

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Fermentação em estado sólido com resíduos agrícolas de frutos do cerrado
para produção da enzima fitase por *Aspergillus awamori* e *Penicillium
roqueforti***

VINÍCIUS DE OLIVEIRA VASCONCELOS



Vinícius de Oliveira Vasconcelos

**Fermentação em estado sólido com resíduos agrícolas para produção da
enzima fitase por *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. William James Nogueira Lima

Montes Claros

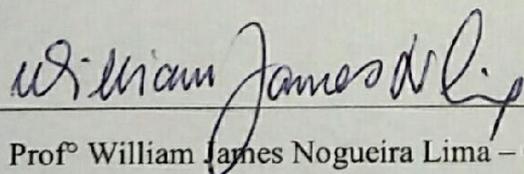
2019

Vinícius de Oliveira Vasconcelos. Fermentação em estado sólido com resíduos agrícolas para produção da enzima fitase por *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti*

Aprovado pela banca examinadora constituída por:

Técnico Sandro Braga Soares – Técnico ICA/UFMG

Prof.º Igor Viana Brandi – Docente ICA/UFMG



Profº William James Nogueira Lima – Orientador ICA/UFMG

Montes Claros 05 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Kátia Aparecida e Hildeberto pelo apoio, amor e carinho incondicionais e por serem sempre meus guias e principais pilares na vida, vocês me moldaram o que sou.

Agradeço aos meus amigos por todo companheirismo e paciência compartilhados, em especial agradeço as minhas amigas Larissa e Alécia pelos momentos compartilhados, vocês foram uma grande força motivadora que me ajudou a alcançar meus objetivos.

Agradeço ao meu orientador William James por ser a mente que me instigou e inspirou a trilhar o meu caminho na ciência. Agradeço a funcionários do Instituto de Ciências Agrárias Fernanda e Sandro por todo apoio técnico oferecido.

Por fim agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais que me acolheu e ofereceu todas as oportunidades para que o meu desenvolvimento fosse possível.

“Para enxergar o mundo num grão de areia
E o paraíso em uma flor do campo
Segure o infinito na palma da sua mão
E a eternidade em uma hora”

William Blake

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar a produção da enzima fitase através da técnica de fermentação em estado sólido (FES) usando como substrato para a mesma resíduos agrícolas de frutas. As espécies fúngicas *Aspergillus awamori* B.361 U2/1 e *Penicillium roqueforti* cepa adquirida da Fundação André Tosello foram usadas para a fermentação em estado sólido, foi preparado o inóculo em frascos erlenmeyer de 500 mL que continham cerca de 100 mL de cultura ágar BDA. Esses frascos foram esterilizados e a incubação ocorreu por 7 dias a 28 °C. Após esse processo foi feito o inóculo na forma de disco miscelial de 1,0 cm de diâmetro que foram macerados em 1,0 mL de solução salina 0,9% cada. As fermentações ocorreram a 70% de umidade em erlenmeyer e o meio de cultivo foi previamente umidificado com 8 mL água destilada. Este era composto de 25 g dos resíduos agrícola de maracujá, umbu, seriguela e coquinho azedo e uma solução de ureia a 3% como fonte de nitrogênio, com adição de 1 mL de inóculo a esses meios de cultivo foi realizada a incubação a 30 °C por 48 horas. Para a extração das enzimas adicionou-se 100 mL de água destilada aos erlenmeyers que sofreram agitação no shaker a 150 rpm por 30 minutos. O extrato obtido foi filtrado para retirada e uso do permeado para mensuração das atividades enzimáticas. A atividade enzimática foi medida através da quantificação colorimétrica da liberação de fosfato inorgânico seguindo método de Fiske e Subbarow (1925). Os resultados indicaram maior produção para o fungo *A. awamori*, ele atingiu valores de atividade enzimática de até 0,256 UI/mL com tempo de fermentação de 24 horas, com resultados superiores para todos os resíduos quando comparado ao *P. roqueforti*, que apresentou maior valor para o resíduo de maracujá com 0,084 UI/mL de atividade enzimática com 24 horas de tempo de fermentação. Conclui-se que o *A. awamori* possuiu maior destaque para a produção da enzima nas condições propostas.

Palavras-chave: Reaproveitamento, resíduo agrícola, cultivo em estado sólido, fitato, fósforo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Hidrólise do fitato em inositol pela ação da enzima fitase.	18
Figura 2 - Fermentação em estado sólido de <i>A. awamori</i> e <i>P. roqueforti</i> realizada em Erlenmeyers.	24
Figura 3 - Fluxograma do processo para formação do extrato enzimático.	25
Figura 4 – Atividade de fitase, expressas em UI/mL, para as fermentações do fungo <i>A. awamori</i> em diferentes substratos.	28
Figura 5 – Atividade de fitase, expressas em UI/mL, para as fermentações do fungo <i>P. roqueforti</i> em diferentes substratos.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de fitases comerciais disponíveis mundialmente no mercado.	20
Tabela 2 – Valores obtidos para caracterização dos substratos usados na fermentação em estado sólido.	27
Tabela 3 – Melhores resultados para fermentação dos fungos <i>A. awamori</i> e <i>P. roqueforti</i>	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FES – Fermentação em estado sólido

FS – Fermentação submersa

FDA – Fibra detergente ácido

FDN – Fibra detergente neutro

EE – Extrato etéreo

PB – Proteína bruta

SUMÁRIO

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Processos Fermentativos	15
3.2 Fermentação Em Estado Sólido (FES)	15
3.3 Principais fatores que influem para a produção enzimática por FES	17
3.3.1 Umidade	17
3.3.2 pH	17
3.3.3 Temperatura.....	17
3.3.4 Outros fatores	18
3.4 Fitase.....	18
3.5 Ácido Fítico	19
3.6 Aplicações Industriais da Fitase	20
3.7 Microrganismos	21
3.8 Substratos – Resíduos Agroindustriais de Frutas	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Caracterização do meio de cultivo.....	23
4.2 Microrganismos	23
4.3 Preparo do inóculo.....	23
4.4 Meio de Cultivo	24
4.5 Fermentação em estado sólido.....	24
4.6 Extração de enzimas	25
4.7 Análise da atividade enzimática da fitase.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 – Caracterização do material	27
5.2 – Fermentação em Estado Sólido	27
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

O contato humano com a tecnologia está intimamente atrelado ao seu desenvolvimento desde o início dos tempos, dentro desses campos tecnológicos a biotecnologia é uma área em constante progressão desde os primórdios da civilização, os primeiros contatos do homem com esse tipo de ciência vêm através da produção principalmente de pães e vinhos nas quais eram usados microrganismos durante os processos. Entretanto a biotecnologia moderna baseia-se em outras técnicas como por exemplo a modificação e introdução de material gênico a fim de alterar favoravelmente os processos metabólicos (COSTA, 2004).

Podem ser observadas muitas pesquisas na área da biotecnologia com intuito de gerar espécies vegetais cada vez mais resistentes a pragas e doenças além de melhorar o teor nutricional das mesmas. Um dos meios mais frequentes para tornar os vegetais mais interessantes no âmbito nutricional é a redução de fatores antinutricionais, esse desenvolvimento biotecnológico ocorre através do uso de aditivos como os prebióticos e enzimas. Há ainda o uso desses recursos para adição em rações animais para melhorar a eficiência alimentar e produtividade de, por exemplo, aves, suínos e peixes.

Nesse sentido os procedimentos biotecnológicos para produção de enzimas despertaram um grande interesse da indústria e intensificou-se as pesquisas para maximização e otimização do uso desse recurso em diversos segmentos além do setor de alimentação e rações, com ênfase para as indústrias têxtil, papel celulose e também de químicos e farmacêuticos. Dados demonstram que no ano de 2010 a produção enzimática movimentou cerca de 6 bilhões de dólares com previsão de crescimento para o ano seguinte.

As enzimas são proteínas catalisadores naturais de reações químicas, elas são essências para os organismos vivos exercendo principalmente função de degradar a matéria orgânica. Esses compostos possuem uma complexa estrutura molecular, sendo formadas por uma parte proteica que pode estar ligada a outros compostos, como carboidratos e lipídeos. Dentro da indústria as enzimas possuem diversos empregos e utilizações, elas podem funcionar de modo a facilitar ou dificultar reações específicas, alguns processos nos quais é possível observar seus usos são, por exemplo, dentro da indústria de alimentos, na qual as enzimas são usadas tanto no processo de fabricação, como as amilases que tem função de ajudar a atividade enzimática das farinhas para panificação, quanto em processos de higienização no qual as mesmas são empregadas visando

auxiliar a remoção de gorduras e proteínas através, principalmente, dos detergentes (ORLANDELLI et al., 2012).

A produção das enzimas em escala industrial é realizada principalmente por dois processos: a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido sendo o primeiro o mais utilizado devido a maior facilidade de desenvolvimento do microrganismo em condições de pH e temperatura controladas. Todavia é possível baratear todo o processo de produção enzimática pelo uso da fermentação em estado sólido, essa requer um menor controle e menos investimentos devido a facilidade de instalação do processo e de recuperação das enzimas podendo obter um resultado tão satisfatório quanto a fermentação submersa. Outros fatores positivos para a fermentação em estado sólido é a possibilidade de reutilização de diversos resíduos agrícolas como meio de cultura que reduz o valor total do processo, fazendo ainda uso de fungos que possuem bom crescimento nesses meios.

Os fungos são um dos principais microrganismos produtores de enzimas, o processo ocorre naturalmente pela infecção da planta pelo fungo que, por sua vez, produz as enzimas extracelulares para transporte e degradação de nutrientes para a célula (ORLANDELLI et al., 2012). Essa produção natural pode ser repetida na fermentação em estado sólido, levando em consideração a composição dos substratos originários de resíduos agroindustriais o desenvolvimento do fungo pode ocorrer de maneira semelhante as características da natureza, esse aspecto torna essa produção extremamente viável contribuindo também para minimizar a quantidade de resíduo a ser despejado no meio ambiente e gerando valor industrial.

O ácido fítico é um composto antinutricional que se liga a diversos minerais e reduz a sua biodisponibilidade, ele possui pouca digestibilidade para animais monogástricos como frangos e porcos pois os mesmos possuem baixa ou nenhuma atividade da enzima fitase intestinal, nesse sentido os mesmos não conseguem usar o ácido fítico disponível (MAGA et al., 1982; LELIS et al., 2009). Desse modo é de interesse da indústria que esse ácido fítico seja hidrolisado para diminuir a poluição por excreção de P em áreas oriundas da criação intensiva de animais e para que o mesmo possa ser também aproveitado nutricionalmente pelos animais. A indústria busca ainda processos mais eficientes para redução desse fitato, Reddy et al. (1982) cita que processos de moagem, hidratação e tratamento térmico são exemplos de como reduzir o fitato presente. Há ainda a possibilidade de adição da enzima fitase de maneira exógena ou ativação da enzima endógena. De acordo Lelis et al. (2009) a produção de fitase para tal aplicação é uma alternativa eficiente para a indústria de alimentos. A fitase é uma enzima do tipo fosfatase responsável pela catalise da hidrólise do ácido fítico em inositol e fosfatos, liberando assim compostos para

serem absorvidos, como o ortofosfato. Essa enzima foi uma das primeiras descritas com a capacidade de liberar o fosfato inorgânico a partir de fosfato orgânico (LELIS et al., 2009).

Foram escolhidos os resíduos de coquinho azedo, maracujá, siriguela e umbu para a realização das fermentações, com o *Aspergillus awamori* sendo fermentado em todos esses enquanto o *Penicillium roqueforti* teve seu desenvolvimento apenas no maracujá, siriguela e umbu.

Essas frutas são típicas da região do norte de Minas e são usadas para fabricação de produtos como polpas, doces ou in natura que são fonte de renda para diversas pequenas agroindústrias e cooperativas, desse modo são gerados resíduos que possuem pouco valor agregado e que podem posteriormente ser melhor aproveitados pela indústria. Existem algumas literaturas que citam a capacidade de algumas dessas frutas de funcionamento como substrato para a fermentação e produção de enzimas diversas, Menezes et al. (2006) pesquisaram e obtiveram resultados positivos a respeito da capacidade de uso de resíduos de maracujá como substrato para a produção de poligalacturonase através da fermentação de *Aspergillus niger*.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de fitase endógena através da fermentação em estado sólido das espécies fúngicas *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* utilizando, a fim de avaliar a viabilidade, de resíduos agrícolas de maracujá, umbu, coquinho e seriguela como substrato para o processo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Processos Fermentativos

A biotecnologia é um campo com constante aprimoramento, é possível ver com maior frequência cada vez mais aplicação de conceitos como recombinação e modificação do DNA e melhoramento e produção de culturas. Dentro de todo esse contexto é importante salientar a função das enzimas afim de otimizar e viabilizar diversos processos produtivos. O Brasil possui pouca produção enzimática sendo, essencialmente um importador dessas além de possuir o consumo das mesmas pela indústria em pequena escala, tendo em vista esse panorama é interessante que se desenvolva essa área cada vez em maior crescimento (SANTOS, 2011).

O uso de microrganismos para obtenção de produtos é variado, podendo-se diversificar o tipo de biorreator a ser usado, o método de cultivo do microrganismo: fermentação submersa ou em estado sólido e fatores como ser contínuo, semicontínuo ou descontínuo. Acerca dos biorreatores é ainda importante que se observe a possibilidade de monitoramento e de controle dos diversos parâmetros do processo e também as características do microrganismo e do substrato para escolher de maneira eficiente o que mais se adeque ao processo (ALMEIDA, 2012). Dentro do âmbito dos produtos obtidos por esses processos é possível citar as enzimas como principal área de interesse para a biotecnologia.

As enzimas são usadas pelos seres humanos de diversas maneiras, sua origem tem início com o uso de preparação brutas de origem animal e vegetal ou indiretamente através de sua ação proveniente do crescimento microbiano, foi apenas recentemente que foi possível para a indústria viabilizar a ação e uso controlado das enzimas.

3.2 Fermentação Em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) é compreendida como o processo no qual à cultura de microrganismos está alocada sobre ou dentro de partículas em matriz sólida de substrato ou material inerte onde o conteúdo de líquido a mesma seja suficiente para o crescimento celular adequado (LIMA et al, 2001). É uma opção viável com rentabilidade potencialmente superior a fermentação submersa, além de ser mais barata já que se pode

usar para a FES resíduos agrícolas que são uma matéria prima de baixo custo (ALMEIDA, 2012).

Originalmente a FES era muito utilizada no Japão com o uso de subprodutos como o farelo de arroz e cascas de frutas como substrato para o processo. O Brasil apresenta-se como um país que possui uma imensa área de produção agrícola que produz grande quantidade de resíduo que acaba por ser subutilizado devido à falta de destino, deste modo é possível tornar a FES um potencial explorador desse recurso para produção industrial rentável que é ainda aliada aos conceitos de sustentabilidade e preservação ambiental. Em menor escala há também diversas cooperativas e pequenas agroindústrias que geram grande quantidade de resíduo que pode ser aplicado como substrato.

Existem muitas características e aspectos relevantes para o processo desse tipo de cultivo: o microrganismo a ser usado, a escolha do substrato mais eficiente, a obtenção de parâmetros mais eficientes e o isolamento e purificação do produto. Um desses aspectos é a baixa umidade do substrato sólido que torna propício apenas o crescimento de fungos e leveduras já que as bactérias demandam alta atividade de água, além de dificultar a contaminação.

O processo da FES é severamente mais econômico que a fermentação submersa, já que além de serem muito mais interessantes para países com abundância de resíduos agroindustriais que o usam como matéria prima barata é ainda possível que se reduza mais os custos tendo em vista que não há necessidade de etapas anteriores como por exemplo o pré-cultivo, além disso o volume de meio para a reação é menor o que implica em menor custo do biorreator. Segundo Hölker et al. (2004) as vantagens da FES tornam a produção enzimática maior em comparação a FS, além disso há também um produto final de maior qualidade com maior atividade que é menos susceptível aos problemas de inibição ao substrato e as variações de temperatura e pH.

Entretanto é importante ressaltar que esse processo necessita de um rígido parâmetro de qualidade para que sua aplicação seja eficiente já que uma de suas principais desvantagens com relação a fermentação submersa é a dificuldade de controle de variáveis como pH, temperatura e umidade, outros problemas são a dificuldade de acompanhamento de mudanças físico-químicas e a facilidade de contaminação do meio.

3.3 Principais fatores que influem para a produção enzimática por FES

3.3.1 Umidade

A umidade é um dos principais aspectos para se obter um processo eficiente, levando em consideração tanto a atividade de água do microrganismo quanto do substrato a ser usado. Fungos são pouco exigentes com relação a esse fator, segundo Almeida (2012) valores entre 40%-60% de umidade podem vir a ser suficientes, entretanto ainda é importante avaliar o custo e disponibilidade do substrato para melhor escolher.

O grau de umidade do substrato é determinado levando em consideração sua origem, as necessidades da cultura a ser usada e o tipo de produto final que se deseja obter (PARIS, 2008). Em condição ideal de umidade o substrato deve formar uma camada superficial de água que irá possibilitar a distribuição otimizada de nutrientes e de oxigênio, altos valores de umidade afetam a obtenção de oxigênio pelo fungo e atrapalham a cinética de crescimento do mesmo, enquanto valores muito baixos podem dificultar o crescimento do microrganismo e gerar, conseqüentemente, uma menor quantidade de enzimas viáveis implicando também em menor porosidade do meio dificultando as trocas gasosas e de calor do meio fermentado.

3.3.2 pH

O pH é um parâmetro de difícil controle na FES em decorrência das variadas propriedades e a consistência dos substratos usados, para que se minimize os problemas com essa variável são escolhidos preferencialmente meios com maior capacidade tamponante, é também possível usar solução-tampão durante a umidificação do substrato.

3.3.3 Temperatura

Um fator de extrema importância para o processo crescimento do microrganismo no cultivo em estado sólido é a temperatura. Tendo em vista que o processo é exotérmico faz-se necessária a dissipação do calor gerado para que isso não interrompa a cinética de desenvolvimento.

Entretanto esse fator é de difícil controle já que os meios usados possuem baixa condutividade e, portanto, atrapalha principalmente a remoção de calor. Algumas alternativas em escala industrial são possíveis para sanar o problema: a introdução de ar comprimido no substrato, o controle geral de temperatura da sala e/ou equipamento onde ocorre a fermentação, ou o uso de um equipamento para a fermentação que permita a troca eficiente de calor. Segundo Hasan (2002) em grande escala aparelhos de refrigeração são ineficientes para a dissipação do calor metabólico em FES, ressaltando ainda mais a importância da porosidade adequada do meio de cultura.

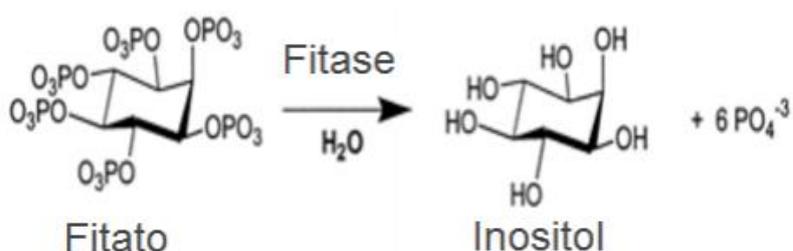
3.3.4 Outros fatores

Deve-se atentar também ao tamanho das partículas, de modo geral ele afeta o aproveitamento do substrato pelo fungo, é necessário que haja um espaço entre as partículas para dissipação do calor, porém, partículas menores favorecem uma maior área de contato que podem gerar empacotamento do leito, já partículas maiores promovem a formação de espaços com retenção de ar que pode ser usado pelos fungos (MAYRINCK, JR., 2014).

3.4 Fitase

A fitase ou *mio-inositol hexaquiوسفato fosfohidrolase* é uma enzima pertencente ao grupo das fosfatases de histidina ácida que hidrolisa o ácido fítico em mio-inositol e ácido ortofosfórico, necessário ao processo metabólico de biossíntese celular (PANDEY et al., 2001). Basicamente existem 2 tipos de fitase: a *mio-inositol hexaquiوسفato 3-fosfohidrolase*, denominada 3-fitase, de origem microbiana, e *mio-inositol hexaquiوسفato 6-fosfohidrolase*, denominada 6-fitase ou fitato 6- fosfatase, de origem vegetal.

Figura 1 - Hidrólise do fitato em inositol pela ação da enzima fitase.



Fonte: adaptado de Silveira (2017).

Essa enzima é um componente naturalmente encontrado em sementes e possui também origem microbiana, ela é descrita como uma enzima capaz de liberar o fosfato inorgânico a partir de fontes orgânicas, lisar ácido fítico em inositol e ácido fosfórico. A fitase está ainda presente no intestino de animais monogástricos, entretanto ela possui baixa atividade e, portanto, é incapaz de digerir o fosfato na forma de P fítico.

As fitases comerciais podem ser produzidas por fermentação submersa ou fermentação em estado sólido, para o primeiro caso é normalmente usada a técnica de DNA recombinante, porém essa é ineficiente tendo em vista o caro processo para recuperação das enzimas. Já a fitase de origem fúngica é mais vantajosa, os fungos produzem a enzima extracelular e isso facilita sua recuperação e ainda elimina etapas caras que são normalmente necessárias para o processo de recuperação. Tengerdy (1996) publicou na época uma estimativa para os custos do processo de produção de celulase, obtendo cerca de \$ 0,2 dólares/kg para a FES, e um valor 100 maior para a fermentação submersa, \$ 20 dólares/kg.

3.5 Ácido Fítico

O fitato, na forma salina, ou ácido fítico é um componente importante em espécies vegetais como legumes, sementes, nozes e cereais, ele constitui até 5% do peso da matriz de suas matrizes e é considerado um fator antinutricional. Segundo Mayrinck Jr. (2014) acredita-se que a principal função do ácido fítico seja de reserva de grupos fosforil e fósforo, sendo que entre 50% e 80% de todo fósforo vegetal se encontra armazenado como fitato, que serão usados durante a germinação das plantas.

O principal fator antinutricional relacionado ao ácido fítico é a sua capacidade de quelação com proteínas, minerais e cátions divalentes como: Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} e Fe^{+2} tornando-os menos disponíveis para absorção no trato gastrointestinal (RAMOS et al., 2012).

A principal fonte natural de fósforo para os animais herbívoros é o fitato, desse modo é importante que esses animais metabolizem o mesmo, para tal é necessário o uso de fitases exógenas ou fosfatases endógenas que auxiliam ainda impedindo o processo de quelação. O fitato excretado não digerido é extremamente maléfica para o meio ambiente, visto que esse possui uma quantidade elevada de fosforo que quando em contato com os ecossistemas

aquáticos pode causar eutrofização, aumentando a população de algas que liberam compostos tóxicos, diminuem a quantidade de oxigênio disponível na água e ainda dificultam a penetração de luz (GALDINO et al., 2017). Uma das alternativas eficientes para evitar esse problema é a adição de fitase na ração animal para diminuir a quantidade excretada.

3.6 Aplicações Industriais da Fitase

São variadas as aplicações da fitase comercialmente, de acordo com Greiner (2007) desde 1991 estão presentes no mercado variantes comerciais da enzima, destacando-se principalmente seu uso em ração de aves e suínos. Isso se deve principalmente pelo fato de que é necessário que se suplemente a ração desses animais com a enzima para maior digestibilidade e aproveitamento do fósforo, sendo imprescindível para que os animais se desenvolvam de maneira adequada.

No campo da alimentação humana é crescente a utilização de fitases durante o processamento de alimentos, ela é usada majoritariamente na produção de alimentos com apelo funcional, com ênfase em alimentos que possuem os cereais como principal matéria prima. Há ainda relatos do uso de fitases na fabricação de pães com resultados eficientes na redução do tempo de fermentação (SALMON, 2011).

Entretanto é importante ficar atento já que fitases de fontes diversas possuem características diversas, como por exemplo, ser termoestável e possuir ampla faixa de pH para atividade catalítica. Desse modo é necessário estar atento para garantir a eficiência máxima da enzima. Na tabela 1 abaixo estão listadas algumas fitases comerciais disponíveis no mercado.

Tabela 1 – Exemplos de fitases comerciais disponíveis mundialmente no mercado.

Empresa	Produto	Microrganismo	Tipo de fermentação
BASF	Natuphos	<i>A. niger</i>	Líquida
AB Enzymes	Finase	<i>A. awamori</i>	Líquida
Alltech	Allzyme phytase	<i>A. niger</i>	Sólida
DSM	Bio-feed phytase	<i>P. lycii</i>	Líquida

Fonte: adaptado de Salmon (2011).

3.7 Microrganismos

Nos processos de fermentação em estado sólido podem ser aplicados diferentes microrganismos: bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo que esses últimos os mais comumente usados e que foram também escolhidos no presente trabalho. O uso desse tipo de microrganismo em larga escala para FES se dá principalmente pelo fato de que as condições de cultivo se assemelham muito as condições de crescimento que esses fungos encontram na natureza, o que possibilita um crescimento otimizado desses microrganismos.

São muitas as culturas usadas na biotecnologia, pode-se citar por exemplo os gêneros fúngicos *Rhizopus*, *Penicillium* e *Aspergillus* são comumente usados para enriquecimento proteico e produção enzimática, sendo que o *Penicillium* usado na produção da penicilina. Há ainda as bactérias do gênero *Lactobacillus* que são usadas para produção de ácido láctico.

A possibilidade de produção da enzima fitase por fungos do gênero *Aspergillus* já vem sendo relatada em trabalhos publicados a algum tempo, Nascimento e seus colaboradores (2018) observaram em testes realizados com fermentações em meio *sreening* fitase que de dezenove espécies do gênero analisadas dezessete foram capazes de produzir a enzima. Na pesquisa desenvolvida foram usados os fungos *Aspergillus awamori* e *Penicillium roqueforti* pois foi visto em outras literaturas a capacidade do mesmo de produzir a enzima fitasse, além disso esses fungos são conhecidos por sua alta capacidade proteolítica e também por serem considerados não tóxicos e não patogênicos tornando-os comumente usados na indústria de alimentos.

3.8 Substratos – Resíduos Agroindustriais de Frutas

O meio de cultura para esse tipo de fermentação é bastante variado, entretanto são normalmente utilizados resíduos agroindustriais pois são um recurso abundante e de baixo custo que cumpre a função de ser uma matriz sólida capaz de fornecer energia, nutrientes e carbono para o crescimento do fungo. Em alguns casos é ainda possível a adição de soluções nutritivas para aumentar o potencial do meio e favorecer o desenvolvimento do microrganismo. Segundo Almeida (2012) são diversos os tipos de resíduos agroindustriais usados como substrato, com destaque para farelos e cereais, mandioca e frutas como a laranja.

Os principais fatores a serem levados em consideração para a escolha do substrato adequado, principalmente em escala industrial, são o seu custo e a disponibilidade de uso, os resíduos agroindustriais se destacam nesses dois parâmetros pois são um subproduto do processo produtivo o que torna o seu uso uma redução de custos e uma matéria prima barata. São encontrados também em grande disponibilidade, desde grandes empresas a pequenas agroindústrias e cooperativas subutilizam esse recurso. Segundo Pereira (2006) são produzidos cerca de 350 milhões de resíduos agroindustriais no Brasil anualmente. Resíduos de fruta subutilizados que podem ser aproveitados como substrato para a produção enzimática da fitase.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção será apresentado e discorrido a respeito das metodologias e os materiais que foram usados para desenvolvimento da fermentação em estado sólido dos fungos, assim como as metodologias de análises usadas para avaliar a atividade enzimática.

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG).

4.1 Caracterização do meio de cultivo

Para a caracterização do material foram feitas as seguintes análises: matéria seca, através da comparação entre o material úmido e o material após processo de secagem em mufla, foram analisadas também as cinzas do material pela análise da queima da matéria seca a 550°C. A determinação da proteína bruta (PB) foi feita seguindo a metodologia padrão de Kjeldahl e para a determinação do extrato etéreo (EE) foi usada a metodologia de Goldfisch. Por as análises de fibra detergente ácido (FDA) e fibra detergente neutro (FDN) foram feitas seguindo a metodologia convencional de Van Soest (1963).

4.2 Microrganismos

As espécies fúngicas *Aspergillus awamori* B.361 U2/1 e *Penicillium roqueforti* cepa adquirida da Fundação André Tosello. Ambos os fungos pertenciam ao banco de células do laboratório de biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG) onde eram mantidos em meio Ágar Batata Dextrose (Ágar BDA).

4.3 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em placas contendo aproximadamente 100 mL de meio de cultura Ágar BDA. Realizou-se então esterilização dessas a 121 °C por 30 minutos e a incubação em estufa BOD por um período de 7 dias a 28 °C.

Após esse processo foi feito o inóculo fúngico, foi usada a técnica de disco micelial para avaliar a produção da enzima fitase por meio da fermentação sólida. Das placas cultivadas com os fungos foram cortados discos miceliais de 1,0 cm de diâmetro, os quais foram retirados e macerados em 1,0 mL de solução salina 0,9% cada um.

4.4 Meio de Cultivo

A pesquisa teve como objetivo usar resíduos agroindustriais como meio de cultivo, nesse sentido a cooperativa Grande Sertão, localizada na cidade de Montes Claros – MG, forneceu resíduos de frutas originários da sua produção para serem reciclados como substrato da fermentação. As fermentações ocorrem em Erlenmeyers de 500ml a 70% de umidade usando como substrato resíduos de maracujá, seriguela, umbu e coquinho azedo. A composição do meio de cultura foi de 25 g dos resíduos de uma das frutas adicionados de uréia a 3% para fonte de nitrogênio, ele foi umidificado de maneira prévia com 8 mL de água destilada e então esterilizado a 121 °C por 15 minutos.

4.5 Fermentação em estado sólido

Após os preparos do meio de cultura e do microrganismo foi feita a adição de 1 mL de inóculo aos substratos previamente preparados nos Erlenmeyers de 500 mL e esses por sua vez foram incubados a 30 °C por 48 horas. A figura 2 mostra os Erlenmeyers

Figura 2 - Fermentação em estado sólido de *A. awamori* e *P. roqueforti* realizada em Erlenmeyers.



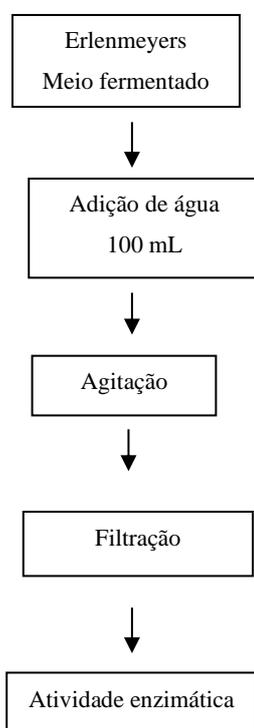
Fonte: autor.

Foram retiradas amostras nos tempos 12, 24, 36 e 48 horas que foram posteriormente usadas para realização das análises posteriores. O experimento foi realizado em duplicata.

4.6 Extração de enzimas

Para a realização da extração das enzimas as amostras retiradas nos tempos 24, 36 e 48 horas foram preparadas, foi adicionado ao meio fermentado sólido 100 mL de água destilada. A suspensão formada foi levada a agitação constante a 150 rpm em *shaker* por 30 minutos, depois disso o extrato cru gerado foi filtrado com auxílio de cortes de papel TNT, o permeado final recolhido foi usado para medida da atividade de fitase. A figura 3 apresenta uma esquematização da fermentação e extração das enzimas.

Figura 3 - Fluxograma do processo para formação do extrato enzimático.



Fonte: autor.

4.7 Análise da atividade enzimática da fitase

A análise de atividade da enzima fitase foi realizada pela medida do fosfato inorgânico liberado no extrato liberado (FISKE e SUBBAROW, 1925), ela é definida como a unidade de medida de atividade (U) para quantidade de enzima necessária para liberação de 1 μmol de fósforo inorgânico de uma solução de fitato de sódio a 0,003 mol/L por minuto dentro das condições do ensaio. Para tal utilizou-se 400 μL do substrato fitato de sódio em um tampão de acetato de sódio com pH 4,0 e 100 μL de extrato enzimático, essa reação ocorreu em banho-maria por 30 minutos a 45 °C, foi adicionado durante a mesma 500 μL de solução de ácido tricloroacético 5%. Após esse processo foram adicionados aos tubos da reação 500 μL de uma solução de ácido sulfúrico, molibdato de amônio e sulfato ferro que formam um reativo colorimétrico. Nessa reação a fitase irá liberar o fosfato inorgânico a partir do fitato como substrato, esse fosfato reage com o molibdato de amônio de modo a formar um complexo “fosfo-molibdato” que é reage com o sulfato ferroso sendo reduzido e formando um composto de cor azul chamado de “azul de molibdênio”. Essa reação pode ser quantificada colorimetricamente com auxílio da curva-padrão contra a concentração de fosfato inorgânico.

Em seguida usou-se o espectrofotômetro para realizar leitura da absorbância em 700 nm e os valores finais foram correlacionados e comparados com a curva padrão originária feita com KH_2PO_4 .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para a caracterização do produto estão expostos abaixo, eles foram importantes para definir as características do ensaio.

5.1 – Caracterização do material

Os resíduos da produção escolhidos eram compostos dos seguintes materiais: Coquinho azedo, maracujá, seriguela e umbu. Eles foram então caracterizados e preparados para ser usados como substrato.

Para caracterização dos materiais foram feitas as análises de matéria seca, cinzas, fibra Detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB). Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 1 abaixo.

Tabela 2 – Valores obtidos para caracterização dos substratos usados na fermentação em estado sólido.

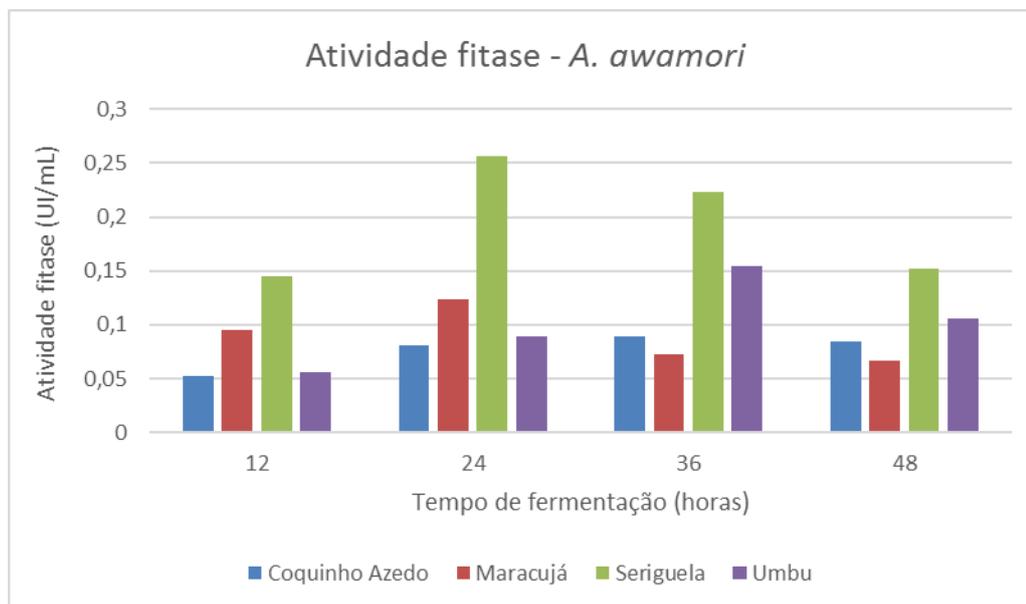
Substratos	Matéria Seca (%)	Cinzas	Fibra	Fibra	Extrato Etéreo (EE)	Proteína Bruta (PB)
			Detergente Neutro (FDN)	Detergente Ácido (FDA)		
Coquinho Azedo	89,6298	1,3060	91,1998	63,4499	12,0548	0,7078
Seriguela	91,7990	2,1010	89,1569	69,0193	18,0734	2,2399
Maracujá	93,9523	3,2157	83,2310	67,7429	1,8904	1,0477

Fonte: autor.

5.2 – Fermentação em Estado Sólido

A Figura 4 refere-se ao cultivo do *A. awamori* utilizando os meios com resíduos de maracujá, seriguela e coquinho azedo. As fermentações semi-sólidas foram realizadas por 48 horas.

Figura 4 – Atividade de fitase, expressas em UI/mL, para as fermentações do fungo *A. awamori* em diferentes substratos.



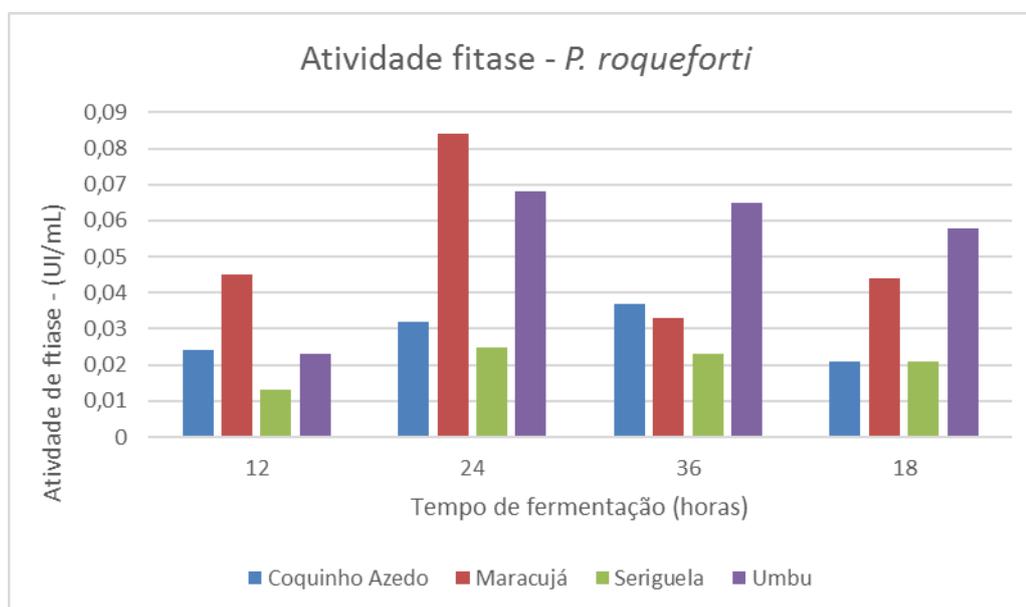
Fonte: autor.

Os melhores resultados obtidos para a fermentação em estado do *A. awamori* foram os seguintes: para o cultivo com resíduo de coquinho azedo obteve-se 0,089 UI/mL com tempo de 36 horas de fermentação, 0,124 UI/mL para o cultivo com resíduo de maracujá com 24 horas de tempo de fermentação, 0,256 UI/mL para o cultivo com resíduo de seriguela com 24 horas de tempo de fermentação e para o cultivo com substrato de resíduo de umbu o resultado obtido foi de 0,154 UI/mL com 36 horas de tempo de fermentação.

Analogamente é possível observar que para o *P. roqueforti* os melhores resultados foram: 0,037 UI/mL para o cultivo com resíduo coquinho azedo com 36 horas de tempo de fermentação, 0,084 UI/mL para o cultivo em resíduo maracujá com 24 horas de tempo de fermentação, 0,025 UI/mL para o cultivo com substrato de resíduo de seriguela com tempo de fermentação de 24 horas e para o cultivo em resíduo de umbu o resultado obtido foi de 0,068 UI/mL com tempo de fermentação de 36 horas. A tabela 5 apresenta os resultados de maneira resumida para as fermentações do *P. roqueforti*.

A Figura 5 referem-se ao cultivo do *P. roqueforti* utilizando os meios com resíduos de maracujá, seriguela e coquinho azedo. As fermentações semi-sólidas também foram realizadas por 48 horas.

Figura 5 – Atividade de fitase, expressas em UI/mL, para as fermentações do fungo *P. roqueforti* em diferentes substratos.



Fonte: autor.

Tabela 3 – Melhores resultados para fermentação do *A. awamori* e *P. roqueforti*

Substrato	Tempo de Fermentação (h)	Atividade Enzimática <i>A. awamori</i> (UI/mL)	Atividade Enzimática <i>P. roqueforti</i> (UI/mL)
Coquinho Azedo	36	0,089	0,037
Maracujá	24	0,124	0,084
Seriguela	24	0,256	0,025
Umbu	36	0,154	0,068

Fonte: autor.

Quando comparados os valores obtidos para o *A. awamori* foram muito superiores do que os obtidos para o *P. roqueforti*, o resultado mais expressivo foi encontrado para o cultivo usando como substrato o resíduo de seriguela, atividade de 0,256 UI/mL para o *A. awamori*, esse valor é 10 vezes maior que o valor encontrado para o mesmo substrato no mesmo tempo de fermentação usando o *P. roqueforti*. A partir disso notou-se que o *P.*

roqueforti não é um bom produtor dessa enzima nas condições em que foi desenvolvido o experimento.

Foi possível observar uma maior atividade enzimática para os fungos, com o *A. awamori*, destacando-se o cultivo com o umbu como substrato. O fato do *A. awamori* atingir maior concentração de fitase pode ser corroborado por outros estudos como o realizado por Silveira et al (2017), que observou ser o *A. awamori* o fungo melhor produtor para cultivos realizados com farelo de soja e de trigo, conseguindo atividades enzimáticas de maior valor quando o farelo de trigo foi usado como substrato.

Lima e seus colaboradores (2014) em um trabalho realizado para obtenção de fitases a partir da fermentação em estado sólido usando como substrato farelo de arroz observaram que o fungo *A. niger* possui um desempenho melhor quando comparada a outros fungos, nessa pesquisa foi possível observar que os resultados mais eficientes foram obtidos no tempo de 36 horas de fermentação, com valores de 41,10 FIT. Um dos fatores mais importantes para uma produção efetiva de fitase é a quantidade de fósforo presente no substrato, o uso de substratos mais ricos em fósforo como é o caso do farelo de arroz é uma opção viável para suplementar e propiciar um melhor desenvolvimento da enzima. Entretanto os substratos usados possuem uma baixa quantidade de fósforo em suas composições naturais, as literaturas apresentam valores de 19 mg.100g⁻¹ de fósforo na seriguela, cerca de 50 mg.100g⁻¹ para o umbu, 18 mg.100g⁻¹ para o coquinho azedo, não foram encontrados valores precisos para o maracujá, porém estima-se que o mesmo possua boa quantidade, próximo aos valores das frutas, de fósforo em sua composição.

Em um trabalho realizado com objetivo de produzir fitase através da fermentação em farelo de trigo e farinha de okara, Marçal e seus colaboradores (2016) observaram um melhor resultado para cepas *A. niger* quando comparado ao *Penicillium funiculosum*, com destaque para o farelo de trigo como fonte de carbono mais eficiente para a fermentação. O *A. niger* INCQS 40018 apresentou atividade fitásica específica de 1,758 U/mg, sendo que foram observadas atividades menores para concentrações de inóculo superior.

Os resultados alcançados pelo presente trabalho apresentam valores pequenos quando comparados as demais literaturas consultadas, Lima et al. (2014) obteve valores com tempo de fermentação de 36 horas valores de 41,1 U/g para fermentação do *A. niger* em farelo de arroz, valor expressivamente maior quando comparado a fermentação dos resíduos pesquisados durante o mesmo tempo de cultivo. Gupta e seus colaboradores (2014) alcançaram resultados ainda mais expressivos para atividade de fitase usando farelo de trigo

para cultivo em estado sólido do *A. niger* NRF9, com um tempo de fermentação de 120 horas obtiveram 112,1 U/g para atividade fitásica, sendo que para os tempos de fermentação de 36 e 48 horas a atividade foi de cerca de 45 U/g, esses valores são também maiores que os valores encontrados no presente trabalho para todos os tempos de fermentação. Há também valores maiores encontrados na literatura para fermentações em estado sólido com *A. awamori* em outros substratos, Silveira (2017) em trabalho para avaliar a produção de fitase por fungos endofíticos dos manguezais do estado de São Paulo encontrou valores de atividade superiores para fermentação do *A. awamori*, 43,98 U/100g para cultivo em farelo de soja e 82,77 U/100g para cultivo em farelo de trigo.

Todavia é possível, mesmo com os baixos valores alcançados pela fermentação, aumentar o rendimento e a produção através da suplementação do meio com compostos indutores, esses compostos apresentam fósforo em sua composição, como por exemplo o KH_2PO_4 . Essa técnica foi usada por Silveira (2017) que adicionou esse composto aos meios fermentativos de farelo de soja e farelo de trigo e obteve maiores valores de produção de enzimas que os já relatados para a atividade, houve um salto de 4 vezes para o valor do cultivo de soja com aumento da atividade para 132,25 U/100g e de 2 vezes para o para o farelo de trigo com aumento da atividade para 115,52 U/100g. Porém foi necessário a realização de processos posteriores para completa eficiência do indutor, visto que o íon K^+ pode inibir a enzima fitase e assim reduzir os valores de atividades encontrados ou inibir (MONTEIRO, 2015). Outros autores também encontraram resultados positivos para essa adição de KH_2PO_4 , Gupta et al. (2014) relataram atividades de até 7430 U/100g para fermentações com *A. niger* NRF9 em farelo de trigo com adição do indutor KH_2PO_4 em concentrações de 0,01%.

A fitase produzida através desses métodos tem diversas aplicações. Na literatura, é possível observar a aplicação das mesmas para suplementação animal principalmente de aves, Costa e seus colaboradores (2007) constataram que frangos que consumiram rações suplementadas com a enzima fitase nas fases inicial e pré-inicial de desenvolvimento tiveram um maior consumo de ração e, conseqüentemente, conseguiram um melhor ganho de peso.

6. CONCLUSÃO

Dentre as duas linhagens de fungos pesquisadas para a seleção e fermentação em estado sólido em meios de cultura compostos por resíduos agrícolas da Cooperativa Grande Sertões destacou-se, em testes qualitativos, somente a espécie *Aspergillus awamori* para a produção da enzima fitase.

A metodologia utilizada de Fiske e Subbarow (1925) mostrou-se ser adequada para a quantificação de atividade de fitase.

A produção da enzima no meio de resíduo de seriguela mostrou que o fungo *Aspergillus awamori* se destacou diante dos demais após as 36 horas de cultivo, alcançando os maiores valores de atividade de fitase. Devido a não quantificação de fitato no meio inicial supões que a ausência ou baixa concentração de P no meio seja uma das razões para a baixa expressão de fitase pelos fungos.

Para futuros trabalhos sugere-se que se use uma tecnologia para aumentar a eficiência da produção de fitase, no caso a adição de 1mM de KH_2PO_4 como indutor no meio de cultivo da fermentação em estado sólido é eficiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. C. O.; Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química** – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC. 2012.

COSTA, F. G. P.; BRANDÃO, P. A.; BRANDÃO, J. S.; SILVA, J. H. V.; Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 865-870, maio/jun., 2007.

FISKE, E. H.; SUBBAROW, Y. V. The colorimetric determination of phosphorus. **Biological Chemistry**, v. 66, p. 375 - 400, 1925.

GALDINO, A. S.; GODOI, R. R.; ANDRADE, S. F. V.; MACHADO, J. M.; DE SOUZA, T. P. P.; GONÇALVES, A. F. A.; LOPES, T. B.; PARACHIN, N. S.; NAVES, L. P.; LIMA, W. J. N.; PEREIRA, V. V.; Produção de fitase fúngica em diferentes hospedeiros: uma breve revisão. **J Microbiol Biotechnol**. 2017.

GERVAIS, P.; MOLIN, P.; The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101. 2003.

GREINER, R.; FAROUK, A. E. Purification and characterization of a bacterial phytase whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement. **The Protein Journal**, v. 26, p. 577-584, 2007.

GUPTA, R. K.; GANGOLIYA, S. S.; SINGH, N. M.; Isolation of thermotolerant phytase producing fungi and optimisation of phytase production by *Aspergillus niger* NRF9 in solid state 53 fermentation using response surface methodology. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 996-1004, 2014.

HASAN, S. D. M.; Produção e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monóceras* obtida por fermentação em estado sólido. **Tese de doutorado** – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. 2002.

HOLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratoryscale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 175-186, 2004.

LELIS, G. R.; ALBINO, L. F. T.; TAVERNARI, F. C.; ROSTAGNO, H. S.; Suplementação dietética de fitase em dietas para frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n° 2, p. 875-889, março/abril, 2009.

LIMA, U. A.; AQUARONE E.; BORZANI W.; SCHMIDELL W.; Fermentação em Estado Sólido. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, SP. 2001.

LIMA, M. B.; MONTE ALEGRE R., PADILHA, G.S.; Produção de fitase por fermentação em estado sólido utilizando farelo de arroz e *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ. Florianópolis - Santa Catarina. 2014.

MAGA, J.A. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, p.1-9, 1982.

MARÇAL, L. V.; COURI, S.; LOPES, J. R. H.; SILVA, L. G.; MELO, V. F.; Produção de fitase através de diferentes linhagens de fungos filamentosos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC**. Rio de Janeiro. 2016.

MAYRINCK, JR., R. J. R.; Produção de fitase e tanase em subprodutos do café por fermentação no estado sólido. **Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos** – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro. 2014.

MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C. L.; COURI, S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3t5b8 em

fermentação semi- sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. **Revista Universidade Rural**, v. 25, p. 15–27, 2006.

NASCIMENTO, J. C. S.; FILHO, L. B. F.; SILVA, R. L. A.; ALBUQUERQUE, P. V.; PEREIRA, L. B. S. B.; COSTA, C. A.; MELO, F. P.; NASCIMENTO, J. S.; AMORIM, M. J. A. A. L.; PORTO, A. L. F.; Seleção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de fitase para inclusão na alimentação animal. **PUBVET**. v.12, n.3, a56, p.1-7, Mar., 2018.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A.; Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAM, P. Solid state fermentation in biotechnology. **Nova Deli: Asiatech**, 2001. 221p.

PARIS, L. D. Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química** – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

PEREIRA, R. E. Avaliação do Potencial Nacional de Geração de Resíduos Agrícolas para a Produção de Etanol. 2006. **Dissertação de Mestrado em Ciências** - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro.

RAMOS, G. D. M.; ASCHERI, J. R.; SILVA, L. G.; DAMASO, M. C. T.; SOUSA, G. F.; COURI, S.; Estabilidade da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9 ao armazenamento e sua aplicação na hidrólise do ácido fítico na farinha de sorgo. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.18 n. 2-4, p.95-106, abr-jun, 2012.

REDDY, N. R.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Phytates in legumes and cereals. **Advances in Food Research**, v.28, p.1-92, 1982.

SALMON, D. N. X.; Desenvolvimento de um bioprocesso para a produção, caracterização e recuperação da fitase de *schizophyllum commune* obtida por fermentação em estado sólido. **Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

SANTOS, A. S.; **Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linha fúngica mutante.** UFRRJ. 2011.

SILVEIRA, L. A.; Produção de fitase por fungos endofíticos dos manguezais do estado de São Paulo. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia** – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2017.

TENGERDY, R. P. Cellulase production by solid substrate fermentation. **J Sci Ind Res.**, v. 55, p. 313–316, 1996.