

## ESTABILIDADE DA FITASE DE *Aspergillus niger* 11T53A9 AO ARMAZENAMENTO E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO ÁCIDO FÍTICO NA FARINHA DE SORGO

### STABILITY OF THE PHYTASE FROM *Aspergillus niger* 11T53A9 TO STORAGE AND ITS APPLICATION IN THE HYDROLYSIS OF PHYTIC ACID IN SORGHUM FLOUR

Gaspar Dias Monteiro Ramos<sup>\*1</sup>; José Ramirez Ascheri<sup>2</sup>; Lucinéia Gomes da Silva<sup>3</sup>; Mônica Caraméz Triches Damaso<sup>4</sup>; Grazielle Fonseca de Sousa<sup>5</sup>; Sonia Couri<sup>3</sup>.

#### RESUMO

O ácido fítico ou fitato é considerado fator antinutricional por complexar-se aos outros minerais tais como ferro, zinco, cálcio, magnésio, no trato gastrointestinal, tornando-os menos disponíveis para a absorção. O presente trabalho teve por objetivos, avaliar a estabilidade da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9, submetida às temperaturas de aplicação industrial (50°C) e, durante o armazenamento sob refrigeração (3,6°C) e congelamento (-16°C). Além disso, a ação da fitase fúngica na hidrólise do ácido fítico presente na farinha de sorgo foi comparada a atuação de uma fitase comercial de *A. niger*. O extrato bruto foi obtido a partir da fermentação em estado sólido por *A. niger* 11T53A9, em condições previamente padronizadas. A fitase se manteve estável a 3,6°C e -16°C durante 6 meses. Na temperatura de 50°C, manteve 86% de sua atividade após 24 horas. O tratamento enzimático da farinha de sorgo com 400 e 800U/kg da fitase de *A. niger* 11T53A9 foi capaz de hidrolisar 88 e 93% do ácido fítico presente na farinha de sorgo, reduzindo-o drasticamente nos tempos de 4 e 3 horas,

respectivamente, enquanto que o efeito da enzima comercial, nas mesmas concentrações, foi de 57,6 e 59,4% em 6 horas de hidrólise. Nas condições estudadas, a fitase de *A. niger* 11T53A9, obtida neste trabalho, teve maior desempenho que a fitase comercial (EC 3.1.3.8) para a farinha de sorgo.

**Palavras-chave:** fitato, fermentação em estado sólido, fator antinutricional

#### ABSTRACT

Phytic acid or phytate is an anti-nutritional factor, which is complexes them minerals such as iron, zinc, calcium, magnesium, in the gastrointestinal tract making them less available for absorption. This study aimed to assess the stability of the crude extract of phytase of *A. niger* 11T53A9, submitted to the industrial application of this enzyme (50°C) and during storage under refrigeration (3.6°C) and freezing (-16°C). Moreover, the action of fungal phytase on hydrolysis of phytic acid present in sorghum flour was compared the performance of a commercial phytase from *A. niger*. The crude

<sup>1</sup>Doutorando da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ; \*Rua Voluntários da Pátria, 30, Belo Horizonte, Valença, RJ, CEP 27600-000, e-mail: gaspar.ramos@bol.com.br

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos;

<sup>3</sup>Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ;

<sup>4</sup>Pesquisadora da Embrapa Agroenergia;

<sup>5</sup>Graduanda do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO.

extract was obtained from the solid-state fermentation by *A. niger* 11T53A9, under standard conditions. The enzyme was stable at 3.6°C and -16°C for 6 months. It retained 86% of its activity after 24 hours at 50°C. The enzymatic treatment of sorghum flour with 400 and 800U/kg of the phytase from *A. niger* 11T53A9 was promising, it was capable of hydrolyzing 88 and 93% of the phytic acid present in the sorghum flour, drastically reducing at time 4 and 3 hours, respectively, while the effect of commercial enzyme at the same concentrations, was 57.6 and 59.4% at 6 hours of hydrolysis. Thus it is concluded that the commercial phytase (EC 3.1.3.8) was less performance than the phytase from *A. niger* 11T53A9 in the studied conditions.

**Key words:** phytate, solid-state fermentation, antinutritional factor.

## 1 INTRODUÇÃO

Fitase, mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolase (EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.26), é um termo genérico aplicado a enzimas que catalisam a hidrólise do ácido fítico (mio-inositol hexaquisfosfato) formando inositolóis com menor número de grupamentos fosfato (KONIETZNY & GREINER, 2002).

O ácido fítico ou fitato é a principal forma de armazenamento de fosfatos em sementes (KONIETZNY & GREINER, 2002), e tem sido considerado um fator antinutricional por complexar-se a outros minerais tais como ferro, zinco, cálcio, magnésio e também com proteínas no trato gastrointestinal, tornando-os menos disponíveis para a absorção (YIN et al., 2007). Outro problema relacionado à ingestão do fitato encontra-se no fósforo ligado a molécula ser pouco assimilado por animais monogástricos durante o processo digestivo. Dessa forma, o fitato é excretado intacto no meio ambiente, tornando-se um problema em áreas de criação intensiva de animais (LEI & PORRES, 2003).

Estudos vêm sendo realizados a cerca da utilização de enzimas exógenas na alimentação de animais monogástricos a fim de melhorar a digestão e absorção, e o emprego de fitases tem se destacado para aplicação, principalmente, em rações (ABIOYE et al., 2010; BRANDÃO et al., 2007; COSTA et al., 2007), mas também em produtos para consumo humano (AFINAH et al., 2010; MATUSCHEK et al., 2005; ROSELL et al., 2009).

Em escala industrial utilizam-se microrganismos para a produção das fitases a partir de diferentes processos fermentativos. Fungos do gênero *Aspergillus* são, geralmente, os microrganismos mais utilizados para a produção industrial de fitases comerciais (MULLANEY & ULLAH, 2003; VATS & BANERJEE, 2004). Para que enzimas sejam empregadas industrialmente uma das características mais importante e desejável é a estabilidade ao tanto armazenamento quanto às condições de reação, sem que ocorram perdas apreciáveis em sua atividade (SHAH & MADAMWAR, 2005).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a estabilidade da fitase de *A. niger* 11T53A9, produzida a partir da fermentação em estado sólido, no armazenamento sob refrigeração, congelamento e, em temperatura de aplicação industrial (50°C), bem como, comparar o grau de hidrólise do ácido fítico presente na farinha de sorgo pela ação da fitase comercial de *A. niger* e a obtida neste trabalho.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

O mutante *A. niger* 11T53A9 da coleção de microrganismos da Embrapa Agroindústria de Alimentos, obtido por técnicas convencionais de mutação e

RAMOS et al. Estabilidade da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9 ao armazenamento e sua aplicação na hidrólise... seleção, conforme COURI & FARIAS (1995), foi utilizado neste estudo devido ao seu maior potencial de produção da enzima fitase, dentre 20 linhagens estudadas (SILVA et al., 2007). A fitase comercial (EC 3.1.3.8) utilizada foi cedida pela BASF (Natuphos® 10000 G) produzida por *A. niger*.

## 2.1 Preparação do inóculo

Os conídios foram transferidos do solo para meio de gelose inclinado, previamente esterilizado a 121°C por 15min, para indução do crescimento e produção da fitase. Os tubos foram incubados a 32°C por sete dias. Para melhorar a adaptação do microrganismo ao meio, foi realizado um segundo repique em gelose, conforme COURI & FARIAS, 1995, porém a fonte de carbono e de fosfato foi ácido fítico. Em seguida, os conídios foram transferidos para o meio de sabugo de milho enriquecido, previamente esterilizados a 121°C por 15min, e incubado a 32°C por cinco dias para ampliar a concentração de esporos (COURI, 1993).

## 2.2 Produção da fitase por fermentação em estado sólido

Os conídios no meio de sabugo de milho foram ressuspensos em uma solução de tween 80 0,1% (v/v) e, utilizados como inóculo na concentração de  $10^7$  esporos/g de meio de fermentação. O meio composto de okara (resíduo da soja), foi previamente umidificado com 60mL de solução de ureia (0,41% em solução de HCl 0,1N), para cada 100g de okara, e, esterilizado a 121°C por 15min. O meio inoculado foi transferido para 10 colunas de vidro e, as colunas eram imersas em banho-maria com circulação, modelo MA-470, Marconi (São Paulo, Brasil). A fermentação procedeu a 30°C por 72h com aeração de 1vvm, conforme SILVA et al. (2009).

A fitase exógena foi extraída com tampão acetato 0,1M, pH 5,0 (100mL/40g de meio fermentado), seguida de incubação sob

agitação por 1h a 30°C. Para remoção do resíduo sólido, a suspensão foi inicialmente filtrada com papel de filtro de filtragem rápida e, posteriormente com membranas Millipore (0,45µm), para remoção dos esporos (SILVA et al., 2007).

## 2.3 Diálise dos extratos

Para analisar a atividade fitásica, o extrato foi dialisado conforme SILVA et al. (2007) com objetivo de remover fosfatos. Os extratos foram dialisados em membrana de éster de celulose, Spectrum e MWCO de 500 Daltons, em tampão acetato 20 mM com trocas dessa solução 3 vezes ao longo de 1 dia, sob refrigeração.

O extrato restante não dialisado foi separado em tubos, sendo um tubo para cada tempo e condição de armazenamento – geladeira e freezer, para estudos de estabilidade conforme item 2.5.

## 2.4 Determinação da atividade fitásica

Para determinação da atividade fitásica, adicionou-se em tubo *Eppendorf* de 2mL, 200µL de tampão acetato (0,1M e pH 5,0), 100µL do extrato enzimático e 100µL da solução de ácido fítico 10mM (marca: Sigma-p0109). A reação foi interrompida com 1,5mL da mistura de soluções (AAM) de ácido sulfúrico 5,0N, molibdato de amônio 10mM e acetona PA na proporção 1:1: 2 v/v. Em seguida, adicionou-se 100µL de ácido cítrico 1,0M. Fez-se paralelamente um branco para cada extrato enzimático diferindo apenas na adição da solução de ácido fítico após a interrupção da reação com a mistura AAM. Após incubação durante 25min a 50°C sob agitação, o fosfato liberado foi medido de acordo com o método de molibdato de amônio (HEINONEN & LATHI, 1981) com algumas modificações. Uma unidade de atividade fitásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de fosfato inorgânico por minuto sob as condições de ensaio.

## 2.5 Estudo da estabilidade da fitase ao armazenamento em baixas temperaturas

O extrato enzimático obtido foi armazenado em frascos individuais sob refrigeração a 3,6°C ( $\pm 2,0$ ) e sob congelamento a -16,0°C ( $\pm 2,5$ ). Análises da atividade fitásica nos extratos dialisados foram realizadas em triplicata no tempo zero e, mensalmente por um período de 6 meses. A estabilidade da fitase foi avaliada pela atividade fitásica relativa, calculada pela relação entre a atividade fitásica nos diferentes tempos de armazenamento e a atividade no tempo 0 multiplicado por 100.

## 2.6 Estudo da estabilidade da fitase à temperatura de aplicação industrial (50°C)

Adicionou-se o extrato enzimático dialisado em tubos de ensaio e submeteu-os em banho-maria a 50°C para simulação de um processo de hidrólise, em triplicata. Os tubos foram retirados nos tempos de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 28, 32h e se determinou a atividade fitásica em triplicata. A estabilidade da fitase foi determinada, conforme descrito no item 2.5.

## 2.7 Cinética de hidrólise enzimática na farinha de sorgo

A matéria-prima utilizada foi o sorgo (*Sorghum bicolor*) da variedade experimental 9929034 (baixo teor de taninos) fornecida pela Embrapa Milho e Sorgo. Os grãos de sorgo foram moídos no nível 2 do moinho de disco Laboratory Mill 3600, Perten (Suécia), elaborando uma farinha de sorgo integral.

Para estudo da cinética de hidrólise do ácido fítico da farinha de sorgo foram utilizadas duas fitases: a produzida laboratorialmente conforme descrito no item 2.2 e, a comercial. Extratos enzimáticos contendo duas concentrações diferentes de cada enzima (400 e 800U de fitase/kg de farinha) foram obtidos e testados. Para

obtenção dos extratos adicionou-se volume adequado de tampão acetato 0,1M, pH 5,5 e 0,1M, pH 5,0 na fitase comercial e na de *A. niger* 11T53A9, respectivamente, de modo a atingir as concentrações definidas por kg da farinha. O pH e temperatura utilizados para a fitase de *A. niger* 11T53A9 foram escolhidos devido sua alta eficiência catalítica e para a comercial conforme os dados contidos na definição para atividade fitásica presente no rótulo.

A cada 20g de farinha de sorgo foram acrescentados 30mL (contendo 400 ou 800 U de fitase/kg de farinha, conforme o teste) de extrato enzimático, previamente aquecido até temperatura do processo de hidrólise 50°C para enzima fúngica de *A. niger* 11T53A9 e 37°C para enzima comercial. O processo ocorreu em condições controladas de temperatura e agitação (Banho-maria, modelo 50, Precision Scientific, Chicago, EUA) em duplicata e, em paralelo, um tratamento controle foi realizado nas mesmas condições, mas com o uso de solução tampão acetato 0,1M, sem enzima. Após os tempos de 1, 2, 3, 4 e 6h, a reação foi paralisada em banho-maria a 100°C por 10min e, as farinhas tratadas foram secas a 60°C. Para avaliação da hidrólise enzimática na farinha de sorgo foi determinado o teor de ácido fítico nos diferentes tempos de reação.

## 2.8 Determinação do teor de ácido fítico

O teor de ácido fítico foi determinado como descrito na AOAC (2010 método 986.11). O ácido fítico foi extraído da amostra moída com 40mL de solução de HCl 2,4% sob agitação por 3h e depois centrifugado. Adicionou-se 1mL do extrato obtido e 1mL de Na<sub>2</sub>EDTA-NaOH em balão volumétrico de 25mL e o avolumou, então passou a mistura por uma coluna BIORAD empacotada com resina de troca aniônica AG1-X4 para retenção do fitato. O fitato foi eluído com solução de NaCl 0,7M e posteriormente digerido a quente com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HNO<sub>3</sub> em

balão micro-Kjeldahl de 100mL. Após digestão ácida, a solução foi transferida para balão volumétrico de 50mL e adicionou-se 2mL de solução de molibdato de amônio, 1mL de solução do reagente ácido sulfônico e o avolumou. Realizou-se leitura em espectrofotômetro a 640nm.

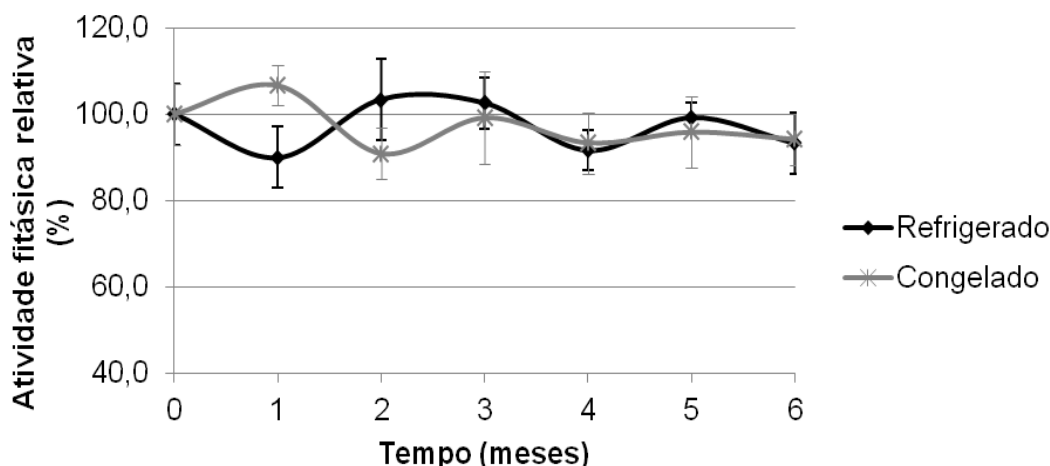
## 2.9 Classificação granulométrica

Esta análise foi realizada em duplicata utilizando um agitador de peneiras RO-TAP, modelo RX-29-10 (Mentor, EUA). Foram usadas 100g de amostra por 10min em um conjunto de sete peneiras arredondadas, vibratórias e com aberturas nas malhas de 1180, 850, 600, 425, 300, 150 e 106 $\mu$ m (16, 20, 30, 40, 50, 100 e 150 mesh, respectivamente) e um fundo. Em seguida, os conteúdos retidos em cada peneira foram pesados e expressos em porcentagens.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Estabilidade ao armazenamento da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9

A estabilidade da fitase em condições de refrigeração a 3,6°C e congelamento a -16°C foi determinada pela atividade relativa fitásica, durante 6 meses de armazenamento, conforme apresentado na Figura 1. As alterações ocorridas ao longo do tempo de armazenamento foram observadas nas diferentes amostras uma vez que para cada condição experimental foi separado um frasco com o extrato produzido e os erros inerentes aos procedimentos de diálise e análise estão inseridos na barra de erros. E, desta forma os resultados obtidos indicam que a atividade fitásica do extrato enzimático foi pouco afetada pela temperatura de armazenamento. A estabilidade enzimática durante o armazenamento é um fator importante, pois viabiliza a logística desde a produção até seu uso, sem perdas expressivas de sua atividade.



**Figura 1.** Estabilidade da fitase de *A. niger* 11T53A9 em condições de refrigeração e congelamento.

SILVA (2002) verificou que a fitase produzida por *A. niger* W2 em polpa cítrica por fermentação em estado sólido, demonstrou estabilidade ao armazenamento

por um período de 2 a 2,5 meses sob refrigeração a 4°C, sem auxílio de conservantes químicos. BRUGGER et al. (2004) observaram que a fitase purificada de

*A. fumigatus* teve boa estabilidade ao armazenamento e reteve acima de 95% de sua atividade inicial após 3 meses em temperatura ambiente e a 4°C. Estes resultados corroboram com o presente estudo ressaltando que o tempo de estudo utilizado nos trabalhos de SILVA (2002) e BRUGGER et al. (2004) foi menor. SALMON et al. (2012) verificaram que a fitase de *Schizophyllum commune* por fermentação em estado sólido apresentou boa estabilidade à estocagem a 4 e 26°C, perdendo somente 10% de sua atividade em 1,4 meses e teve melhor estabilidade a 4°C, mantendo 38% da sua atividade inicial após 3,7 meses de armazenamento. Mas com menor estabilidade comparada ao presente estudo.

### 3.2 Estabilidade da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9 na condição de aplicação industrial

O estudo da estabilidade da fitase a temperatura de aplicação industrial é outro

fator importante, pois a enzima precisa ser estável o suficiente, na condição de processo, para que a reação de hidrólise do fitato presente na matéria-prima seja catalisada. A fitase produzida neste trabalho manteve 93 e 86% de sua atividade em 8 e 24h, respectivamente, a 50°C (Figura 2). A glicosilação pode ter influenciado de forma positiva na estabilidade da fitase em estudo. Segundo GREINER et al. (2009), a enzima purificada de *A. niger* 11T53A9 possui uma característica de glicosilação, e de acordo com HAN & LEI (1999) a glicosilação foi vital para a termoestabilidade da fitase de uma levedura mutante de *Pichia pastoris*, a qual resultou em redução de 34% de sua estabilidade com a deglicosilação completa da enzima.

Os dados da curva (Figura 2) se ajustaram ao modelo matemático expresso pela equação polinomial de 2ª ordem (Equação 1) com coeficiente de determinação de 0,915, explicando 91% da variação total da atividade enzimática, no intervalo de tempo estudado.

$$y = -0,019x^2 - 0,081x + 95,34 \quad R^2 = 0,915 \quad (\text{Eq 1})$$

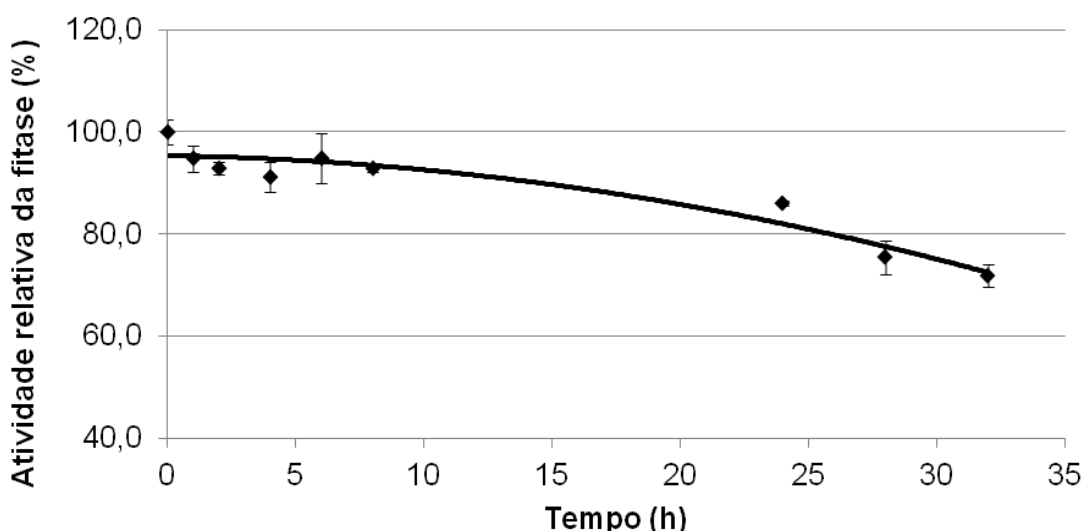


Figura 2. Estabilidade da fitase de *A. niger* 11T53A9 na temperatura de 50°C.

SILVA (2002) verificou que a fitase de *A. niger* W2 foi estável a 50°C e a partir de 6h de incubação ocorreu um leve declínio de sua atividade catalítica, que se manteve constante até 8h, assim como a fitase do atual estudo. A fitase purificada de *Rhizopus oryzae* por RANI & GHOSH (2011) manteve-se 100% estável quando incubada a 50°C por 30min. Enquanto, nas temperaturas de 60, 70 e 80°C foi observado uma perda de 10% e o tempo de meia vida a 70°C foi estimado em 8,25h, mostrando boa termoestabilidade da fitase. SINGH & SATYANARAYANA (2009) encontraram que a fitase purificada de *Sporotrichum thermophile* manteve 100% de atividade a 60°C por 5h, com tempo de meia-vida de 16h a 60°C e de 90min a 80°C, e observaram um aumento da termoestabilidade na presença de estabilizadores como trealose, glicerol, sorbitol e ácido fítico. ZHANG et al. (2010) verificaram que a fitase purificada de *A. ficuum* NTG-23 mostrou boa termoestabilidade sem perdas de atividade por 1h a 60°C, ao passo que a 70°C perdeu 14% e quando aumentou para 80°C a atividade desapareceu em 10min.

### 3.3 Cinética de hidrólise enzimática da fitase na farinha de sorgo

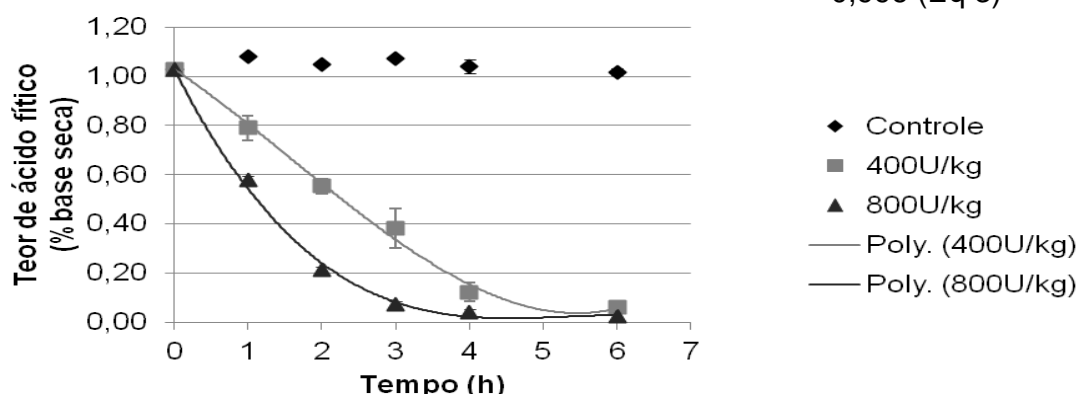
Muitas pesquisas são realizadas adicionando-se fitase à matéria-prima, principalmente quando se trata de nutrição animal, para que tenha ação hidrolítica no trato gastrointestinal (COSTA et al., 2007). Porém, outra estratégia pode ser utilizada, trata-se da incubação *in vitro* da matéria-prima contendo fitase exógena para obtenção de farinhas com baixo teor de ácido fítico.

Os perfis cinéticos de hidrólise da farinha de sorgo utilizando extrato enzimático de fitase de *A. niger* 11T53A9, nas concentrações 400 e 800U de fitase/kg de farinha, além da condição controle (sem enzima) encontram-se na Figura 3.

Os dados das curvas (Figura 3) se ajustaram ao modelo matemático expresso pela equação polinomial de 3ª ordem (Equação 2 e 3) com coeficientes de determinação de 0,995 e 0,996 explicando 99,5 e 99,6% da variação total do teor de ácido fítico para as curvas com concentrações de 400 (Eq. 2) e 800 (U de fitase/kg de farinha) (Eq.3), respectivamente, no intervalo de tempo estudado.

$$y = 0,005x^3 - 0,025x^2 - 0,203x + 1,03 \quad R^2 = 0,995 \quad (\text{Eq 2})$$

$$y = -0,007x^3 + 0,114x^2 - 0,594x + 1,03 \quad R^2 = 0,996 \quad (\text{Eq 3})$$



**Figura 3.** Perfil cinético da hidrólise enzimática de fitase de *A. niger* 11T53A9 na farinha de sorgo com concentração da fitase de 400 e 800U/kg de farinha, e condição controle (sem enzima).

Com a aplicação da fitase verificou-se uma redução do teor de ácido fítico em cerca de 23 e 44% usando a concentração enzimática de 400 e 800U/kg, respectivamente, em 1h de hidrólise. Em 2h de processo, nas mesmas concentrações enzimáticas, a redução foi de 46 e 79%, respectivamente. Portanto, a eficiência de hidrólise do ácido fítico foi diretamente proporcional ao aumento da concentração enzimática.

Após esse tempo, verificou-se que o tratamento enzimático nos tempos de 4 e 3h, utilizando as concentrações enzimáticas de 400 e 800U/kg, reduziu drasticamente o teor de ácido fítico em 88 e 93%, respectivamente, mostrando que o procedimento em estudo é bastante promissor.

Se o processo para obtenção de uma farinha com menor teor de ácido fítico, por ação de fitase, for realizado na indústria (*in vitro*) aumentam as chances de êxito comparado com a adição da fitase na matéria-prima para sua ação *in vivo* (no trato gastrointestinal). Nessa segunda opção, a matéria-prima adicionada de enzima é processada e armazenada até ser consumida. Com isso a atividade enzimática pode ser reduzida, parcial ou totalmente, devido a temperaturas altas no processamento, tempo e temperatura de armazenamento do produto acabado, bem como interferências no trato gastrointestinal, problemas que não ocorrem no caso *in vitro*.

SILVA (2003) realizou hidrólise do ácido fítico presente na farinha de lupino com uso de fitase de *A. niger*, conseguindo uma redução do teor de fitato em menos tempo que o exposto nesse trabalho. Verificou que 40min de incubação foi suficiente para hidrolisar todo ácido fítico na farinha de lupino, utilizando uma concentração enzimática de 500U/kg. Porém, observou que esta redução não foi ocasionada somente pela hidrólise enzimática, pois 25% do ácido fítico havia sido removido por extração,

situação que não ocorreu no presente estudo, pois após a incubação da farinha de sorgo com o extrato enzimático, promoveu-se a secagem sem remoção do líquido que estava em excesso na farinha. Com isso, evitou-se a ocorrência de perdas de compostos solúveis como sais minerais presentes na farinha, os quais são importantes para uma adequada nutrição.

SILVA (2003) utilizou no processo de hidrólise, uma proporção de extrato enzimático: farinha de lupino de 7,5:1, enquanto que, neste estudo a proporção de solução foi bem menor 1,5:1. Com essa menor quantidade de água conseguiu-se secar a suspensão diretamente, sem a necessidade de remoção de líquido excedente, portanto, não provocando a redução do teor de ácido fítico, conforme observado na curva controle (Figura 3).

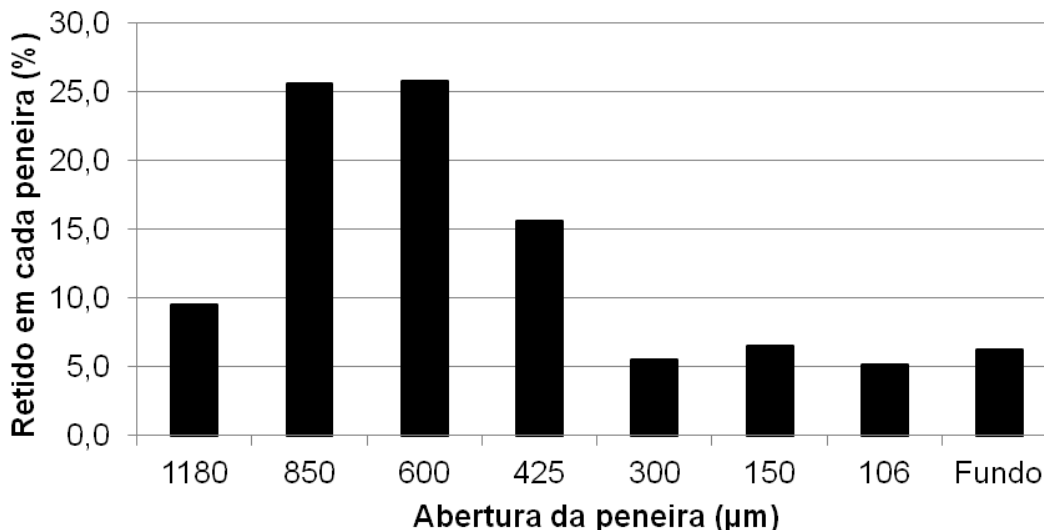
SILVA (2003), em outro experimento, realizou hidrólise do ácido fítico presente em uma mistura de farinha de lupino e farelo de trigo com uso de fitase de *A. niger*. Verificou que houve uma redução do ácido fítico na mistura de 55 e 71% utilizando concentração enzimática de 500 e 1000U/kg, respectivamente, em 60min de incubação. Porém, observou-se que esta redução não foi ocasionada somente pela hidrólise enzimática, pois 49% do ácido fítico foram removidos por extração no tratamento controle. Justificou como uma provável contribuição na diferença de eficiência da redução do ácido fítico entre a farinha de lupino e a mistura de farinha, a concentração inicial de ácido fítico das amostras de 0,60 e 2,65%, respectivamente.

Outro fator importante é o tamanho de partícula. A eficiência da hidrólise enzimática pode ser aumentada com a diminuição do tamanho da partícula de farinha devido a uma maior exposição do ácido fítico para ação da enzima fitase. No presente estudo a farinha tinha uma granulometria mais grossa, com 77% da farinha com granulometria acima de 425 $\mu$ m (Figura 4), desfavorecendo a ação



enzimática, comparado com SILVA (2003) que trabalhou com uma farinha mais

fina de granulometria inferior a 400µm.



**Figura 4.** Classificação granulométrica da farinha de sorgo após moagem em moinho de disco para tratamento enzimático.

MATUSCHEK et al. (2005) realizou hidrólise do ácido fítico presente na farinha de sorgo com uso de fitase comercial de trigo, conseguindo uma redução total do ácido fítico em 24h de incubação utilizando uma concentração enzimática de 2000U/kg de farinha.

SCHONS et al. (2011) aplicaram enzima fitase comercial em farinha de sorgo usando concentração enzimática de 100U/kg e verificaram uma aumento no teor de fósforo de 0,27% para 0,69% após 24h incubado. Esse aumento do teor de fósforo é ocasionado pela hidrólise do ácido fítico provocado pela ação da fitase.

Pesquisas vêm mostrando a eficiência da ação da fitase para redução do teor de ácido fítico em diferentes alimentos. Assim como o observado neste trabalho, cujo tratamento com fitase de *A. niger* 11T53A9 reduziu o teor de ácido fítico no sorgo em 93% em 3h de hidrólise utilizando concentração de 800U de fitase/kg de farinha.

### 3.4 Cinética de hidrólise enzimática na farinha de sorgo com a fitase comercial

Os perfis cinéticos de hidrólise do ácido fítico, usando extrato enzimático comercial, na farinha de sorgo aplicados com concentrações de fitase de 400 e 800 (U/kg de farinha), além do controle (sem enzima) encontram-se na Figura 5.

Comparando as duas enzimas utilizadas neste trabalho (Figuras 3 e 5), após 6h de processamento, os resultados obtidos com a enzima *A. niger* 11T53A9, nas mesmas concentrações (400 e 800U/kg), quanto à redução do teor de ácido fítico foi próximo de 100% enquanto que o efeito da enzima comercial foi de 57,6 e 59,4%, respectivamente. Desta forma conclui-se que a enzima comercial, para a farinha de sorgo nas condições estudadas, teve menor desempenho que a fitase de *A. niger* 11T53A9.

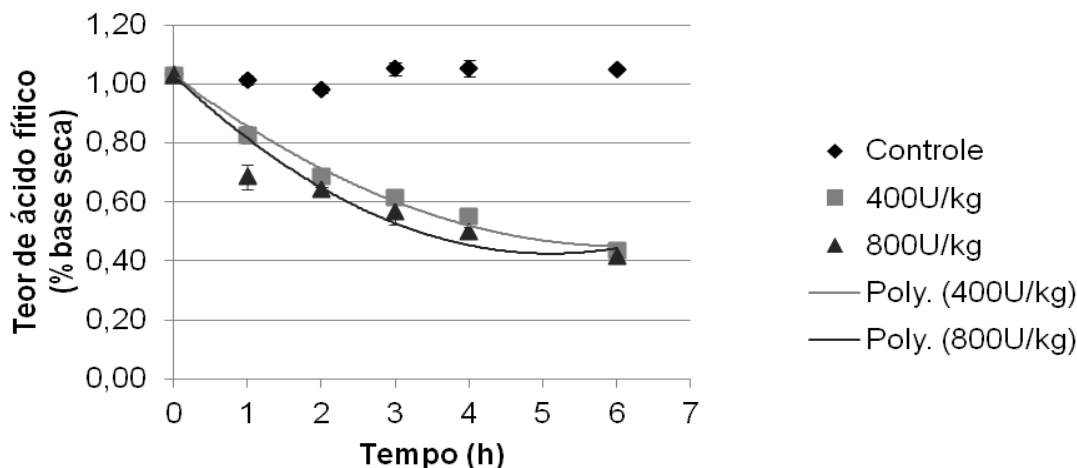
Os dados das curvas (Figura 5) se ajustaram ao modelo matemático expresso na equação polinomial de 2ª ordem

(Equação 4 e 5) com coeficientes de determinação de 0,986 e 0,907 explicando 98,6 e 90,7% da variação total do teor de ácido fítico para as curvas com concentrações de 400 (Eq 4) e 800 (Eq.5) (U

de atividade/kg de farinha), respectivamente, no intervalo de tempo estudado.

$$y = 0,013x^2 - 0,188x + 1,03 \quad R^2 = 0,986 \quad (\text{Eq } 4)$$

$$y = 0,018x^2 - 0,236x + 1,03 \quad R^2 = 0,907 \quad (\text{Eq } 5)$$



**Figura 5.** Perfil cinético da hidrólise enzimática da farinha de sorgo utilizando a fitase comercial com concentração de 400 e 800U/kg de farinha, e condição controle (sem enzima).

#### 4 Conclusão

A fitase de *A. niger* 11T53A9 se mostrou estável a temperatura de aplicação industrial e ao armazenamento, tanto em temperatura de congelamento quanto de refrigeração, sem adição de conservadores, o que a torna viável para utilização comercial.

O tratamento enzimático da farinha de sorgo utilizando a fitase de *A. niger* 11T53A9 foi bastante promissor, pois se mostrou eficiente na hidrólise do ácido fítico, reduzindo-o drasticamente nos tempos de 4 e 3h, utilizando as concentrações de 400 e 800U de fitase/kg de farinha, respectivamente. E apresentou melhor desempenho que a enzima comercial nas condições estudadas, mostrando seu potencial para aplicação industrial.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Avelino Santos Rodrigues da Embrapa Milho e Sorgo pelo fornecimento do sorgo, a Carmine Conte da Embrapa Agroindustria de Alimentos pelo suporte nas análises de ácido fítico e a CAPES pela bolsa concedida.

#### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOYE, S.; IGE, D.; AKINREMI, O. et al. Characterizing fecal and manure phosphorus from pigs fed phytase supplemented diets. **Journal of Agricultural Science**, v.2, p.3-12, 2010.
- AFINAH, S.; YAZID, A.M.; ANIS SHOBIRIN, M.H. et al. Phytase: application in food industry. **International Food Research Journal**, v.17, p.13-21, 2010.

- RAMOS et al. Estabilidade da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9 ao armazenamento e sua aplicação na hidrólise... ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 18.ed. Washington, 2010.
- BRANDÃO, P.A.; COSTA, F.G.P.; BRANDÃO, J.S. et al. Efeito da adição de fitase em rações de frangos de corte durante as fases de crescimento e final. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.492-498, 2007.
- BRUGGER, R.; NUNES, C.S.; HUG, D. et al. Characteristics of fungal phytases from *Aspergillus fumigatus* and *Sartorya fumigata*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.63, p.383-389, 2004.
- COSTA, F.G.P.; BRANDÃO, P.A.; BRANDÃO, J.S. et al. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.3, p.865-870, 2007.
- COURI, S. **Efeitos de cations na morfologia e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. Rio de Janeiro, 1993. 199p. Tese (Doutorado em Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- COURI, S.; FARIAS, A.X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v.26, p.314-317, 1995.
- GREINER, R.; SILVA, L.G.; COURI, S. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 795-807, 2009.
- HAN, Y.; LEI, X.G. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.364, p.83-90, 1999.
- HEINONEN, J.K.; LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**, v.113, p.313-317, 1981.
- KONIETZNY, U., GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food and Technology**, v.37, p.791-812, 2002.
- LEI, X.G.; PORRES, J.M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v.25, n.21, p.1787-1794, 2003.
- MATUSCHEK, E.; SVANBERG, U. The effect of fruit extracts with polyphenol oxidase (PPO) activity on the in vitro accessibility of iron in high-tannin sorghum. **Food Chemistry**, v.90, n.4, p.765-771, 2005.
- MULLANEY, E.J.; ULLAH, A.H.J. The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.312, p.179-184, 2003.
- RANI, R.; GHOSH, S. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource Technology**, v.102, p.10641-10649, 2011.
- ROSELL, C.M.; SANTOS, E.; PENELLA, J.M.S. et al. Wholemeal wheat bread: a comparison of different breadmaking processes and fungal phytase addition. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 2, p. 272-277, 2009.
- SALMON, D.N.X.; PIVA, L.C.; BINATI, R.L. et al. A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability.

**Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.35, p.1067-1079, 2012.

SCHONS, P.F.; RIES, E.F.; BATTESTIN, V. et al. Effect of enzymatic treatment on tannins and phytate in sorghum (*Sorghum bicolor*) and its nutritional study in rats. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, n.6, p.1253-1258, 2011.

SHAH, A.R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v.40, p.1763-1771, 2005.

SILVA, A.R.Z. **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**. Curitiba, 2002. 96p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná.

SILVA, L.G. et al. Obtenção da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9 por fermentação semi-sólida, em colunas aeradas. In: 8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2009, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: Unicamp, 2009. v.1. CD-ROM.

SILVA, L.G. et al. Seleção de *Aspergillus niger* produtores de fitase. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba: CIETEP, 2007. v.1, p.1-7. CD-ROM.

SILVA, L.G. **Processos enzimáticos para degradação de ácido fítico em formulações a base de lupino (*Lupinus albus*)**. Rio de Janeiro, 2003. 114p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology**, v.100, p.2046-2051, 2009.

VATS, P.; BANERJEE, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.3-14, 2004.

YIN, Q.Q.; ZHENG, Q.H.; KANG, X.T. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. **Animal Feed Science and Technology**, v.132, p.341-350, 2007.

ZHANG, G.Q.; DONG, X.F.; WANG, Z.H. et al. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. **Bioresource Technology**, v.101 p. 4125-4131, 2010.