



AVALIAÇÃO DE FONTES DE FOSFATO PARA PRODUÇÃO DE FOSFATASE ÁCIDA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

J.C. ROLA¹, F.A. LIMA¹, E.J. RIBEIRO¹, M.M. RESENDE¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química

E-mail para contato: mresende@ufu.br

RESUMO – Os microrganismos, tanto bactérias quanto 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 usando o fungo *Trichoderma harzianum* em diferentes fontes de fosfato. Uma análise de ANOVA foi realizada para avaliar a diferença significativa entre os meios de cultura Tr1, Tr2 e Tr3. O microrganismo produziu a enzima em todos os meios, porém os resultados de Tr2 mostraram-se mais relevantes, além de apresentar pouca variação de pH no processo fermentativo. O maior crescimento celular foi no meio Tr1 chegando a 4,023 g/L no final da batelada.

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de recursos minerais para restauração do conteúdo de fósforo do solo advém da deficiência de disponibilidade desse elemento nas plantas, que é considerado um fator limitante importante para a produção de alimentos em muitos solos agrícolas. Dessa forma, os microrganismos, tanto as bactérias, quanto os fungos, desempenham um papel fundamental no ciclo natural do fósforo e convertem as formas insolúveis de fósforo, em uma forma acessível, sendo essa uma característica importante para o crescimento e sobrevivência das plantas (Behera et al., 2014).

Os principais mecanismos de solubilização P empregados por microrganismos do solo incluem: (1) solubilização e dissolução mineral de compostos de P complexos, (2) 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 solubilizantes de fosfato (Guimarães et al., 2004; Boyce e Walsh, 2007; Leitão, et al. 2010).

Destes fungos, o *Trichoderma harzianum* destaca-se por ter a capacidade de induzir a absorção e fornecer fosfato solúvel no solo, o que o torna um potente agente fertilizante (Kapri e Tewari 2010). Fungo saprófito presente em vários solos, incluindo o bioma do cerrado brasileiro (Souza et al., 2016). Além disso, o *T. harzianum* é encontrado em diferentes tipos de adubos e vegetais em decomposição, possui também alta capacidade metabólica e sua

inter-relação agressiva na competição por fontes de energia, tornando-o a espécie mais abundante desse gênero (Rahman et al., 2011).

Dados da literatura consideram que a maior parte da atividade de fosfatase em solos é de origem microbiana, especialmente na rizosfera (Garcia et al., 1992; Xu e Johnson 1995) e tem sido demonstrado que as fosfatases ácidas de origem microbiana são mais eficientes na hidrólise de compostos orgânicos de fósforo, em comparação com os seus homólogos nas plantas (Tarafdar et al., 2001).

A produção de fosfatases ácidas feita por uma variedade de fungos teve uma grande relevância devido ao seu potencial biotecnológico em processos industriais, de diagnóstico e de biorremediação. Essas enzimas desempenham um papel específico na eliminação, mobilização e aquisição de fosfato, aumentando a fertilidade do solo e o crescimento das plantas.

Portanto, diante da relevância e do potencial de aplicação biotecnológica das fosfatases, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a produção de fosfatase ácida por fermentação submersa em diferentes fontes de fosfatos.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo

O fungo *Trichoderma harzianum* foi isolado 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 Procesos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e são mantidas em ultrafreezer a (-70 °C).

2.2. Produção de Fosfatase Ácida por fermentação submersa e análise estatística

Para produção da enzima, foi inoculado 1 mL do fungo *T. harzianum* na concentração de $2,4 \times 10^8$ esporos/mL em volume de 200mL de meio de cultivo. Foram avaliadas três fontes de fosfato nos meios de cultura Tr1, Tr2 e Tr3, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Meios de cultura para produção de fosfatase ácida

Tratamentos	Açúcar (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	Fonte de Fosfato (g/L)
Tr1 ⁽¹⁾	20,0	5,0	5,0
Tr2 ⁽²⁾	20,0	5,0	1,0
Tr3 ⁽³⁾	20,0	5,0	2,0

Tr1⁽¹⁾: Meio de cultura com CaHPO₄ como fonte de fosfato.

Tr2⁽²⁾: Meio de cultura com KH₂PO₄ como fonte de fosfato.

Tr3⁽³⁾: Meio de cultura com NaH₂PO₄ como fonte de fosfato.

Uma análise de ANOVA de fator duplo com repetições, utilizando α igual a 0,05 foi realizada para ver se há diferença entre os tratamentos para os resultados de atividade enzimática. As condições operacionais foram: temperatura de 28 °C, agitação de 150 rpm. Os tratamentos foram feitos em duplicatas e o pontos de amostragem foram retirados nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas de operação, depois estas amostras foram centrifugados para retirada da biomassa e obtenção do extrato bruto contendo a enzima de interesse.

2.3. Metodologia analítica

Determinação de células (Biomassa): A concentração celular (densidade microbiológica) foi determinada de acordo com (Vieira et al., 2009) pelo cálculo de massa seca (g/L). Essa foi obtida pela centrifugação (centrífuga da macr Beckman J-25 com torração igual a 8000 RPM) de 15 mL da suspensão celular, seguida pela resuspensão do precipitado em volume conhecido de água destilada 15 mL em recipiente previamente tarado, seguida da introdução do sistema (recipiente + células) em estufa a $85 \pm 1,0$ °C. Após 24 horas, o recipiente foi acondicionado em dessecador com sílica gel até resfriamento e após a verificação de peso constante a massa celular seca foi anotada. A diferença de massa correspondeu à massa de células presente no volume de suspensão celular.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 mostra os resultados da análise estatística referente a resposta de atividade enzimática nos tempos de 48h e 72h. Analizando as amostras tem-se o valor-P tendendo a zero, ou seja, muito menor que o α de 0,05 adotado na análise, tal fato mostra que os tratamentos Tr1, Tr2 e Tr3 são diferentes. Também, o valor F ser maior que o $F_{\text{crítico}}$ remete a mesma conclusão. Com relação aos tempos de fermentação o valor-P é superior ao α adotado então se conclui que os resultados são praticamente iguais indicando a não variação da atividade ao longo deste período de tempo. Este mesmo raciocínio pode ser obtido pela análise do valor F ser menor que $F_{\text{crítico}}$.

Tabela 2: Quadro de ANOVA para Atividade Enzimática nos tempos de 48 e 72h.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	$F_{\text{crítico}}$
Amostras Tr1, Tr2 e Tr3 – Ativ. Enzimática	0,1333	2	0,0665	140,8855	9,06E-06	5,1432
Tempo fermentação 48h e 72h	4,41E-05	1	4,41E-05	0,0931	0,7704	5,9873

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, Tr2 e Tr3.

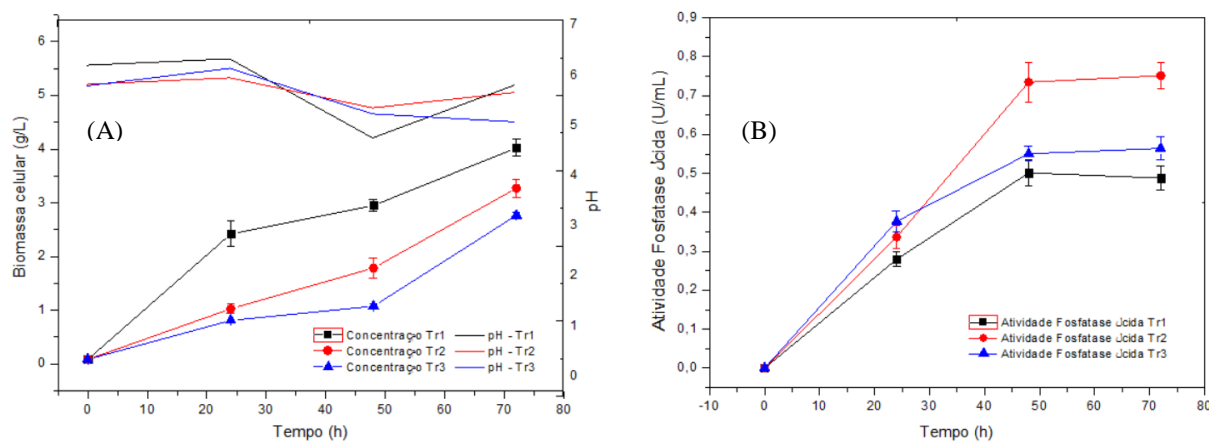


Figura 1: (A) Cinética de crescimento celular e pH. (B) Atividade da fosfatase ácida.

Pode-se observar na Figura 1 (B) que o tratamento Tr2 mostrou-se mais promissor para produção da enzima em estudo se comparado com os demais. Este tratamento atingiu seu valor máximo de 0,773 U/mL de atividade nas primeiras 48 horas, depois apresentou pouca variação até o final da fermentação. O mesmo não foi observado para Tr1 e Tr3, apresentando valores de atividades próximos a 0,50 U/mL, ou seja, uma redução de 35% se comparado com Tr1. Portanto a fonte de fóstato influenciou a produção da enzima fosfatase ácida, o *Trichoderma harzianum* teve preferência pelo KH_2PO_4 .

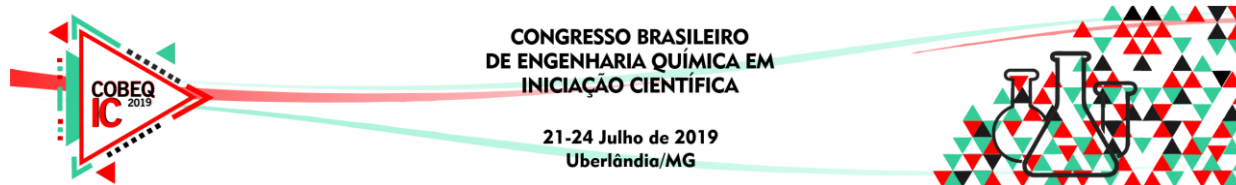
Souza, 2011 estudou a influência da concentração de glicose na produção da fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum* cepa ALL42. No seu estudo, o fungo apresentou um aumento de 21% na atividade enzimática quando aumentou a suplementação de glicose de 0,5 para 1,5% (m/v).

O crescimento celular na Figura 1 (A) mostra o tratamento Tr1 tendo maior destaque. Depois de 72h de batelada a biomassa para este tratamento foi de 4,023 (g/L), enquanto que nos tratamentos Tr2 e Tr3 foram de 3,271 (g/L) e 2,770 (g/L), respectivamente. É importante salientar que não houve correção de pH para nenhum tratamento. Todos valores foram menores que 6,0 (pH na região ácida) durante o processo fermentativo, chegando ao valor de 4,65 no Tr1.

Leitão e colaboradores em 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%.

4. CONCLUSÕES

Diante destes resultados, o fungo *Trichoderma harzianum* mostrou potencial para produção de fosfatase ácida. O meio de cultura Tr2 apresentou melhores resultados de atividade enzimática para produção de fosfatase ácida. Neste tratamento o microrganismo



obteve um crescimento celular final de 3,271 g/L, o pH variou pouco na faixa de 5,85 a 5,25 e atividade enzimática de 0,773 U/mL.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro Fundação de Apoio Universitário/UFU, 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) e Fundação de Apoio Universitário/UFU.

6. REFERÊNCIAS

- AMES BN. Assay of inorganic phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 1966; 8:115–118.
- BEHERA B.C.; SINGDEVSACHAN S.K.; MISHRA R.R.; DUTTA S.K.; THATOI, H.N. 2014. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove. A review, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3, 97–110.
- BOYCE A, WALSH G. Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis*. *J Biotechnol.* 2007; 132(1):82–87.
- GARCIA, C.; FERNANDEZ, T.; COSTA, F.; CERRANTI, B.; MASCIANDARO, G. Kinetics of phosphatase activity in organic wastes. *Soil Biol. Biochem.*, v. 25, p. 361–5, 1992.
- GUIMARÃES LHS, TERENCE HF, JORGE JA, LEONE JA, POLIZELI MDTM. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. *Biotechnol Appl Biochem.* 2004; 40:201–207.
- KAPRI A.; TEWARI, L. 2010. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma sp.* *Braz J Microbiol.* 41(3):787–795.
- LEITÃO, V.O.; LIMA, R.C.M.; VAINSTEIN, M.H.; ULHOA, C.J. 2010. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol Lett.* 32(8):1083–1088.
- RAHMAN, A. et al. Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. *Turk J Biol*, v. 35, p. 183–194, 2011.
- SIQUEIRA, P.F. 2007. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Master Dissertation, Universidade Federal do Paraná/ Universities of Provence and of the Mediterranean.
- SOUZA, A.A. 2011. Produção e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum* ALL42. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás.



SOUZA, A.A.; LEITÃO, V.O.; RAMADA, M.H.; MEHDAD, A.; GEORG, R.C.; Ulhôa, C.J. 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.

TARAFDAR, J. C.; YADAV, R. S.; MEENA, S. C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. J. Plant Nutr. Soil Sci. v. 164, p. 279-282, 2001.

VIEIRA, P.A.; FARIA, S.; VIEIRA, R.B.; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. 2009. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. World Journal of Microbiology and Biotechnology. v. 25, Issue 3, p. 427–438.

XU, J. G.; JOHNSON, R. L. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. Plant Soil, v. 173, p. 3–10, 1995.