

## **OBTENÇÃO DE FOSFATASE ÁCIDA POR FEMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO *Trichoderma harzianum* EM MILHETO**

Jussara Maria Martins de Almeida Afonso<sup>1</sup>

Jessica Gatti Silva<sup>2</sup>

Miriam Maria de Resende<sup>3</sup>

### **Química ambiental**

#### **Resumo**

A utilização de substratos alternativos vem sendo reaproveitados na formulação de meios para produção de diversos produtos biotecnológicos. Neste aspecto um dos interesses da biotecnologia moderna é a utilização de fontes não convencionais de industriais e agrícolas para despoluir o ambiente e criar produtos e tecnologias alternativas associadas à produção de fósforo. As fosfatases produzidas por fungos ganham cada vez mais destaque devido ao seu papel biotecnológico em processos industriais. As fosfatases ácidas são classificadas pelo seu pH ótimo de atuação (pH inferior a 6,0). O presente trabalho tem como objetivo a produção de fosfatases ácidas por meio de fermentação submersa, utilizando milho como fonte de fosfato e o fungo *Trichoderma harzianum*. A cultura fúngica utilizada nesse estudo pertence ao banco de microrganismos do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e são mantidas em ultrafreezer a (-70) °C. Para a fermentação, foram inoculados 235 mL de água destilada estéril com células de *Trichoderma harzianum* na concentração de  $3 \times 10^8$  esporos/mL com 100 g de substrato. A recuperação das enzimas foi realizada utilizando 100 mL de meio. O pH do extrato foi medido em pHmetro previamente calibrado. Obteve-se, para o substrato milho, concentração final de  $7,0 \times 10^8$  esporos/mL, atividade enzimática de 21 U.mL<sup>-1</sup> e pH de 4,53 demonstrando o importante potencial para produção de fosfatase ácida pelo o fungo *Trichoderma harzianum*.

**Palavras-chave:** Substratos não convencionais, Biotecnologia, Fungos.

---

<sup>1</sup>Jussara Maria Martins de Almeida Afonso: Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia, Núcleo de Processos Biotecnológicos, jussarammartins@live.com.

<sup>2</sup>Jessica Gatti Silva: Doutoranda em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia, Núcleo de Processos Biotecnológicos, jessicagatti16@gmail.com.

<sup>3</sup>Prof. Dr. Miriam Maria de Resende da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica, Núcleo de Processos Biotecnológicos, mresende@ufu.br.

## INTRODUÇÃO

O fósforo é crucial no metabolismo das plantas, desempenhando papel importante na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese. É também componente estrutural dos ácidos nucleicos de genes e cromossomos, assim como de muitas coenzimas, fosfoproteínas e fosfolipídeos. As limitações na disponibilidade de P no início do ciclo vegetativo podem resultar em restrições no desenvolvimento, das quais a planta não se recupera posteriormente, mesmo aumentando o suprimento de P a níveis adequados. O suprimento adequado de P é, pois, essencial desde os estádios iniciais de crescimento da planta (Grant et. al., 2001).

Bactérias e fungos estão envolvidos nos processos de solubilização e mineralização de P no solo, desempenhando papel fundamental no ciclo biogeoquímico desse elemento (Paul & Clark, 1997; Richardson, 2001). A assimilação de fósforo por microrganismos depende de enzimas específicas, incluindo fosfatases, que podem hidrolisar moléculas contendo fósforo. Essas enzimas são responsáveis pela mineralização do fosfato orgânico quando os níveis de fosfato inorgânico livre no solo são baixos (Aoyama et al., 2003).

As fosfatases estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas tanto em organismo procaríotos quanto em eucariotos (Guimarães et al., 2004), sendo responsáveis por hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico liberando fosfato inorgânico (Wang et al., 2007). São descritos na literatura diferentes mecanismos de hidrólise e especificidades ao substrato de acordo com o pH ótimo da enzima (Bernard et al., 2002; Guimarães et al., 2003).

De acordo com o pH ótimo de reação, as fosfatases são divididas em alcalinas (EC 3.1.3.1) e ácidas (EC 3.1.3.2). As formas ácidas podem hidrolisar o monoéster-O-substituído de ácido fosforotióico, produzindo álcool e ácido tiofosfórico, sugerindo que o átomo de oxigênio é o radical e o fosfato é necessário para essa reação ocorrer (Hollander, 1971), enquanto as alcalinas podem hidrolisar o monoéster-S-substituído de ácido fosforotióico, junto com a ligação S-P, produzindo ortofosfato e o correspondente tio-

Realização

Apoio

álcool, e, devido sua capacidade de hidrolisar em pH alcalino, podem atuar sobre ATP, ADP, AMP, p-nitrofenil fosfato, glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, gliceraldeído-3-fosfato e pirofosfato (Simão et al., 2007).

A produção de enzimas microbianas pode ser obtida utilizando a fermentação submersa (FSbm). A FSbm é a mais comum no âmbito industrial, pois proporciona alta eficiência na produção de enzimas e praticidade, dispensando tratamentos sofisticados de filtração, aeração, controle de temperatura e homogeneização do meio (Norouzian et al., 2006).

Para baratear a produção destas enzimas algumas estratégias podem ser adotadas, como a substituição dos componentes do meio de cultivo por materiais de baixo custo ou até mesmo subprodutos não convencionais. Esses subprodutos não convencionais são materiais ricos em nutrientes como proteínas, carboidratos, lipídios e sais minerais, dentre outras substâncias de interesse, que podem ser facilmente metabolizados por cepas microbianas (Oliveira et al., 2013).

Além disso, esses subprodutos não convencionais podem possuir baixo custo, apresentam boa disponibilidade, despertando assim, o interesse dos pesquisadores na busca de produtos com um alto valor comercial e baixo custo, como proteínas, enzimas, biofertilizantes, biossurfactantes dentre outros metabólitos microbianos (Laufenberg, 2003).

## METODOLOGIA

### *Microrganismos*

Os fungos da espécie *Trichoderma harzianum* (ver Figura 1) foram isolados/coletados no Complexo Mineraloquímico de Araxá (Vale Fertilizantes), Minas Gerais. O isolado de fungos foi identificado por testes bioquímicos de taxonomia convencional, pela Fundação André Tosello para Pesquisa e Tecnologia (Campinas-SP). Estas culturas fúngicas pertencem ao banco de microrganismos do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e são mantidas em ultrafreezer a (-70) °C.

Realização

Apoio



Figura 01. Fungos *Trichoderma harzianum* ativados em meio de cultura Czapek. Fonte: própria autora.

### ***Fermentação Submersa (FSbm)***

As fermentações submersas foram realizadas em reatores estáticos (frascos cônicos de 500 mL de volume) (ver Figura 2). Foi inoculado uma solução de 235 mL de água pH 4 com células de *Trichoderma harzianum* na concentração de  $3 \times 10^8$  conídios/mL com 100 g de milho previamente esterilizados à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 30 minutos. A FSbm foi realizada por sacrifício, ou seja, para cada ponto amostral foi descartado um reator estático. Efetuou-se o controle para cada ponto amostral. Os reatores estáticos foram adicionados na estufa BOD Thermostat Cabinets TS 606-G/4-i em temperatura de 25°C.



Figura 02. FSbm de milho. Fonte: própria autora.

Realização

Apoio

### ***Recuperação da Enzima***

A recuperação da enzima foi realizada utilizando 100 mL de meio extrativo. O meio extrativo utilizado foi o Tween 80 1% em água. Após a adição do meio, o meio fermentado foi agitado com auxílio de um bastão de vidro e filtrado, obtendo-se o extrato enzimático bruto.

### ***Biomassa (Determinação de células)***

A biomassa para fungos foi determinada pela filtração do caldo fermentado de um volume conhecido. Os filtros de papel, pesados previamente, apresentavam diâmetro 90 mm e retenção de partículas de 4-7 µm. Depois de filtrado, os filtros com a biomassa foram levados para estufa à temperatura de 100±1,0°C e o sobrenadante foi reservado para análises da atividade da fosfatase ácida. A diferença de massa do filtro antes e depois da filtração foi a massa de células presente no volume do caldo fermentado, sendo que a concentração celular foi expressa em (g/L) (Equação 01).

$$\text{Biomassa seca } \left(\frac{g}{L}\right) = \left[ \frac{mFantes - mFdepois}{Vfiltrado} \right] \quad \text{Equação 01}$$

### ***Determinação do pH***

O pH foi medido em pHmetro Gehaka de bancada, previamente calibrado.

### ***Produção de conídios***

O meio recuperado contendo Tween 80 com células de *Trichoderma harzianum* foi transferido para tubos de ensaio estéreis, devidamente identificados. A partir da suspensão fúngica, foi realizada a contagem de esporos em microscópio luminoso com câmara de Neubauer seguindo a metodologia de Embrapa 2012.

### ***Ensaio Enzimático***

A atividade da fosfatase ácida foi medida de acordo com Leitão et al. (2010), utilizando como substrato fosfato de p-nitrofenilo sal disódico hexahidratado (p-NPP)

Realização

Apoio

(Sigma Aldrich <sup>TM</sup>). A mistura para o ensaio consistiu em 50 µL do extrato enzimático, 100 µL da solução de (p-NPP) concentração 5 mmol/L e 350 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L e pH 5,00. Após a adição dos reagentes, incubou à 45°C em banho termostático por 15 min. Por fim, depois deste período, a reação foi interrompida com a adição de 1000 µL de NaOH na concentração de 0,1 mol/L. A quantidade de (p-NP) liberada foi determinada em espectrofotômetro (UV/visível) a 405 nm de comprimento de onda. Uma unidade (1U) de atividade da fosfatase ácida foi definida como 1 µM de p-nitrofenol (p-NP) formado por minuto (Ames, 1966).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 01 apresenta os resultados obtidos de crescimento celular expressa em (g/L), pH e produção de conídios(conídios/mL) para fermentação submersa, utilizando milho:

TEMPO (DIAS)	CRESCIMENTO CELULAR (G/L)	PH	CONÍDIOS/ML
3	0,72	5,28	1,5x10 <sup>8</sup>
5	1,55	4,70	2,3x10 <sup>8</sup>
7	1,89	4,60	5,6x10 <sup>8</sup>
9	2,23	4,53	7,0x10 <sup>8</sup>

Tabela 01: Fermentação submersa de milho obtendo-se crescimento celular, pH e produção de conídios.

A partir dos resultados nota-se relativamente fácil controlar a FSbm, uma vez que a transferência de massa, calor e oxigênio são facilitadas e a homogeneidade geralmente é superior. Este processo é mais confiável e reproduzível, de fácil controle e monitoramento o que torna a condução da fermentação e a observação dos parâmetros chaves mais simples (Fazenda et al., 2008).

Realização

Apoio

Os experimentos realizados por Ghazanfar, Raza e Raza, 2018, demonstraram um melhor crescimento das espécies de *Trichoderma* spp. testadas em ambiente ácido, quando em comparação ao ambiente alcalino. Esses resultados validam com o atual estudo, cujo maior estímulo da formação de biomassa foi o pH 4,53.

Ao final de 9 dias, foi possível observar que a na temperatura de 25 °C apresentou um valor de  $7 \times 10^8$  conídios/mL para o milho. Aceves et al. (2008) avaliaram 15 substratos orgânicos para a produção massiva de esporos de *Trichoderma harzianum*. Os substratos inoculados foram incubados por um período de 21 dias a  $25 \pm 2$  °C, obtendo uma faixa de produção heterogênea, onde o melhor resultado foi de  $4,43 \times 10^8$  conídios/mL para o sabugo de milho.

A Figura 03 mostra a atividade enzimática de fosfatase ácida ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) para o substrato milho:

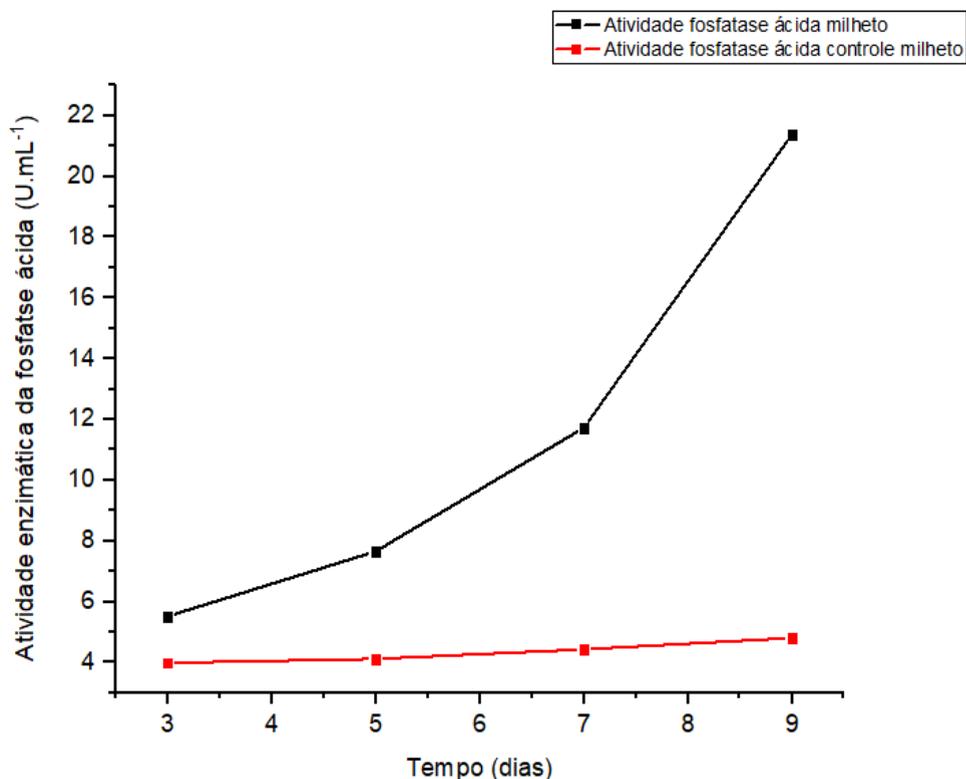


Figura 03. Atividade enzimática da fosfatase ácida para o substrato milho.

Farinas et al. (2014), em seu estudo descreve que a atividade enzimática é fortemente influenciada pelo pH, uma vez que os sítios ativos de enzimas são frequentemente constituídos por grupos iônicos, os quais, a fim de catalisar a reação, devem estar na forma iônica adequada para manter sua conformação, permitindo uma eficiente ligação ao substrato. Nesse estudo, o pH foi ajustado para 4 na extração enzimática.

Os valores finais de atividade enzimática da fosfatase ácida foram descontados dos seus respectivos controles. A atividade enzimática de fosfatase ácida apresentou valor significativo de 21,00 (U.mL<sup>-1</sup>) para o substrato milho no tempo 9 dias de fermentação. Kapri et al., 2010, estudaram a produção de fosfatase ácida utilizando 14 espécies de *Trichoderma* spp. incluindo o fungo *Trichoderma harzianum* e verificaram o aumento da atividade enzimática no intervalo de 72 horas de incubação.

Leitão et al., 2010 produziu a enzima por fermentação submersa usando o fungo *Trichoderma harzianum*. Depois do processo de purificação da enzima por cromatografia em Pheny-Sepharose, conseguiram atividade específica de 12,4 U/mg e rendimento global de 56,3%. Lima (2006), também observou o desenvolvimento do *Trichoderma harzianum* e verificou que o fungo foi capaz de produzir fosfatase ácida, fosfatase alcalina, e outras enzimas, sendo que neste caso as enzimas estavam presentes no sobrenadante de cultura líquida contendo farelo de soja e de milho.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a utilização do substrato milho em fermentação submersa para a produção de fosfatase ácida apresentou grande potencial de aplicação. Houve uma produção de conídios de  $7,0 \times 10^8$  (conídios/mL) para o milho, o pH atingiu um valor próximo a 4,5 e uma atividade enzimática de fosfatase ácida constante ao longo do tempo, chegando a um valor final de 21 U.mL<sup>-1</sup>.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e

Realização

Apoio



Científico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

AMES BN. Assay of inorganic phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 1966; 8:115–118. Ames, B.N. (1966) Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. *Methods in Enzymology*, 8, 115-118. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)08014-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(66)08014-5).

AOYAMA, H. et al. Protein tyrosine phosphatases: properties and biological functions. *Quím. Nova* [online]. 2003, vol.26, n.6, pp.896-900. ISSN 0100-4042. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600019>.

BERNARD, M.; MOUYNA, I.; DUBREUCQ, G.; DEBEAUPUIS, J. P.; FONTAINE, T.; VORGIAS, C.; FUGLSANG, C.; LATGÉ, J. P. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, v. 148, n. 9, p. 2819-2829, 2002.

EMBRAPA. Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma*. IV curso teórico e prático. 18 a 20 de setembro de 2012. Jaguariúna, SP. Disponível em: [www.cnpma.embrapa.br](http://www.cnpma.embrapa.br). <https://doi.org/10.47749/t/unicamp.2018.1037020>.

FARINAS, C. S., PIROTA, R. D. P. B., FONSECA, R. F., NETO, V. B. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. EMBRAPA, Capítulo 7. 2014. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.357>.

FAZENDA, M. L.; SEVIOUR, R.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Chapter 2. Submerged Culture Fermentation of Higher Fungi: The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*, v. 63, 2008. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00158-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00158-9).

GRANT, et al. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Revista Informações agrônômicas* nº 95 – setembro/2011.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCEI, H. F.; JORGE, J. A.; LEONE, F. A.; POLIZELI, M. de L. T. de M. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 201-207, 2004.

GUIMARÃES, L. H. S.; JORGE, J. A.; TERENCEI, H. F.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C.; POLIZELI, M. de L. T. de M. Effect of carbon source on alkaline phosphatase production and excretion in *Aspergillus caespitosus*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 210-217, 2003.

HOLLANDER, V. P. 19 acid phosphatases. *The Enzymes*, v. 4, p. 449-498, 1971.

KAPRI, A. TEWARI, L., Phosphate Solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, ISSN 1517-8382, 2010.

Realização

Apoio

LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, v.87, p.167-198, 2003.

LEITÃO, V.O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*, *Biotechnology Letters*, v. 32(8), p. 1083-1088, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0264-2>.

LIMA, M. C. R. Caracterização Bioquímica de uma fosfatase ácida produzida por *Trichoderma harzianum*. 2006. 54 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, 2006.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. *Biotechnology Advance*, v. 24, n. 1, p. 80-85, 2006.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. *Soil microbiology and biochemistry*. San Diego: Academic Press, 1996. 340 p.

OLIVEIRA, A.C., VARGAS, J.C., RODRIGUES, M.L., MARIANO, A.B. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.15, n.1, p.19-26, 2013. ISSN 1517-8595.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soli microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, Victoria, v. 28, p. 897-906, 2001.

SIMÃO, A. M. S.; BELOTI, M. M.; CEZARINO, R. M.; ROSA, A. L.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 146, n. 4, p. 679-687, 2007.

WANG, Y. P.; HOULTON, B. Z.; FIELD, C. B. A model of biogeochemical cycles of carbon, nitrogen, and phosphorus including symbiotic nitrogen fixation and phosphatase production. *Global Biogeochemical Cycles*, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2007.

Realização

Apoio