

PRODUÇÃO DE FOSFATASE ÁCIDA POR *Trichoderma harzianum* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Frederico Alves Lima¹

Olga Silva Santos²

Miriam Maria de Resende³

Química Ambiental

RESUMO

Os microrganismos, tanto as bactérias quanto os fungos desempenham um papel central no ciclo natural do fósforo podendo converter suas formas insolúveis em uma forma acessível, de fácil absorção para as plantas. As fosfatases ácidas produzidas por fungos são enzimas que desempenham um papel específico na eliminação, mobilização e aquisição de fosfato, aumentando a fertilidade do solo e o crescimento das plantas. O presente trabalho tem como objetivo a produção de fosfatases ácidas por fermentação submersa de melão de soja utilizando o fungo *Trichoderma harzianum*. Foram analisadas as concentrações de 25 (Tr1) e 75 (Tr2) g/L de melão de soja. Os resultados mostraram satisfatórios para o tratamento Tr2 apresentando atividade enzimática de 3,90 U/mL, crescimento celular final de 6,83 g/L e pH constante para todo o processo fermentativo.

Palavras-chave: Fosfatase ácida; Biorreator; *Trichoderma harzianum*.

INTRODUÇÃO

A deficiência de fósforo disponível na planta é considerada um fator limitante importante para a produção de alimentos em muitos solos agrícolas. Por isso, recursos minerais são necessários para restaurar o conteúdo de fósforo do solo. Os microrganismos, tanto as bactérias quanto os fungos desempenham um papel central no ciclo natural do fósforo e convertem as formas insolúveis de fósforo em uma forma acessível, isto é uma característica importante para o crescimento e a sobrevivência das plantas (Behera et al., 2014).

Os principais mecanismos de solubilização de P empregados por microrganismos do solo incluem: (1) solubilização e dissolução mineral de compostos de P complexos, (2)

¹Frederico Alves Lima: Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia; Núcleo de Processos Biotecnológicos; contato eletrônico: alveslimafrederico@gmail.com.

²Olga Silva Santos: Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia; Núcleo de Processos Biotecnológicos; contato eletrônico: silvasantos.olga@gmail.com.

³Prof. Dr. Miriam Maria de Resende da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica; Núcleo de Processos Biotecnológicos; contato eletrônico: mresende@ufu.br.

liberação de P durante a degradação do substrato e (3) liberação de enzimas extracelulares, como fosfatases para degradação enzimática. Entre os microrganismos solubilizantes de fosfato, as estirpes dos gêneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* e fungos tais como *Aspergillus sp.*, *Humicola sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Metarhizium sp.* e *Trichoderma harzianum* são poderosos solubilizadores de fosfato (Leitão, et al., 2010). Destes fungos, destacam-se *T. harzianum*, como um fungo saprófito presente em solos, incluindo o bioma do cerrado brasileiro (Souza et al., 2016). Este fungo foi destacado como um potente agente fertilizante, dada a sua capacidade de induzir a absorção e fornecer fosfato solúvel no solo (Kapri e Tewari, 2010).

O aproveitamento de subprodutos ou resíduos agroindustriais como substratos para produção de enzimas é uma abordagem bastante interessante. As vantagens da utilização de resíduos agroindustriais são as grandes quantidades, baixo valor agregado e destinação ambientalmente viável. O melão de soja por exemplo, forte candidato para redução de preços em meio de cultura, é um coproduto gerado pela evaporação do líquido remanescente da secagem da proteína concentrada de soja. Possui uma alta concentração de açúcares, nitrogênio, ácidos graxos, aminoácidos e minerais (Siqueira, 2007).

As fosfatases ácidas produzidas por uma variedade de fungos ganharam atenção devido ao seu potencial biotecnológico em processos industriais, de diagnóstico e de biorremediação. Estas enzimas desempenham um papel específico na eliminação, mobilização e aquisição de fosfato, aumentando a fertilidade do solo e o crescimento das plantas. Assim, diante da relevância e do potencial de aplicação biotecnológica das fosfatases, o presente trabalho propõe avaliar a produção de fosfatases ácida de *Trichoderma harzianum* em meio de cultura a base de melão de soja.

METODOLOGIA

Microrganismos

Os fungos *Trichoderma harzianum* 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 Andre Tosello para Pesquisa e Tecnologia (Campinas-SP). Esta cultura fúngica 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.

Produção de Fosfatase Ácida por fermentação submersa em erlenmeyer

Para produção da enzima, foi inoculado 15 mL do fungo *T. harzianum* na concentração de $3,5 \times 10^8$ esporos/mL em volume de 200 mL de meio de cultivo. Foram avaliadas duas condições de meio de cultura Tr1 e Tr2 suplementado apenas com melão de soja nas concentrações de 25 e 75 g/L, respectivamente. As condições operacionais foram: temperatura de 28°C, agitação de 160 rpm. Foram amostrados pontos nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de operação, depois estes foram filtrados para retirada da biomassa e obtenção do extrato bruto contendo a enzima de interesse.

Metodologia analítica

Determinação de células (Biomassa)

A concentração celular (densidade microbiológica) foi determinada pelo *cálculo* de massa seca, obtida pela filtração do caldo fermentado de um volume conhecido. Os filtros de papel, pesados previamente, apresentava diâmetro 90 mm e retenção de partículas de 4-7 µm. Depois de filtrado, o filtro com a biomassa foram levados para estufa à temperatura de $60 \pm 1,0^\circ\text{C}$ e o sobrenadante foi reservado para análises da atividade da fosfatase ácida. Após 24 horas, o filtro foi acondicionado em dessecador com sílica gel até resfriamento e, posteriormente, foi pesado. Este procedimento foi repetido até a verificação de peso constante para a medida da biomassa seca. A diferença de massa do filtro antes e depois da filtração foi a massa de células presente no volume do caldo fermentado, a concentração celular foi expressa em (g/L).

Determinação do pH

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

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) (Sigma Aldrich

™). Uma unidade (1U) de atividade da fosfatase ácida será definida como 1 μ M de p-nitrofenol (p-NP) formado por minuto (Ames, 1966).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 (A) mostra a cinética de crescimento celular expressa em (g/L) e de pH, e (B) mostra a Atividade da fosfatase ácida (U/mL) para os tratamentos Tr1 e Tr2.

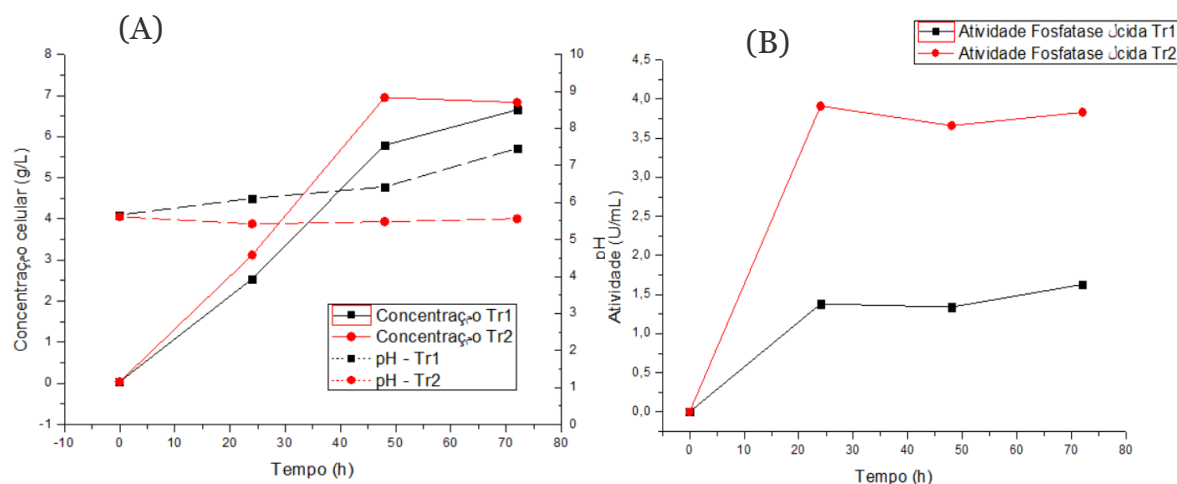


Figura 1: (A) Cinética de crescimento celular e pH. (B) Atividade da fosfatase ácida.

Pode-se observar que o melão de soja na concentração de 75 g/L (Tr2) mostrou-se mais promissor para produção da enzima em estudo se comparado com a concentração 25 g/L (Tr1). O Tr2 atingiu seu valor máximo de 3,90 U/mL de atividade nas primeiras 12 horas, depois apresentou-se pouca variação até o final da fermentação. O mesmo não foi observado para Tr1, apresentando valor de atividade de 1,38 U/mL. Portanto fica evidente que a concentração de carboidrato influencia na atividade da fosfatase ácida. Souza, 2011 estudou a influência da concentração de glicose na produção da fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum* cepa ALL42. No seu estudo, o fungo apresentou um aumento de 21% na atividade enzimática quando aumentou a suplementação de glicose de 0,5 para 1,5% (m/v).

É importante salientar que não houve correção de pH em nenhum tratamento. Na concentração de 75 g/L o melão de soja apresentou efeito tamponante com pH próximo a 5,50, ficando praticamente constante em todo processo. O crescimento celular final foi próximo para os dois tratamentos, sendo 6,65 para Tr1 e 6,83 g/L para Tr2.

Souza et al., 2016, estudaram a produção de fosfatase ácida por cepas de *T. Harzianum* em meio de cultivo suplementado com 15 g/L de glicose, sem adição de fosfato inorgânico e

pH ajustado para 4,0. Obtiveram a máxima atividade da fosfatase ácida de 14,3 U/mg em 48 de processo. Depois de 72 horas de processo, a atividade reduziu para valores próximo de 10 U/mg, permanecendo constante por mais 18 horas restantes.

CONCLUSÕES

Diante destes resultados, o melão de soja pode ser uma excelente opção para redução de preços em meio de cultivo para processos fermentativos. O meio de cultura com melhores resultados foi composto por melão de soja na concentração de 75 g/L. Neste tratamento o microrganismo obteve um crescimento celular final de 6,83 g/L, apresentou pH constante e próximo a 5,50 e atividade enzimática de 3,90 U/mL.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS

Behera B.C., Singdevsachan S.K., Mishra R.R., Dutta S.K., Thatoi, H.N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove — A review, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3, 97–110, 2014.

Kapri A, Tewari L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma sp.* *Braz J Microbiol.*2010; 41(3):787–795.

Leitão VO, Lima RCM, Vainstein MH, Ulhoa CJ. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol Lett.*2010; 32(8):1083–1088.

Siqueira, PF. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Master Dissertation, Federal University of Paraná/ Universities of Provence and of the Mediterranean, 2007.

Souza, AA. Produção e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum* ALL42. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2011.

Souza AA, Leitão VO, Ramada MH, Mehdad A, Georg RdC, Ulhoa CJ, et al. (2016) *Trichoderma harzianum* Produces a New Thermally Stable Acid Phosphatase, with Potential for Biotechnological Application. *PLoS ONE* 11(3): e0150455. doi:10.1371/journal.pone.0150455.