.

ROUSSOS, S. **Continuous enzymes and fungal metabolites production in solid state fermentation using a counter-current reactor**. In: INTERNATIONAL TRAINING COURSE – SOLID STATE FERMENTATION. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1997a.

ROUSSOS, S.; LONSANE B. K.; RAIMBAULT, M.; VINEGRA-GONZALEZ. **Advances in solid state fermentation**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1997.

SILVA, L. G.; TRUGO, L. C. Characterization of fitase activity in lupin seed. **Journal of Food Biochemistry**, v.20, p. 329-340, 1996.

SOCCOL, 2000 (PANDEY, A; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potencial of agro-industrial residues: II Cassava bagasse. **Bioresource Technology**. V. 74, p. 81-87. 2000.

SOCCOL, C. R., PANDEY, A., SZAKACS G., SABU, A . Microbial production of extra cellular phytase using polystyrene as inert solid suport. **Bioresource Technology**. London: v.83, n.3, p.229 - 233, 2002.

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico: biotransformação de resíduo de mandioca por *Rhizopus* e basidiomicetos do gênero *Pleurotus***. Tese (Professor Titular) – Universidade Federal do Paraná, 1994a.

SOCCOL, C. R. **Citric acid and glucoamylase production from cassava by-products in solid state fermentation**. In: INTERNATIONAL TRAINING COURSE SOLID STATE FERMENTATION. Montpellier: ORSTOM, 1998a.

SUZUKI, J.T. Panorama da avicultura paranaense. **Análise Conjuntural**. v.24, n.3-4, p.10. 2002

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. R. **Microbiologia**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

UFPR. **Bioquímica: aulas práticas**. 2 ed. Scientia et Labor: Curitiba, 1988.

VELLOSO *et al.* Efeito da substituição parcial do milho pela polpa cítrica peletizada no desenvolvimento e na qualidade da carcaça de suínos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, p. 31-42, 1974.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos.** Zaragoza: Acribia, 1995.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnología de las enzimas.** Zaragoza Acribia, 1991.