



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Faculdade de Engenharia Química  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química**



**Produção em fermentação submersa e avaliação da imobilização  
de fosfatases ácidas de *Trichoderma* spp.**

FREDERICO ALVES LIMA

Uberlândia – MG  
2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Faculdade de Engenharia Química  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química**



**Produção em fermentação submersa e avaliação da imobilização  
de fosfatases ácidas de *Trichoderma* spp.**

FREDERICO ALVES LIMA

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Miriam Maria de Resende

**Orientador no exterior:** Dr. Jose Manuel Guisan Seijas

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Uberlândia - MG  
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L7326p 2021 Lima, Frederico Alves, 1990-  
Produção em fermentação submersa e avaliação da imobilização de fosfatases ácidas de *Trichoderma* spp. [recurso eletrônico] / Frederico Alves Lima. - 2021.

Orientadora: Miriam Maria de Resende.  
Coorientador: Jose Manuel Guisan Seijas.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.5003>  
Inclui bibliografia.

1. Engenharia Química. I. Resende, Miriam Maria de, 1971-, (Orient.). II. Guisan Seijas, Jose Manuel, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

---

CDU:66.0

André Carlos Francisco  
Bibliotecário – CRB-6/2047



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química  
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado, 07/2021, PPGEQ				
Data:	23 de novembro de 2021	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	13:20
Matrícula do Discente:	11723EQU003				
Nome do Discente:	Frederico Alves Lima				
Título do Trabalho:	Produção em fermentação submersa e avaliação da imobilização de fosfatases ácidas de <i>Trichoderma</i> spp.				
Área de concentração:	Desenvolvimento de processos químicos				
Linha de pesquisa:	Engenharia Bioquímica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Coleta e seleção de cepas e estudo da produção, purificação e utilização de enzimas e bioprodutos em processos industriais				

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Eliana Flávia Camporese Sérvulo - EQ/UFRJ; Eliana Setsuko Kamimura - FZEA/USP; Gilberto de Oliveira Mendes - ICIAG/UFU; Líbia Diniz Santos - PPGEA/UFU; Eloízio Júlio Ribeiro - FEQUI/UFU e Miriam Maria de Resende - PPGEQ/UFU, orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Miriam Maria de Resende, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Maria de Resende, Presidente**, em 23/11/2021, às 13:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Libia Diniz Santos, Membro de Comissão**, em 23/11/2021, às 13:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Eloizio Julio Ribeiro, Membro de Comissão**, em 23/11/2021, às 13:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Gilberto de Oliveira Mendes, Membro de Comissão**, em 23/11/2021, às 13:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **ELIANA FLAVIA CAMPORESE SERVULO, Usuário Externo**, em 23/11/2021, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Eliana Setsuko Kamimura, Usuário Externo**, em 23/11/2021, às 13:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3196428** e o código CRC **E239C846**.

---

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 10 DE NOVEMBRO DE 2021.

BANCA EXAMINADORA:

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Miriam Maria de Resende**

Orientadora (PPGEQ/UFU)

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliana Flávia Camporese Sérvulo**

(Escola de Química/UFRJ)

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliana Setsuko Kamimura**

(FZEA/USP)

---

**Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes**

(ICIAG/UFU)

---

**Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro**

(FEQUI/UFU)

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Líbia Diniz Santos**

(PPGEA/UFU)

*Dedico esta Tese aos meus pais Frede e Eliane, ao meu parceiro e irmão  
Guilherme, e à minha companheira Ana Letícia pelo apoio, e,  
sobretudo, compreensão nos momentos difíceis.  
Vocês somam significativamente  
em minha vida!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma na concretização deste trabalho, em especial:

Primeiramente a Deus, por abençoar e iluminar todas oportunidades que me foram dadas nesta etapa tão importante de minha vida.

À minha família, com carinho minha mãe Eliane, meu pai Frede, meu irmão Guilherme e minha companheira Ana Letícia pelo incentivo, amor e esforços dedicados para meu desenvolvimento, sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado!

À professora Dra. Miriam Maria de Resende que acompanha minha formação acadêmica desde a graduação, primeiramente me orientando como aluno de Iniciação científica e posteriormente como aluno de mestrado e doutorado. Meu muito obrigado pela oportunidade, apoio, paciência, incentivo e ensinamentos de inestimável valor.

Ao professor Dr. José M. Guisan do Instituto de Catálises e Petroquímica - CSIC, pela supervisão e parceria no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por me receber em seu laboratório em Madri de braços abertos e disponibilizar todo material e equipamentos necessários para desenvolvimento da etapa de Imobilização Enzimática desta pesquisa. Obrigado por sua disponibilidade, por todo o conhecimento valioso transferido, pela sabedoria e, sobretudo, amizade.

Aos funcionários da FEQUI/UFU, e colegas do NUCBIO pela atenção, conversas diárias e auxílio em questões técnicas.

A todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

À FAPEMIG pela bolsa de estudos concedida durante a pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), juntamente com o Programa Institucional de Internacionalização (PrInt) e pelo processo - 88887.374365/2019-00, pelo apoio financeiro durante doutorado sanduíche.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Objetivo Geral.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 A importância do Fósforo .....	5
2.2 Fosfatases – Visão Geral.....	6
2.2.1 Fosfatases ácidas .....	7
2.2.2 Fosfatases em microrganismos.....	8
2.2.3 Técnicas de purificação e características bioquímicas das fosfatases ácidas.....	9
2.2.4 Aplicações das fosfatases .....	12
2.3 Processos fermentativos para produção enzimática.....	13
2.3.1 Fermentação submersa (FSb) .....	14
2.4 Imobilização Enzimática.....	15
2.4.1 Métodos de Imobilização de enzimas.....	16
2.4.1.1 Imobilização por ligações químicas.....	17
2.4.1.2 Imobilização por retenção física .....	22
2.4.2 Imobilização das Fosfatases .....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1 Microrganismos .....	26
3.2 Preservação dos microrganismos em discos de papel .....	26
3.3 Avaliação do potencial enzimático dos microrganismos.....	28
3.4 Produção das fosfatases por fermentação submersa (FSb).....	29

3.4.1	Ativação do microrganismo preservado .....	29
3.4.2	Fermentação submersa em Incubadora Agitadora Shaker .....	30
3.4.3	Cultivos da fermentação submersa .....	30
3.4.4	Avaliação da fonte de fosfato para produção da fosfatase ácida.....	32
3.4.5	Otimização do meio de cultura para produção de fosfatase ácida por cepas de <i>Trichoderma sp.</i> .....	33
3.4.6	Liofilização das enzimas .....	34
3.5	Caracterização das fosfatases ácidas.....	34
3.6	Seleção de suportes para imobilização das fosfatases ácidas .....	35
3.6.1	Preparação e ativação dos suportes .....	35
3.6.1.1	Monoaminoetil-N-etil (MANAE).....	35
3.6.1.2	DEAE Sefarose e DEAE Toyoperl 650s .....	36
3.6.1.3	Sulfopropil agarose .....	36
3.6.1.4	Agarose glioxil 6BCL (Ag-6BCL) .....	36
3.6.1.5	Agarose polietilenimina (Ag-PEI).....	37
3.6.2	Procedimentos de imobilização .....	37
3.6.3	Técnicas de pós imobilização – capas com os polímeros polietilenimina (PEI) e dextrano-sulfato .....	38
3.7	Metodologia analítica .....	39
3.7.1	Determinação da biomassa seca em fermentação submersa .....	39
3.7.2	Determinação do pH.....	39
3.7.3	Determinação do consumo de substrato por HPLC.....	39
3.7.4	Ensaio enzimático.....	40
3.7.5	Testes de Reprodutibilidade .....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1	Testes preliminares .....	41
4.1.1	Potencial de atividade enzimática pelas cepas de <i>Trichoderma sp.</i> .....	41

4.1.2	Potencial de produção de fosfatase ácida por fermentação submersa em diferentes meios de cultivo.....	43
4.1.3	Avaliação de fontes de fosfato para produção de fosfatase ácida em fermentação submersa.....	45
4.2	Otimização dos reagentes do meio selecionado por meio do Planejamento Composto Central em fermentação submersa .....	49
4.2.1	Avaliação da produção da fosfatase ácida pelo <i>Trichoderma asperellum</i> , frente à suplementação do meio de cultivo proposto pelo PCC.....	50
4.2.2	Avaliação da produção da fosfatase ácida pelo <i>Trichoderma harzianum</i> , frente à suplementação do meio de cultivo proposto pelo PCC.....	55
4.2.3	Avaliação da produção da fosfatase ácida pelo <i>Trichoderma reesei</i> , frente à suplementação do meio de cultivo proposto pelo PCC.....	61
4.2.4	Validação dos meios de cultivos sugeridos pelo PCC para cada microrganismo estudado .....	67
4.3	Avaliação da produção de ACPase com meio de cultivo a base de melaço de soja em fermentação submersa .....	71
4.4	Estudo da imobilização das fosfatases ácidas.....	78
4.4.1	Caracterização e imobilização das fosfatases comerciais em diferentes suportes.....	78
4.4.2	Melhoramento dos derivados imobilizados.....	83
4.4.3	Imobilização das ACPases produzidas pelas cepas de <i>Trichoderma</i> . .....	87
5	CONCLUSÕES.....	90
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94
	ANEXO 1 .....	120

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ação das fosfatases sobre seus substratos, em que: ROP - substrato; E.ROP - complexo enzima-substrato; E-Pi - fosforil enzima; Pi - fósforo inorganico; APi - éster de fosfato; E - enzima livre (adaptado, NAKAGI, 2007).....	7
Figura 2.2 – Principais métodos de imobilização de enzimas. (adaptado de .....	17
Figura 2.3 – Esquema de imobilização enzimática por adsorção via troca iônica. Fonte: FERNÁNDEZ-FERNÁNDES et al. (2012). .....	18
Figura 2.4 – Esquema ilustrativo de imobilização por ligações iônicas em suportes aniônicos. (a) MANAE-agarose; (b) DEAE-agarose. Fonte: MORAIS Jr (2016).....	20
Figura 2.5 – Esquema demonstrativo de imobilização por ligações iônica em suportes catiônicos. (a) Carboximetil-agarose; (b) Sulfopropil-agarose. Fonte: MORAIS Jr (2016). .....	20
Figura 2.6 – Esquema ilustrativo resultante da imobilização covalente unipontual em suportes de CNBr-agarose. Fonte: MORAIS Jr (2016).....	22
Figura 2.7 – Esquema ilustrativo de resultante da imobilização covalente multipontual em suporte heterofuncional amino-glioxil agarose. Fonte: MORAIS Jr (2016). .....	22
Figura 2.8 – Suportes de quitosana: (A) Suportes antes da ativação (B) Suportes depois da ativação com gluteraldeído (2%). Fonte: ANAND e SRIVASTAVA (2014).....	24
Figura 3.1 – Fluxograma das estratégias e experimentos de fermentação submersa e imobilização.....	25
Figura 3.2 – Materiais utilizados na preservação. ....	27
Figura 3.3 - (A) Preparo de suspensão com leite em pó a 10%. (B) Transferência de papel filtro picado para placas de Petri contendo suspensão de esporos. ....	27
Figura 3.4 - (A) Papel colonizado antes do processo de secagem. (B) Papel colonizado envolvido em papel de filtro em frascos do tipo penicilina, contendo sílica gel azul. ...	28
Figura 3.5 – Meios de cultivo de melão de soja depois do repouso por 24h a 4 °C e antes do processo de centrifugação. As concentrações são: A – 50 g/L; B – 75 g/L; C – 100g/L. (Fonte: Arquivo do autor).....	32
Figura 3.6: Esquema ilustrativo dos suportes DEAE e tabela com propriedades descritivas. ....	36
Figura 4.1 – Índice enzimático da protease, celulase, amilase e pectinase para os microrganismos estudados.....	43

Figura 4.2 – (A) Cinética da biomassa celular e pH; (B) Atividade da fosfatase ácida - Fermentação submersa das 3 cepas de <i>Trichoderma</i> utilizando meio Tr1 (CaHPO <sub>4</sub> como fonte de fosfato).....	47
Figura 4.3 – (A) Cinética da biomassa celular e pH; (B) Atividade da fosfatase ácida – Fermentação submersa das 3 cepas de <i>Trichoderma</i> utilizando meio Tr2 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> como fonte de fosfato).....	47
Figura 4.4 – (A) Cinética da biomassa celular e pH; (B) Atividade da fosfatase ácida – Fermentação submersa das 3 cepas de <i>Trichoderma</i> utilizando meio Tr3 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> como fonte de fosfato).....	48
Figura 4.5 – Diagrama de Pareto das variáveis estudadas no PCC para atividade da fosfatase ácida do microrganismo <i>T. asperellum</i> . ....	51
Figura 4.6 – Distribuição dos resíduos relativos à atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. asperellum</i> . ....	51
Figura 4.7 – Valores preditos em relação aos observados para resposta de atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. asperellum</i> .....	52
Figura 4.8 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. asperellum</i> em relação as concentrações (g/L) de sacarose e extrato de levedura. ....	52
Figura 4.9 – Curva de contorno para as concentrações de extrato de levedura e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de <i>T. asperellum</i> .....	53
Figura 4.10 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. asperellum</i> em relação as concentrações (g/L) de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e sacarose. ....	53
Figura 4.11 – Curva de contorno para as concentrações de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de <i>T. asperellum</i> .....	54
Figura 4.12 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. asperellum</i> em relação as concentrações (g/L) de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e extrato de levedura. ....	54
Figura 4.13 – Curva de contorno para as concentrações de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e extrato de levedura objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de <i>T. asperellum</i> .....	55
Figura 4.14– Diagrama de Pareto das variáveis estudadas no PCC para atividade da fosfatase ácida do microrganismo <i>T. harzianum</i> . ....	56
Figura 4.15 – Distribuição dos resíduos relativos à atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. harzianum</i> . ....	57
Figura 4.16 – Valores preditos em relação aos observados para resposta de atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. harzianum</i> . ....	57

Figura 4.17 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. harzianum</i> em relação as concentrações (g/L) de sacarose e extrato de levedura.....	58
Figura 4.18 – Curva de contorno para as concentrações de extrato de levedura e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de <i>T. harzianum</i> . .....	58
Figura 4.19 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. harzianum</i> em relação as concentrações (g/L) de sacarose e $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	59
Figura 4.20 – Curva de contorno para as concentrações de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de <i>T. harzianum</i> . .....	59
Figura 4.21 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. harzianum</i> em relação as concentrações (g/L) de extrato de levedura e $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	60
Figura 4.22 – Curva de contorno para as concentrações de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e extrato de levedura objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de <i>T. harzianum</i> . .....	60
Figura 4.23 – Diagrama de Pareto das variáveis estudadas no PCC para atividade da fosfatase ácida do microrganismo <i>T. reesei</i> .....	61
Figura 4.24 – Distribuição dos resíduos relativos à atividade da fosfatase ácida .....	62
Figura 4.25 - Valores preditos em relação aos observados para resposta de atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. reesei</i> . .....	63
Figura 4.26 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. reesei</i> em relação as concentrações (g/L) de sacarose e extrato de levedura. ....	63
Figura 4.27 – Curva de contorno para as concentrações de extrato de levedura e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de <i>T. reesei</i> . .....	64
Figura 4.28 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. reesei</i> em relação as concentrações (g/L) de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e sacarose. ....	64
Figura 4.29 – Curva de contorno para as concentrações de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de <i>T. reesei</i> . .....	65
Figura 4.30 – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo <i>T. reesei</i> em relação as concentrações (g/L) de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e extrato de levedura. ....	65
Figura 4.31 – Curva de contorno para as concentrações de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e extrato de levedura objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de <i>T. reesei</i> . .....	66
Figura 4.32 – (A) Cinéticas de crescimento da biomassa celular e produção enzimática; (B) consumo de substrato para o <i>Trichoderma asperellum</i> .....	67
Figura 4.33 – (A) Cinéticas de crescimento da biomassa celular e produção enzimática; (B) consumo de substrato para o <i>Trichoderma harzianum</i> . ....	68

Figura 4.34 – (A) Cinéticas de crescimento da biomassa celular e produção enzimática;	
(B) consumo de substrato para o <i>Trichoderma reesei</i> .	69
Figura 4.35– Cinética de pH das cepas de <i>Trichoderma</i> em seus respectivos	70
Figura 4.36 – Cinética de crescimento da biomassa celular dos microrganismos nos meios de cultivo MS25, MS50, MS75, MS100, sem tratamento.	72
Figura 4.37 – Cinética de atividade da fosfatase ácida dos microrganismos nos meios de cultivo (MS25, MS50, MS75 e MS100) utilizando melão de soja sem tratamento.	73
Figura 4.38 – Cinética de crescimento da biomassa celular dos microrganismos nos meios de cultivo MS25, MS50, MS75, MS100, com tratamento.	75
Figura 4.39 – Cinética de atividade da fosfatase ácida dos microrganismos nos meios de cultivo (MS25, MS50, MS75 e MS100) utilizando melão de soja com tratamento.	76
Figura 4.40 – FTIR dos extratos enzimáticos produzido pelas cepas de <i>Trichoderma</i> : [T.a] <i>Trichoderma asperellum</i> , [T.h] <i>Trichoderma harzianum</i> , [T.r] <i>Trichoderma reesei</i> .	78
Figura 4.41: Estabilidade da ACPase livre de trigo germinado em função do pH (A) e da temperatura (B).	79
Figura 4.42: Estabilidade da ACPase livre de batata em função do pH (A) e da temperatura (B).	79
Figura 4.43 - SDS-Page (8-18%) das fosfatases ácidas comerciais - Linha 1: proteínas padrão; Linha 2: ACPase de batata; Linha 3: ACPase de trigo germinado.	80
Figura 4.44 – Mecanismo de adsorção iônica das ACPases no suporte Toyopearl DEAE-650s. A imobilização da primeira etapa foi realizada usando 25 mM, pH 7,0 de tampão cloridrato de Triza. A segunda etapa foi a oxidação e redução das cadeias glicosídicas da ACPase no derivado.	84
Figura 4.45 – ACPases imobilizadas em Toyopearl tratadas com solução de pycrilsulfonic. A: ACPase de derivado de trigo germinado antes e depois de oxidado e reduzido; B: ACPase de derivado de batata antes e depois de oxidado e reduzido.	85
Figura 4.46 - ACPases imobilizadas em Toyopearl tratadas com reagente de Schiff. A: ACPase de trigo germinado; B: ACPase de batata. 1: derivados de ACPases imobilizados; 2: derivados de ACPases oxidados; 3: Derivados de ACPases oxidados e reduzidos.	85
Figura 4.47 – Perfil de inativação térmica a 60 °C e pH 7,0 do biocatalisador: (A) ACPase de trigo germinado e (B) ACPase de batata - (■) enzima livre, (●) enzima apenas imobilizada em Toyopearl DEAE-650s, (▲) enzima imobilizada em Toyopearl DEAE-650s e também oxidada e reduzida.	86

Figura 4.48 – Influência da temperatura na atividade de: (A) ACPase de trigo germinado e (B) ACPase de batata - (■) enzima livre; (●) enzima apenas imobilizada em Toyopearl DEAE-650s; (▲) enzima imobilizada em Toyopearl DEAE-650s e também oxidada e reduzida. .... 87

Figura 4.49 – Perfil de imobilização do extrato enzimático de melão de soja nos suportes: (A) Glioxil Agarose PEI (600-1000KDa); (B) DEAE Toyopearl 650s. .... 89

Figura 4.50 – Perfil de imobilização do extrato enzimático dos meios sintéticos nos suportes: (A) Glioxil Agarose PEI (600-1000KDa); (B) DEAE Toyopearl 650s..... 90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Principais processos de purificação da fosfatase ácida em diferentes microrganismos (adaptado de SOUZA, 2011). .....	11
Tabela 2.2 – Exemplos de suportes usados para imobilização de enzimas por troca de íons. ....	19
Tabela 2.3 – Principais grupos funcionais das moléculas enzimáticas. ....	21
Tabela 3.1 – Composição do meio Czapek, meio de cultivo utilizado para ativação dos esporos preservados. ....	26
Tabela 3.2 – Meios de cultura empregados na fermentação submersa. ....	30
Tabela 3.3 – Ficha técnica nutricional do melaço de soja da empresa CJ Selecta. ....	31
Tabela 3.4 - Concentração dos reagentes utilizados no experimento. ....	33
Tabela 3.5 – Delineamento dos tratamentos referente ao Planejamento Composto Central. ....	34
Tabela 4.1 – Resultados do potencial de atividade enzimático das cepas de <i>Trichoderma sp.</i> em relação as enzimas proteases, celulase, amilase e pectinase. ....	42
Tabela 4.2 – Potencial de produção da fosfatase ácida em meios de cultura sintéticos. ....	44
Tabela 4.3 - Quadro de ANOVA para Atividade Enzimática dos três microrganismos nos tempos de 48 e 72h. ....	46
Tabela 4.4 - Concentrações das variáveis proposta pelo Planejamento Composto Central e resultados da resposta no tempo de 72h para cada microrganismo. ....	49
Tabela 4.5 – Variação de pH dos microrganismos nos meios de culturas (MS25, MS50, MS75 e MS100) sem tratamento do melaço de soja. ....	74
Tabela 4.6 - Variação de pH dos microrganismos nos meios de culturas (MS25, MS50, MS75 e MS100) com tratamento do melaço de soja. ....	77
Tabela 4.7 – Imobilização das fosfatases ácidas em diferentes suportes. ....	81
Tabela 4.8 – Imobilização das fosfatases produzidas pelas cepas de <i>Trichoderma</i> nos suportes de troca iônica. ....	88

## RESUMO

Fosfatases ácida (ACPases) são hidrolases que promovem a hidrólise do fosfato monoéster, transformando o fosfato orgânico em uma forma inorgânica solúvel. Estas enzimas podem ser produzidas por uma variedade de fungos, que ganhou atenção em decorrência de seu potencial biotecnológico em processos industriais de diagnóstico e de biorremediação. As ACPases desempenham um papel específico na mobilização e aquisição de fosfato, aumentando a fertilidade do solo, e o crescimento das plantas. Diante da relevância e do potencial de aplicação biotecnológica dessas fosfatases, o presente trabalho propõe a avaliação de sua produção em meios de cultivo de baixo custo, e também sua imobilização em suportes. Os testes preliminares foram fundamentais para analisar o potencial de produção enzimática das três cepas de *Trichoderma*, e, também, definir o meio de cultivo MC-2 a ser otimizado para cada microrganismo. Assim, por meio do Planejamento Composto Central foi possível desenvolver equações de atividade da fosfatase ácida (U/mL) usando como parâmetros três reagentes: sacarose, extrato de levedura, e fosfato de potássio monobásico. Os melhores resultados foram para o *Trichoderma reesei*, utilizando-se o meio MSO-Tr obteve-se crescimento de biomassa celular e atividade enzimática, cujos valores finais médios foram de  $5,32 \pm 0,48$  g/L e  $1,96 \pm 0,14$  U/mL, respectivamente, consumindo toda glicose e sacarose após decorridas 48 h. O *Trichoderma harzianum* teve potencial de produção enzimático intermediário. Utilizando-se o meio selecionado MSO-Th, as cinéticas de crescimento celular, e atividade enzimática chegaram a um valor final médio de  $3,58 \pm 0,27$  g/L e  $0,81 \pm 0,05$  U/mL, respectivamente. O *Trichoderma asperellum*, com o meio selecionado MSO-Ta, obteve resultados próximos aos do *Trichoderma harzianum*. Também, foi avaliada a produção da ACPase, utilizando melão de soja como única fonte nutritiva. Os melhores resultados para as fermentações submersas foram utilizando o melão de soja bruto. O *Trichoderma reesei* destacou apresentando o melhor crescimento de biomassa celular com  $6,82 \pm 0,43$  (g/L) para o meio MS75, suplementado com 75 g/L de melão de soja. Por outro lado, o *Trichoderma harzianum* teve destaque na atividade enzimática, chegando a valores de  $4,15 \pm 0,14$  (U/mL), com o meio de cultivo suplementado com 100 g/L desse substrato. Nesse trabalho também foi estudado uma técnica simples e rápida de imobilização enzimática baseada na troca iônica para melhorar a estabilidade térmica das fosfatases ácidas. A imobilização não foi eficiente para os suportes DEAE-Sepharose, e Manae agarose. Por outro lado, Toyopearl DEAE-650s mostrou-se promissor, com rendimento de imobilização acima de 95%, e recuperação de atividade acima de 85%, para ambas as enzimas. A fim de melhorar esses biocatalisadores para resistirem à altas temperaturas, uma segunda etapa foi introduzida no processo. Para isso, foram realizadas reações de oxidação e redução das cadeias glicosídicas da fosfatase ácida, permitindo demonstrar a formação de grupos de aldeídos, e posterior interação com os grupos aminas, e verificar a estabilidade das diferentes formas (livre e imobilizada). Ambos os biocatalisadores apresentaram atividade residual após uma hora de inativação, na temperatura de 60 °C, fato não observado para a enzima livre. O derivado de trigo germinado foi o melhor, apresentando atividade residual de 66,7% no derivado apenas

imobilizado, e 76,2% para o derivado oxidado/reduzido. A imobilização dos extratos enzimáticos produzidos pelas cepas de *Trichoderma* tiveram melhor desempenho no suporte Glioxil Agarose com PEI de 600-1000 KDa com destaque para o *Trichoderma asperellum*.

Palavras-chave: Fosfatase ácida, *Trichoderma* spp., *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei*, otimização meio de cultivo, melão de soja, imobilização, Toyopearl DEAE-650s, estabilidade térmica.

## ABSTRACT

Acid phosphatases (ACPases) are hydrolases that promote the hydrolysis of the phosphate monoester by transforming the organic phosphate into a soluble inorganic form. These enzymes can be produced by a variety of fungi, they also have biotechnological potential in industrial, diagnostic and bioremediation processes. ACPases play a specific role in the mobilization and acquisition of phosphate, increasing soil fertility and plant growth. Thus, considering the biotechnological application of these acids phosphatases, the present work aimed to evaluate the production in low-cost culture media, and also their immobilization in supports. The preliminary tests were important to check the enzymatic production potential of the 3 *Trichoderma* strains and also to define the MC-2 culture medium to be optimized for each microorganism. Through Central Compound Planning it was possible to develop equations of acid phosphatase activity (U/mL) using as parameters three reagents: sucrose, yeast extract and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . The best results were for *Trichoderma reesei* using the MSO-Tr medium obtained cell biomass growth and enzymatic activity of  $5.32 \pm 0.48$  g/L and  $1.96 \pm 0.14$  U/mL, respectively, it was also consumed whole glucose and sucrose after 48 hours. *Trichoderma harzianum* played an intermediary role in enzyme production. Using the selected MSO-Th medium, cell growth kinetics and enzyme activity were  $3.58 \pm 0.27$  g/L and  $0.81 \pm 0.05$  U/mL, respectively. *Trichoderma asperellum* with the selected MSO-Ta medium obtained results similar to those of *Trichoderma harzianum*. ACPase production using soy molasses as the only nutritional source was also evaluated. The best results for submerged fermentations were using raw soy molasses. *Trichoderma reesei* showed the best growth of cell biomass with  $6.82 \pm 0.43$  (g/L) for MS75 medium, supplemented with 75 g/L of soybean molasses. On the other hand, *Trichoderma harzianum* was highlighted in the enzymatic activity, reaching values of  $4.15 \pm 0.14$  (U/mL), with the culture medium supplemented with 100 g/L of this substrate. In this work, a simple and fast technique of enzymatic immobilization based on ion exchange was also studied to improve the thermal stability of acid phosphatases. Immobilization was not efficient for the supports DEAE-Sepharose, and Manae agarose. On the other hand, Toyopearl DEAE-650s showed promise, with immobilization yield above 95% and activity recovery above 85%, for both enzymes. In order to improve these biocatalysts to withstand high temperatures, a second step was introduced into the process. Therefore, oxidation and reduction reactions of the glycosidic chains of the ACPases were carried out, allowing to demonstrate the formation of aldehyde groups and subsequent interaction with the amine groups, in addition to verifying the stability of the different forms (free and immobilized). Both biocatalysts showed residual activity after 1 hour of inactivation at a temperature of 60 °C, which was not observed for the free enzyme. The germinated wheat derivative was the best, with residual activity of 66.7% for the single immobilized derivative and 76.2% for the oxidized/reduced derivative. The immobilization of enzymatic extracts produced by *Trichoderma* strains had a better performance on Glyoxil Agarose support, with an emphasis on *Trichoderma asperellum*.

Key-words: Acid phosphatase, *Trichoderma* strains, culture medium optimization, soybean molasses, immobilization, Toyopearl DEAE-650s, thermal stability.

# 1 INTRODUÇÃO

A deficiência no fósforo disponível para a planta é considerada um fator limitante importante para a produção de alimentos em muitos solos agrícolas. Desse modo, 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 indisponíveis de fósforo em uma forma acessível, que é uma característica importante para o crescimento e a sobrevivência das plantas (BEHERA et al., 2014). Os principais mecanismos empregados por microrganismos do solo incluem: (1) solubilização e dissolução mineral de compostos de P complexos; (2) liberação de fósforo durante a degradação do substrato; e (3) liberação de enzimas extracelulares, como fosfatases para degradação enzimática (SOUZA et al., 2016).

Essas enzimas são geralmente classificadas como fosfatases alcalinas e, fosfatases ácidas (RAWAT e TEWAR, 2011; ANAND e SRIVASTAVA, 2012). A fosfatase ácida (ACPase) (monoéster fosfo-hidrolase EC 3.1.3.2) é uma hidrolase que promove a hidrólise do fosfato monoéster, transformando o fosfato orgânico em uma forma inorgânica solúvel (DUFF et al., 1994; ANAND e SRIVASTAVA, 2012). Assim, desempenham um papel específico na mobilização e aquisição de fosfato, aumentando a fertilidade do solo e o crescimento das plantas (KAPRI, 2010; BEHERA et al., 2017).

Também, essas enzimas ganharam atenção em decorrência de seu potencial biotecnológico em processos industriais, sendo amplamente aplicadas no processamento de alimentos para animais monogástricos que liberam fosfato (AZEEM et al., 2014). Em células animais, elas têm sido utilizadas como biomarcadores em radioimunoensaios para diagnosticar algumas enfermidades (MUNIYAN et al., 2013). A aplicação na biorremediação de solos poluídos, também, foi relatada com o uso de ACPases derivadas de plantas e fungos micorrízicos (MISRA et al., 2012).

Vários são os microrganismos disponibilizadores de fosfato e produtores de enzimas com alta aplicabilidades, dentre eles destacam-se 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*, como solubilizadores de fosfato (BOYCE e WALSH, 2007; LEITÃO, et al. 2010, BADER et al., 2020).

Desses fungos, o *Trichoderma harzianum* apresentou maior relevância como um fungo saprófito presente em solos, incluindo no bioma do cerrado brasileiro (SOUZA et al., 2016). O referido fungo foi destacado como um potente agente fertilizante, dada à sua capacidade de

induzir a absorção e fornecimento do fosfato solúvel ao solo (SOUZA et al., 2018). Além disso, esse fungo é capaz de colonizar raízes e folhas de plantas hospedeiras, promovendo mudanças bioquímicas benéficas (KAPRI e TEWARI, 2010, BADER et al. 2020).

*Trichoderma asperellum* é um fungo filamentosos, frequentemente isolado de solo livre de raízes, rizosfera de várias plantas, tecidos vegetais saudáveis e madeira morta. Seu amplo espectro de substratos sugere um excelente oportunismo ambiental, além de ser um poderoso antagonista de outros fungos, pois é capaz de parasitar sobre eles ou inibir seu crescimento e desenvolvimento (JAKLITSCH, 2009, DAS et al., 2019, SHANG et al., 2020).

GÁRCIA-LÓPEZ et al. (2015) estudaram a contribuição de *T. asperellum* para absorção de fósforo pela planta, a partir de formas fito-disponíveis, tais como fosfatos de cálcio (rocha fosfática) e fitatos (hidrólise enzimática). Eles concluíram que a solubilização dos fosfatos e fitatos foi favorecida pelo efeito ligeiramente acidificante, e pelo aumento da concentração de ânions orgânicos promovido pelo fungo, nos meios de crescimento das plantas. A solubilização do fósforo insolúvel por *T. asperellum* Q1, e o efeito de sua enzima, fosfatase ácida, sobre a promoção do crescimento de *Arabidopsis* em estresse salino foi estudada por ZHAO et al. em 2017.

Outra espécie em destaque é o *Trichoderma reesei*. Considerado um produtor de celulose e hemicelulose convencional usadas industrialmente para despolimerizar biomassas vegetais para obtenção de açúcares simples, que são convertidos em intermediários químicos e biocombustíveis, como o etanol (MARTINEZ et al., 2008, NOGUCHI et al., 2021). Ainda, foram realizados estudos com ênfase na produção de  $\beta$ -glicosidase (XIA et al., 2018), além de potenciais contribuições para a biotecnologia de combustíveis e outras aplicações industriais.

O aproveitamento de subprodutos ou resíduos agroindustriais como matéria-prima para produção de bioprodutos de valor agregado, como as enzimas, é estrategicamente importante para economia, biotecnologia e meio ambiente (ACOSTA et al., 2020). Um ponto importante que deve ser considerado para o desenvolvimento de processos mais baratos, é a seleção de componentes de meios de cultivo com custos reduzidos, que correspondem à 10 e 30% das despesas globais (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). As pesquisas com substratos baratos e alternativos são, principalmente, centradas em resíduos de colheitas, e processos agroindustriais. As vantagens da utilização de resíduos agroindustriais são: disponibilidade, por serem gerados em grandes quantidades; altos níveis de carboidratos ou lipídios, que favorecem o crescimento microbiano e síntese de enzimas; além de reduzir custos com tratamentos destes resíduos por parte das indústrias (FERNANDES et al., 2021).

O melaço de soja é um exemplo de coproduto, gerado pela evaporação do líquido remanescente da secagem da proteína concentrada de soja, com alta concentração de açúcares, nitrogênio, ácidos graxos, aminoácidos e minerais (SIQUEIRA, 2007; SIQUEIRA et al., 2008). No processo de produção de concentrados proteicos, o melaço é concentrado em até 50% de seus sólidos totais, e, posteriormente, adicionado a rações animais. SILVA et al. (2012) produziu etanol a partir de melaço de soja hidrolisado enzimaticamente, e ROMÃO et al. (2012) produziu etanol com melaço de soja hidrolisado com ácido. MORAIS Jr, (2016) purificou, caracterizou e imobilizou lipases produzidas por *Geotrichum candidum* e *Candida rugosa* à base desse riquíssimo substrato.

As enzimas produzidas geralmente apresentam restrições quanto à sua aplicação na forma solúvel em reações, devido à sua instabilidade em solução, tornando o processo mais caro (BOM, 1999). Assim, a imobilização enzimática surge como solução para alguns desses problemas, na aplicação dessas enzimas como biocatalisadores em processos produtivos. Quando imobilizada, a enzima pode apresentar vantagens como reutilização ou uso contínuo, facilidade na sua separação do meio reacional, possibilidade de modulação de suas propriedades catalíticas, prevenção de possíveis contaminações microbianas, e a possibilidade de estabilização da sua estrutura tridimensional (MATEO et al., 2007; BELHO et al., 2014; KALITA e AMBASHT, 2019).

Portanto, cabe salientar que as enzimas, principalmente as fosfatases produzidas pelos fungos do gênero *Trichoderma*, desempenham um papel específico na mobilização e aquisição de fósforo, juntamente com técnicas de imobilização enzimática, visando futuras aplicações. Assim, o presente trabalho propõe-se avaliar a produção em fermentação submersa, e a imobilização de fosfatases ácida dos fungos *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. reesei*, bem como das fosfatases ácidas comerciais.

## **1.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho apresenta como objetivo o estudo da produção e imobilização de fosfatases ácidas, por meio da fermentação de melaço de soja e outros meios de cultura de baixo custo, utilizando-se cepas de *Trichoderma* sp. Também, propõe a imobilização de fosfatases ácidas comerciais em diferentes suportes.

Objetivos Específicos:

- Estudar as estirpes de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma reesei* na produção de fosfatases ácidas por fermentação submersa;
- Avaliar o efeito da utilização de melão de soja e/ou meios de cultura sintéticos simples como substratos de baixo custo, e estudar possíveis variações de concentrações de sais nos meios de cultura, para a produção da fosfatase ácida;
- Comparar a produção da fosfatase, com valores obtidos pela literatura, para verificação da viabilidade da produção desta enzima nos substratos alternativos;
- Estudar a imobilização das ACPases produzidas, e das ACPases comerciais em diferentes suportes: Manae Agarose, DEAE-Sefarose, DEAE Toyopearl-650s, Glioxil Agarose 6 BCL, Glioxil Agarose 4 BCL/PEI 10 KDa, Glioxil Agarose 6BCL/PEI 600-1000 KDa.
- Avaliar a estabilidade térmica das ACPases livres e imobilizadas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresenta os principais temas relacionados ao estudo, destacando-se a importância do fósforo na nutrição de plantas e as fosfatases em um contexto geral. Posteriormente, contextualiza a aplicabilidade da enzima fosfatase ácida, bem como técnicas de produção, caracterização, purificação e imobilização para futuras aplicações em processos biotecnológicos.

### 2.1 A importância do Fósforo

O fósforo (P) é um componente estrutural dos ácidos nucleicos e também identificado como macronutriente essencial para todas formas de vida (PLAXTON e LAMBERS, 2015; BEHERA et al., 2017). Também, possui relevante papel como regulador de diversas vias metabólicas, transporte e armazenamento de energia na forma de fosfato de adenosina e está presente na constituição das moléculas de DNA e RNA, (FURLANI, 2004).

O fósforo elementar não é encontrado na natureza. Ele interage de forma espontânea e fácil com o oxigênio formando o pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ) e combina com a água para formar ácido fosfórico. Ocupa o décimo primeiro lugar na ordem de abundância de elementos nas rochas ígneas da crosta terrestre (CHANG e GOLDSBY, 2013). Nos solos, o fosfato de cálcio é a forma inorgânica mais encontrada em solos básicos, por outro lado, em solos ácidos estão mais presentes os fosfatos de ferro ou alumínio. Grande parte dos solos brasileiros são classificada como latossolos, considerados muito profundos, bem drenados, altamente degradados e fortemente ácidos. Portanto, a presença de óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al) dominam nesses solos e facilitam tanto a adsorção de fosfato como a formação de fosfatos de Fe e Al (BARROSO et al., 2006).

A presença de uma população microbiana auxilia na mobilização deste nutriente. Bactérias e fungos utilizam resíduos orgânicos como fonte de carbono, energia e nutrientes (SMECK, 1985; NEVES, 1992) os quais são indisponíveis para o vegetal (LÓPEZ-BUCIO et al., 2002). Estes microrganismos produzem metabólitos ácidos e enzimas, dentre elas, as fosfatases são as principais enzimas responsáveis pela mineralização do fósforo orgânico (NAHAS e ASSIS, 1992; GYANESHWAR et al., 2002).

A baixa solubilidade e a deficiência de fósforo disponível no solo impulsionam a aplicação de fertilizantes fosfatados com o objetivo de aumentar a produtividade das culturas. Uma alternativa interessante ao uso de fertilizantes convencionais químicos, para melhor

aproveitamento do fósforo existente, ou adicionado, seria o aproveitamento de microrganismos responsáveis pela solubilização destes compostos (SILVA et al., 2001, SHEN et al., 2011).

## 2.2 Fosfatases – Visão Geral

As fosfatases são enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos eucariotos e procariotos (GUIMARÃES et al., 2004). Estas enzimas são responsáveis por hidrolisar ésteres e anidros de ácidos fosfóricos e participam de vários processos biológicos, tais como: assimilação de fósforo, metabolismo intermediário e sinalização celular. São responsáveis pela mineralização de fosfato orgânico a baixos níveis de fosfato inorgânico livre (AOYAMA et al., 2003).

As fosfatases estão divididas em dois grandes grupos de acordo com o pH ótimo de atuação: fosfatases ácidas, grupo de enzimas que possuem pH ótimo igual ou inferior a 6,0 e as fosfatases alcalinas que apresentam pH ótimo de atuação igual ou superior a 8,0. Todavia, uma nova classificação divide essas enzimas em 5 grandes famílias: (i) fosfatases alcalinas; (ii) fosfatases ácidas de baixo peso molecular; (iii) fosfatase ácida de alto peso molecular; (iv) fosfatases púrpuras e (v) proteínas fosfatases (GUIMARÃES et al., 2004; RAWAT e TEWARI, 2011; ANAND e SRIVASTAVA, 2012).

As fosfatases alcalinas se diferem das ácidas quanto a faixa de pH ótimo para a catálise e também por apresentar algumas peculiaridades no mecanismo reacional. Elas necessitam de cátions mono e bivalentes para a catálise (por exemplo: magnésio, cobalto, manganês), ao contrário da fosfatase ácida, que realizam suas reações sem a presença destes íons (STEC et al., 2000; AOYAMA et al., 2003).

As fosfatases púrpuras (PAPs, EC 3.1.3.2) são membros de metalo-família da fosfoesterase de hidrolases ácidas contendo metal binuclear. Essas enzimas estão presentes em animais, plantas, bactérias e fungos. PAPs hidrolisam uma ampla gama de fosfomonoéster e substratos de amida. Por desenvolver a característica relacionada com cor púrpura na etapa de purificação destas enzimas, tal fato foi considerado uma particularidade de separá-las em uma família à parte. Esta cor é resultado da transição e transferência de cargas causada por resíduos de tirosina ligados coordenadamente a íons férricos (TRAN et al., 2010, SCHENK et al., 2013). Em plantas, os genes da fosfatase ácida púrpura (PAP) codificam uma das classes mais predominantes dessas fosfatases ácidas (DENG et al., 2020).

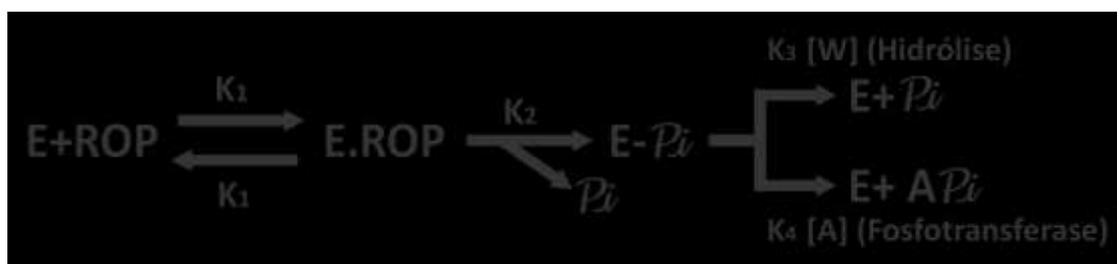
As proteínas fosfatases são fosfotransferases que catalisam a transferência de grupos fosforil das cadeias laterais de aminoácidos previamente fosforilados pela molécula de água.

Essas enzimas apresentam como peça-chave na manutenção do equilíbrio celular, regulando várias reações reversíveis de fosforilação (DIKMAN e YARDEN, 1999). A fosforilação e desfosforilação de proteínas atuam na regulação de processos de sinalização celular, ou seja, controle de diferenciação e proliferação celular (LI et al., 2000).

### 2.2.1 Fosfatases ácidas

As fosfatases ácidas (orthophosphoric – monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.2) são uma família de enzimas amplamente distribuídas na natureza (BULL et al., 2002). Podem ser secretadas por vários microrganismos como bactérias (MAGBOUL e McWEENEY, 1999; SALEH e BELISLE, 2000; ROMBOLA, 2014; AMOOZADEH, et al., 2020) fungos (TARAFDAR et al., 1988; BERNARD et al., 2002; LIMA, 2006; LEITÃO et al., 2010; ZHAO et al., 2017), também por plantas (FERNANDES et al., 2000, CHAFIK et al., 2020, FEDER et al., 2020) ou células animais (MOURA et al., 2006). As plantas e os microrganismos são responsáveis pela produção da maioria das fosfatases ácidas encontradas no solo, sendo sua atividade fundamental no ciclo do fósforo e na liberação desse composto para as plantas (SOUZA, 2011, ZHAO et al., 2017).

As rotas reacionais da ação da fosfatase sobre seus substratos é mostrado de forma esquemática na Figura 2.1 (NAKAGI, 2007). De acordo com o esquema, o substrato se liga ao sítio ativo da enzima formando o complexo enzima-substrato (E.ROP). A quebra do complexo promove a liberação do fosfato inorgânico (Pi) e do intermediário fosforilado E – Pi. Esta molécula pode sofrer hidrólise pela molécula de água (W) liberando o fósforo inorgânico (Pi) e a enzima livre. Também, se for adicionado ao meio de reação um aceptor (A), pode ocorrer a transferência de fosfato inorgânico formando assim, um novo éster de fosfato (APi), numa reação de transfosforilação.



**Figura 2.1** – Ação das fosfatases sobre seus substratos, em que: ROP - substrato; E.ROP - complexo enzima-substrato; E-Pi - fosforil enzima; Pi - fósforo inorgânico; APi - éster de fosfato; E - enzima livre (adaptado, NAKAGI, 2007).

Dados da literatura mostram que as fosfatases ácidas são amplamente distribuídas em organismos como plantas, animais e microrganismos e foram caracterizadas em diversos tecidos, como sementes, raízes, próstata e células ósseas (GUIMARÃES et al., 2004; AL-OMAR, 2010; ZHANG et al., 2013). Até o momento, essas enzimas foram aplicadas em uma ampla gama de processos, incluindo a mobilização e aquisição de P, aumento da fertilidade do solo e crescimento das plantas (KAPRI, 2010).

Em células animais, elas têm sido utilizadas como biomarcadores em radioimunoensaios para diagnóstico de doenças ósseas, metástases, inflamação crônica e câncer de próstata (MUNIYAN et al., 2013; QUINTERO et al., 2013). No processo industrial, as fosfatases ácidas são aplicadas no processamento de alimentos para animais monogástricos, para aumentar o valor nutricional e reduzir o fosfato excretado por eles (SEBASTIAN et al., 1996; AZEEM, et al., 2014).

A aplicação na biorremediação de solos poluídos também foi relatada usando ACPases derivadas de plantas e fungos micorrízicos (MISRA et al., 2012). Vários estudos revelam que a atividade destas enzimas de solo pode ser utilizada de forma prática como marcadores da qualidade em inúmeras situações. Aspectos relativos à fertilidade, indicação de poluição, remediação de solos contaminados pode ser identificadas pela ação destas enzimas (PURCENA et al., 2014).

### **2.2.2 Fosfatases em microrganismos**

As fosfatases têm sido estudadas em vários microrganismos, desde bactérias como, por exemplo, *Lactobacillus curvatus* (MAGBOUL e McSWEENEY, 1999), *Mycobacterium tuberculosis* (SALEH e BELISLE, 2000), porém um número considerável delas foram caracterizadas a partir de fungos como *Aspergillus* sp., *Humicola* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Metarhizium* sp., *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* (GUIMARÃES et al., 2004; HAAS et al., 1991; ALEKSIEVA et al., 2003; BOYCE e WALSH, 2007; LI et al., 2006; LEITÃO et al., 2010; ZHAO et al., 2017).

Estudos de YADAV e TARAFDAR (2003), mostraram que *Aspergillus niger* liberou elevada quantidade de fosfatases seguida pelo gênero *Penicillium*. O fungo *Penicillium* sp. também teve habilidade de produzir fosfatase ácida intracelular. Em NAHAS et al. (1994) o número de fungos produtores de fosfatase ácida no solo, superou em 150% o de produtores de

fosfatase alcalina; constatou ainda que os fungos possuem maior atividade da fosfatase ácida, enquanto que as bactérias da fosfatase alcalina.

Outro microrganismo que merece destaque é o *Trichoderma harzianum*. Fungo saprofítico presente nos solos, comumente encontrado no bioma do cerrado brasileiro. Considerado como agente fertilizante, devido à sua capacidade de liberar, induzir a captação e fornecer fosfato solúvel no solo (KAPRI e TEWARI, 2010). Além disso, são capazes de colonizar raízes e folhas das plantas hospedeiras, promovendo alterações bioquímicas benéficas. Também são responsáveis pela solubilização de nutrientes inorgânicos (carbono, nitrogênio e fósforo) e indução de resistência a doenças causada por patógenos vegetais (HARMAN et al., 2004; VERMA et al., 2007, BADER et al. 2020).

Dada a aplicação considerável de *T. harzianum* como agente de controle biológico, numerosos estudos foram conduzidos para aumentar nossa compreensão dos mecanismos envolvidos no micoparasitismo (RAMADA et al., 2015; GOMES et al., 2015). É sabido que esse fungo é capaz de produzir enzimas hidrolíticas, como fosfatases,  $\beta$ -glucanase (NORONHA e ULHOA, 1996), quitinases (ULHOA e PEBERDY, 1992) e xilanases (BUCHERT e HEIKINHEIMO, 1998). Além disso, estudos sobre a privação de fosfato revelaram o potencial de *Trichoderma* spp. como agentes de solubilização do fosfato, solubilizando os fosfatos presentes no solo e aumentando a fertilidade do solo e o crescimento das plantas (KAPRI e TEWARI, 2010).

LEITÃO et al. (2010) purificaram e caracterizaram uma fosfatase ácida (ACPaseI) de *T. harzianum*. Esta enzima apresentou pH e temperatura ótimos a 4,8 e 55 °C, respectivamente, e foi fortemente inibida pelo tungstato de sódio. Também foi caracterizada por hidrolizar uma ampla gama de ésteres fosforilados, incluindo moléculas orgânicas envolvidas no processo celular, como trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP). Dados publicados também mostraram que ACPases de microorganismos são mais eficientes na hidrólise de fosfato orgânico do que aquelas derivadas de plantas (KAPRI and TEWARI, 2010).

### **2.2.3 Técnicas de purificação e características bioquímicas das fosfatases ácidas**

Inúmeros trabalhos publicados referentes à purificação e caracterização bioquímica das fosfatases ácidas produzidas por plantas ou microrganismos são descritas por etapas cromatográficas. Porém, devido à variabilidade observada e características bem particulares, a utilização de uma única técnica torna-se inviável (BERNARD et al., 2002).

Técnicas cromatográficas envolvendo cromatografias de troca iônica, de exclusão molecular e de interação hidrofóbica são empregadas. A Tabela 2.1 exemplifica os principais processos de purificação, dentre eles, destacam-se a cromatografia de troca iônica seguida por uma cromatografia de filtração em gel (SOUZA, 2011).

A cromatografia por interação hidrofóbica (HIC) merece destaque pois é bastante utilizada com êxito no fracionamento e purificação de proteínas (QUEIROZ et al., 2001). Neste tipo de cromatografia a separação das proteínas é promovida através das interações hidrofóbicas entre ligantes hidrofóbicos e regiões não-polares na superfície das proteínas. Com essa técnica, a adsorção é aumentada uma vez que aumenta a concentração de sal no tampão, principalmente o sulfato de amônio (QUEIROZ et al., 2001; LEITÃO et al., 2010). Quando comparada à cromatografia de troca iônica ou de fase reversa, pode-se dizer que as interações ocorridas na HIC são mais fracas, fato que favorece a manutenção da atividade biológica da molécula que está sendo purificada (GARCIA et al., 2004). Uma nova fosfatase ácida de cactus (*Opuntia megacantha* Salm-Dyck) foi purificada por cromatografia, utilizando uma coluna de DEAE Sefarose. O monômero purificado foi caracterizado com 44 kDa de peso molecular, determinado por SDS-PAGE. O pH e temperaturas ótimos para a atividade da enzima foram de 5,5 e 60 °C, respectivamente (CHAFIK et al., 2020).

Estudos referente à caracterização bioquímica destas enzimas mostram perfis bastante distintos, variando de peso molecular, especificidade à substratos ou inibição por íons. JING et al. (2006) descreveram duas isoformas de fosfatases ácidas (I e II) produzidas por *Pinctada fucata*. Estes biocatalisadores foram separados por cromatografia de troca iônica e posteriormente cromatografia em gel de filtração. Apresentaram pH ótimos de 4,6 e 3,2 utilizando o p-Nitrofenilfosfato como substratos e massas moleculares de 64,3 e 208,8 kDa, respectivamente.

Com o objetivo de definir a formação estrutural das fosfatases ácidas (PAP1) por estudos de cristalografia, KUSUDO et al. (2003) purificaram e caracterizaram uma fosfatase ácida púrpura extraída de batata doce. A massa molecular da PAP1 foi de 60 kDa quando determinada por eletroforese. Na tentativa de classificar fosfatase ácidas de minhocas *Eisenia veneta*, duas isoenzimas (I e II) de fosfatases ácidas e uma terceira de fosfatase alcalina foram separadas por gel de filtração (STUBBERUD et al., 2000).

**Tabela 2.1** – Principais processos de purificação da fosfatase ácida em diferentes microrganismos (adaptado de SOUZA, 2011).

<b>Microrganismo</b>	<b>Método de purificação</b>	<b>Referência</b>
<i>Agaricus bisporus</i>	Q-Sepharose, TSK-DEAE 5PW	WANNET et al., 2000
<i>Aspergillus caespitosus</i>	DEAE-Celulose, Concavalina A-Sepharose	GUIMARÃES et al., 2004
<i>Aspergillus oryzae</i>	Troca iônica (ânion)	FUJITA et al., 2003
<i>Aspergillus ficcum</i>	Troca iônica e cromofocoisoeletrico	ULLAH e PHILLIPPY 1994
<i>Labeo rohita</i>	Sp-Sephadex G-50 e G-75; Sephadex G-100; CM-Celullose	SIDDQUA et al., 2008
<i>Mucor hiemalis</i>	DEAE-Sepharose CL 6B; Sephacryl S-100 HR; Phenyl agarose; Sephadex G-25	BOYCE e WALSH, 2007
<i>Pinctada fucata</i>	DEAE-Sepharose; Sephadex G-200; Concavalina A-Sepharose 4B	JIN et al., 2006
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DEAE-Sepharose; Phenyl-Sepharose; Mono Q-Sepharose.	MAGBOUL e Mc SWEENEY, 1999
<i>Lactobacillus pentosus</i>	DEAE-SPW; TSWgel G-3000 PWXL	PALACIOS et al., 2005
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Con. A Sepharose 4B; High Q anion resin	LI et al., 2006
<i>Saccharomyces serevisiae</i>	DEAE Sepharose; Sephacryl S-300	MAN-JIN et al., 2009
<i>Trichoderma harzianum</i>	Phenyl Sepharose CL-4B	LEITÃO et al., 2010
<i>Trichoderma harzianum</i>	Superdex 200 HiLoad	SOUZA et al., 2016
<i>Trichoderma asperellum</i>	DEAE Sepharose Fast Flow	ZHAO et al., 2017

AGUIRRE-GARCÍA (2007) identificou e caracterizou uma fosfatase ácida de protozoário *Cryptosporidium parvum* responsável por infecções intestinais em inúmeras espécies de mamíferos, incluindo os humanos. Com objetivo de entender os mecanismos de infecção e grau de virulência deste protozoário, tendo como referência fosfatases ácidas produzidas por outros parasitas (*Leishmania donovani*, *L. mexicana* e *Trypanosoma cruzi*), o pesquisador descobriu que essa enzima era fortemente inibida por ortovanadato de sódio, molibdato de sódio e tungstato de sódio.

LEITÃO et al. (2010) purificaram pela primeira vez uma fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum*. O biocatalisador tinha habilidade de hidrolisar diversos substratos

como: ATP, ADP, AMP, fenil fosfato de sódio e D-frutose-6-Fosfato. A enzima apresentou massa molecular de 57 kDa, pH ótimo de 4,8 e temperatura ótima de 55 °C. Sua atividade foi inibida por tungstato de sódio e cloreto de ferro (FeCl<sub>3</sub>).

Quanto à especificidade ao substrato, a ACPase de *Lactobacillus curvatus* apresentou capacidade de hidrolisar diferentes substratos fosfatados. Ela se destacou por exibir alta atividade com p-nitrofenilfosfato, D-glicose-6-fosfato, O-fosfato-DL-serina, D-frutose-6-fosfato (MAGBOUL e Mc SWEENEY, 1999).

#### **2.2.4 Aplicações das fosfatases**

Estudos referentes à utilização das fosfatases ácidas como biomarcadores estão cada vez mais frequentes. Esta enzima pode ser considerada uma hidrolase lisossomal biomarcadora, sendo que, em situações de estresse celular, ocorre extravasamento da enzima para fluidos intra e extracelulares ocasionando a alteração de seus níveis, podendo ser tratada como indicadora de tal estresse (SINGH e AGRAWAL, 2008). Em células animais, as fosfatases têm sido usadas como biomarcadores em radioimunoensaios para o diagnóstico de metástases ósseas, inflamação crônica e câncer de próstata (MUNIYAN et al., 2013; QUINTERO et al., 2013).

As fosfatases ácidas podem atuar na desfosforilação de receptores de moléculas sinalizadoras, como a insulina, na regulação do processo de transdução de sinal (BOTTINI et al., 2004). Também, neste contexto, as fosfatases ácidas podem participar em processos de sinalização celular como, por exemplo, os que envolvem o ácido ascórbico na resposta a condições fotoxidativas e ataques de patógenos em plantas. (ZHANG et al., 2010).

Outras aplicações das fosfatases têm sido na área de nutrição animal e indústria de fertilizantes. A adição de fósforo inorgânico em fertilizantes tem provocado uma maior transferência dele em rios durante processos de escoamento superficial. Tais práticas têm levado a uma maior poluição destes mananciais, uma vez que o nitrogênio e o fósforo são dois nutrientes limitantes para o crescimento de algas (FOY e WITHERS, 1995).

Estratégias nutricionais vêm sendo tomadas com a utilização de nutrientes digestivos juntamente da adição de enzimas para amenizar problemas ambientais em granja de aves e suínos. Um exemplo, são as fitases e as fosfatases ácidas, que possuem a capacidade de liberar fósforo inorgânico da molécula de ácido fítico (ácido mio-inositol hexafosfórico) (LEI e PORRES, 2003). Quando adicionadas em rações de animais monogástricos, a ação enzimática diminui os efeitos anti-nutricionais de dietas ricas neste ácido. Portanto, o resultado é a redução

da excreção fecal e urinária do fosfato, (BALI e SATYANARAYANA, 2001, AZEEM et al., 2014).

O grande uso das fosfatases microbianas se dá como insumo em kits de reagentes para análises clínicas, principalmente para as técnicas imunoenzimáticas por ELISA. Os testes imunológicos baseados na detecção de antígenos ou anticorpos podem acoplar enzimas, tais como a fosfatase alcalina a um anticorpo ou anti anticorpo, dependendo do ensaio, as quais permitem a detecção da reação antígeno anticorpo e a interpretação do resultado (ALMEIDA, 2000).

A enzimocósmética é ainda um novo campo de estudo e visa o emprego de enzimas em produtos cosméticos, dificultando ou facilitando as reações bioquímicas da pele. Neste sentido, as fosfatases alcalinas vem sendo consideradas um agente redutor de micro rugas, atuando no estímulo à proliferação dos fibroblastos (BON et al., 2008).

### **2.3 Processos fermentativos para produção enzimática**

Os dois principais processos empregados para a produção enzimática por microrganismos são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSb) (FERNANDES et al., 2021). O parâmetro que dita a grande diferença entre eles é o teor de água presente no meio reacional (CASTRO e PEREIRA, 2010).

A água é responsável por diversas funções em bioprocessos, tais como a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos. Também, participa na remoção de metabólitos e a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos, carboidratos e permeabilidade da membrana plasmática (CASTRO e PEREIRA, 2010, LU et al., 2021). Em relação ao cultivo de fungos filamentosos, a limitação de água pode causar a desnaturação enzimática, ocasionando um desequilíbrio nas vias metabólicas. Também, pode afetar os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, assim como reduzir a taxa de crescimento microbiano e aumentar o período de aclimação celular (CASTRO e PEREIRA, 2010).

A escolha do ambiente físico do meio fermentativo é de fundamental importância para o desenvolvimento microbiano aplicado à produção enzimática (PANYACHANAKUL et al., 2017). Entre os microrganismos, os fungos têm maior capacidade de crescimento em FES, talvez por assemelhar melhor ao ambiente natural em que são encontrados. Bactérias e leveduras, devido ao seu caráter unicelular, têm maior habilidade de absorver nutrientes no meio líquido (SHARMA et al., 2001; LI e ZONG, 2010).

Quando se objetiva a produção em larga escala de enzimas por fermentação, o uso de um substrato de alto custo pode ocasionar um grande aumento do valor do produto final, portanto o barateamento deste componente do meio se faz importante (FERNANDES, 2006; DAMASO et al., 2008). O aproveitamento de subprodutos ou resíduos agroindustriais como substratos para produção de enzimas é uma abordagem bastante interessante (FERNANDES et al., 2021).

Pesquisas em substratos baratos e alternativos são principalmente centradas em resíduos de colheitas e processos agroindustriais. As vantagens da utilização de resíduos agroindustriais são em relação as grandes quantidades produzidas e a possibilidade de dar uma destinação socioambiental correta. DHILLON et al. (2011) avaliaram o potencial de resíduos agrícolas para a produção de celulase e hemicelulase utilizando culturas isoladas e associadas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, e conseguiram atingir o objetivo da produção de enzimas hidrolíticas a um baixo custo, além de gerir os resíduos que causariam problemas de poluição ambiental.

O melaço de soja, objetivo de estudo deste trabalho, é um coproduto promissor gerado pela evaporação do líquido remanescente da secagem da proteína concentrada de soja, com alta concentração de açúcares, nitrogênio, ácidos graxos, aminoácidos e minerais (SIQUEIRA, 2007). SILVA et al. (2012) produziu etanol a partir de melaço de soja hidrolisado enzimaticamente e RODRIGUES et al., (2017) utilizando o mesmo substrato produziu 12,6 g/L do biosurfactantes rafinose, pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Também, obtiveram índice de emulsificação máximo de 96%. MORAIS Jr (2016) purificou e imobilizou lipases produzidas através da fermentação submersa do melaço de soja por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*.

### **2.3.1 Fermentação submersa (FSb)**

A fermentação submersa pode ser definida como aquela que ocorre em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis. Uma grande vantagem é possibilitar um melhor controle dos parâmetros do processo como temperatura, pH, aeração, agitação, e concentração de nutrientes, devido à homogeneidade do meio (SANROMÁN and COUTO, 2006, SILVA et al., 2019, RAMAMOORTHY et al., 2019). A facilidade de automatizar muitas operações (JAKUBÍKOVA et al., 2006) e a possibilidade de obter elevadas quantidades de biomassa em um pequeno espaço físico num curto intervalo de tempo (LOUREIRO et al., 2003), também ganham destaque. Todos esses fatores são importantes para

o rendimento do produto de interesse e, por esse motivo, a FSb tem sido a mais aplicada na indústria (VAIDYANATHAN et al., 1999; PANDEY, 2002, LIU et al., 2020). O custo de produção de enzimas microbianas é fortemente ligado à sua produtividade (SHELDO e PELT, 2013; FLORENCIO et al., 2017). O custo dos substratos e as variações de rendimento enzimático, são problemas economicamente determinantes para produção, prejudicando seu potencial para aplicação em escala industrial (LIMAYEM e RICKE, 2012).

Os ambientes reacionais podem ser diversos, como frascos agitados, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial (LU et al., 2021). Estima-se que 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por FSb, geralmente com o emprego de microrganismos geneticamente modificados. Isso porque, os microrganismos selvagens são mais adaptados às condições fornecidas por fermentação em estado sólido, talvez pelo fato de simular melhor seu habitat natural (FARINAS et al., 2014).

Entretanto, este processo apresenta alguns inconvenientes quando comparado a fermentação no estado sólido, tais como: a maior probabilidade de contaminação, devido à maior quantidade de água; dificuldade de esporulação do micélio em fermentações fúngicas e o favorecimento à repressão catabólica pelo fato dos açúcares (glicose, frutose, sacarose, maltose, etc) estarem dispersos em todo o meio líquido. (LIMA et al., 2003; PAPAGIANNI, 2004; SÁNCHEZ, 2009).

Dentre os fungos filamentosos, os fungos endofíticos se destacam por apresentarem grande potencial para produção de enzimas industriais por fermentação em estado líquido (CORRÊA et al., 2014). Os fungos endofíticos são aqueles que vivem na estrutura interna das plantas, especialmente folhas, caules e raízes, sem causar nenhum sintoma evidente a seus hospedeiros, em uma relação definida como endossimbiose (AZEVEDO et al., 2001; HYDE e SOYTONG, 2008). Embora pouco estudados no sentido ecológico, muitos deles são conhecidos por produzir uma variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos com possíveis aplicações em ativos anticancerígenos, antimicrobianos, anti-inflamatórios e outros produtos com aplicações farmacêuticas (TANASOVA e STURLA, 2012; PANT et al., 2014).

## **2.4 Imobilização Enzimática**

A ideia de imobilização enzimática é uma oportunidade interessante de associar os benefícios das membranas e enzimas. Os processos de imobilização enzimática são técnicas que foram adaptadas por muitos anos e tem uma ampla gama de aplicações, desde processos de tratamento de água e esgoto, degradação de poluentes e bactérias, aplicações médicas em

biossensores e implantes ósseos, até síntese orgânica (BECKER et al., 2017 ; CALDAS et al., 2017; SIGURDARDÓTTIR et al., 2018).

Nos últimos anos, a busca por tecnologias para aplicação de enzimas tem chamado atenção com objetivo de padronizar a qualidade dos produtos, reduzir custos energéticos e impactos ambientais, atendendo às normas ISO 9000 e 14000 (BON et al., 2008). Assim sendo, a imobilização enzimática surge como resposta para alguns destes problemas relacionados à aplicação destes biocatalisadores em processos industriais (KUJAWA et al., 2021).

A imobilização enzimática pode ser entendida como a técnica que mantém o biocatalisador fisicamente localizado numa região específica do suporte com preservação de sua atividade catalítica, podendo ser reutilizada para sua finalidade específica (CHIBATA et al., 1978; MORAIS Jr, 2016; KUJAWA et al., 2021). O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo reacional, em comparação à sua forma livre. Contudo, alterações estruturais, que modificam os sítios ativos, não são recomendadas (VIEIRA, 2009).

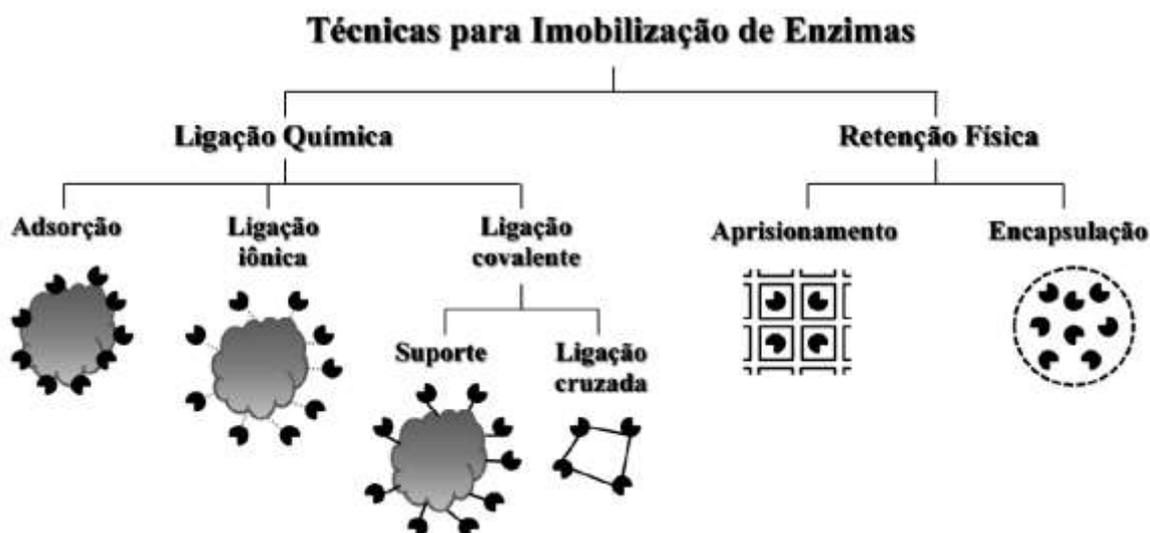
O primeiro trabalho sobre imobilização foi relatado em 1916, quando os pesquisadores GRIFFIN e NELSON, tentando purificar a invertase, observaram que a enzima adsorvida em carvão ativo manteve sua atividade e não era desorvida com as lavagens. Desse momento até os dias de hoje, vários métodos de imobilização foram desenvolvidos, cada um com suas limitações que devem ser consideradas quando aplicados. Não existe um método ou suporte universal para classes específicas de enzimas e reações. A melhor técnica ou o melhor suporte de imobilização devem ser descobertos através de testes empíricos, afinal não existe um método ou suporte universal (MENDES et al., 2011).

Propriedades químicas e físicas podem sofrer modificações após a imobilização. Os efeitos desta técnica devem ser considerados sobre a estabilidade, propriedades cinéticas, além da produtividade enzimática. A escolha criteriosa do método de imobilização, suporte utilizado, quantidade de enzima, pH, temperatura e tempo de imobilização são parâmetros de fundamental importância (BULCHHOLZ, 1979; VIEIRA, 2009; MORAIS Jr, 2016).

#### **2.4.1 Métodos de Imobilização de enzimas**

Os protocolos de imobilização enzimática em suportes são baseados em mecanismos físicos e químicos (GIRELLI e MATTEI, 2005). Há um variado número de técnicas podendo ser encapsulamento, aprisionamento ou confinamento; adsorção em materiais insolúveis como

resinas de troca iônica, copolimerizadas ou se ligar a uma matriz insolúvel por ligações covalentes (GUISAN, 2006). A Figura 2.2 apresenta as principais técnicas de imobilização.



**Figura 2.2** – Principais métodos de imobilização de enzimas. (adaptado de JEGANNATHAN et al., 2008; MORAIS Jr, 2016).

Para escolher qual é o método de imobilização mais adequado, é necessário realizar uma análise de possíveis aplicações e condições operacionais onde a enzima irá atuar. Ademais, é importante analisar o tempo e custos a fim de viabilizar o método escolhido, afinal estes parâmetros afetarão diretamente no custo final do produto (FERNANDES et al., 2010).

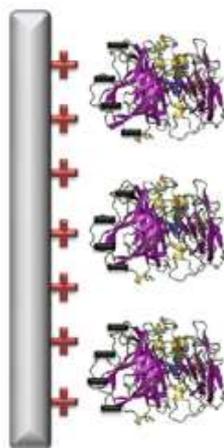
#### 2.4.1.1 Imobilização por ligações químicas

A imobilização enzimática realizada por ligações químicas consiste na interação entre os grupos ativados da enzima com os grupos reativos da superfície do suporte. Esta interação pode ser realizada por adsorção, ligações iônicas ou ligações covalentes (QUILLES Jr, 2015).

##### a) Adsorção

O método de adsorção ou adsorção física é considerado o procedimento mais fácil para se preparar um sistema de imobilização. A Figura 2.3 mostra de forma esquemática a técnica, que consiste na mistura, sob condições apropriadas, do suporte insolúvel com a solução enzimática seguida da separação do derivado imobilizado do meio reativo. A adsorção ocorre por interações superficiais ou secundárias entre os grupos da enzima e os grupos do suporte através de

força de Van der Waals, interações iônicas, adsorção física ou até por interações hidrofóbicas (JEGANNATHAN et al., 2008).



**Figura 2.3** – Esquema de immobilização enzimática por adsorção via troca iônica. Fonte: FERNÁNDEZ-FERNÁNDES et al. (2012).

A eficiência da técnica está diretamente relacionada com alguns parâmetros, tais como pH, temperatura, força iônica, natureza do solvente e quantidade de enzima. O controle destas variáveis é requerido para a adsorção otimizada e preservação da atividade, devido a ligação entre o suporte e enzima.

Tal método promove pouca perturbação à estrutura nativa da enzima. Entretanto, apresenta a dessorção como uma grande desvantagem, devido à ligação fraca entre a enzima-suporte (KENNEDY e CABRAL, 1987). Um exemplo de aplicação desta metodologia é o suporte hidrofóbico octil-sefaroze, onde o grupo octil é acoplado covalentemente à sefaroze com matriz reticulada de 4% por ligação éter. Este meio hidrofóbico formado, com perda mínima e nenhuma propriedade iônica, é ideal para algumas enzimas se adsorverem (MORAIS Jr, 2016).

### **b) Ligação iônica**

O princípio deste método é a interação do suporte-enzima através de grupos funcionais ionizáveis de ambos. Durante o processo de immobilização, pode ocorrer simultaneamente algum tipo de adsorção, porém, prevalecem as interações iônicas porque são a maioria (FERNANDES et al., 2010). Os suportes iônicos podem ser carregados negativamente (suportes catiônicos) ou positivamente (suportes aniônicos) (Tabela 2.2).

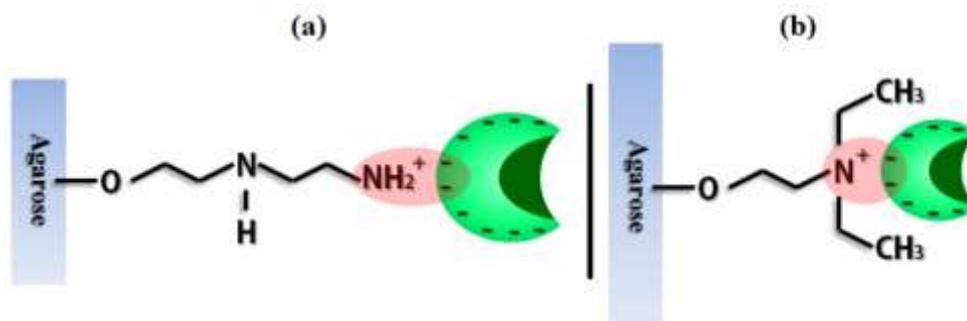
O procedimento experimental é semelhante ao de adsorção, porém a eficiência de imobilização neste caso, está relacionada com propriedades tamponantes do meio reacional. O objetivo é facilitar a transferência iônica entre os grupos ativos do suporte e enzima (VICHENEWSKI, 1995).

**Tabela 2.2** – Exemplos de suportes usados para imobilização de enzimas por troca de íons.

<b>Trocadores aniônicos</b>	<b>Trocadores catiônicos</b>
DEAE – Celulose	CM – Celulose
ECTEOLA – Celulose	Fosfato de celulose
TEAE – Celulose	Dowex50
DEAE – Sepharose	Amberlite CG – 50
Toyoperl – DEAE	Carboximetil – Agarose
DEAE – Agarose	Sulfopropil – Agarose
MANAE - Agarose	Amberlite IRC – 50
Amberlite IRA 93	Amberlite IR – 120
Amberlite IRA 410	Amberlite IR – 200
Amberlite IRA 900	Amberlite XE – 97

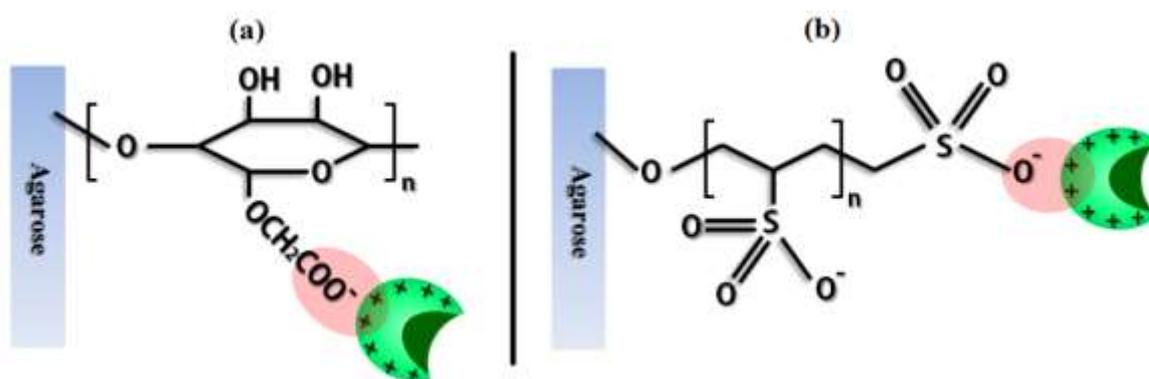
Como benefícios, destacam-se: possibilidade de reutilizar o suporte, simplicidade do método, baixo custo à grande disponibilidade de suportes. Além destes, outra vantagem relacionada a este método é a baixa mudança conformacional na estrutura enzimática, devido ao caráter iônico da ligação e às condições amenas de imobilização, resultando em imobilizados com alta atividade. Por outro lado, como desvantagem, pode haver a liberação da enzima pelo suporte, por variações de pH e força iônica do meio, afinal são dois parâmetros de grande importância (WEETALL, 1975; FISHER, 2010).

A Figura 2.4 mostra as interações iônicas da enzima com suportes aniônicos utilizados na imobilização de enzimas por ligação iônica.



**Figura 2.4** – Esquema ilustrativo de imobilização por ligações iônicas em suportes aniônicos. (a) MANAE-agarose; (b) DEAE-agarose. Fonte: MORAIS Jr (2016).

Os suportes monoaminoetil-N-etil agarose (MANAE) e dietilaminoetanol agarose (DEAE), carregados positivamente, são exemplos de suportes aniônicos. Os suportes catiônicos carboximetil e sulfopropil são carregados negativamente com os grupos funcionais  $\text{OCH}_2\text{COO}^-$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ , respectivamente (Figura 2.5).



**Figura 2.5** – Esquema demonstrativo de imobilização por ligações iônicas em suportes catiônicos. (a) Carboximetil-agarose; (b) Sulfopropil-agarose. Fonte: MORAIS Jr (2016).

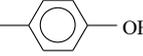
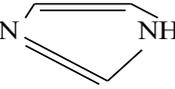
### c) Ligação covalente

A imobilização por ligações covalentes é um dos métodos mais estudados e utilizados neste ramo (CHEN e GU, 2008). Neste método ocorre os mais variados tipos de ligações, podendo imobilizar a enzima através de qualquer um dos seus grupos reativos. Com respeito aos grupos funcionais das enzimas (Tabela 2.3), a situação está relativamente definida, afinal somente os grupos presentes nas ramificações laterais de aminoácidos, depois de realizar as ligações peptídicas, poderão reagir. Para se obter uma eficiente ligação suporte-enzima é necessário fazer a ativação do suporte antes da imobilização. Esta ativação é frequentemente feita com reagentes que contêm grupos hidroxil ou amino (CAO, 2005).

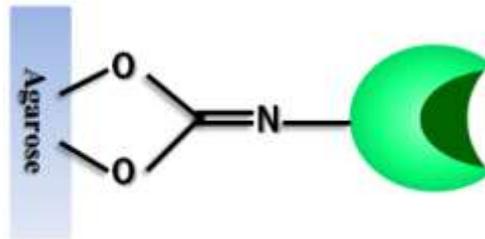
Devido a alguns inconvenientes como, condições mais drásticas e o maior número de etapas, a imobilização por este método necessita de um tempo maior para sua realização. Porém em condições apropriadas de pH e força iônica do meio reacional, estes derivados enzimáticos apresentam maior estabilidade e alta resistência a temperaturas e a solventes orgânicos em geral (MATEO et al., 2000; BAYRAMOGLU et al., 2011).

Outro fator importante que deve ser considerado nesta metodologia é a força da ligação enzima-suporte. A estabilidade da enzima é maior quando ocorre ligação multipontual (gloxil, epóxi, glutaraldeído) se comparada com a ligação covalente unipontual (MATEO et al. 2007). A Figura 2.6 exemplifica a imobilização por ligação covalente unipontual, neste caso a imobilização se dá através da região amino terminal da enzima em suportes de bromocianógeno (CNBr) ativado.

**Tabela 2.3** – Principais grupos funcionais das moléculas enzimáticas.

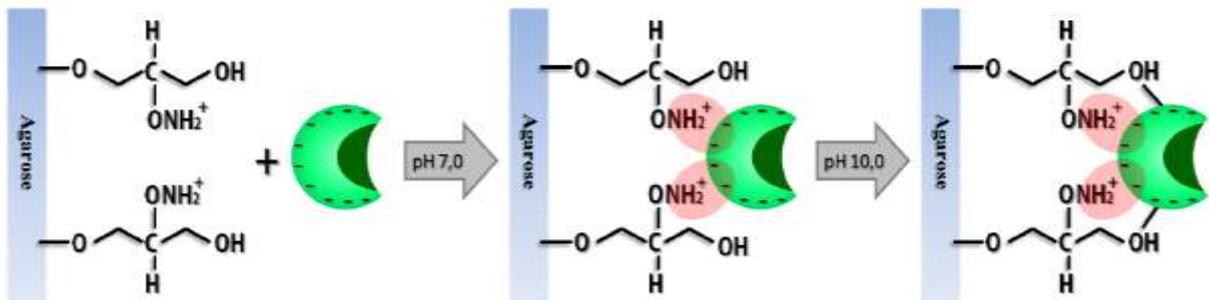
<b>Grupo</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Aminoácido</b>
Amina primária	- NH <sub>2</sub>	N-Terminal Lisina (Lys)
Ácido carboxílico	- COOH	C-Terminal Ácido aspártico (β) Ácido glutâmico (γ)
Tiol	- SH	Cisteína (Cis)
Fenol		Tirosina
Imidazole		Histidina (His)
Hidroxila	- OH	Serina

Alguns suportes ativados (por exemplo, suportes de gloxil) apenas imobilizam enzimas, a pH 10, por meio de uma ligação simultânea de dois pontos através de grupos amino. Desse modo, as enzimas são espontaneamente orientadas no suporte através da região da superfície com a maior densidade nos resíduos de Lisina (Lys). Os grupos gloxil são muito estáveis e, portanto, pode ser promovida uma imobilização covalente multiponto muito intensa entre essa região enzimática e o suporte altamente ativado (GUISAN, 2006).



**Figura 2.6** – Esquema ilustrativo resultante da imobilização covalente unipontual em suportes de CNBr-agarose. Fonte: MORAIS Jr (2016).

Além da região com a maior densidade de resíduos de Lys, outras regiões da superfície podem estar envolvidas na imobilização covalente multiponto: a região com a maior densidade nas porções carboxílicas, a região com a maior densidade nos resíduos de His, etc. Essas imobilizações são realizadas usando suportes heterofuncionais tendo grupos capazes de adsorver as enzimas em grupos glicoxil que são capazes de reagir covalentemente com resíduos de Lys (GUISAN, 2006). A enzima é primeiramente adsorvida no suporte a pH 7,0 e, em seguida, o derivado imobilizado pode ser adicionalmente incubado a pH 10, a fim de facilitar a imobilização multiponto entre os grupos glicoxil na superfície do suporte e os resíduos Lys colocados na superfície da enzima adsorvida (GUISAN, 2006) (Figura 2.7).



**Figura 2.7** – Esquema ilustrativo de resultante da imobilização covalente multipontual em suporte heterofuncional amino-glicoxil agarose. Fonte: MORAIS Jr (2016).

#### 2.4.1.2 Imobilização por retenção física

O método de imobilização enzimática por retenção física é também conhecido como aprisionamento ou encapsulação. Consiste na formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma matriz tridimensional. Esta técnica também inclui encapsulação em gel ou em fibras que impedem a interação química entre o suporte e os grupos constituintes da enzima, mantendo a estrutura tridimensional e o seu sítio ativo sem alterações (SILVA et al., 2008).

Esta metodologia proporciona um sistema onde as moléculas menores dos substratos e produtos se difundam da solução até o sítio ativo da enzima no interior da matriz, enquanto as enzimas (moléculas maiores) ficam retidas no interior do suporte. Um exemplo de imobilização de enzimas por retenção física é a microencapsulação que se caracteriza pelo revestimento da enzima com um polímero formando microesferas (RATHORE et al., 2012).

Uma das principais vantagens da utilização deste método de imobilização é a grande área superficial disponível para o contato do sítio ativo da enzima com o substrato, além da possibilidade de realizar a imobilização de diferentes enzimas num mesmo suporte, ao mesmo tempo (MENDES et al., 2011).

#### **2.4.2 Imobilização das Fosfatases**

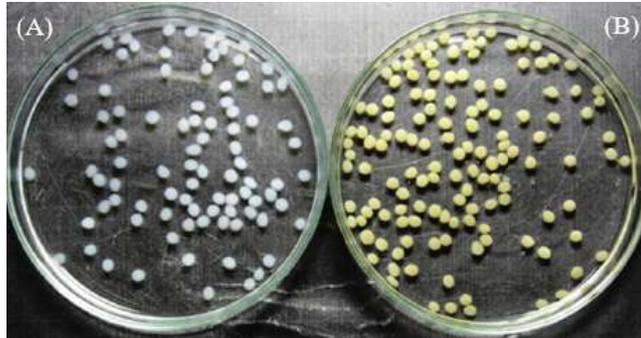
A imobilização enzimática surgiu como um interessante campo dentro da enzimologia para se tornar real as aplicações em processos industriais. Imobilizar enzimas como as fosfatases ácidas é vantajoso com relação à estabilidade aprimorada, reutilização por vários ciclos e sua recuperação (BELHO et al., 2014).

Matrizes diferentes estão sendo exploradas para o propósito, e o avanço no campo é significativo (DUTTA et al., 2013). Um grande exemplo é a agarose, um polissacarídeo linear neutro formado de unidades básicas repetidas de agarobiose. Este último, é um dissacarídeo constituído por D-galactose e 3,6-anidro-L-galactopiranosose. Este suporte apresenta características interessantes como formação de géis fortes, mesmo em baixas concentrações, hidrofílico, histerese térmica e alta porosidade. Derivados de agarose como glioxil-agarose (TARDIOLI et al., 2011; SIAR et al., 2017), octil-agarose (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2016; ZAAK et al., 2017; ALMEIDA et al., 2018); amino-glioxil agarose e carboxi-glioxil agarose (GUERRERO et al., 2017) têm sido empregados para imobilização de várias enzimas.

Os pesquisadores AMBASHT e KALITA (2019), estudando a imobilização da fosfatase ácida de trigo germinado em gel de agarose tiveram bons resultados. Com 75,25% de imobilização, a enzima imobilizada apresentou melhor estabilidade e aumento no valor de Km se comparada à enzima solúvel. Com esta técnica, a reutilização da fosfatase ácida imobilizada mostrou-se promissora, podendo ser utilizada até oito ciclos, porém com menor perda de atividade nos três primeiros.

Outra matriz de suporte utilizada para imobilização da fosfatase ácida é a quitosana, definida como amino polissacarídeo natural obtido a partir da desacetilação da quitina (CASAL et al., 2005). É um material orgânico barato, não tóxico e biocompatível que o torna um suporte

ideal para imobilização enzimática (JUANG et al., 2001). ANAND e SRIVASTAVA (2014) descreve a imobilização da fosfatase ácida isolada das sementes de *Vigna aconitifolia* em suportes de quitosana ativado por glutaraldeído (Figura 2.8).

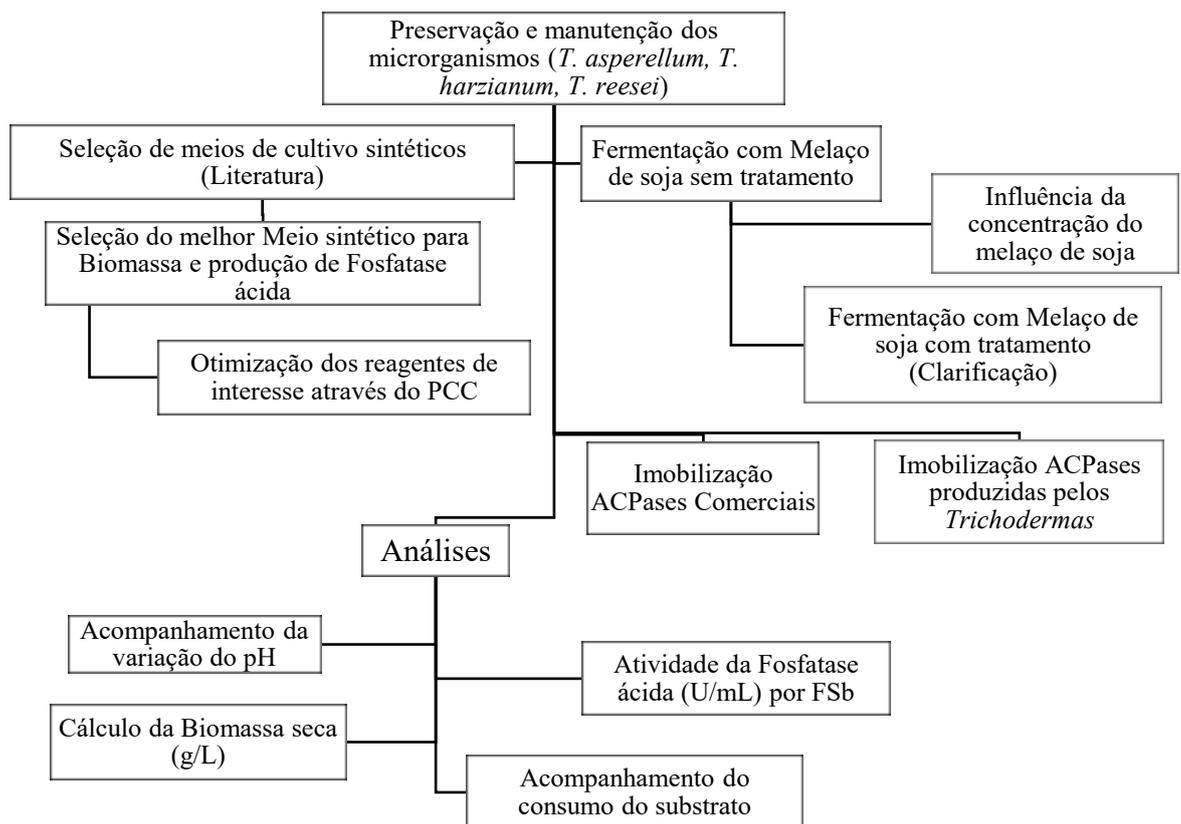


**Figura 2.8** – Suportes de quitosana: (A) Suportes antes da ativação (B) Suportes depois da ativação com glutaraldeído (2%). Fonte: ANAND e SRIVASTAVA (2014).

A imobilização foi realizada com sucesso em esferas de quitosana através do método de reticulação com 83% do rendimento de imobilização. A enzima imobilizada permaneceu estável por quase dois meses com mais de 50% de sua capacidade hidrolítica em comparação com sua forma aquosa.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados o material e métodos utilizados para o desenvolvimento experimental desse trabalho. Com objetivo de ilustrar, de forma resumida, a metodologia empregada nesse trabalho é mostrado na Figura 3.1, fluxograma das estratégias adotadas e experimentos de fermentação submersa, realizados com *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. reesei*. A etapa de Imobilização das ACPases comerciais foi realizada no Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP) do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) localizado na cidade de Madri, Espanha. As demais etapas foram realizadas no Núcleo de Processos Biotecnológicos (Nucbio) pertencente a Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) localizado na cidade de Uberlândia, Brasil.



**Figura 3.1** – Fluxograma das estratégias e experimentos de fermentação submersa e imobilização.

### 3.1 Microrganismos

Os fungos *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* e *T. reesei* foram avaliados nesse estudo. Eles foram isolados/coletados no Complexo Minerquímico de Araxá (Vale Fertilizantes), Minas Gerais. Os isolados de fungos foram identificados por testes bioquímicos de taxonomia convencional, pela Fundação Andre 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. Para garantir as características originais dos fungos, foi realizada a técnica de preservação em discos de papel, e, posteriormente, para sua ativação, utilizou-se o meio Czapek modificado de composição descrita na Tabela 3.1 (adaptado de ARAÚJO, 2014).

**Tabela 3.1** – Composição do meio Czapek, meio de cultivo utilizado para ativação dos esporos preservados.

Reagentes	Concentração (g/L)
<i>NaNO<sub>3</sub></i>	2,0
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	1,0
<i>MgSO<sub>4</sub></i>	0,5
<i>KCl</i>	0,5
<i>FeSO<sub>4</sub></i>	0,01
<i>Sacarose</i>	30,0
<i>Ágar</i>	20,0

### 3.2 Preservação dos microrganismos em discos de papel

A preservação em discos de papel é utilizada para estocagem por anos. A grande vantagem desse método é minimizar a probabilidade de variação genética, já que não há crescimento durante o período de armazenamento. Os materiais utilizados estão representados na Figura 3.2.

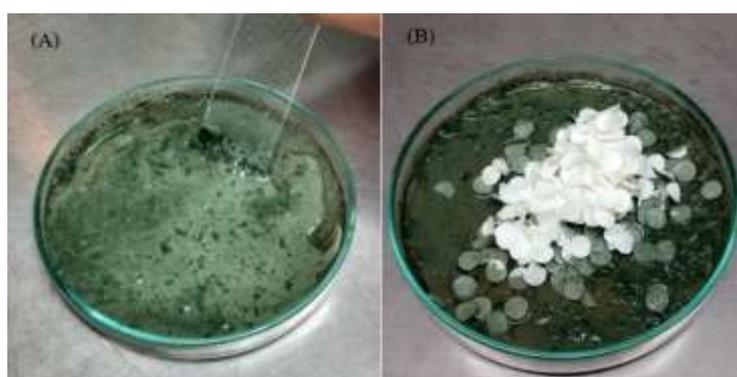
A metodologia consiste em esterilizar a seco os frascos de vidro, contendo  $\frac{3}{4}$  de sílica gel azul, à temperatura de 170 °C, por três vezes. Posteriormente, foi esterilizado em autoclave os tampões, papel de filtro, o papel toalha, e a lâmina de vidro, envoltos com papel de alumínio,

à temperatura de 120 °C, por 45 minutos. Também, foi esterilizado em autoclave a solução de leite em pó (10 % em peso), à 120 °C, por 15 minutos.



**Figura 3.2** – Materiais utilizados na preservação.

Os microrganismos foram repicados em placas contendo meio Czapek e incubados por 7 dias. Em seguida, uma suspensão de esporos foi preparada, transferindo 5 mL da solução de leite em pó 10% para cada placa. Para obtenção da suspensão mãe, fez-se a raspagem com auxílio de uma lâmina de vidro estéril, conforme a Figura 3.3 (A). Após o preparado da suspensão mãe, transferiu-se o papel de filtro picado para a placa. Nessa etapa é importante salientar que os papéis não podem ficar encharcados, para não dificultar o processo de secagem, conforme a Figura 3.3 (B).



**Figura 3.3** - (A) Preparo de suspensão com leite em pó a 10%. (B) Transferência de papel filtro picado para placas de Petri contendo suspensão de esporos.

Com o auxílio de uma pinça foi transferido o papel picado embebido para folhas de papel toalha com intuito de retirar o excesso de umidade, em seguida, foi transferido para placas

de Petri contendo folhas de papel de filtro estéril e deixado secar nas mesmas condições de incubação por 8-10 dias (Figura 3.4).

Depois de seco, realizou-se o teste de prova. Portanto foi transferido para uma placa contendo meio Czapek pedaço do papel picado e incubou a 25 °C. Fez-se a comparação de cada microrganismo com a placa controle, com objetivo de observar a presença de contaminantes.

Após o período do teste de prova, os papeis já colonizados e secos foram envoltos com Papel de filtro e em seguida transferidos para os frascos de vidro contendo sílica gel azul, conforme a Figura 3.4 (B). Por último, os recipientes foram codificados e armazenados em geladeira a 10 °C.



**Figura 3.4** - (A) Papel colonizado antes do processo de secagem. (B) Papel colonizado envolvido em papel de filtro em frascos do tipo penicilina, contendo sílica gel azul.

### 3.3 Avaliação do potencial enzimático dos microrganismos

O uso de meios sólidos específicos permite o rastreamento rápido da presença ou ausência de enzimas específicas. Nesse ensaio foi avaliada a capacidade de produção de diferentes enzimas pelos fungos *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. reesei*, através do índice enzimático. Esse foi calculado pela relação entre o diâmetro do halo (mm) gerado ao redor da colônia e o diâmetro da colônia (mm).

As enzimas estudadas foram protease, celulase, amilase e pectinase. Cada metodologia foi realizada em duplicata. Para detectar a atividade proteolítica foi utilizado o meio nutriente ágar, contendo gelatina como substrato. As placas foram incubadas durante 7 dias a 25 °C. Após o período de incubação dos isolados neste meio, foi adicionada sobre ele uma solução saturada de sulfato de amônio, cujo precipitado tornou o ágar mais opaco, e acentuou as zonas claras ao redor das colônias, onde a gelatina foi degradada (AKUJOBI et al., 2012).

A atividade da celulase foi determinada através da degradação da celulose em meio Ágar com celulose como única fonte de carbono, fundamentada pela metodologia descrita por

TEATHER E WOOD (1982) e HERCULANO et. al., (2011). Para os ensaios foram utilizados meio Ágar-carboximetilcelulose, com a seguinte composição em (g/L): 0,5 de MgSO<sub>4</sub>; 0,5 de KCl; 3,0 de NaNO<sub>3</sub>; 0,01 de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 15,0 ágar e 10,0 carboximetilcelulose. Depois de 5 dias de incubação foi vertida sobre as placas 10 mL de solução corante de vermelho congo (1 g/L). Após 15 minutos, em repouso, a solução foi descartada, em seguida, as culturas foram lavadas com NaCl 2 M, e deixadas em repouso com essa solução por 15 minutos. A presença de zonas claras ao redor das culturas mostra a atividade da celulase.

Para avaliar a atividade de amilase, os isolados foram cultivados em meio mínimo de composição (g/L): 0,5 de MgSO<sub>4</sub>; 0,5 de KCl; 3,0 de NaNO<sub>3</sub>; 0,01 de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 15,0 ágar (ROTTAVA et al., 2010) suplementado por amido, sendo incubada a 25 °C, durante 5 dias, para medida do halo de degradação do amido. Para isso, foram vertidos 2 mL de solução lugol sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução lugol foi descartada, e a atividade amilolítica detectada pela formação de halo claro circundado por uma zona azulada (DEB et al., 2013).

A pectinase foi observada em placa com meio constituído (g/L): 5,0 de pectina; 6,5 de extrato de levedura; 2,0 de glicose e 5,0 de ágar. Os microrganismos foram inoculados em discos de papel e incubados a 25 °C, por 5 dias. Após a incubação, as placas foram reveladas com uma solução 0,05% de vermelho-rutênio, por 5 minutos, e lavadas com água destilada. A formação de halo vermelho púrpuro ao redor da colônia contrastando com o restante claro da placa significou que o microrganismo foi capaz de degradar a pectina (REDDY e SREERAMULU, 2012).

### **3.4 Produção das fosfatases por fermentação submersa (FSb)**

#### **3.4.1 Ativação do microrganismo preservado**

A ativação do microrganismo foi realizada através do repique das culturas, anteriormente preservadas, em placas de Petri contendo meio Czapek. O procedimento consiste em espalhar o disco de papel, contendo o microrganismo preservado, sobre a placa com 0,1 mL de água destilada estéril. O espalhamento deve ser homogêneo por toda placa de diâmetro 9 cm. Após essa etapa, as placas foram levadas para estufa à temperatura de 25 °C, por 5 dias.

### 3.4.2 Fermentação submersa em Incubadora Agitadora Shaker

Os fungos *T. asperellum*, *T. reesei*, *T.harzianum* foram inoculados separadamente em quantidades de cada microrganismo a serem definidas para cada processo fermentativo. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio de cultura, selecionados no ítem 3.4.3. Foram mantidos sob agitação em mesa agitadora, com 150 rpm de agitação e temperatura de 25 °C.

### 3.4.3 Cultivos da fermentação submersa

Os meios de cultura empregados no processo fermentativo para a produção das fosfatases ácidas foram selecionados da literatura. A Tabela 3.2 mostra os reagentes e, também, suas concentrações, para cada referência. Nessa etapa foi avaliado crescimento de biomassa celular (g/L), atividade da fosfatase ácida (U/mL), e pH para cada um dos três fungos.

**Tabela 3.2** – Meios de cultura empregados na fermentação submersa.

Meios de Cultivo	Reagentes – Concentração (g/L)	Referências
<b>Meio 1 – JP</b>	Sacarose – 20,0 Extrato de Levedura – 5,0	Laboratório Farroupilha
<b>Meio 2 – JP modificado</b>	Sacarose – 20,0 Extrato de Levedura – 5,0 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2,0	Laboratório Farroupilha/UFU
<b>Meio 3 – Czapek líquido</b>	Sacarose – 30,0 NaNO <sub>3</sub> – 2,0 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,0 MgSO <sub>4</sub> – 0,5 KCl – 0,5 FeSO <sub>4</sub> – 0,01	Adaptado de ARAÚJO, 2014
<b>Meio 4 – Sampaio</b>	Glicose – 10,0 Extrato de Levedura – 0,5 MgSO <sub>4</sub> – 0,1 MnSO <sub>4</sub> – 0,001 FeSO <sub>4</sub> – 0,001 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 0,5	SAMPAIO et al., 2003

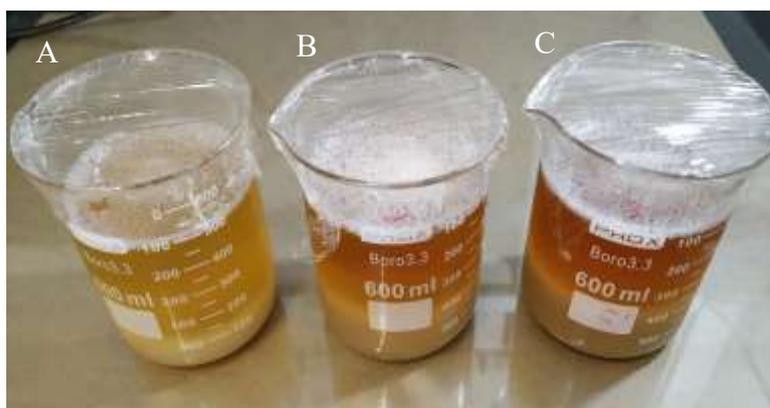
	KCl – 0,2	
<b>Meio 5 – Leitão</b>	Glicose – 2,5 Peptona bacteriana – 1,0 Ureia – 0,3 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2,0 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 14,0 Mg(SO <sub>4</sub> )7.H <sub>2</sub> O – 0,3	LEITÃO et al., 2010
<b>Meio 6 – Souza</b>	Glicose – 15,0 Extrato de Levedura – 2,5 CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O – 0,3 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1,4 Mg(SO <sub>4</sub> )7.H <sub>2</sub> O – 0,3	SOUZA et al., 2016

Também, estudou-se meio de cultivo à base de melaço de soja, produto doado pela empresa parceira CJ Selecta, localizada na cidade de Araguari-MG. A Tabela 3.3 apresenta a ficha técnica de composição nutricional e níveis de garantia deste produto.

**Tabela 3.3** – Ficha técnica nutricional do melaço de soja da empresa CJ Selecta.

<b>COMPOSIÇÃO TÍPICA.....(g/Kg)</b>	<b>CARBOIDRATOS TOTAIS</b>
	<b>Açúcares.....(g/kg)</b>
Proteínas totais (min).....50	Sacarose.....199
Mistura (máx).....250	Glicose.....6
Gordura total (máx).....5	Frutose.....26
Fibras totais (máx).....3	Rafinose.....50
	Estaquiose.....119
<b>NÍVEIS DE GARANTIA.....(%)</b>	<b>MINERAIS TOTAIS</b>
	<b>Minerais.....(mg/Kg)</b>
Umidade (máx).....30	Fósforo.....4150
Matéria mineral (máx).....10	Cálcio.....100
Açúcares totais (min).....40	Sódio.....400
Sólidos solúveis (BRIX).....70	Magnésio.....1300
Acidez total.....1	Potássio.....25400
	Enxofre.....500

Como é observado, o melaço de soja é um produto bastante completo, por isso foram testados meios de cultivo somente à base desse substrato nas concentrações (g/L) de 25, 50, 75 e 100 com e sem tratamento de clarificação. O melaço de soja foi submetido à clarificação (Figura 3.5) para remoção de impurezas decorrentes do processo de beneficiamento da soja, visando melhor aproveitamento do material. Após o preparo das soluções de concentração descritas acima, o pH do melaço de soja foi ajustado para 3,0, com adição de ácido sulfúrico concentrado. Depois, os recipientes foram levados para geladeira, em repouso durante 24 horas. Ao final desse processo de clarificação, os meios de cultivo foram centrifugados a 4500 rpm (3250 g), por 30 minutos, e o pH do sobrenadante (melaço de soja clarificado) foi ajustado para 5,5, com solução de NaOH 6 mol/L sendo novamente centrifugado, conforme protocolo utilizado por (SLIVINSKI, 2014; ACOSTA et al., 2020), para depois ser esterilizado.



**Figura 3.5** – Meios de cultivo de melaço de soja depois do repouso por 24h a 4 °C e antes do processo de centrifugação. As concentrações são: A – 50 g/L; B – 75 g/L; C – 100g/L. (Fonte: Arquivo do autor).

#### **3.4.4 Avaliação da fonte de fosfato para produção da fosfatase ácida**

Foram avaliadas três fontes de fosfato nos meios de cultura Tr1, Tr2 e Tr3, conforme a Tabela 3.4 para os três microrganismos estudados. O objetivo desse ensaio foi avaliar a produção da fosfatase ácida quanto à disponibilidade de fonte de fosfato solúvel no meio de cultivo. O reagente  $\text{CaHPO}_4$  apresenta baixa solubilidade, por isso, utilizamos uma concentração maior. Por sua vez, o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  apresenta solubilidade intermediária, e, por fim, o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  possui uma solubilidade alta, em meio aquoso. Uma análise de ANOVA de fator

duplo com repetições, utilizando  $\alpha$  igual a 0,05 foi realizada para ver se há diferença entre os tratamentos para os resultados de atividade enzimática.

**Tabela 3.4** - Concentração dos reagentes utilizados no experimento.

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

Tr1<sup>(1)</sup>: Meio de cultura com CaHPO<sub>4</sub> como fonte de fosfato.  
Tr2<sup>(2)</sup>: Meio de cultura com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fonte de fosfato.  
Tr3<sup>(3)</sup>: Meio de cultura com NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fonte de fosfato.

### 3.4.5 Otimização do meio de cultura para produção de fosfatase ácida por cepas de *Trichoderma sp.*

Depois de definido o Meio de Cultura JP modificado (item 3.4.3), foi realizado um Planejamento Composto Central (PCC) com 2<sup>3</sup>, mais 3 réplicas no ponto central e mais 6 experimentos no ponto axial para estudar as concentrações dos reagentes no meio sintético. Foi definido um PCC, que foi repetido para cada cepa de *Trichoderma* estudada (Tabela 3.5).

As variáveis a serem estudadas no planejamento foram: (X1) sacarose; (X2) extrato de levedura industrial, marca Biorigin e (X3) fosfato de potássio monobásico. As respostas para esses planejamentos foram: atividade de fosfatase, crescimento biomassa celular (massa seca – g/L) e consumo do substrato. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata, totalizando 34 bateladas. O  $\alpha$  utilizado foi de rotabilidade, e o seu valor absoluto foi 1,682.

Os valores reais e codificados das variáveis foram determinados após os resultados obtidos em testes preliminares. Os valores de sacarose (X1) em (g/L) foram 6,60 (- $\alpha$ ), 10,00 (-1), 15,00 (0), 20,00 (+1), 23,40 (+ $\alpha$ ); os valores de extrato de levedura – Biorigin (X2) utilizados em (g/L) foram 0,00 (-  $\alpha$ ), 2,00 (-1), 5,00 (0), 8,00 (+1), 10,00 (+ $\alpha$ ) e fosfato de potássio monobásico (X3) em (g/L) foram 0,16 (- $\alpha$ ), 0,50 (-1), 1,00 (0), 1,50 (+1), 1,84 (+ $\alpha$ ). Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do Software Statistica 7.1, da empresa StatSoft.

No caso da utilização do melão de soja, foi avaliado somente a concentração do melão e o tipo de microrganismo, uma vez que o melão de soja possui uma composição nutricional completa.

**Tabela 3.5** – Delineamento dos tratamentos referente ao Planejamento Composto Central.

Tratamentos	X1 (g/L)	X2 (g/L)	X3 (g/L)
1	10,00	2,00	0,50
2	10,00	2,00	1,50
3	10,00	8,00	0,50
4	10,00	8,00	1,50
5	20,00	2,00	0,50
6	20,00	2,00	1,50
7	20,00	8,00	0,50
8	20,00	8,00	1,50
9	6,60	5,00	1,00
10	23,41	5,00	1,00
11	15,00	0,00	1,00
12	15,00	10,00	1,00
13	15,00	5,00	0,16
14	15,00	5,00	1,84
15	15,00	5,00	1,00
16	15,00	5,00	1,00
17	15,00	5,00	1,00

#### 3.4.6 Liofilização das enzimas

Os extratos enzimáticos foram dialisados para a retirada dos sais, e, posteriormente, liofilizadas para armazenagem e posterior utilização. O processo de liofilização foi realizado de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante.

#### 3.5 Caracterização das fosfatases ácidas

A estrutura química dos derivados foi determinada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), acoplada a uma refletância total atenuada (ATR-FTIR) em um espectrofotômetro PerkinElmer (Spectrum Two), acoplado a um Miracle ATR - Single Reflection ZnSe / L1600115. Foram registrados 16 exames na região entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Antes desta análise, os derivados foram liofilizados para remoção da água.

SDS-PAGE foi feito para determinar o peso molecular das ACPases, em gel de acrilamida a 12% (p/v). Caso fique difícil a visualização em brilhante coomassie blue, a coração em prata, de alta sensibilidade, foi realizada (BLUM et al., 1987).

As fosfatases ácidas produzidas nas formas livres e imobilizadas foram estudadas para verificação da influência do pH e da temperatura na atividade e na estabilidade. O efeito da temperatura na estabilidade da fosfatase ácida foi estudado para as temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. As amostras foram preparadas seguindo os protocolos de imobilização. A atividade enzimática foi calculada nos tempos 0, 2, 4, 24, 48, e 72 horas, e calculou-se a atividade residual (%) conforme item 3.9.7. O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), tempo para que a atividade se reduza a metade, foi determinado através do acompanhamento da cinética para cada temperatura.

O efeito do pH na estabilidade de fosfatase ácida foi avaliado nos pH de 3,0, 5,0, 7,0, 8,5 e 10,0. Utilizou-se tampão acetato de sódio 50 mM para os pH de 3,0 e 5,0 para o pH de 7,0 utilizou-se tampão (Triz), Triza-hydrochloride 50 mM, e, para os experimentos em pH 8,5 e 10,0 utilizou-se tampão bicarbonato de sódio 50 mM. Preparou-se as amostras, conforme os protocolos de imobilização à temperatura ambiente, e sob agitação mecânica, por 24 horas. Após este tempo, determinou-se a atividade enzimática, e calculou-se as atividades expressada (%) como descrito no item 3.9.7.

### **3.6 Seleção de suportes para imobilização das fosfatases ácidas**

As fosfatases ácidas foram testadas em diversos suportes para verificar qual deles oferece maior atividade e estabilidade enzimática. Os suportes utilizados foram Monoaminoetil-N-etil agarose (MANAE), Dietilaminoetanol sefarose (DEAE), DEAE Toyopearl-650, agarose glioxil 6BCL e agarose polietilenimina (PEI), de tamanhos 10 KDa e 600-1000 KDa.

Primeiramente, foram testados os suportes nas enzimas comerciais. Posteriormente, os suportes com melhores resultados, referentes à imobilização das enzimas comerciais, foram aplicados nas enzimas produzidas nesse trabalho.

#### **3.6.1 Preparação e ativação dos suportes**

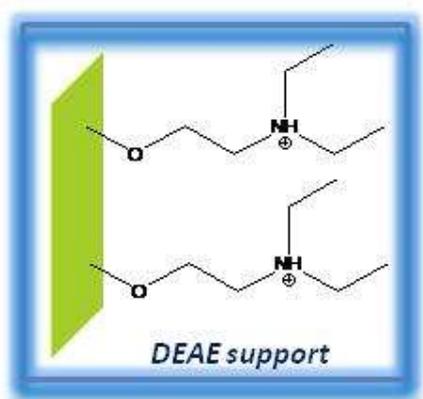
##### **3.6.1.1 Monoaminoetil-N-etil (MANAE)**

O suporte MANAE foi preparado conforme descrito por FERNANDEZ-LAFUENTE et al. (1998). Uma solução contendo 27,0 mL de etilenodiamina 2 M, pH 4,50 e 100 mL de água destilada foi preparada, após ajustar o pH em 10 com NaOH, completou-se o volume, com gotas de água destilada, para 200 mL. Adicionou-se 35 g de glioxil agarose à esta solução, e deixou-se sob constante agitação mecânica, durante 2 horas. Após este tempo, adicionou-se 2 g de borohidreto de

sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) e deixou-se sob agitação mecânica, por mais 2 horas. Finalmente, o gel foi lavado com, aproximadamente, 1 L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0 e, aproximadamente, 1 L de água destilada. Posteriormente, o suporte foi filtrado e seco, por filtração a vácuo para, então, ser utilizado.

### 3.6.1.2 DEAE Sefarose e DEAE Toyoperl 650s

Os suportes DEAE Sefarose e DEAE Toyoperl 650s são suportes comerciais já ativados e adquiridos das empresas GE Healthcare Bio-Science e Tosoh, respectivamente. Para o uso seguiu-se as indicações do fabricante com algumas ressalvas. Primeiramente, a suspensão de cada um destes suportes foi lavada com abundância, utilizando o tampão Triz (Triza hidrócloride) 12,5 mM e pH 7,0. Posteriormente, o suporte foi filtrado e seco por filtração a vácuo, para, então, ser utilizado. O suporte pronto para uso foi estocado em temperatura de 4 °C. Na Figura 3.6 é apresentado o esquema ilustrativo dos suportes DEAE, juntamente com as propriedades descritivas.



Propriedades	Descrição
Intensidade da troca iônica	Fraca atração iônica
Limite de exclusão	4 x 0,16 (proteínas globulares)
Matriz	Cross-link agarose 6%
Forma da malha	Esférica, 45 – 165 $\mu\text{m}$

**Figura 3.6:** Esquema ilustrativo dos suportes DEAE e tabela com propriedades descritivas.

### 3.6.1.3 Sulfopropil agarose

Suporte comercial já ativado e adquirido da empresa GE Healthcare. Para a utilização foram seguidos os protocolos do fabricante com algumas modificações. Primeiro, a suspensão foi lavada com tampão acetato de sódio 10 mM e pH 5,0, em abundância, e seca por filtração a vácuo, para, então, ser utilizado.

### 3.6.1.4 Agarose glioxil 6BCL (Ag-6BCL)

A agarose foi ativada com grupos glioxil, por esterificação da agarose 6BCL com glicidol. Posteriormente, oxidou-se a gliceril-agarose resultante da fase anterior com periodato de sódio, como foi descrito por GUIBAN (1988).

### **3.6.1.5 Agarose polietilenimina (Ag-PEI)**

As PEIs (polietilenimina) dos tamanhos de 10 KDa e 600-1000 KDa foram adicionadas aos suportes de agarose glioxil 6BCL, utilizando-se a metodologia proposta por BATALLA et al. (2008). O protocolo consiste na preparação de duas soluções.

Primeiramente, foi preparada a solução contendo a PEI de interesse. Foram pesados 20 g de PEI, diluída em 40 mL de água deionizada e corrigido o pH para 10,0. Posteriormente, foi preparada a solução contendo a agarose. Para 15 g de suporte agarose glioxil 6BCL, foi solubilizado em 40 mL de tampão bicarbonato 0,1 M e pH 10 com 0,1 M de NaCl, utilizando agitador de pás, suavemente. Quando o gel tiver totalmente homogeneizado, foi adicionado a primeira solução contendo a PEI, e foi agitado por 3 horas.

Após este período, reduziu-se com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) na concentração de 10 mg/mL, por 2 horas, também agitando em pás. Depois da redução, o suporte foi filtrado e iniciou-se a etapa de lavagem. Primeiro, foi lavado com tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4, posteriormente, com tampão borato 0,1 M e pH 9,0, então, com NaCl 0,5 M, e, finalmente, com água deionizada em abundância e estocado em temperatura de 4 °C.

### **3.6.2 Procedimentos de imobilização**

As enzimas foram imobilizadas sob agitação muito suave, usando-se diferentes suportes, em temperatura ambiente, e pH variados. Retiraram-se amostras do branco sobrenadante e suspensão, em diferentes tempos, para determinar a atividade catalítica do processo.

O rendimento de imobilização define-se como a quantidade de enzima unida ao suporte, calculada como a relação entre as atividades enzimáticas do sobrenadante e do branco inicial, descrito na equação 3.1. A atividade expressada (Equação 3.2) é a atividade final do biocatalisador, e se calcula como a relação da atividade na suspensão final depois do processo de imobilização e a atividade do branco inicial (TROBO-MASEDA et al., 2020).

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Atividade final sobrenadante} \left( \frac{U}{mL} \right)}{\text{Atividade inicial} \left( \frac{U}{mL} \right)} \right) \cdot 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Atividade Expressada (\%)} = \left( \frac{\text{Atividade suspensão} \left( \frac{U}{mL} \right)}{\text{Atividade inicial} \left( \frac{U}{mL} \right) \cdot \text{Rendimento}} \right) \cdot 100 \quad (3.2)$$

Por norma geral, a relação da solução enzimática e suporte foi de 10 mL de solução enzimática, para cada grama de suporte. A concentração da enzima comercial ACPase-trigo foi de 5 mg/mL, e da enzima ACPase-batata foi de 10 mg/mL.

As imobilizações utilizando os suportes MANAE, DEAE Sefarose, DEAE Toyoperl 650s e as agaroses com PEI foram realizadas em tampão (Triz) Triza hydrochloride 25 mM pH 7,0, e temperatura de 25 °C. Para o suporte glioxil agarose 6 BCL utilizou-se o pH 8,5 mais o reagente ditioneitol (DTT), na concentração de 10 mM, para os testes de imobilização unipontual (BOLIVAR et al., 2009), e o pH 10,0, para os testes de imobilização multipontual, ambos em tampão bicarbonato de sódio 25 mM, e temperatura de 25 °C (BLANCO e GUIÁN, 1989). Após o processo de imobilização, as soluções foram filtradas a vácuo e lavadas com os respectivos tampões de imobilização diluídos pela metade (RODRIGUES et al., 2009). As imobilizações utilizando os suportes com polímeros também seguiram o mesmo procedimento.

A fim de melhorar o processo de imobilização, para o suporte DEAE Toyoperl 650s usou-se a técnica de oxidação com periodato de sódio (NaOI<sub>4</sub>), em diferentes concentrações, a fim de retirar parte das glicolizações presentes em enzimas de planta, e, posteriormente, redução com borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) em diferentes concentrações (CLELAND, 1967).

Em todas as imobilizações as atividades das enzimas imobilizadas foram avaliadas de acordo com o item 3.8.2, e, também, ensaios de estabilidade enzimática em relação ao pH e à temperatura (determinação do tempo de meia vida).

### **3.6.3 Técnicas de pós imobilização – capas com os polímeros polietilenimina (PEI) e dextrano-sulfato**

A técnica consiste em adicionar uma capa protetora composta de PEI ou dextrano-sulfato no derivado enzimático. Esta etapa foi realizada com objetivo de melhorar a estabilidade do biocatalisador frente à temperatura e/ou pH. Para tal, foram utilizados os biocatalisadores em suporte DEAE Toyoperl 650s, e, também, o mesmo imobilizado depois de oxidar e reduzir,

na proporção de 1g de biocatalisador para 10 mL de solução do polímero, em temperatura ambiente, e agitação muito suave.

O preparo da solução dos polímeros se deu em ressuspender o PEI 25 kDa na concentração de 25 mg/mL, e o dextrano-sulfato de tamanho 600-1000 KDa, na concentração 5 mg/mL em tampão (Triz) 25 mM a pH 7,0.

Para realização do ensaio foi medido a atividade enzimática no tempo inicial, e depois de 3 horas, e, também, foi realizado o teste com o reativo picrilsulfônico para identificação de aminas primárias (grupos reativos de cargas negativas) (CLELAND, 1967).

### **3.7 Metodologia analítica**

#### **3.7.1 Determinação da biomassa seca em fermentação submersa**

A concentração celular (densidade microbiológica) para fungos foi determinada pelo cálculo de massa seca (g/L) obtida pela centrifugação (centrífuga da marca Beckman J-25 com rotação igual a 8000 rpm – 12.096 g) de um volume conhecido da amostra (15 mL). O sobrenadante foi reservado para análises posteriores, e o corpo de fundo resuspendido com água destilada e colocado em recipiente previamente tarado, seguida da introdução do sistema (recipiente + células), em estufa a  $80 \pm 1,0$  °C. Após 24 horas, o recipiente foi acondicionado em dessecador com sílica gel até resfriamento, e, posteriormente, foi pesado. Esse procedimento foi repetido, até a verificação de peso constante para a medida da massa celular seca. A diferença entre as massas (recipiente + células e somente o recipiente) será a massa de células presente no volume de suspensão celular (VIEIRA et al., 2009).

#### **3.7.2 Determinação do pH**

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

#### **3.7.3 Determinação do consumo de substrato por HPLC**

As análises das concentrações do consumo de substrato pelos microrganismos, ao longo dos testes, foram realizadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H, nas quais os componentes foram separados, e detectados por análise em detector ultravioleta (UV) a 210

nm. A fase móvel foi composta por ácido fosfórico (0,1%), com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno a 32 °C, e volume de injeção de 20 µL. As concentrações do consumo dos substratos (sacarose, glicose e frutose) serão calculadas com auxílio de curvas padrão realizadas previamente.

### 3.7.4 Ensaio enzimático

A atividade da fosfatase ácida foi medida de acordo com LEITÃO et al. (2010), com algumas modificações. Foi utilizado como substrato o fosfato de p-nitrofenilo sal disódico hexahidratado (p-NPP) (Sigma Aldrich™). Uma unidade (1 U) de atividade da fosfatase ácida foi definida como 1 µM de p-nitrofenol (p-NP) formado por minuto (AMES, 1966). Foi feita uma curva de calibração, utilizando a fosfatase ácida de trigo padrão, fornecida pela empresa Sigma Aldrich™, curva no Anexo 1. Para os ensaios de estabilidade referente à temperatura e pH, foi calculada a atividade residual (%), conforme a equação 3.3 abaixo:

$$\text{Atividade residual (\%)} = \frac{(\text{Atv.ti})}{\text{Atv.inicial}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

Sendo,

- (Atv.ti): atividade da suspensão (enzima/suporte) ou enzima solúvel no tempo  $t_i$ , expressa em U/mL;
- (Atv.inicial): atividade da suspensão ou enzima solúvel no tempo zero, expressa em U/mL.

### 3.7.5 Testes de Reprodutibilidade

Visando garantir a reprodutibilidade dos resultados, todos os experimentos foram repetidos nas condições de otimização dos planejamentos experimentais. Também foram repetidos os experimentos da cinética, nas condições selecionadas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na etapa experimental foram apresentados nesse capítulo, bem como as discussões pertinentes em cada caso. Primeiramente, serão discutidos os resultados preliminares referentes ao potencial de produção enzimático, e produção de fosfatase ácida em meio líquido. Em um segundo momento, serão apresentados os resultados relacionados à fermentação submersa, e também a otimização dos meios de cultura para cada um dos microrganismos estudados. Por último, os resultados pertencentes à caracterização parcial das fosfatases produzidas e imobilização. Todos experimentos foram realizados em duplicata.

### 4.1 Testes preliminares

#### 4.1.1 Potencial de atividade enzimática pelas cepas de *Trichoderma sp.*

O uso de meios seletivos mais simples é empregado para o rastreamento rápido de grandes populações de fungos para a presença ou ausência de certas enzimas específicas. Nesse experimento foi avaliado o potencial de atividade do *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma reesei* para as enzimas protease, celulase, amilase e pectinase.

Importante salientar que os três microrganismos cresceram em todos os meios sólidos seletivos, com destaque para o *Trichoderma asperellum* que apresentou diâmetro de crescimento micelial de 4,95 cm para o meio à base de amido, em um período de 5 dias, como visto na Tabela 4.1. Ao avaliar a Figura 4.1 observa-se a presença do halo hidrolítico para as proteases, celulase e pectinase. Apenas no meio seletivo para amilase não foi observado esse halo, apesar de possuir crescimento micelial para os três microrganismos. O maior Índice Enzimático verificado foi para o *Trichoderma reesei* quanto à presença de proteases sendo de  $1,95 \pm 0,06$ , os demais valores estão próximos quando comparados aos desvios padrões.

Vários pesquisadores utilizavam esses métodos para identificação rápida do potencial de produção enzimático, quando possuem vários microrganismos selecionados. GUIMARÃES et al. (2006) coletaram e isolaram fungos filamentosos do solo, húmus, plantas, bagaço de cana-de-açúcar em diferentes regiões do Estado de São Paulo. Quarenta isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de produzir xilanase, glicose-oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, fitase, pectinase e amilase. Entre esses, vinte e três isolados exibiram potencial enzimático. PASHA et al. (2013) observaram a maior atividade amilolítica e celulolítica para o

fungo *Aspergillus foetidus* MTCC 10367, apresentando um halo hidrolítico de 12 mm e 18 mm, respectivamente, maior que o crescimento micelial.

**Tabela 4.1** – Resultados do potencial de atividade enzimática das cepas de *Trichoderma sp.* em relação as enzimas proteases, celulase, amilase e pectinase.

***Trichoderma asperellum***

<b>Enzima</b>	<b>Halo micelial médio(mm)</b>	<b>Halo hidrolítico médio (mm)</b>	<b>I<sub>d</sub>E ± Desv.Pad*</b>
<b>Protease</b>	29,6	45,0	1,52 ± 0,05
<b>Celulase</b>	38,7	50,3	1,30 ± 0,03
<b>Amilase</b>	49,5	0,0	0,00 ± 0,00
<b>Pectinase</b>	42,5	54,6	1,28 ± 0,10

***Trichoderma harzianum***

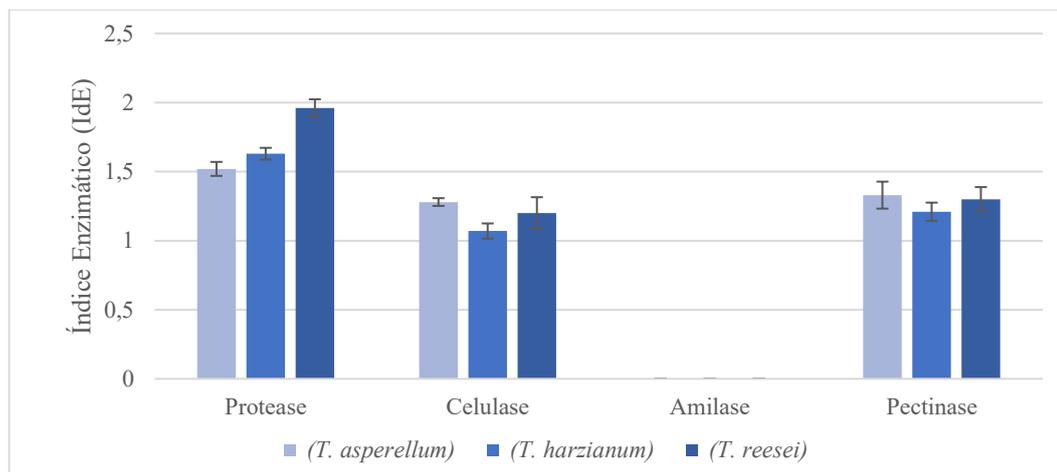
<b>Enzima</b>	<b>Halo micelial médio(mm)</b>	<b>Halo hidrolítico médio (mm)</b>	<b>I<sub>d</sub>E ± Desv.Pad*</b>
<b>Protease</b>	9,8	16,0	1,63 ± 0,04
<b>Celulase</b>	19,1	20,5	1,07 ± 0,06
<b>Amilase</b>	23,6	0,0	0,00 ± 0,00
<b>Pectinase</b>	15,5	18,8	1,21 ± 0,07

***Trichoderma reesei***

<b>Enzima</b>	<b>Halo micelial médio(mm)</b>	<b>Halo hidrolítico médio (mm)</b>	<b>I<sub>d</sub>E ± Desv.Pad*</b>
<b>Protease</b>	10,2	20,0	1,95 ± 0,06
<b>Celulase</b>	17,5	21,0	1,20 ± 0,12
<b>Amilase</b>	22,0	0,0	0,00 ± 0,00
<b>Pectinase</b>	14,0	18,6	1,33 ± 0,09

\*I<sub>d</sub>E: Índice Enzimático com seu respectivo desvio padrão

As proteases verificadas por diferentes espécies de *Mucor spp.* cultivadas em meio sólido seletivo, por 96 horas, apresentaram halos que variaram de 30 a 64 mm (ALVES et al., 2002). Os resultados de atividade enzimática do fungo *Mucor racemosus fresenius* referentes a razão de crescimento micelial radial e zona hidrolítica em meio sacarose-ágar foi de 1,314 indicaram que o fungo exibiu maior atividade para a enzima invertase (ARAÚJO, 2019).



**Figura 4.1** – Índice enzimático da protease, celulase, amilase e pectinase para os microrganismos estudados.

#### 4.1.2 Potencial de produção de fosfatase ácida por fermentação submersa em diferentes meios de cultivo.

Nessa seção foi analisado o potencial de produção da ACPase em 6 meios de cultivo (concentrações definidas na seção 3.4.3) nos tempos de 0, 24, 48, e 72 horas, por fermentação submersa. Além disso, foi quantificada a produção da biomassa celular (g/L) e também o acompanhamento do pH em todos os pontos amostrais. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados referente ao último ponto amostral (72 horas de processo) estão representados na Tabela 4.2 juntamente com o teste de Tukey.

Fica evidente que os três melhores meios de cultivos foram o MC-1, MC-2 e MC-3, com destaque para o MC-1, que apresentou maior crescimento da biomassa celular para todos microrganismos testados, variando de 7,33 até 8,30 g/L. Também, esse meio apresentou o segundo melhor resultado para a atividade da ACPase, que variou de aproximadamente 0,137 até 0,199 U/mL. Esses resultados para o crescimento da biomassa celular já eram esperados, porque esse meio de cultivo é utilizado no Laboratório de Biocontrole Farroupilha para desenvolvimento das hifas de *Trichoderma asperellum*, do produto Quality.

O meio de cultivo MC-2 foi uma adaptação do MC-1, ao qual adicionou-se o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sal muito utilizado como aditivo alimentar e fertilizante, que também é utilizado como uma excelente fonte de potássio e fósforo, além de ser agente tamponante. Os melhores resultados para atividade enzimática nesse ensaio foram para este meio de cultivo, chegando a valores de aproximadamente 0,647 U/mL para o *Trichoderma harzianum*, mais que o triplo do valor

encontrado em MC-1, para este mesmo microrganismo. A biomassa celular final neste meio de cultivo que mais destacou foi de  $6,09 \pm 0,09$  g/L para o *Trichoderma reesei*.

**Tabela 4.2** – Potencial de produção da fosfatase ácida, biomassa celular e pH final nos meios de cultura sintéticos.

***Trichoderma asperellum***

Meio de cultura*	Biomassa celular (g/L)	Atividade ACPase (U/mL)	pH	Referências
MC-1	$8,30 \pm 0,21$	$0,151 \pm 0,006^{b, C}$	$4,36 \pm 0,16$	Laboratório Farroupilha
MC-2	$4,45 \pm 0,44$	$0,314 \pm 0,019^{a, C}$	$4,25 \pm 0,06$	Laboratório Farroupilha/UFU
MC-3	$3,84 \pm 0,13$	$0,166 \pm 0,003^{b, C}$	$5,05 \pm 0,14$	Adaptado Araújo, 2014
MC-4	$2,47 \pm 0,22$	$0,059 \pm 0,012^{c, D}$	$2,53 \pm 0,02$	Sampaio et al., 2003
MC-5	$3,10 \pm 0,06$	$0,079 \pm 0,006^{c, D}$	$6,93 \pm 0,06$	Leitão et al., 2010
MC-6	$6,32 \pm 0,14$	$0,085 \pm 0,006^{c, D}$	$2,02 \pm 0,03$	Souza et al., 2016

***Trichoderma harzianum***

Meio de cultura*	Biomassa celular (g/L)	Atividade ACPase (U/mL)	pH	Referências
MC-1	$7,33 \pm 0,54$	$0,199 \pm 0,006^{b, B}$	$5,01 \pm 0,06$	Laboratório Farroupilha
MC-2	$4,46 \pm 0,20$	$0,647 \pm 0,050^{a, A}$	$5,50 \pm 0,08$	Laboratório Farroupilha/UFU
MC-3	$3,71 \pm 0,34$	$0,143 \pm 0,015^{bc, C}$	$5,16 \pm 0,09$	Adaptado Araújo, 2014
MC-4	$3,68 \pm 0,12$	$0,062 \pm 0,006^{d, D}$	$2,05 \pm 0,02$	Sampaio et al., 2003
MC-5	$3,00 \pm 0,06$	$0,067 \pm 0,006^{d, D}$	$6,00 \pm 0,21$	Leitão et al., 2010
MC-6	$4,76 \pm 0,56$	$0,095 \pm 0,022^{cd, D}$	$2,82 \pm 0,02$	Souza et al., 2016

***Trichoderma reesei***

Meio de cultura*	Biomassa celular (g/L)	Atividade ACPase (U/mL)	pH	Referências
MC-1	$7,70 \pm 0,10$	$0,137 \pm 0,012^{c, C}$	$4,31 \pm 0,16$	Laboratório Farroupilha
MC-2	$6,09 \pm 0,09$	$0,550 \pm 0,016^{a, B}$	$5,37 \pm 0,09$	Laboratório Farroupilha/UFU
MC-3	$4,34 \pm 0,09$	$0,226 \pm 0,015^{b, B}$	$4,99 \pm 0,18$	Adaptado Araújo, 2014
MC-4	$3,01 \pm 0,18$	$0,049 \pm 0,007^{c, D}$	$2,34 \pm 0,04$	Sampaio et al., 2003
MC-5	$2,02 \pm 0,09$	$0,079 \pm 0,012^{de, D}$	$6,99 \pm 0,08$	Leitão et al., 2010
MC-6	$6,49 \pm 0,64$	$0,091 \pm 0,016^{d, D}$	$2,33 \pm 0,09$	Souza et al., 2016

(\*) Meio de cultura: Os meios de cultivo testados estão definidos na seção 3.4.3.

Letras minúsculas: Teste de Tukey analisando meios de cultivo diferentes com o mesmo microrganismo.

Letras maiúsculas: Teste de Tukey analisando diferentes microrganismos para cada meio de cultivo.

Outro meio de cultivo que merece destaque é o MC-4. Ele foi utilizado para selecionar microrganismos solubilizadores de fosfato no trabalho de CABRAL (2016), e foi responsável por selecionar o *Trichoderma harzianum* (microrganismo identificado pela Fundação André

Tosello de Pesquisa e Tecnologia, Campinas/SP) desse trabalho. Fato interessante observado foi o pH, que, depois de 72 h de fermentação, atingiu valores de 2,05 até 2,53, para as cepas de *Trichoderma*, porém, estes resultados afetaram negativamente a produção da enzima, sendo desprezível os valores das atividades enzimáticas. Esse comportamento também foi observado no trabalho CABRAL (2016), essa redução do pH foi justificada pela formação de ácido acético e lático. Portanto, para este trabalho teve destaque positivo para a solubilização da rocha fosfática.

Os meios de cultivo MC-5 e MC-6 não tiveram resultados satisfatórios para a atividade enzimática, apesar do MC-6 ter tido bom desenvolvimento de biomassa celular, para todos microrganismos. LEITÃO et al. (2010) estudando ACPase secretada por *Trichoderma harzianum* fermentando o meio MC-5 identificaram uma atividade específica de 12,4 U/mg em uma faixa de pH variando de 4,5 - 6,0. SOUZA et al. (2016), utilizando o meio de cultivo MC-6, e inoculando  $10^7$  esporos/mL de *T. harzianum*, e pH ajustado para 4,0, obteve-se o 14,3 U/mg de atividade específica no extrato bruto depois de 48 h.

Portanto, o meio de cultivo sintético selecionado para etapa da otimização foi o MC-2. Este apresenta as maiores médias de atividade de ACPase para todos microrganismos e difere significativamente dos demais meios de cultivo conforme o teste de Tukey (Tabela 4.2). Etapas posteriores de avaliação de fontes de fosfato e otimização dos reagentes por meio do PCC para cada microrganismo foram feitas.

#### **4.1.3 Avaliação de fontes de fosfato para produção de fosfatase ácida em fermentação submersa.**

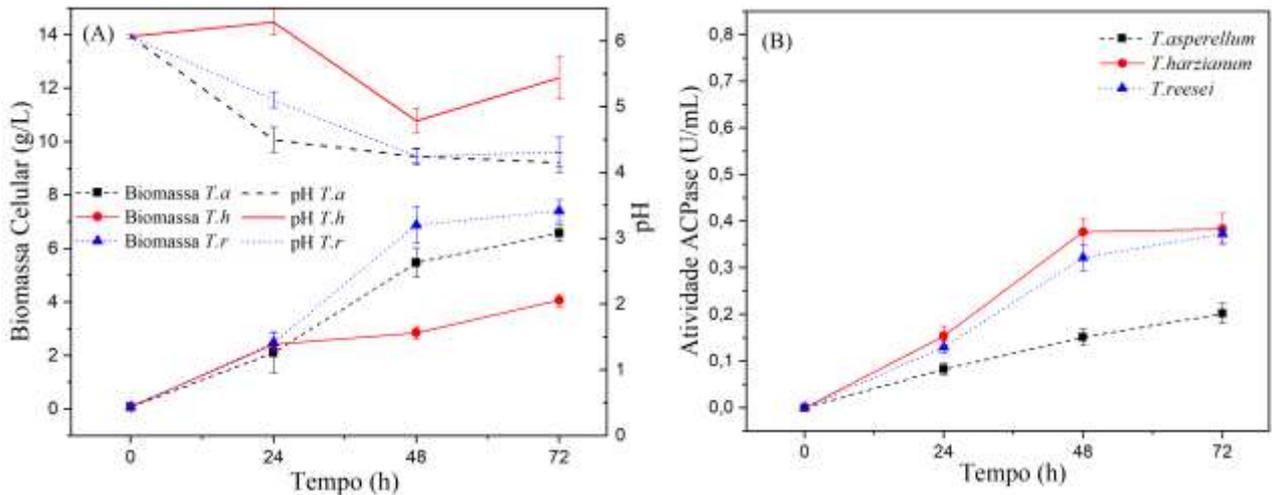
A Tabela 4.3 mostra os resultados da análise estatística referente a resposta de atividade enzimática nos tempos de 48 h e 72 h para *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. reesei*. A análise dos meios de cultura fermentados pelo *T. asperellum* apresentou o valor-p de 0,002, muito menor que o  $\alpha$  de 0,05, adotado na análise, isso indica que os tratamentos Tr1, Tr2 e Tr3 possuem diferença estatística entre eles. Também, o valor  $F_{\text{calculado}}$  ser maior que o  $F_{\text{crítico}}$  remete a mesma conclusão. Com relação aos tempos de fermentação para este microrganismo, o valor-p também é inferior ao  $\alpha$  adotado, tal fato remete à conclusão de que os valores são diferentes entre eles, e isso indica que ainda não chegou no estado estacionário, sendo interessante fermentar por mais tempo. Esse mesmo raciocínio pode ser obtido pela análise do valor  $F_{\text{calculado}}$  ser maior que  $F_{\text{crítico}}$ .

A análise estatística para atividade enzimática dos microrganismos *T. harzianum* e *T. reesei* remetem às mesmas conclusões. O valor-p para ambos tende a zero, ou seja, muito menor que o  $\alpha$  de 0,05 adotado na análise, tal fato mostra que os tratamentos Tr1, Tr2 e Tr3 são diferentes. Com relação aos tempos de fermentação o valor-p é superior ao  $\alpha$  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  $F_{\text{calculado}}$  ser menor que  $F_{\text{crítico}}$ .

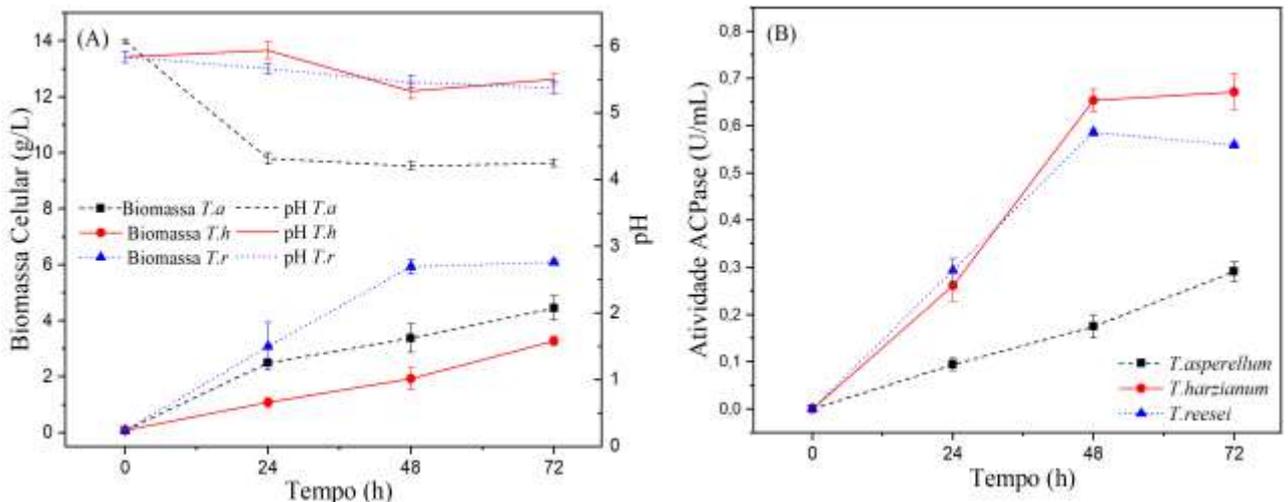
**Tabela 4.3** - Quadro de ANOVA para Atividade Enzimática dos três microrganismos nos tempos de 48 e 72h.

<b>FONTE DA VARIACÃO</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>valor-P</b>	<b>F<sub>crítico</sub></b>
<b>Amostras Tr1, Tr2 e Tr3 – Ativ. Enzimática (<i>T. asperellum</i>)</b>	0,014	2	0,007	21,050	0,002	5,143
<b>Tempo fermentação 48h e 72h (<i>T. asperellum</i>)</b>	0,009	1	0,009	25,986	0,002	5,987
<b>Amostras Tr1, Tr2 e Tr3 – Ativ. Enzimática (<i>T. harzianum</i>)</b>	0,171	2	0,085	44,591	2,50E-04	5,143
<b>Tempo fermentação 48h e 72h (<i>T. harzianum</i>)</b>	5,50E-04	1	5,50E-04	0,271	0,621	5,987
<b>Amostras Tr1, Tr2 e Tr3 – Ativ. Enzimática (<i>T. reesei</i>)</b>	0,095	2	0,047	17,004	0,003	5,143
<b>Tempo fermentação 48h e 72h (<i>T. reesei</i>)</b>	0,002	1	0,002	0,682	0,440	5,987

As Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 mostram a cinética de crescimento celular (biomassa seca), atividade da fosfatase ácida e variação de pH em de 72 horas de fermentação líquida para os meios de cultura Tr1, Tr2 e Tr3, respectivamente.

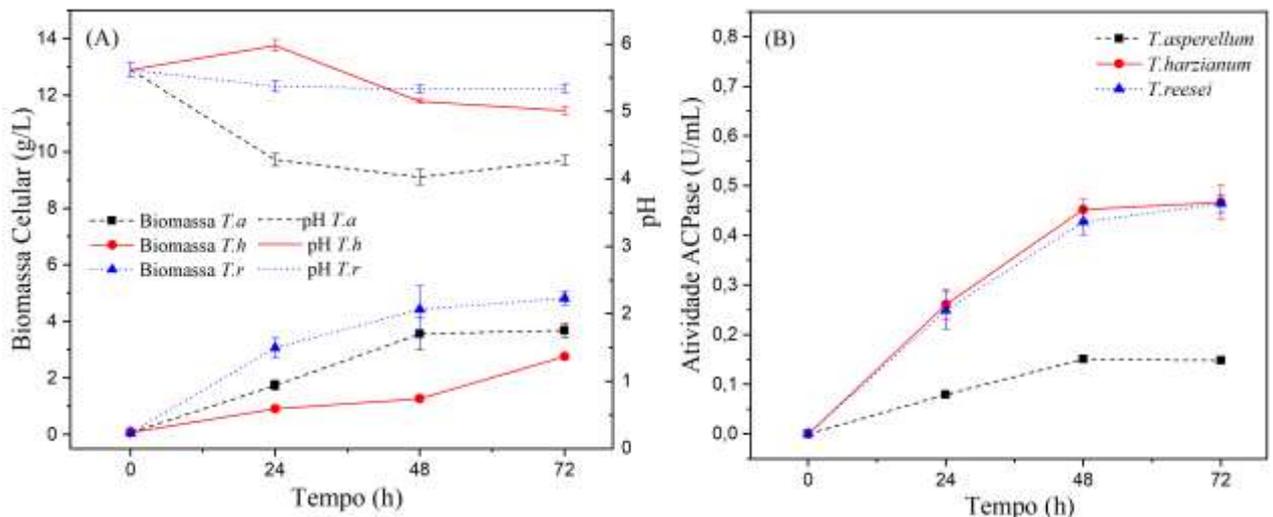


**Figura 4.2** – (A) Cinética da biomassa celular e pH; (B) Atividade da fosfatase ácida - Fermentação submersa das 3 cepas de *Trichoderma* utilizando meio Tr1 (CaHPO<sub>4</sub> como fonte de fosfato).



**Figura 4.3** – (A) Cinética da biomassa celular e pH; (B) Atividade da fosfatase ácida - Fermentação submersa das 3 cepas de *Trichoderma* utilizando meio Tr2 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fonte de fosfato).

Através da análise das Figuras, nota-se que o *Trichoderma reesei* apresentou melhor crescimento em todas fontes de fosfato estudadas. Depois de 72 horas de bataleda, a maior biomassa seca para este microrganismo foi de 7,41 g/L, no meio de cultura Tr1, que possui fosfato de cálcio como fonte de fósforo.



**Figura 4.4** – (A) Cinética da biomassa celular e pH; (B) Atividade da fosfatase ácida – Fermentação submersa das 3 cepas de *Trichoderma* utilizando meio Tr3 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  como fonte de fósforo).

Pode-se observar na Figura 4.4 (B) que o *Trichoderma harzianum* mostrou-se mais promissor para produção da enzima em análise, se comparado com os demais. Nesse meio de cultura Tr2, suplementado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , este microrganismo atingiu seu valor máximo de 0,672 U/mL de atividade, nas primeiras 48 horas, depois apresentou pouca variação até o final da fermentação. O segundo melhor resultado foi para o *T. reesei*, apresentando atividade enzimática 16,8% menor que *T. harzianum* e biomassa seca final média de 6,09 g/L, para este meio de cultivo.

LEITÃO et al. (2010) produziram 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%.

Estudos da produção de fosfatase ácida pelo *Trichoderma asperellum* Q1, em condições de estresse salino, impactaram positivamente no crescimento de *Arabidopsis* (ZHAO et al., 2017). Estes pesquisadores estudaram também, a solubilização do fósforo em 3 fontes de fósforo, o fósforo tricálcico (TCP), fósforo de cálcio dibásico (DCP), e ácido fítico na presença, e ausência de sal. A melhor produção enzimática foi de  $9,61 \cdot 10^{-3}$  U/mL, para meio de cultura contendo ácido fítico, como fonte de P, para ativar a produção da fosfatase ácida. Posteriormente, purificaram esta enzima, e aplicaram na promoção de crescimento da *Arabidopsi*.

É importante salientar que não houve correção de pH para nenhum tratamento, e todos valores foram menores que 6,0 (pH na região ácida) durante todo o processo fermentativo.

Portanto, a fonte de fostato influenciou a produção da enzima fosfatase ácida, e o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi a fonte de fostato escolhida para ser otimizada em etapas futuras.

#### 4.2 Otimização dos reagentes do meio selecionado por meio do Planejamento Composto Central em fermentação submersa

Os tratamentos foram realizados em uma incubadora shaker conforme o procedimento descrito na seção 3.4.2. O Planejamento Composto Central (PCC) foi elaborado com intuito de maximizar a produção da fosfatase ácida pelas três cepas de *Trichoderma*. Este planejamento foi proposto em 5 níveis, com 3 repetições no ponto central e 3 variáveis relacionadas com a concentração, foram estudadas: X1 – sacarose; X2 – extrato de levedura industrial da marca Biorigin; e X3 – fostato de potássio monobásico. Todos os tratamentos foram realizados em duplicatas, totalizando 34 tratamentos para cada cepa.

A resposta analisada foi a atividade da fosfatase ácida (ACPase) expressa em (U/mL), para cada microrganismo no tempo de 72 h, tempo final da batelada. Todos os dados estatísticos foram calculados utilizando o StatSoft Software Statística 7.1, e mostrados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** - Concentrações das variáveis proposta pelo Planejamento Composto Central e resultados da resposta no tempo de 72 h para cada microrganismo.

ENSAIOS	X1 (g/L)	X2 (g/L)	X3 (g/L)	ACPase <sup>(1)</sup>	ACPase <sup>(2)</sup>	ACPase <sup>(3)</sup>
				<i>T.a</i> (U/mL)	<i>T.h</i> (U/mL)	<i>T.r</i> (U/mL)
1	(-1)10,00	(-1)2,00	(-1)0,50	0,133	0,584	0,830
2	(-1)10,00	(-1)2,00	(+1)1,50	0,082	0,452	1,146
3	(-1)10,00	(+1)8,00	(-1)0,50	0,589	0,620	1,116
4	(-1)10,00	(+1)8,00	(+1)1,50	0,464	0,480	2,024
5	(+1)20,00	(-1)2,00	(-1)0,50	0,138	0,676	1,279
6	(+1)20,00	(-1)2,00	(+1)1,50	0,090	0,494	1,361
7	(+1)20,00	(+1)8,00	(-1)0,50	0,530	0,715	1,942
8	(+1)20,00	(+1)8,00	(+1)1,50	0,591	0,560	2,790
9	(-α)6,60	(0)5,00	(0)1,00	0,261	0,520	1,035
10	(+α) 23,41	(0) 5,00	(0)1,00	0,422	0,964	2,538
11	(0)15,00	(-α)0,00	(0)1,00	0,058	0,052	0,085
12	(0)15,00	(+α)10,5	(0)1,00	0,401	0,249	1,822
13	(0)15,00	(0)5,00	(-α)0,16	0,650	0,738	1,476

14	(0)15,00	(0)5,00	(+α)1,84	0,255	0,308	2,556
15	(0)15,00	(0)5,00	(0)1,00	0,452	1,006	2,010
16	(0)15,00	(0)5,00	(0)1,00	0,463	1,033	2,144
17	(0)15,00	(0)5,00	(0)1,00	0,436	0,997	2,138

<sup>(1)</sup> ACPase *T.a* (U/mL):Atividade da fosfatase ácida para o *Trichoderma asperellum*.

<sup>(2)</sup> ACPase *T.h* (U/mL):Atividade da fosfatase ácida para o *Trichoderma harzianum*.

<sup>(3)</sup> ACPase *T.r* (U/mL):Atividade da fosfatase ácida para o *Trichoderma reesei*.

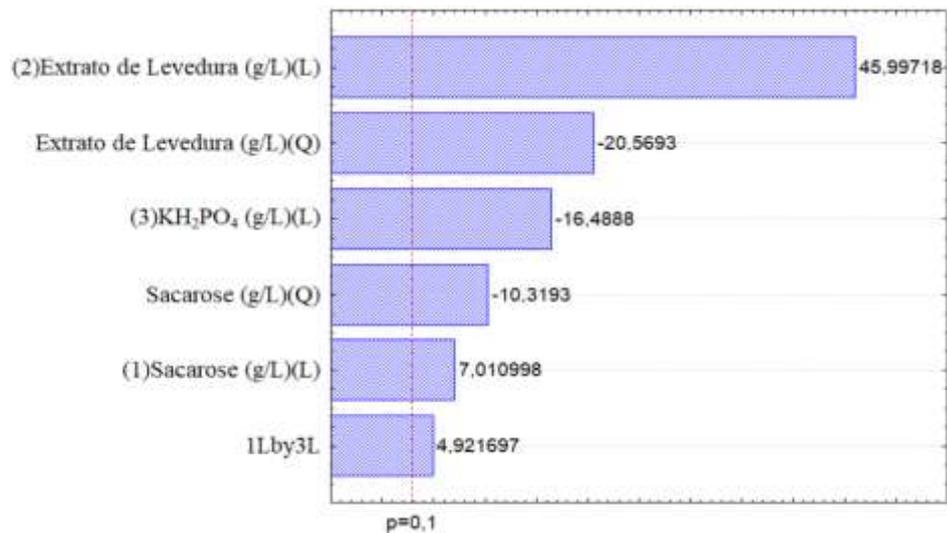
#### 4.2.1 Avaliação da produção da fosfatase ácida pelo *Trichoderma asperellum*, frente à suplementação do meio de cultivo proposto pelo PCC

A resposta da atividade de fosfatase ácida foi analisada pelos dados da Tabela 4.4 e pelo diagrama de Pareto mostrado na Figura 4.5. Após a análise estatística, tem-se a Equação codificada 4.1, com 90% de confiança.

$$ACPase[T.a] \left( \frac{U}{mL} \right) = 0,45 + 0,026X_1 - 0,040X_1^2 + 0,169X_2 - 0,079X_2^2 + \\ - 0,061X_3 + 0,024X_1X_3 \quad (4.1)$$

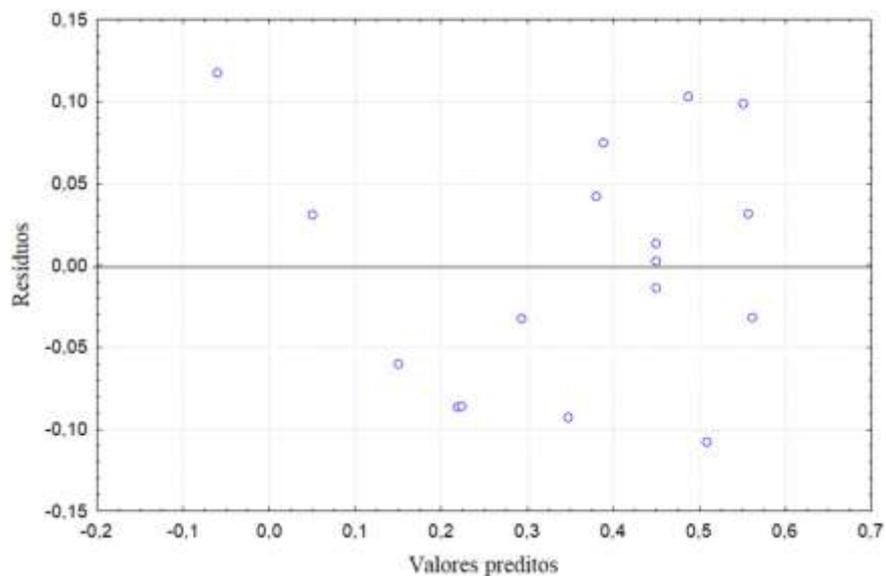
O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,86, indicando que cerca de 86% dos dados experimentais são descritos pelo modelo proposto na Equação 4.1. O valor negativo do coeficiente linear de  $X_3$  mostra que para maiores concentrações de fosfato de potássio monobásico diminui a resposta da atividade para este microrganismo. Tal fato pode ser observado na Tabela 4.4 comparando os tratamentos 1 e 2 ou também 3 e 4, por exemplo.

A variável de  $X_2$  possui o maior efeito nessa equação por possuir o maior coeficiente linear, ou seja, maiores concentrações dela aumentam a atividade enzimática. Também, pode ser exemplificado comparando os resultados dos tratamentos 2 e 4, na Tabela 4.4.



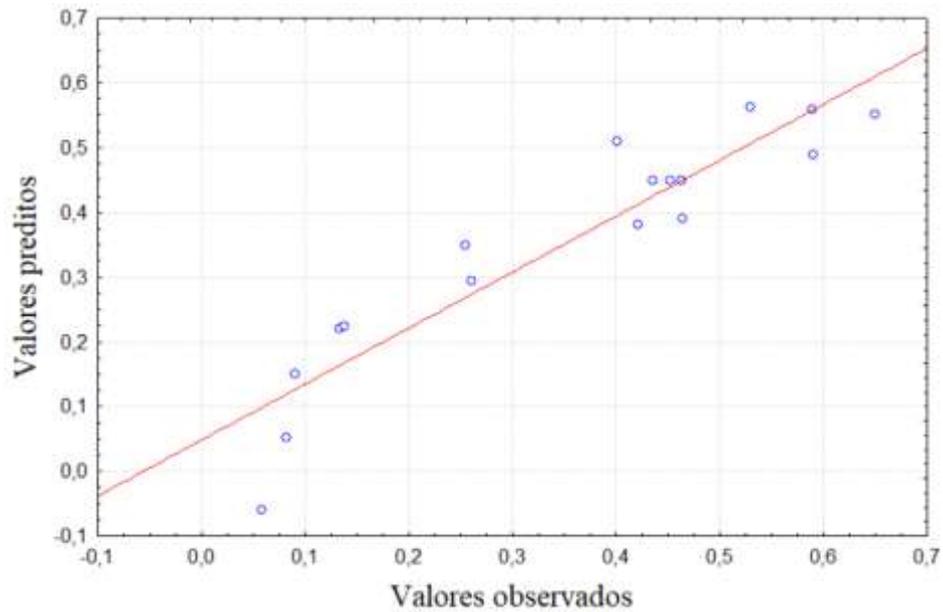
**Figura 4.5** – Diagrama de Pareto das variáveis estudadas no PCC para atividade da fosfatase ácida do microrganismo *T. asperellum*.

A Figura 4.6 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero, e sem tendências, indicando uma variância constante para todos valores de resposta.



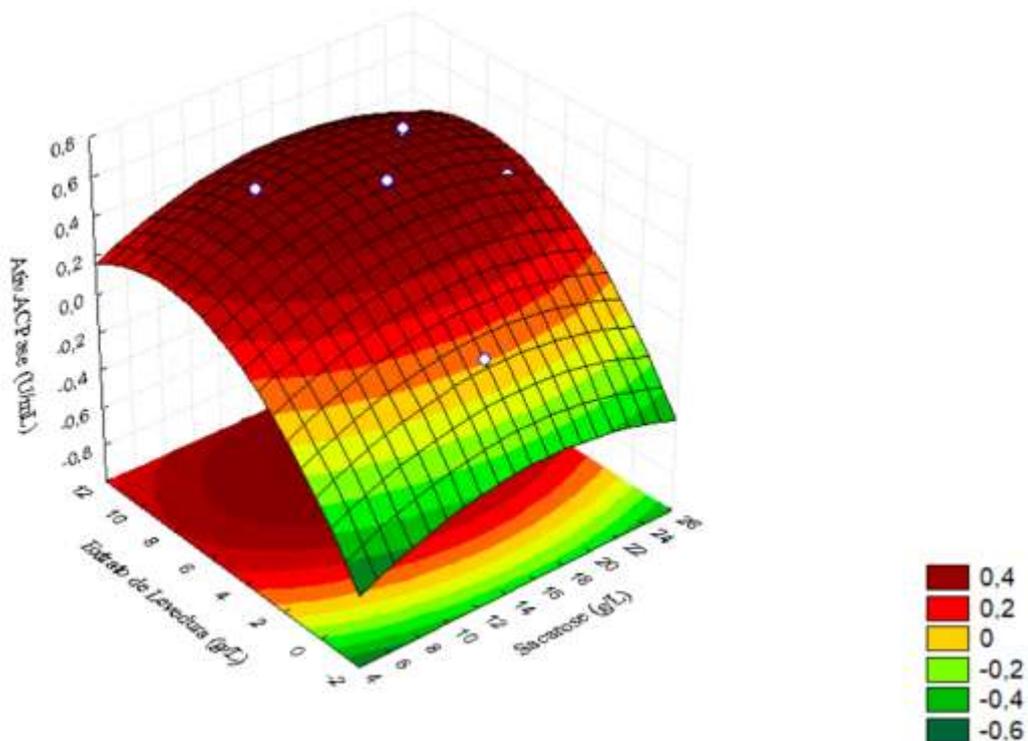
**Figura 4.6** – Distribuição dos resíduos relativos à atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. asperellum*.

A Figura 4.7 mostra a distribuição dos valores preditos em função aos valores observados, nela é possível observar a proximidade dos valores analisados com os preditos. Tal fato indica que o modelo é apropriado para as análises dos dados.

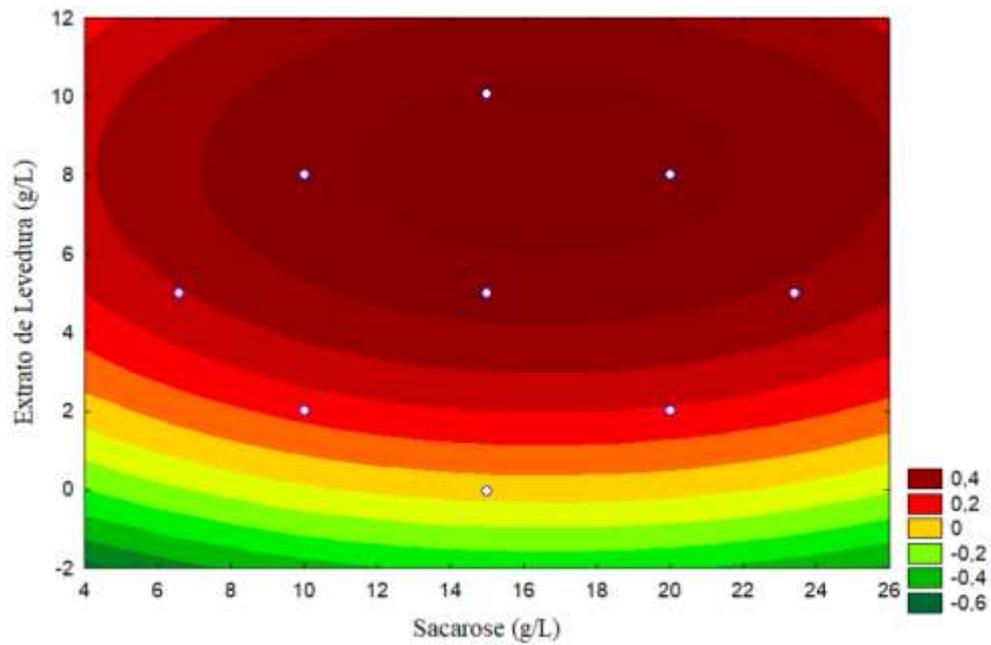


**Figura 4.7** – Valores preditos em relação aos observados para resposta de atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. asperellum*.

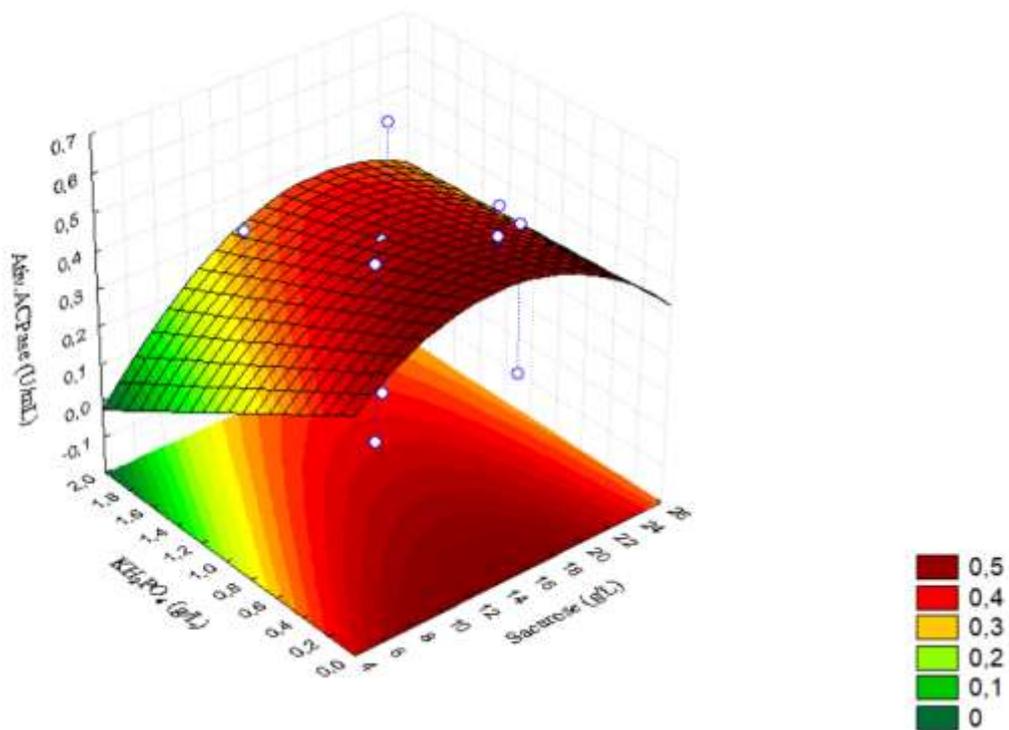
Os melhores resultados observados por este microrganismo estão representados nas Figuras 4.8 a 4.13 e indicam faixas de concentrações para o meio de cultivo que variam de 11 a 17,5 g/L de sacarose, 6 a 10,5 g/L de extrato de levedura e 0 a 0,2 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



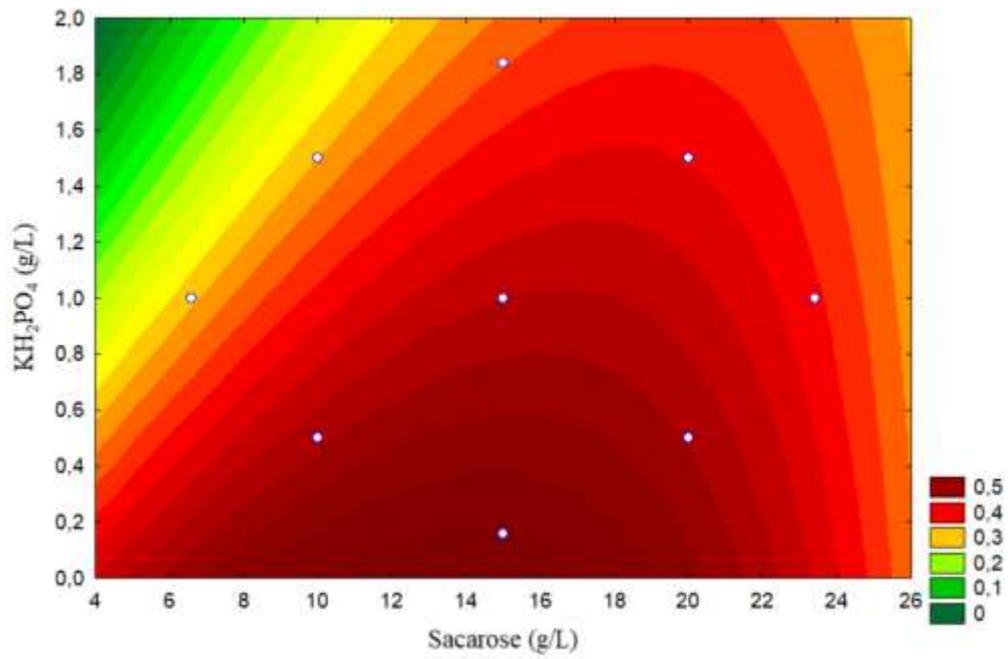
**Figura 4.8** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. asperellum* em relação as concentrações (g/L) de sacarose e extrato de levedura.



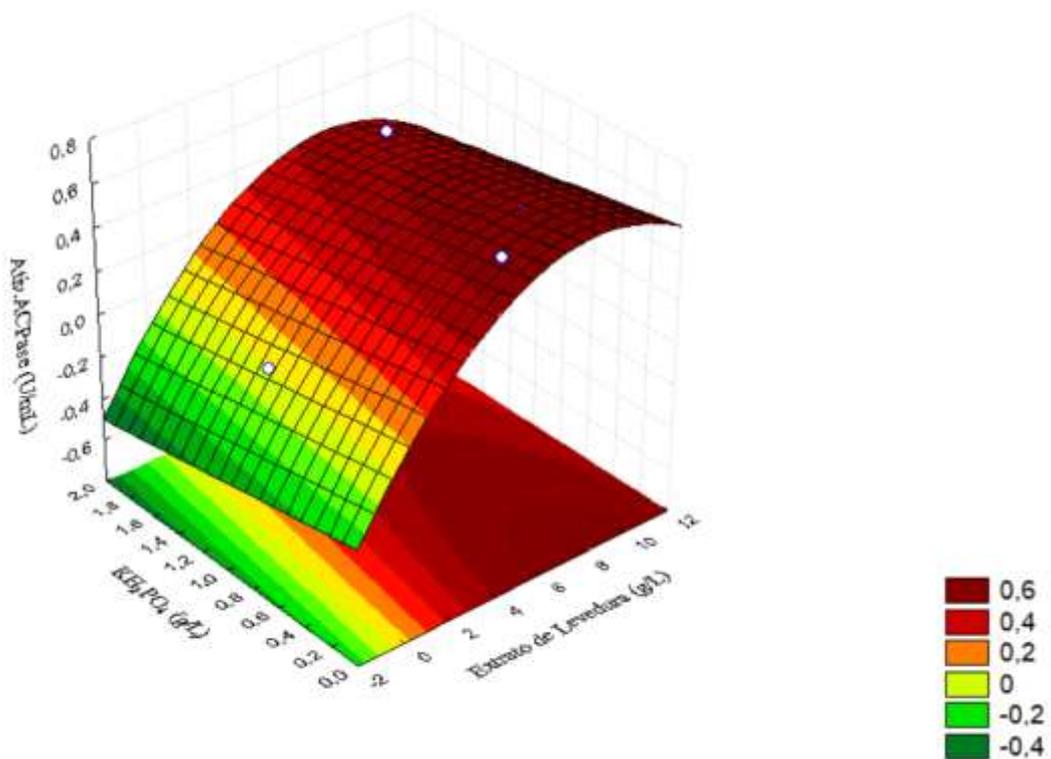
**Figura 4.9** – Curva de contorno para as concentrações de extrato de levedura e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de *T. asperellum*.



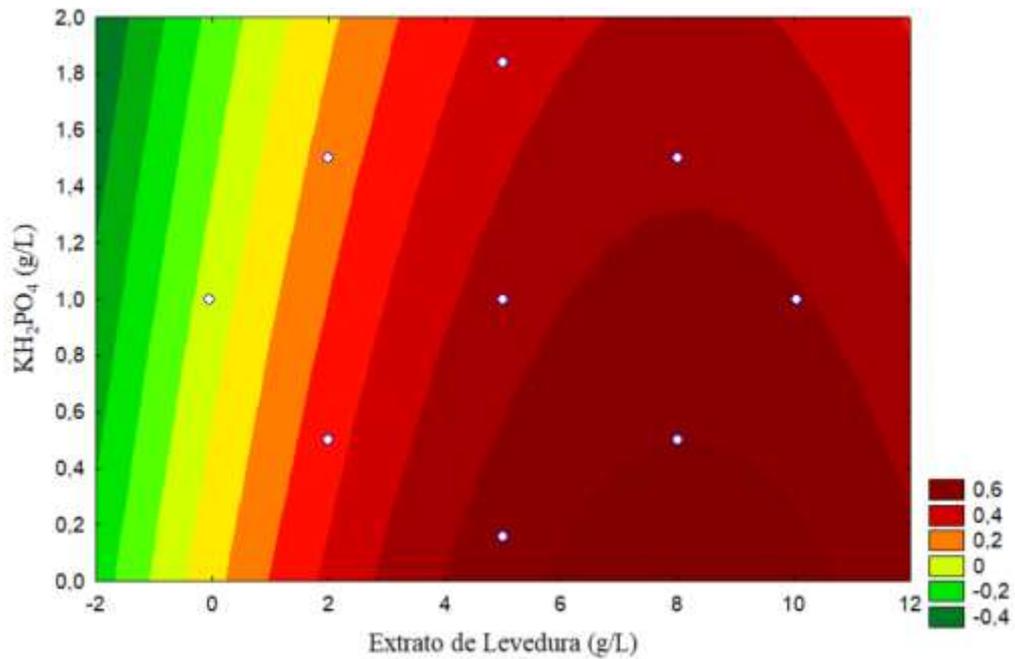
**Figura 4.10** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. asperellum* em relação as concentrações (g/L) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e sacarose.



**Figura 4.11** – Curva de contorno para as concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de *T. asperellum*.



**Figura 4.12** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. asperellum* em relação as concentrações (g/L) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e extrato de levedura.



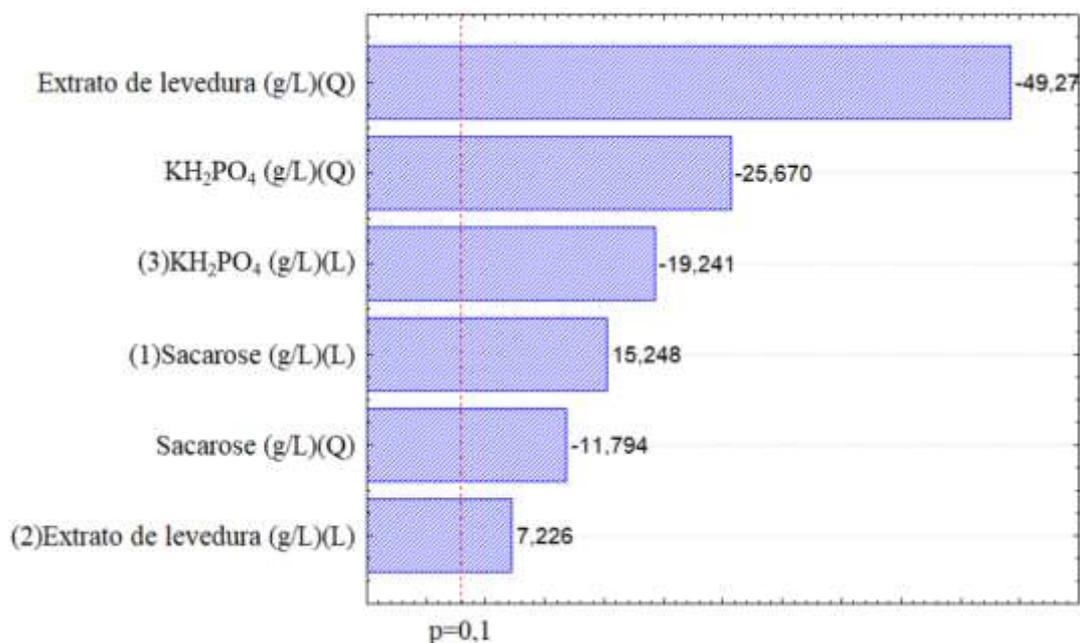
**Figura 4.13** – Curva de contorno para as concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e extrato de levedura objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de *T. asperellum*.

Diante da análise das figuras acima, a maior atividade da fosfatase ácida está associada a quantidades, relativamente altas, de fontes de carboidratos (sacarose), nitrogênio (extrato de levedura), e o fosfato, para este fim, pode ser praticamente desprezado. Quando as variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  estão nestas faixas, a atividade da enzima atinge a concentração média de 0,6 U/mL, tendo a máxima em 0,65 U/mL.

#### 4.2.2 Avaliação da produção da fosfatase ácida pelo *Trichoderma harzianum*, frente à suplementação do meio de cultivo proposto pelo PCC

A resposta da atividade de fosfatase ácida foi analisada pelos dados da Tabela 13 e pelo diagrama de Pareto mostrado na Figura 4.14. Após a análise estatística tem-se a Equação codificada 4.2, com 90% de confiança.

$$ACPase[T.h] \left( \frac{U}{mL} \right) = 1,003 + 0,077X_1 - 0,066X_1^2 + 0,037X_2 - 0,275X_2^2 + \\ - 0,097X_3 - 0,006X_3^2 \quad (4.2)$$



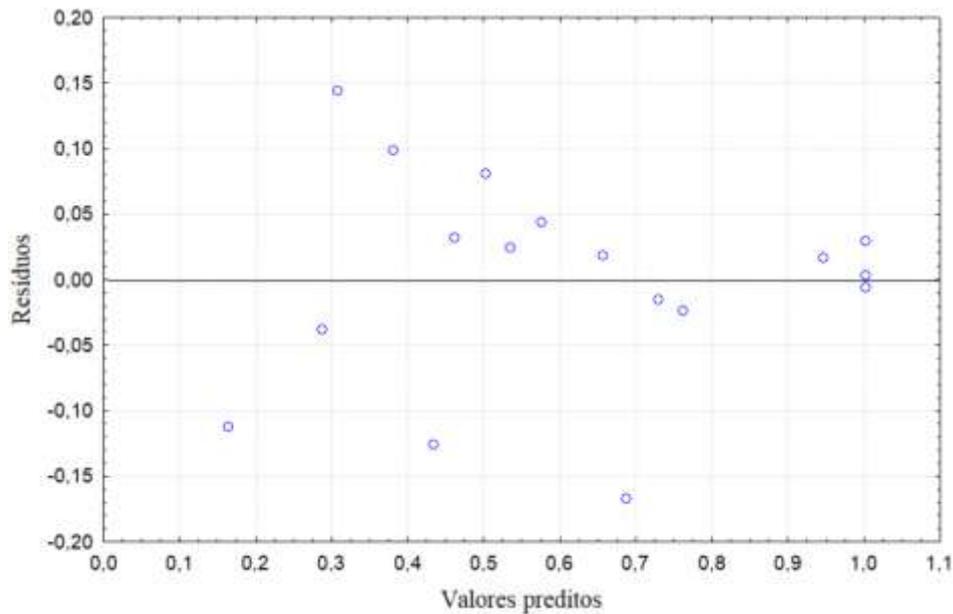
**Figura 4.14**– Diagrama de Pareto das variáveis estudadas no PCC para atividade da fosfatase ácida do microrganismo *T. harzianum*.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,92, indicando que cerca de 92% dos dados experimentais são descritos pelo modelo proposto na Equação 4.2. Os valores positivos dos coeficientes lineares  $X_1$  e  $X_2$  mostram que maiores concentrações de sacarose e extrato de levedura favorecem a produção da enzima, pois sua atividade aumenta. Este comportamento pode ser visto através dos tratamentos 2 e 8 da Tabela 4.4.

O valor negativo do coeficiente linear de  $X_3$  mostra que para maiores concentrações de fosfato de potássio monobásico diminui a resposta da atividade para este microrganismo. Tal fato pode ser observado na Tabela 4.4 comparando os tratamentos 5 e 6 ou também 7 e 8, por exemplo.

A variável de  $X_3$  possui, também, o maior efeito nessa equação por obter o maior coeficiente linear. Entretanto, esse efeito é desfavorável, ou seja, maiores concentrações dela resultam em uma menor atividade enzimática. Também, pode ser exemplificado comparando os resultados dos tratamentos 1 e 2, na Tabela 4.4.

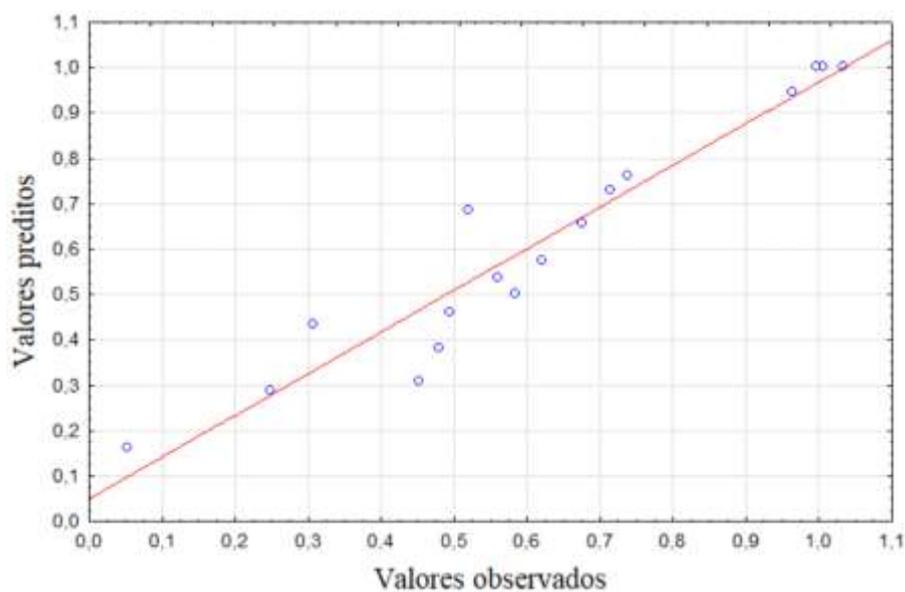
A Figura 4.15 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero e sem tendências, indicando uma variância constante para todos valores de resposta.



**Figura 4.15** – Distribuição dos resíduos relativos à atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. harzianum*.

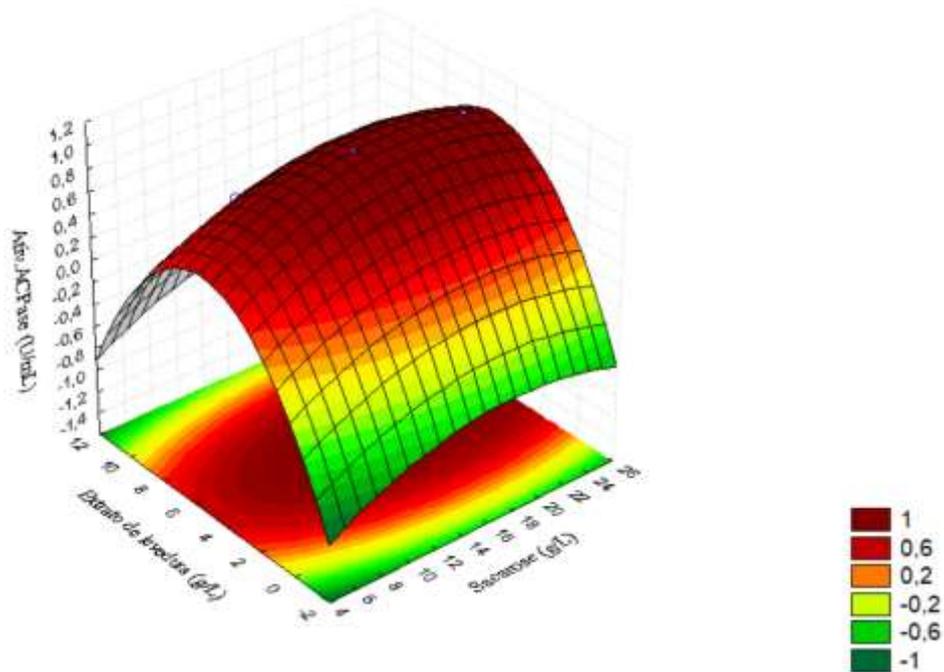
A Figura 4.16 mostra a distribuição dos valores preditos em função aos valores observados, nela é possível observar a proximidade dos valores observados com os preditos. Tal fato indica que o modelo é apropriado para as análises dos dados.

As maiores atividade da fosfatase ácida produzidas por estes microrganismos foram para as faixas de concentrações: 14,5 – 22,0 (g/L) de sacarose, 3,5 – 7,0 (g/L) de extrato de levedura, e 0,6 – 1,1 (g/L) de fosfato de potássio monobásico.

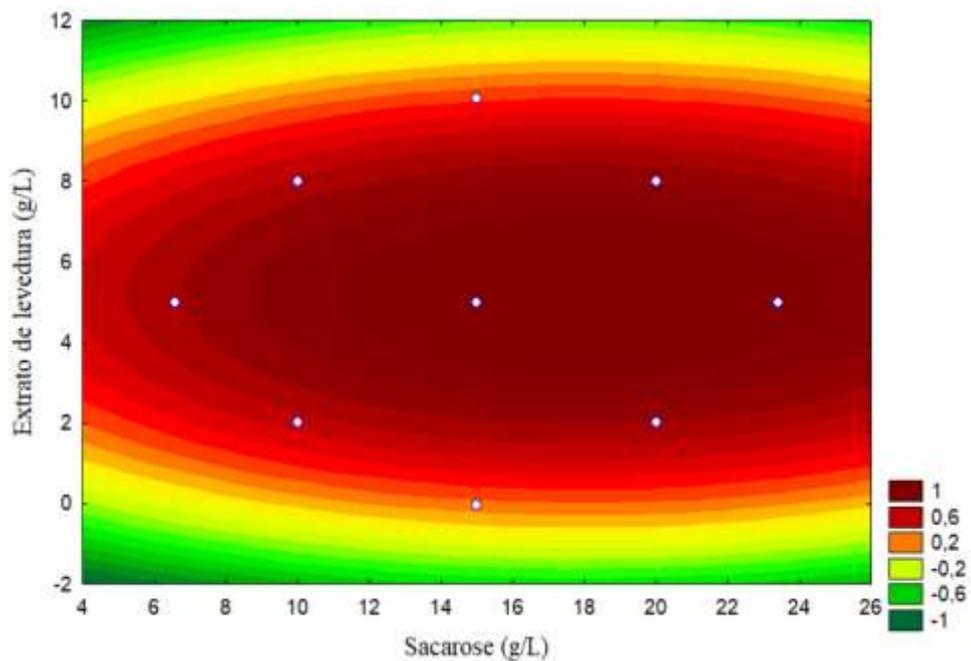


**Figura 4.16** – Valores preditos em relação aos observados para resposta de atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. harzianum*.

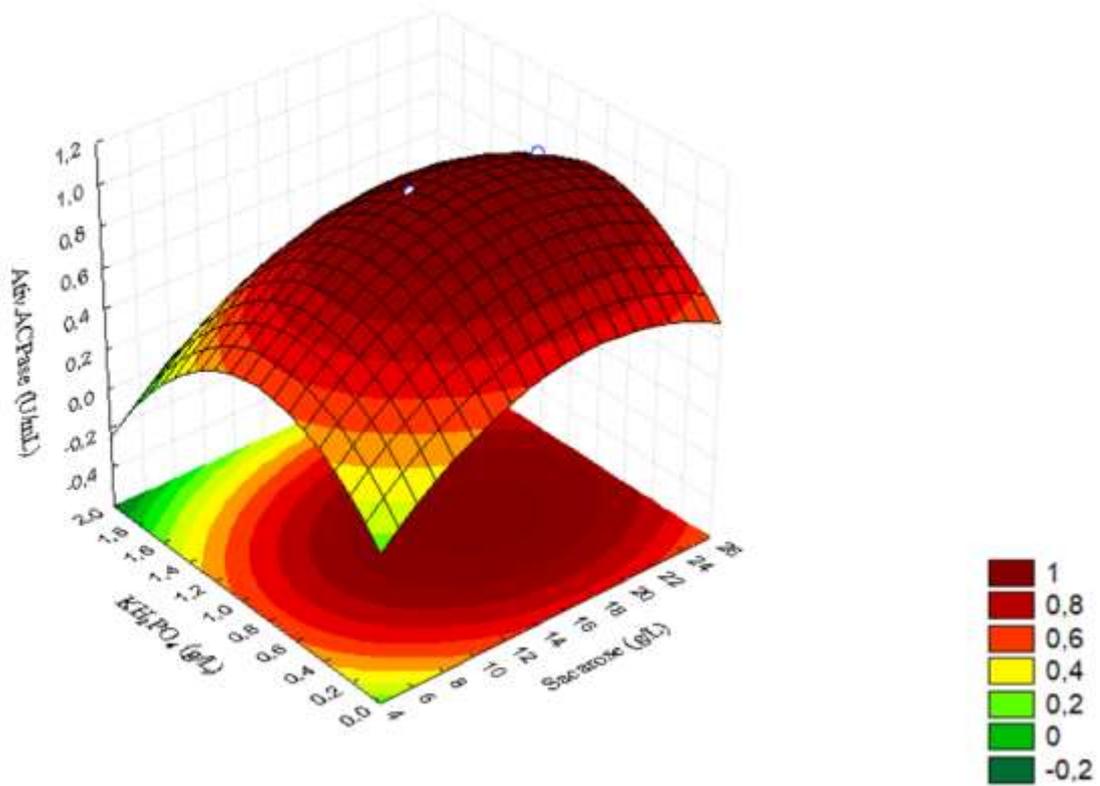
As Figuras 4.17, 4.19 e 4.21, que correspondem as superfícies de respostas, e também as Figuras 4.18, 4.20 e 4.22, que mostram as curvas de contorno, ilustram estes valores. Ambos os gráficos retratam duas a duas das variáveis correspondentes.



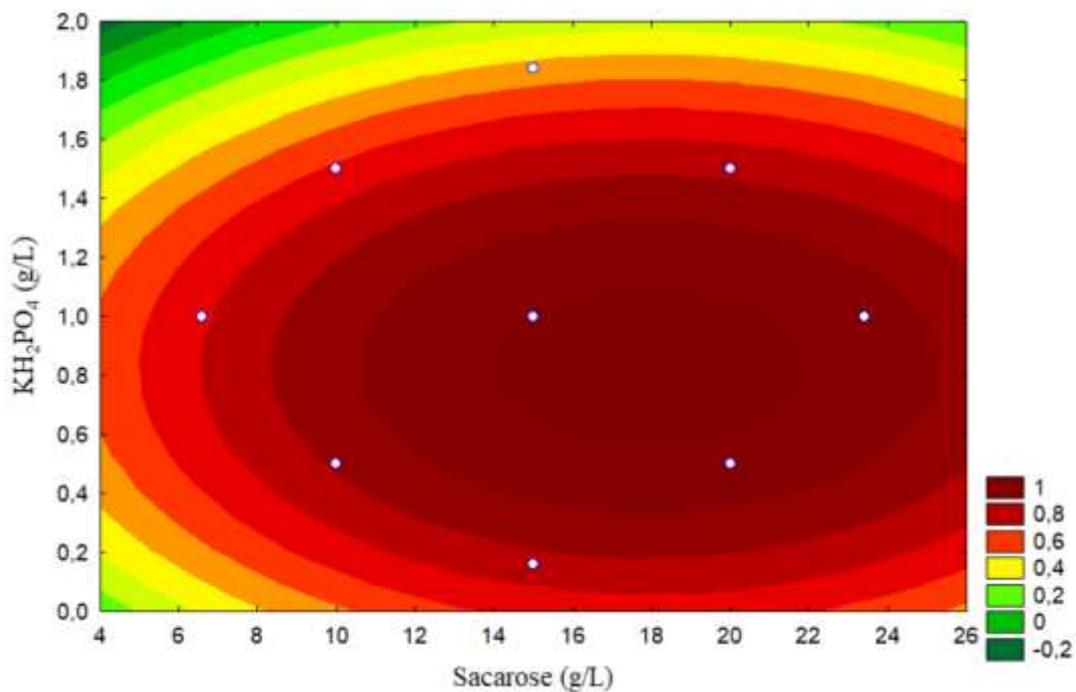
**Figura 4.17** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. harzianum* em relação as concentrações (g/L) de sacarose e extrato de levedura.



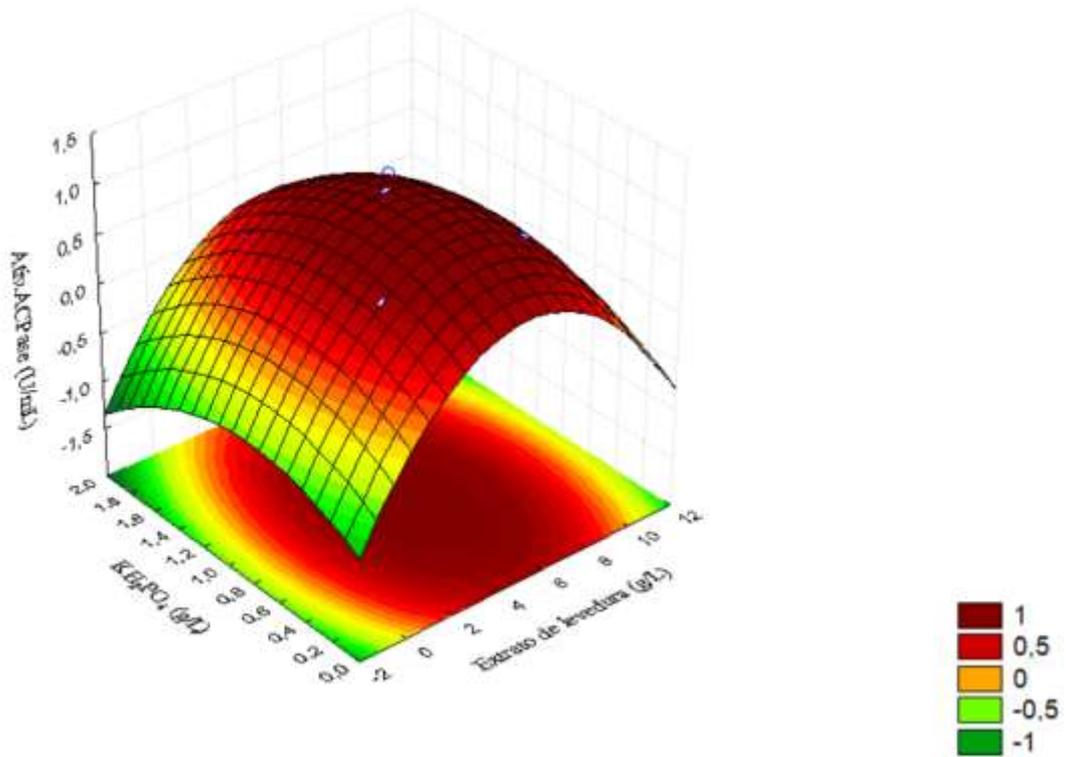
**Figura 4.18** – Curva de contorno para as concentrações de extrato de levedura e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de *T. harzianum*.



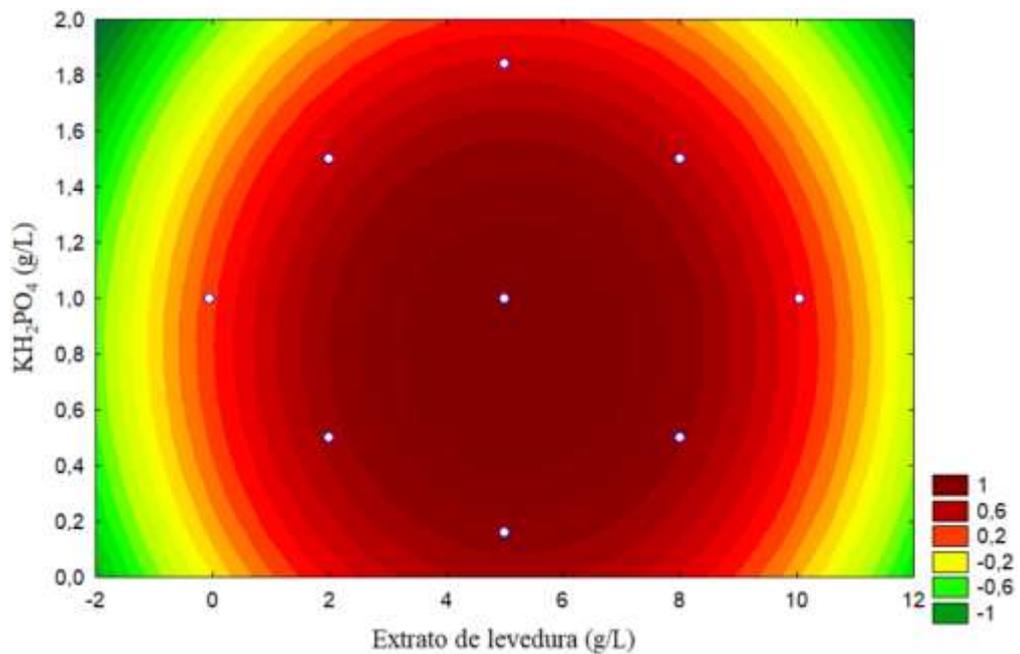
**Figura 4.19** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. harzianum* em relação as concentrações (g/L) de sacarose e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



**Figura 4.20** – Curva de contorno para as concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de *T. harzianum*.



**Figura 4.21** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. harzianum* em relação as concentrações (g/L) de extrato de levedura e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



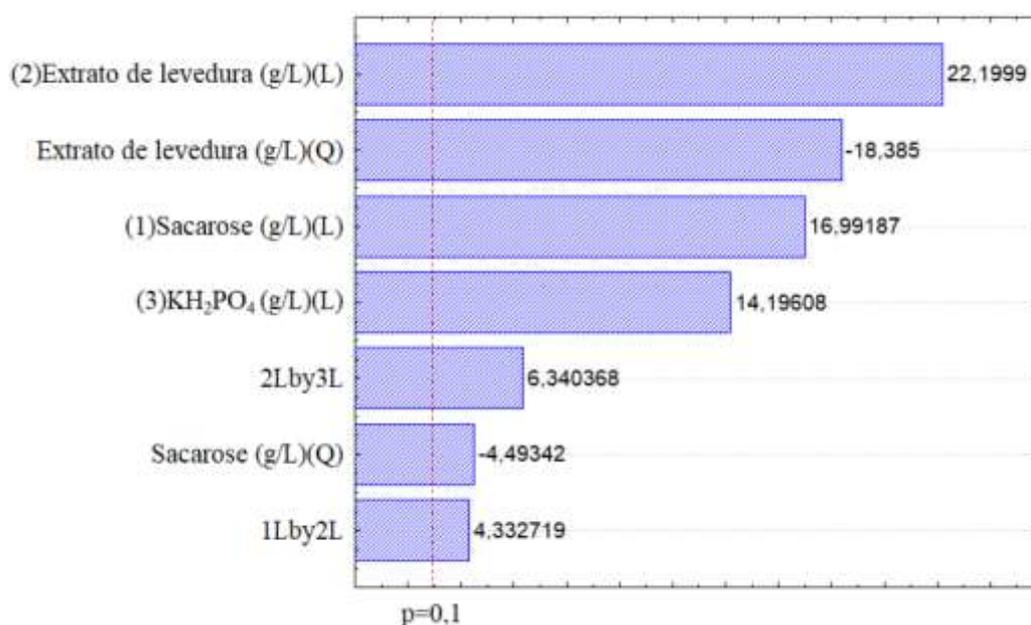
**Figura 4.22** – Curva de contorno para as concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e extrato de levedura objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de *T. harzianum*.

### 4.2.3 Avaliação da produção da fosfatase ácida pelo *Trichoderma reesei*, frente à suplementação do meio de cultivo proposto pelo PCC

Após a análise estatística dos resultados da Tabela 4.4 e diagrama de Pareto mostrado na Figura 4.23, tem-se a resposta de atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. reesei*. A Equação codificada 4.3, com 90% de confiança, correlaciona a resposta de atividade enzimática com as variáveis significativas estudadas.

$$ACPase[T.r] \left( \frac{U}{mL} \right) = 2,062 + 0,348X_1 - 0,097X_1^2 + 0,456X_2 - 0,399X_2^2 + 0,291X_3 + 0,116X_1X_2 + 0,170X_2X_3 \quad (4.3)$$

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,97, indicando que, aproximadamente, 97% dos dados experimentais são descritos pelo modelo proposto na Equação codificada 4.3. Os valores positivos dos coeficientes lineares  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  mostram que maiores concentrações de sacarose, extrato de levedura, e fosfato de potássio monobásico favorecem a produção da enzima, pois sua atividade aumenta. Esse comportamento pode ser exemplificado através dos tratamentos 1 e 8 ou 1 e 15, na Tabela 4.4. Nesse primeiro exemplo, o aumento da concentração das variáveis significativas aumentou a atividade enzimática em 336%, ou seja, mais de 3 vezes.



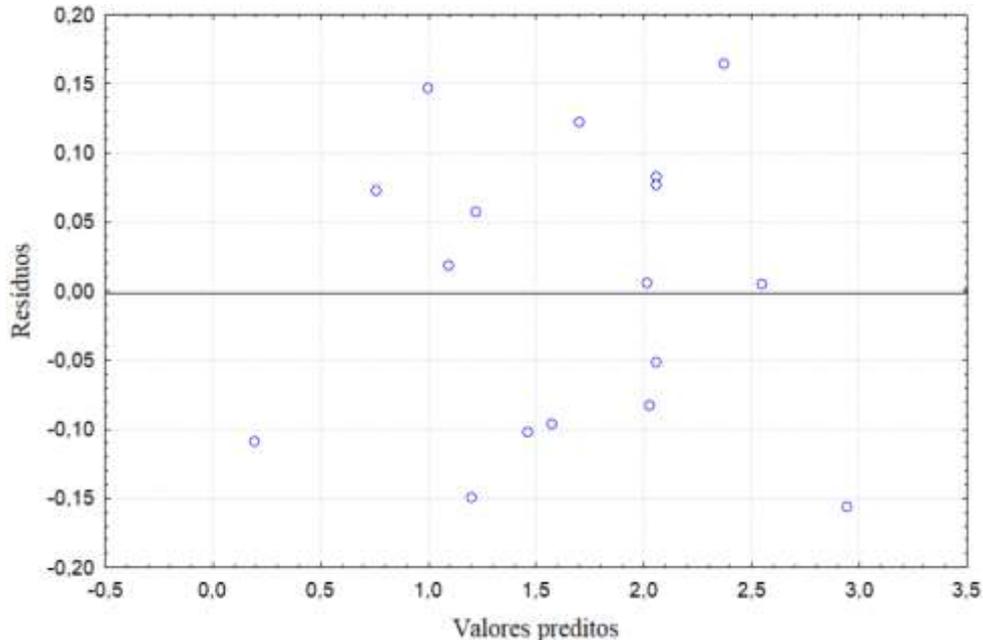
**Figura 4.23** – Diagrama de Pareto das variáveis estudadas no PCC para atividade da fosfatase ácida do microrganismo *T. reesei*.

A variável de  $X_2$  (extrato de levedura) é responsável pelo maior efeito nesta equação, uma vez que obtêm o maior coeficiente. Este efeito é favorável (positivo), ou seja, maiores concentrações dela resultam em uma maior atividade enzimática. Também, pode ser exemplificado com a comparação dos resultados dos tratamentos 2 e 4, na Tabela 4.4. Mantendo constante a fonte de carboidrato e fosfato, porém aumentando o extrato de levedura de 2 para 8 (g/L), a atividade da fosfatase ácida teve um aumento de aproximadamente 76%.

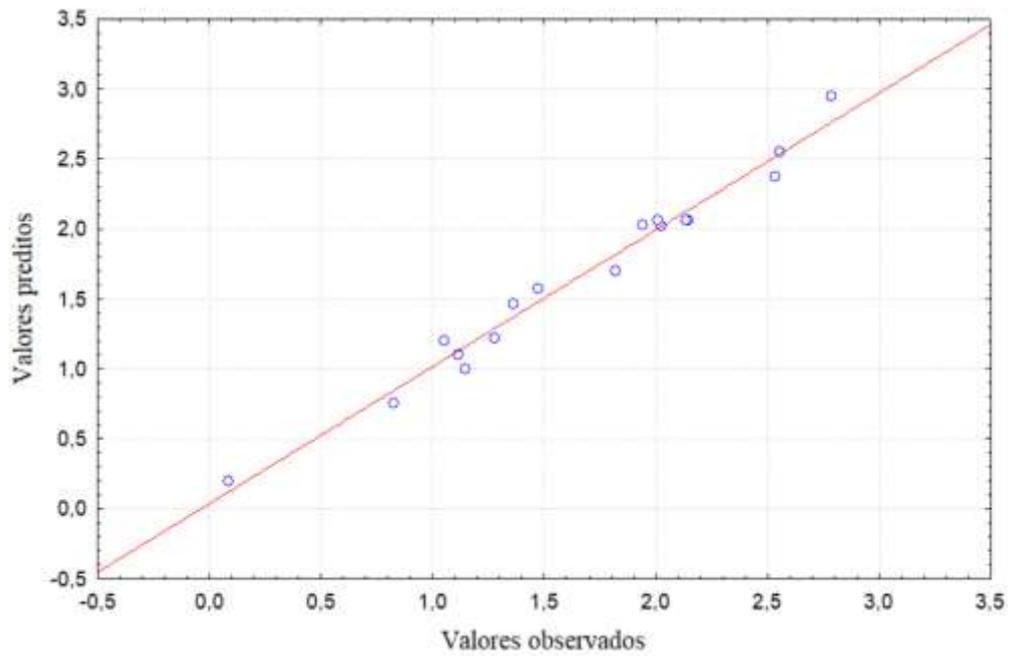
A Figura 4.24 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero, e sem tendências, indicando uma variância constante para todos valores de resposta.

A Figura 4.25 mostra a distribuição dos valores previstos em função aos valores observados no modelo. Nela é possível observar uma certa proximidade entre esses valores, o que indica que o modelo é apropriado para as análises dos dados.

As maiores atividades da fosfatase ácida produzidas por estes microrganismos foram para as faixas de concentrações: 20,0 – 26,0 (g/L) de sacarose, 6,0 – 9,5 (g/L) de extrato de levedura e 1,6 – 2,0 (g/L) de fosfato de potássio monobásico.

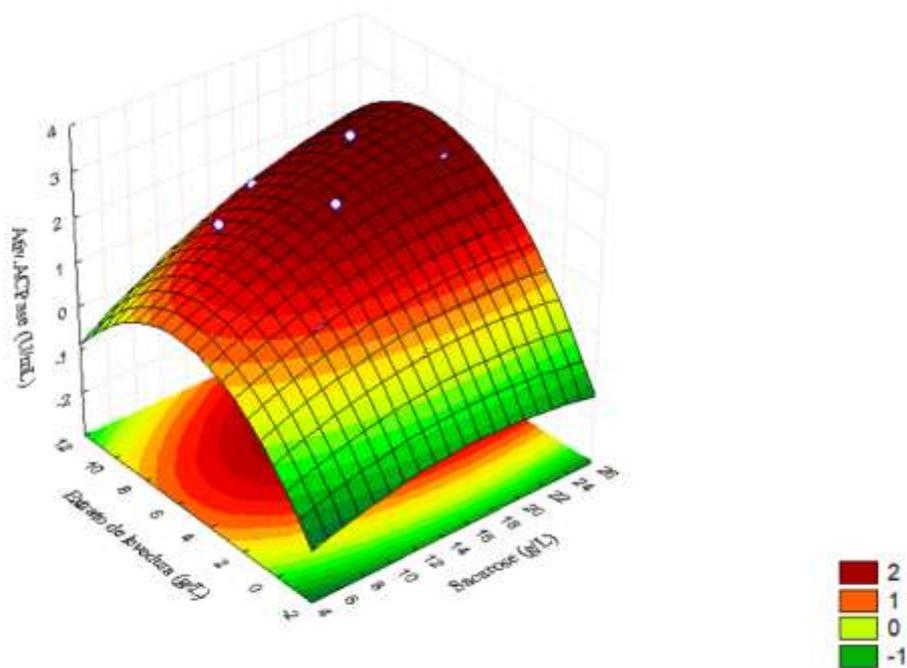


**Figura 4.24** – Distribuição dos resíduos relativos à atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. reesei*.

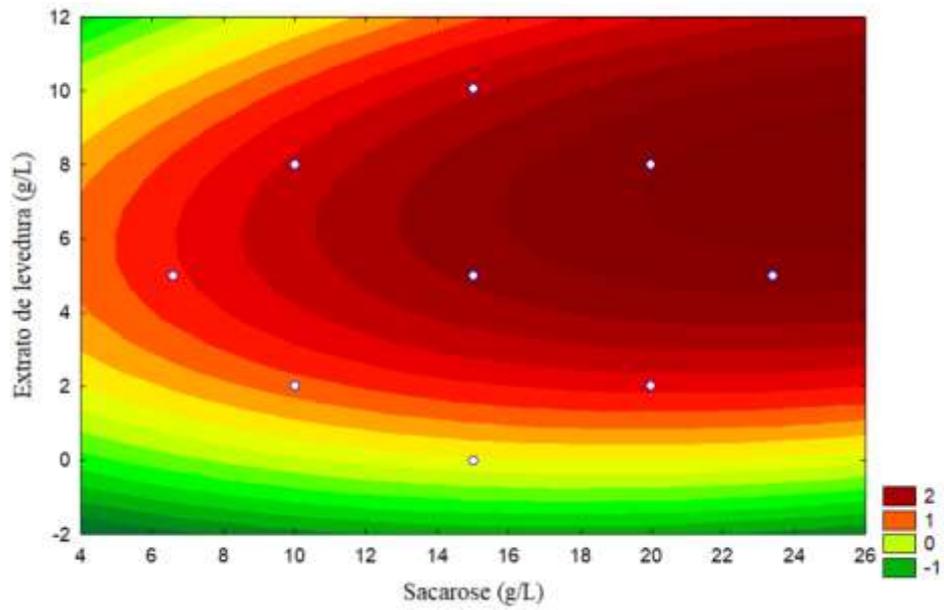


**Figura 4.25** - Valores preditos em relação aos observados para resposta de atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. reesei*.

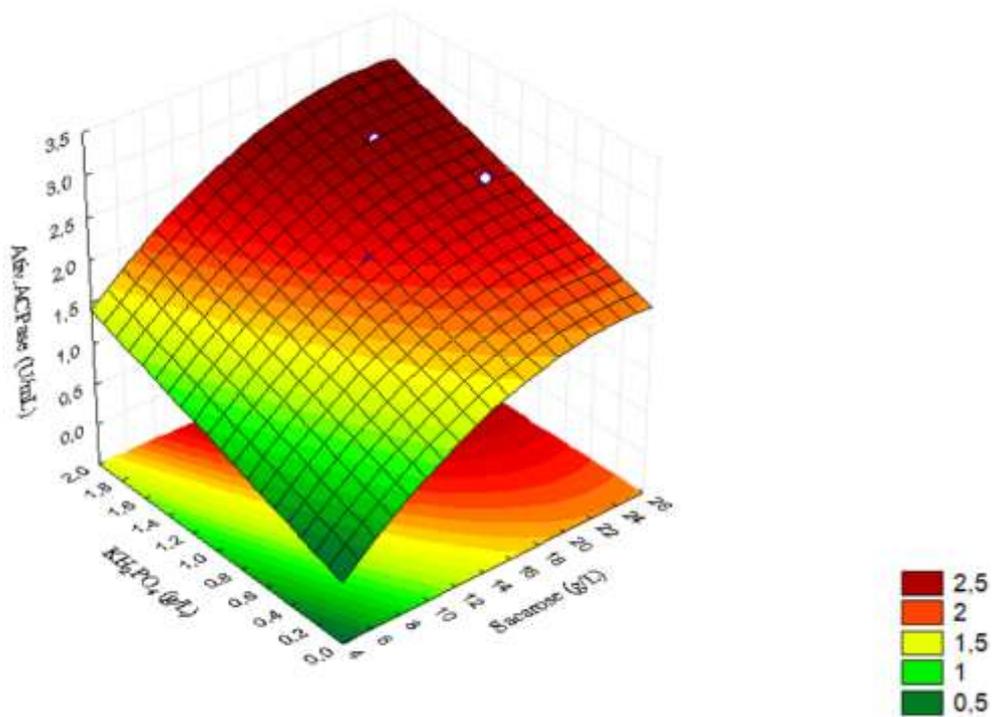
Estas faixas de concentrações estão representadas nas Figuras 4.26, 4.28 e 4.30, que correspondem às superfícies de respostas e também nas Figuras 4.27, 4.29 e 4.31, que mostram as curvas de contorno. Ambos os gráficos retratam duas a duas das variáveis de interesse correspondentes.



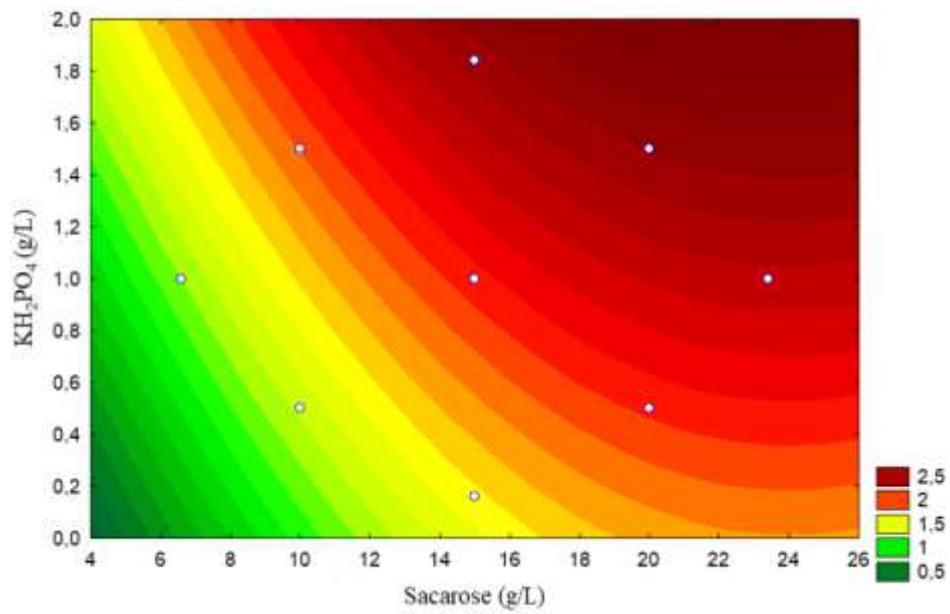
**Figura 4.26** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. reesei* em relação as concentrações (g/L) de sacarose e extrato de levedura.



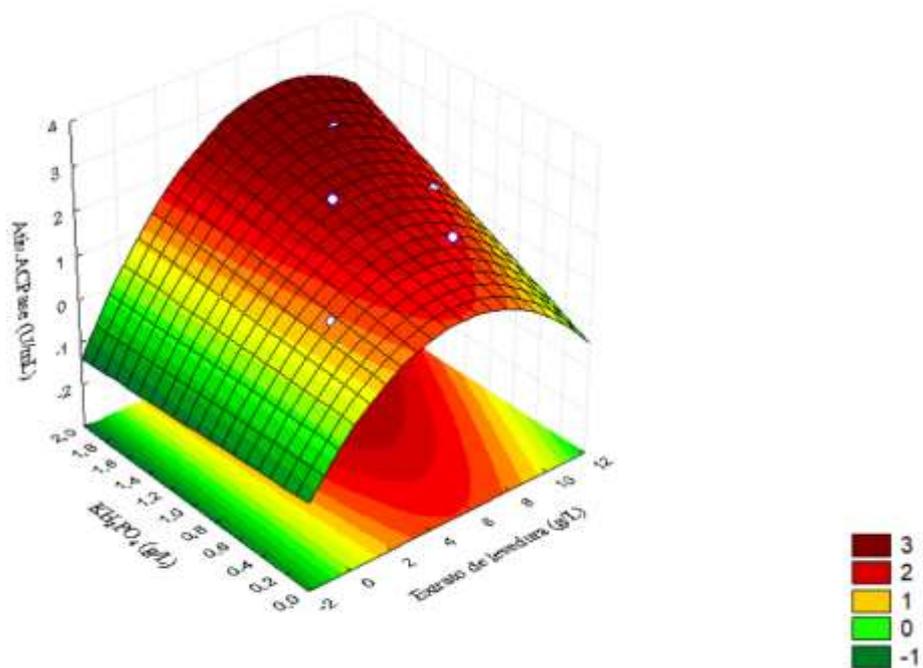
**Figura 4.27** – Curva de contorno para as concentrações de extrato de levedura e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de *T. reesei*.



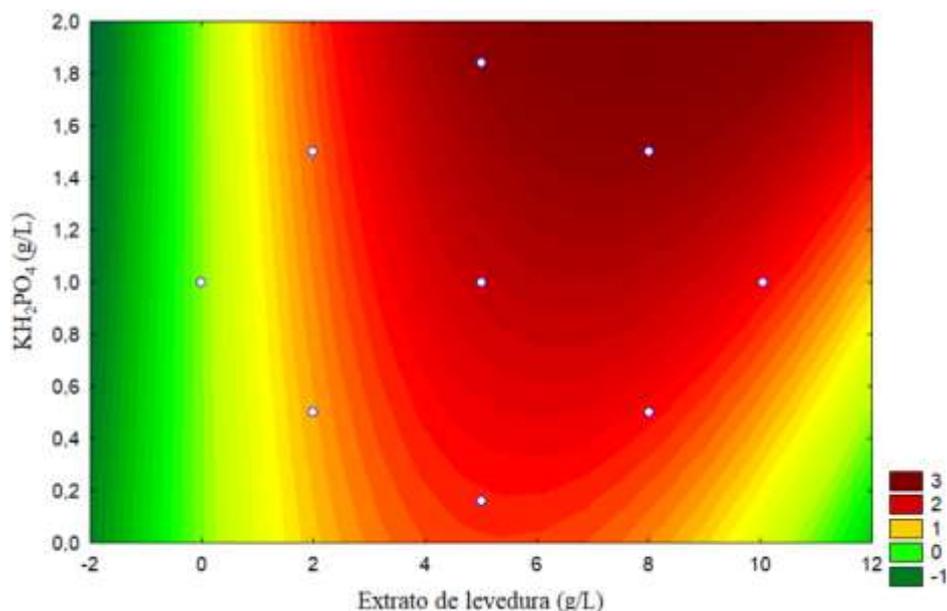
**Figura 4.28** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. reesei* em relação as concentrações (g/L) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e sacarose.



**Figura 4.29** – Curva de contorno para as concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e sacarose objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de *T. reesei*.



**Figura 4.30** – Superfície de resposta para atividade da fosfatase ácida produzida pelo *T. reesei* em relação as concentrações (g/L) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e extrato de levedura.



**Figura 4.31** – Curva de contorno para as concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e extrato de levedura objetivando a máxima atividade da fosfatase ácida de *T. reesei*.

Portanto, o Planejamento Composto Central melhorou a produção enzimática de todos microrganismos, quando comparada aos testes preliminares. A fermentação em estado líquido do *Trichoderma harzianum* apresentou os piores resultados entre as três cepas de fungos. Nos testes iniciais, possuía atividade enzimática média de 0,750 U/mL, e depois do PCC a atividade da fosfatase ácida chegou no valor máximo de 1,006 U/mL, ou seja, 34% maior que os testes preliminares.

Os melhores resultados comparativos foram para o *Trichoderma reesei*. Antes apresentava resultados de atividade da fosfatase ácida em média 0,648 U/mL. Com o meio de cultura nas faixas de concentração indicadas pelo PCC a atividade enzimática, máxima, foi de 2,790 U/mL, um aumento de aproximadamente 3,3 vezes.

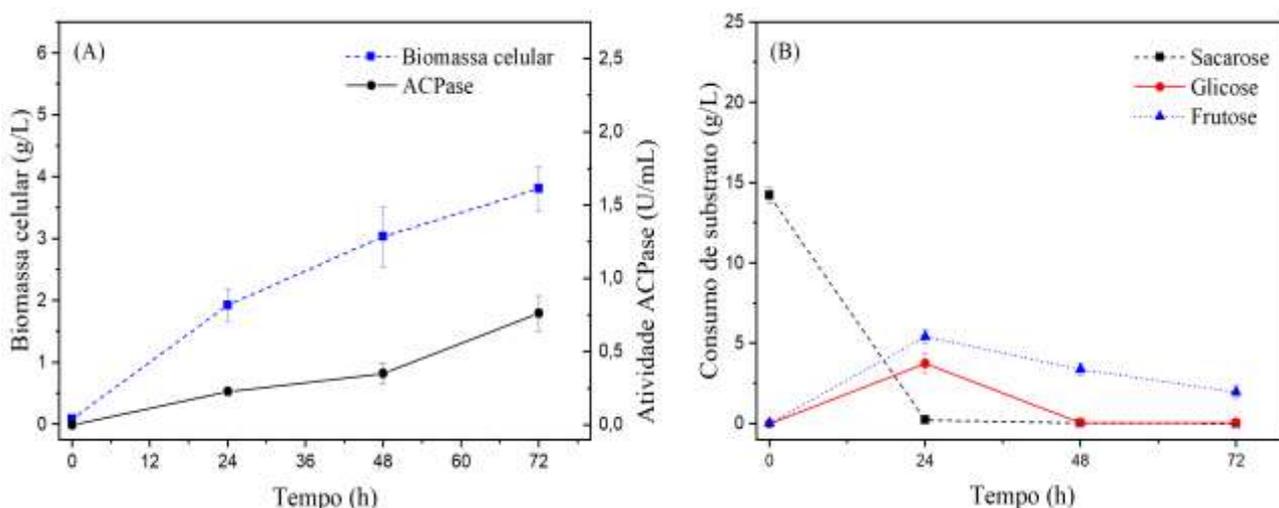
O *Trichoderma asperellum* apresentou resultados intermediários quando comparados com os dois microrganismos acima. Em meio de cultura suplementado, com sacarose na faixa de concentração de 11 a 17,5 g/L, extratado de levedura de 6 a 10,5 g/L e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de 0 a 0,2 g/L, teve uma atividade enzimática máxima de 0,650 U/mL, enquanto que antes a atividade média girava em torno de 0,405 U/mL, ou seja, um aumento de aproximadamente 60% do valor inicial.

#### 4.2.4 Validação dos meios de cultivos sugeridos pelo PCC para cada microrganismo estudado

Nessa etapa foi verificado a reprodutibilidade dos resultados dos modelos propostos pelo PCC, quando empregadas as condições experimentais indicadas pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno. A validação foi realizada em triplicata, para cada meio de cultura selecionado, por microrganismo.

O meio de cultivo para o *Trichoderma asperellum*, que maximizava a atividade da fosfatase ácida, estava nas seguintes faixas de concentrações (g/L): [11,0 - 17,5] de sacarose, [6 - 10,5] de extrato de levedura, e [0 - 0,2] de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Optou-se por trabalhar com o meio de cultura composto de 15,0 g/L sacarose, 8,0 g/L de extrato de levedura e 0,2 g/L de fosfato de potássio monobásico, meio de cultivo titulado como MSO-Ta. A Figura 4.32 (A) mostra as cinéticas de crescimento celular e atividade enzimática, chegando a um valor final médio de  $3,81 \pm 0,35$  g/L e  $0,76 \pm 0,12$  U/mL, respectivamente.

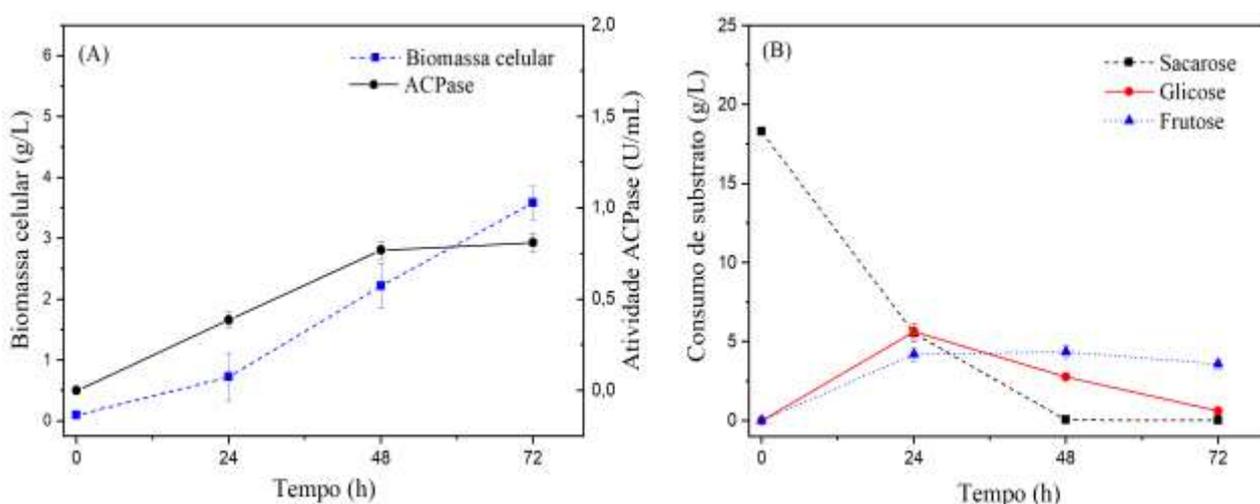
O carboidrato utilizado nos meios de cultura foi a sacarose, que é hidrolisado em glicose e frutose. Analisando a Figura 4.32 (B), este microrganismo, em 24 horas, consome toda a sacarose, sendo que uma parte utilizada para seu crescimento celular, e a outra foi transformada em glicose e frutose. A glicose por ser um carboidrato de fácil absorção é consumida totalmente em 48 h, conforme a cinética. O mesmo não ocorre para a frutose, sobrando um resíduo de aproximadamente 2,0 g/L no meio de cultura.



**Figura 4.32** – (A) Cinéticas de crescimento da biomassa celular e produção enzimática; (B) consumo de substrato para o *Trichoderma asperellum*.

Conforme o PCC, o fungo *Trichoderma harzianum* teve o potencial de produção da enzima intermediário, quando comparado com os outros microrganismos. As maiores atividades da fosfatase ácida produzidas por este microrganismo foram para as faixas de concentrações (g/L): [14,5 – 22,0] de sacarose, [3,5 – 7,0] de extrato de levedura e [0,6 – 1,1] de fosfato de potássio monobásico. Portanto, o meio selecionado foi composto de 18,0 g/L de sacarose, 5,0 g/L de extrato de levedura e 0,8 g/L de fosfato de potássio monobásico, meio de cultivo titulado como MSO-Th.

A Figura 4.33 (A) mostra as cinéticas de crescimento celular, e atividade enzimática, chegando a um valor final médio de  $3,58 \pm 0,27$  g/L e  $0,81 \pm 0,05$  U/mL, respectivamente.

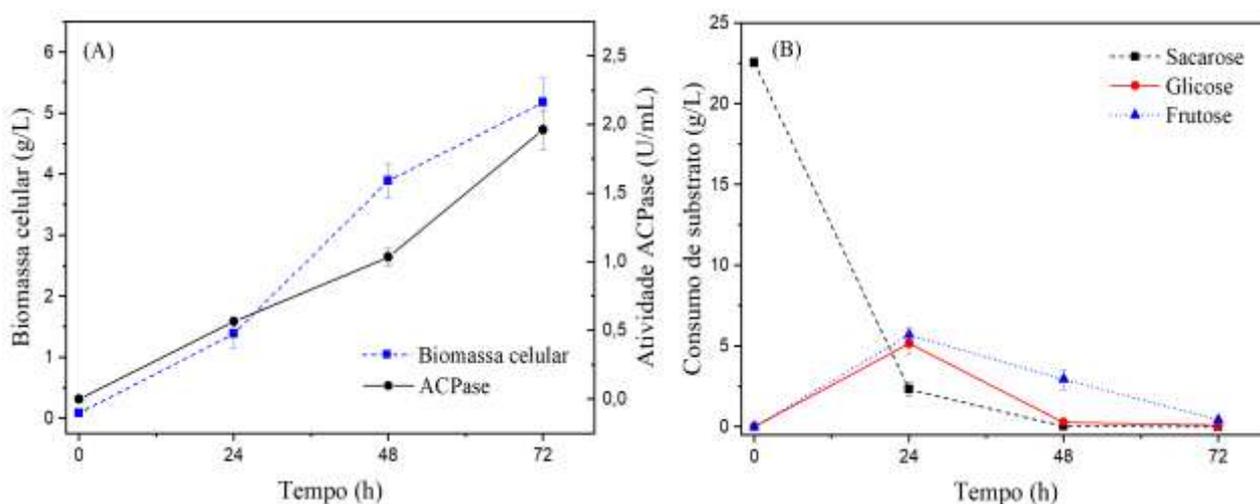


**Figura 4.33** – (A) Cinéticas de crescimento da biomassa celular e produção enzimática; (B) consumo de substrato para o *Trichoderma harzianum*.

Como esse microrganismo apresentou o menor crescimento celular, em relação aos demais, o consumo de substrato foi menor, deixando maior concentração residual no meio. Quando comparado com *T. asperellum*, o seu consumo do carboidrato foi mais lento, demandando o dobro do tempo para consumir a sacarose, ou seja, 48 horas. Esse resultado afetou também o consumo de glicose e frutose. A primeira foi consumida, praticamente, por completo, após 72h, e a segunda foi consumida parcialmente, deixando um resíduo de, aproximadamente, 3,5 g/L no meio de cultivo.

Os melhores resultados foram para o *Trichoderma reesei*. O meio de cultura que maximiza a atividade enzimática estava nas faixas de concentrações (g/L): [20,0 – 26,0] de sacarose, [6,0 – 9,5] de extrato de levedura, e [1,6 – 2,0] de fosfato de potássio monobásico. Optou-se por trabalhar com o meio composto de 23,4 g/L de sacarose, 8,0 g/L de extrato de levedura e 1,84 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , meio de cultivo titulado como MSO-Tr.

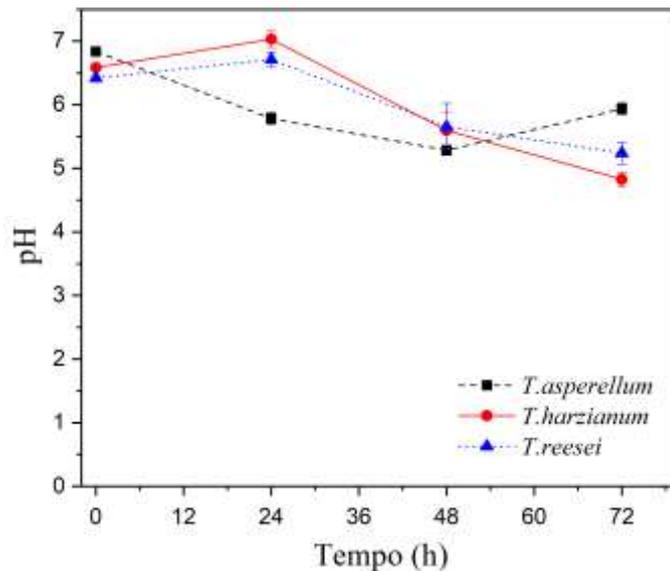
Os resultados estão apresentados na Figura 4.34, é notório o destaque do crescimento da biomassa celular, e a atividade enzimática, chegando a um valor final médio de  $5,32 \pm 0,48$  g/L e  $1,96 \pm 0,14$  U/mL, respectivamente. O consumo da sacarose e glicose se deu por completo, depois de decorridas 48h de fermentação, enquanto a frutose registrou resíduos mínimos de, aproximadamente, 0,5 g/L no final do processo.



**Figura 4.34** – (A) Cinéticas de crescimento da biomassa celular e produção enzimática; (B) consumo de substrato para o *Trichoderma reesei*.

A Figura 4.35 mostra a variação média do pH para os três microrganismos. O pH inicial variou de 6,5 até 6,8, visto que os meios de cultivo para cada cepa de *Trichoderma* tiveram concentrações diferentes e a correção inicial não foi feita, seguindo os mesmos procedimentos do PCC.

No geral, o comportamento do pH foi satisfatório, pois todos permaneceram na região ácida nesse tempo da batelada (Figura 4.35). Os meios de cultura fermentados pelo *T. harzianum* e *T. reesei* tiveram comportamentos semelhantes, mantendo-se, praticamente, constantes nas primeiras 24 horas, e chegando-se a valores próximo de 5,0, no final do processo. Vários autores relatam que o pH ótimo, para a atividade da fosfatase ácida, varia entre 3,5 – 6,0, dependendo do microrganismo produtor (GARCIA et al., 2004; ROMBOLA et al., 2014). Os microrganismos do solo de cerrado, em sua maioria, são capazes de produzir enzimas da classe das fosfatases ácidas, uma vez que os pH desses solos variam entre 4,9 – 5,7 (PURCENA et al., 2014).



**Figura 4.35**– Cinética de pH das cepas de *Trichoderma* em seus respectivos meios de cultivos indicado pelo PCC.

SOUZA et al. (2016) partindo da concentração inicial de  $10^7$  esporos/mL de *T. harzianum* em meio de cultivo suplementado com glicose 15 g/L, e sem adição de fonte de fosfato inorgânico, obtiveram 14,3 U/mg como máxima atividade específica da enzima, em 48 horas de fermentação. Depois desse tempo, observaram uma redução dessa atividade, e acreditam ser devido à formação de fosfato inorgânico, presente no meio de cultivo. O pH de trabalho foi de 4,0, sendo controlado durante toda as 90 horas de processo.

Alguns trabalhos envolvendo a produção de fosfatase ácida e crescimento celular do *Trichoderma harzianum* ALL42 indicam inibição e secreção de proteínas em altas concentrações de glicose. RAMADA et al. (2015) detectaram baixa produção de proteínas totais para esta espécie, quando crescida em meio 2,0% de glicose. LIMA (2006) observou que o *T. harzianum* ALL 42, quando inoculado em meio com apenas glicose, como fonte de carbono, secretou menos a proteína, quando comparado com produções realizadas em meio suplementado com milho, farelo de soja, amido comercial e ração animal.

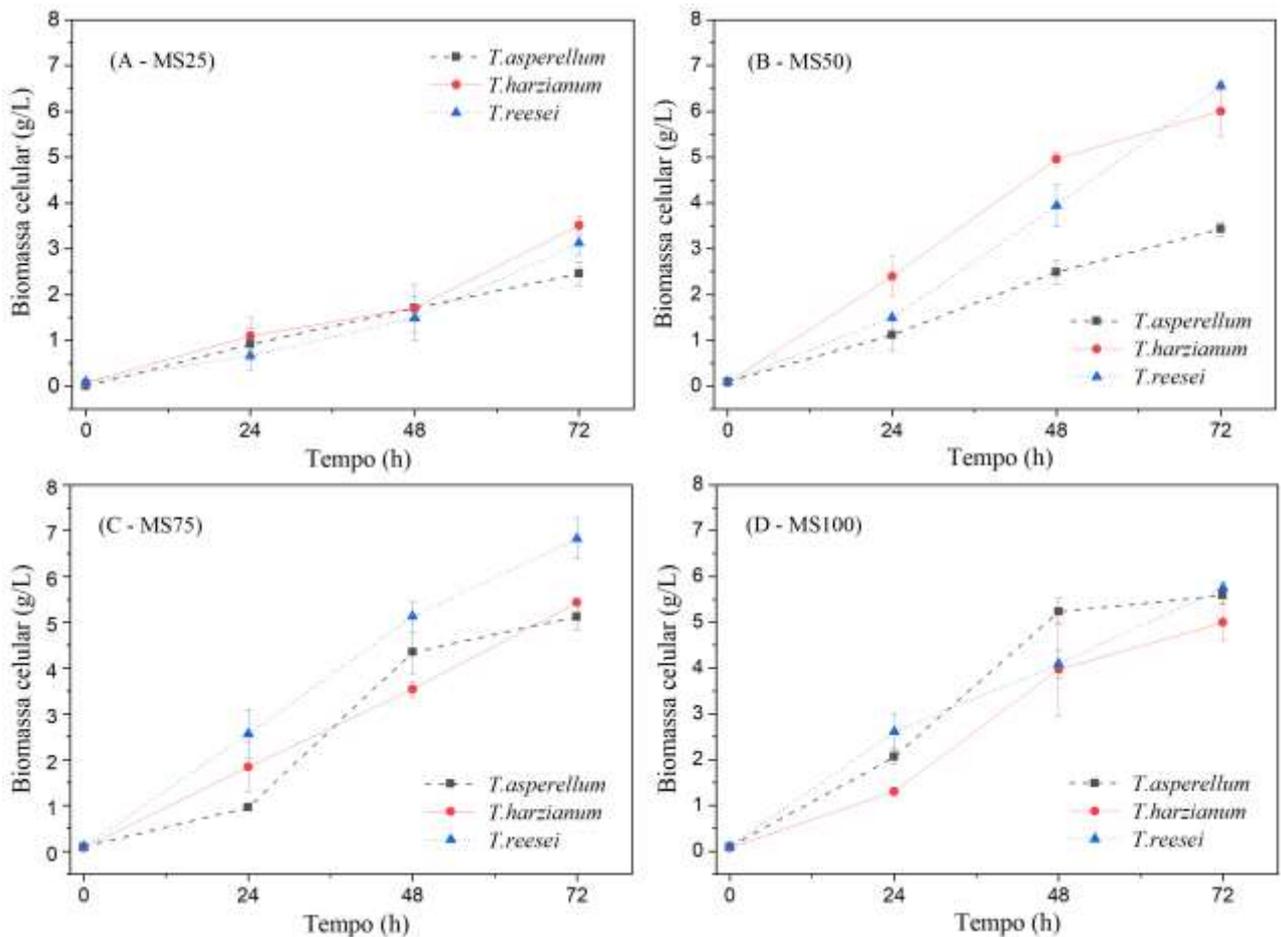
A produção de fosfatase ácida por este microrganismo mostrou-se proporcional à quantidade de glicose adicionada no trabalho de SOUZA (2011). O fungo *T. harzianum* ALL42, quando crescido em meio seletivo com 1,5% de glicose, apresentou uma atividade 0,17 U/mL, sendo 21% maior que a atividade observada no mesmo meio, porém com 0,5% deste carboidrato.

### 4.3 Avaliação da produção de ACPase com meio de cultivo a base de melaço de soja em fermentação submersa

Nessa seção estão os resultados referentes à fermentação submersa, utilizando melaço de soja, como única fonte nutritiva para os microrganismos estudados. Primeiramente serão apresentados os resultados referentes ao melaço de soja, sem tratamento ácido de precipitação, e, depois, os resultados com o tratamento. As fermentações ocorreram utilizando os fungos separadamente nos meios de cultivos (MS25, MS50, MS75 e MS100), cujas concentrações (g/L) do substrato foram 25, 50, 75 e 100, respectivamente.

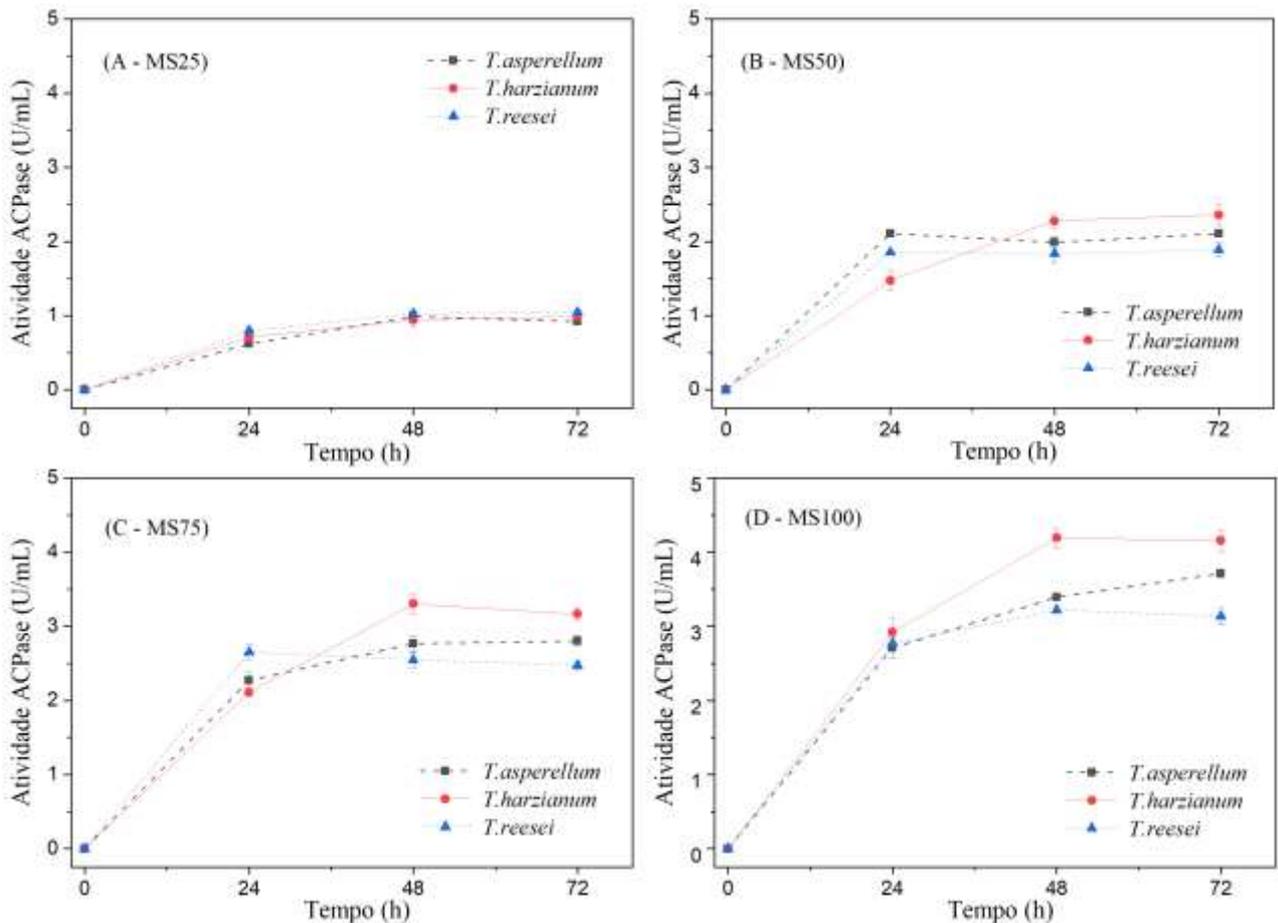
A Figura 4.36 mostra os resultados relativos ao crescimento de biomassa celular dos três fungos para os quatro meios de cultivos testados. É evidente que os microrganismos preferiram os meios (B) - MS50 e (C) - MS75, com destaque para o *Trichoderma reesei* que apresentou crescimento celular médio final de  $6,55 \pm 0,09$  (g/L) e  $6,82 \pm 0,43$  (g/L), respectivamente.

O meio de cultura (A) - MS25, apresentou os piores resultados de crescimento em 72 h de batelada, para os três microrganismos. Também, neste meio de cultivo foi observado um maior do crescimento depois de 48 h de processo, indicando a necessidade de um período maior de fermentação. O meio de cultura (D) - MS100 não seguiu a tendência de maior quantidade de substrato, maior o crescimento da biomassa celular. Os três microrganismos apresentaram biomassa celular média final parecidas, entre 5,00 e 5,50 g/L. Tal fato pode remeter a uma certa inibição da biomassa celular por parte de excesso de substrato.



**Figura 4.36** – Cinética de crescimento da biomassa celular dos microrganismos nos meios de cultivo MS25, MS50, MS75, MS100, sem tratamento.

Na Figura 4.37 estão os resultados referentes às cinéticas da atividade da fosfatase ácida. As maiores atividades foram nas fermentações utilizando os meios de cultura (C) - MS75 e (D) - MS100, e o microrganismo que mais se destacou foi *Trichoderma harzianum*, apresentando atividade enzimática final média de  $3,16 \pm 0,08$  (U/mL) e  $4,15 \pm 0,14$  (U/mL), respectivamente. É importante salientar que, em todos os meios de cultura testados o processo se estabilizou em 48 h, ou seja, a partir deste tempo já se tem a máxima atividade enzimática, indicando que o processo já poderia ser interrompido. O meio (A) - MS25 apresentou os piores resultados indicando uma atividade ao redor de 1,00 (U/mL) para os microrganismos.



**Figura 4.37** – Cinética de atividade da fosfatase ácida dos microrganismos nos meios de cultivo (MS25, MS50, MS75 e MS100) utilizando melaço de soja sem tratamento.

Outra variável importante para produção da enzima é o pH, sendo fundamental que esteja na faixa ácida. A Tabela 4.5 mostra a variação do pH ao longo das 72 horas de batelada. O meio de cultura (A) – MS25 mostrou comportamento destoante dos demais meios de cultura. Ao longo da sua fermentação houve um aumento do pH, até a região neutra, para todos microrganismos chegando em 7,15 para o *T. harzianum* e 7,07 para o *T. reesei*. Também, de forma geral, ocorreu um ligeiro aumento do pH na maioria dos meios de cultura fermentados depois de 48 h de fermentação.

Diante dos resultados apresentados na Figura 4.37 e na Tabela 4.5 foi reduzido o tempo do processo fermentativo para 48 h, nos meios de cultura com tratamento ácido. O motivo da redução do tempo de processo está relacionado com o ligeiro aumento de pH entre 48 h e 72 h para a maioria dos meios fermentados e também a estabilização da atividade enzimática neste período.

**Tabela 4.5** – Variação de pH dos microrganismos nos meios de culturas (MS25, MS50, MS75 e MS100) sem tratamento do melão de soja.

<i>Trichoderma asperellum</i>				
Tempo (h)	pH (MS25)	pH (MS50)	pH (MS75)	pH (MS100)
0	5,51±0,035	6,12±0,021	6,01±0,007	5,81±0,014
24	4,59±0,092	4,92±0,042	4,94±0,113	5,09±0,064
48	5,03±0,103	5,83±0,064	5,83±0,014	5,44±0,035
72	6,64±0,106	6,69±0,042	7,11±0,042	6,22±0,049

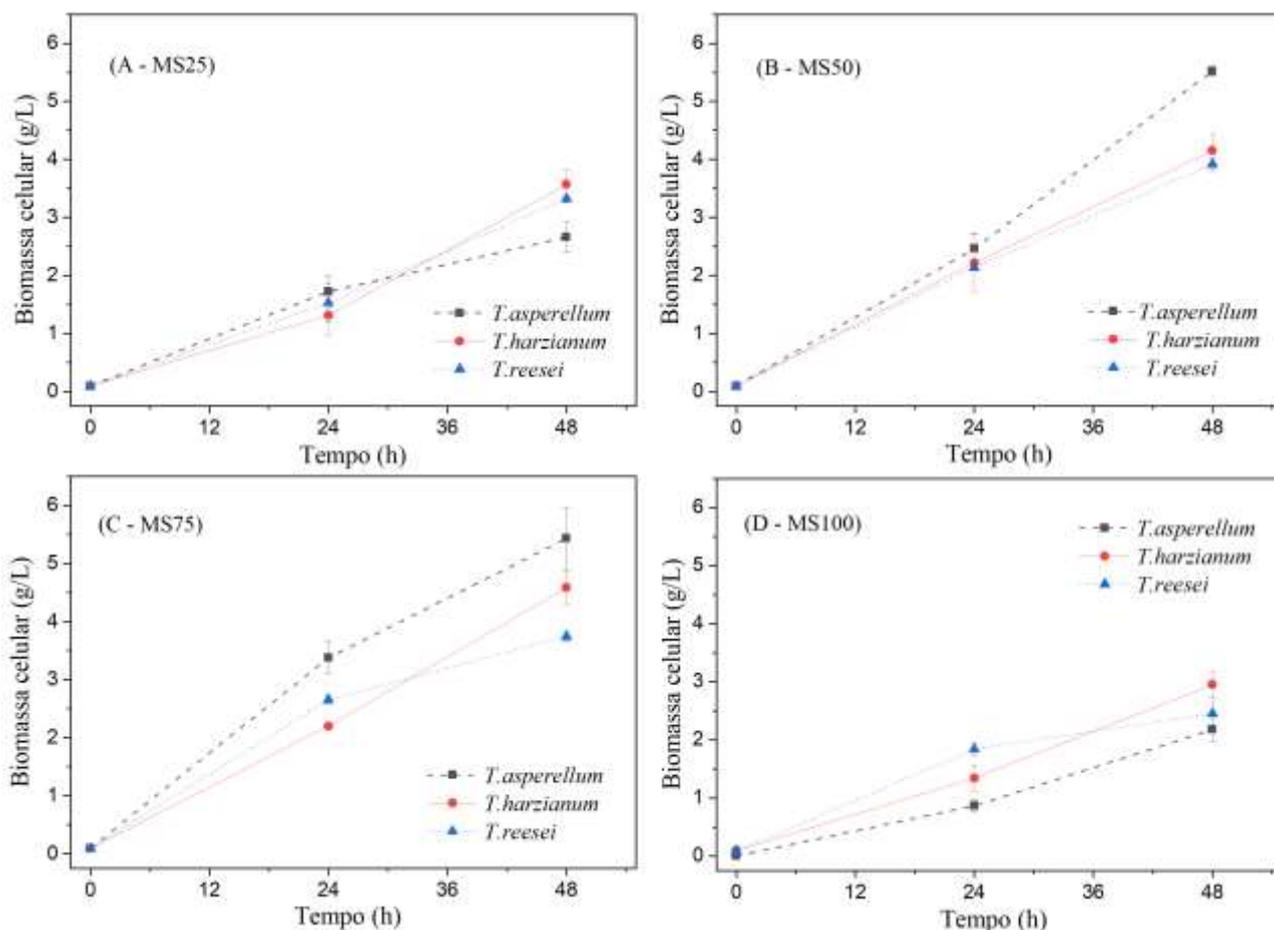
<i>Trichoderma harzianum</i>				
Tempo (h)	pH (MS25)	pH (MS50)	pH (MS75)	pH (MS100)
0	5,54±0,028	5,66±0,007	5,51±0,014	5,47±0,014
24	6,50±0,127	6,55±0,170	5,78±0,007	5,64±0,064
48	6,52±0,028	6,26±0,170	6,08±0,021	5,83±0,035
72	7,14±0,099	5,61±0,042	5,91±0,057	5,68±0,121

<i>Trichoderma reesei</i>				
Tempo (h)	pH (MS25)	pH (MS50)	pH (MS75)	pH (MS100)
0	5,53±0,028	6,12±0,021	6,01±0,007	5,81±0,014
24	6,96±0,064	5,35±0,057	5,35±0,057	5,70±0,014
48	7,17±0,233	5,77±0,049	5,77±0,028	5,72±0,064
72	7,07±0,423	5,68±0,028	5,68±0,007	5,61±0,078

Agora serão apresentados os resultados referentes ao tratamento ácido de precipitação do melão de soja. O tratamento ácido de precipitação é muito favorável para clarificação dos meios de cultivo, porém podem precipitar, também, proteínas que favorecem o processo fermentativo. O que é utilizado para reduzir efeitos tóxicos, juntamente com processos de detoxificação, são comumente realizados para remoção parcial destes interferentes (ANTUNES et al., 2017; GUPTA et al., 2017).

A Figura 4.38 mostra a cinética do crescimento de biomassa celular, e pode-se notar que o comportamento foi similar às fermentações sem o tratamento do substrato, no mesmo tempo de batelada, porém com algumas ressalvas. Os meios de cultura com maior crescimento foram (B) - MS50 e (C) - MS75, com destaque para o *Trichoderma asperellum* que obteve biomassa celular média final de  $5,52 \pm 0,085$  (g/L) e  $5,43 \pm 0,533$  (g/L). Os meios (D) - MS100 apresentaram os piores resultados, indicando uma certa inibição de crescimento por parte da concentração do substrato. Os meios (A) - MS25 apresentaram resultados intermediários

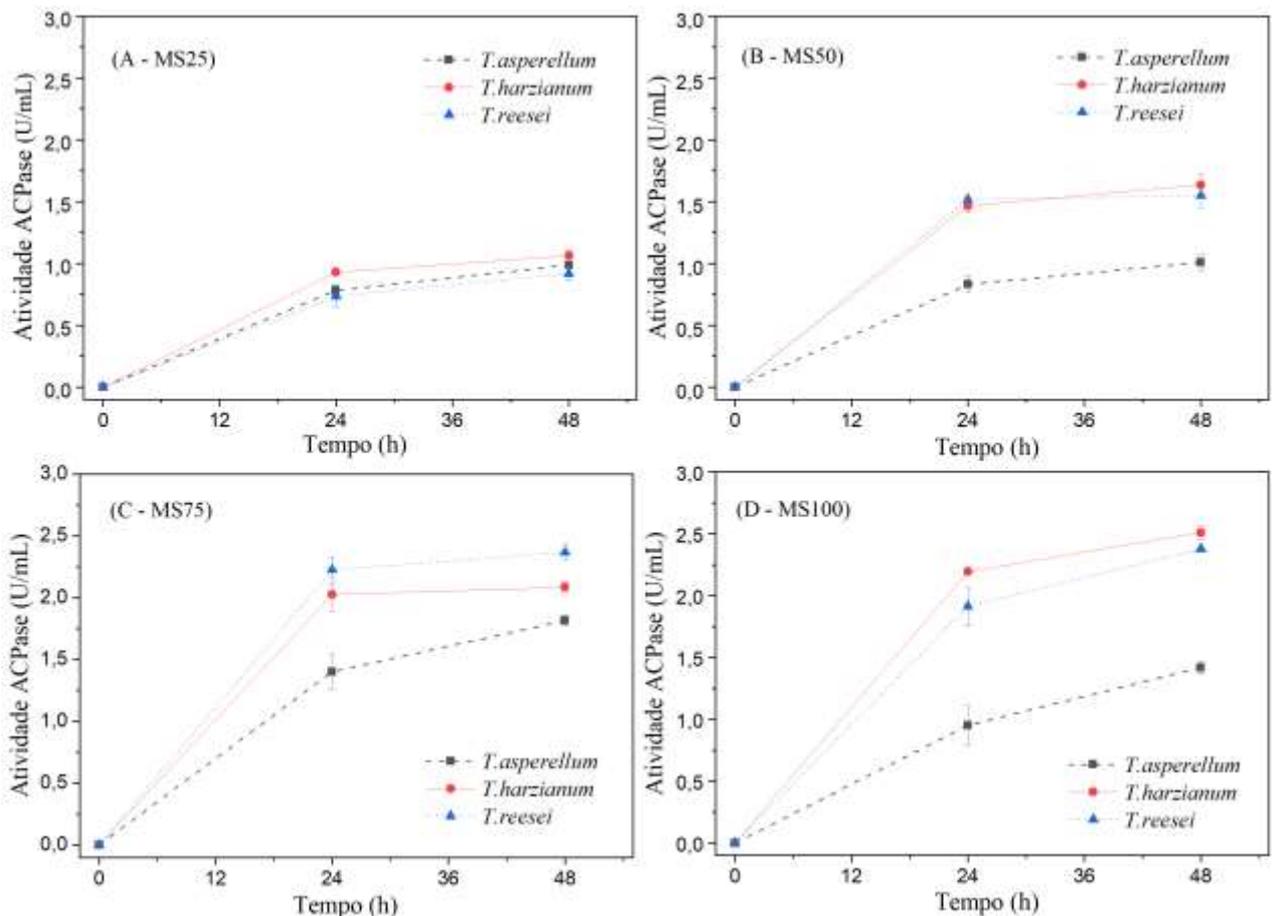
quando comparados com MS50 e MS75, porém foram superiores se comparado com o MS25 sem tratamento, de forma geral.



**Figura 4.38** – Cinética de crescimento da biomassa celular dos microrganismos nos meios de cultivo MS25, MS50, MS75, MS100, com tratamento.

A Figura 4.39 mostra os resultados de atividade enzimática nos meios com tratamento do melão de soja. Os maiores valores de atividade da fosfatase ácida foram para os meios de cultivo (C) - MS75 e (D) - MS100 com destaque para os microrganismos *T. harzianum* e *T. reesei* que apresentaram resultados próximos a 2,50 U/mL no meio MS100.

De maneira geral, as atividades médias no tempo de 48 h, para os meios em destaque com o tratamento do substrato, foram piores que os resultados dos mesmos meios de cultivo sem tratamento. O meio MS100, com tratamento e fermentado pelo *T. harzianum*, reduziu a atividade enzimática em 37,5%, se comparado com o mesmo meio, porém sem tratamento. Esse comportamento de redução também foi observado para o *T. reesei*, que reduziu a atividade enzimática em, aproximadamente, 17% nestes mesmos meios de cultivo.



**Figura 4.39** – Cinética de atividade da fosfatase ácida dos microrganismos nos meios de cultivo (MS25, MS50, MS75 e MS100) utilizando melão de soja com tratamento.

A estratégia de reduzir o tempo de fermentação, para manter o pH na região ácida, foi percebida em quase todas fermentações (Tabela 4.6), com exceção dos meios MS25 e MS50 fermentados pelo *Trichoderma harzianum*. O comportamento crescente para o (A) - MS25 chegando próximo da região neutra também já tinha sido observado nele, sem o processo de tratamento ácido do substrato. Os meios (C) - MS75 foram os que menos sofreram variações de pH para os microrganismos estudados.

MORAIS Jr et al. (2016) otimizaram a produção e caracterizaram lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* em meio de cultura a base de melão de soja. Nesse trabalho foi possível concluir que a região de maior produção de lipase apresentava as seguintes condições: concentração de melão de soja de 200 g/L, pH inicial de 3,5 e temperatura de  $27 \pm 1$  °C. O fungo *G. candidum* apresentou produção máxima de 11,48 U/mL, após 24 h, e a levedura *C. rugosa* chegou a 12,12 U/mL, após 12 h.

**Tabela 4.6** - Variação de pH dos microrganismos nos meios de culturas (MS25, MS50, MS75 e MS100) com tratamento do melão de soja.

*Trichoderma asperellum*

Tempo (h)	pH (MS25)	pH (MS50)	pH (MS75)	pH (MS100)
0	5,54±0,035	5,53±0,070	5,52±0,014	5,49±0,028
24	5,78±0,021	5,51±0,113	5,39±0,042	5,28±0,120
48	5,90±0,014	5,57±0,035	5,35±0,021	5,10±0,035

*Trichoderma harzianum*

Tempo (h)	pH (MS25)	pH (MS50)	pH (MS75)	pH (MS100)
0	5,57±0,014	5,49±0,070	5,49±0,049	5,44±0,085
24	6,08±0,035	5,80±0,191	5,43±0,170	5,35±0,078
48	7,18±0,078	6,36±0,354	5,40±0,049	5,24±0,042

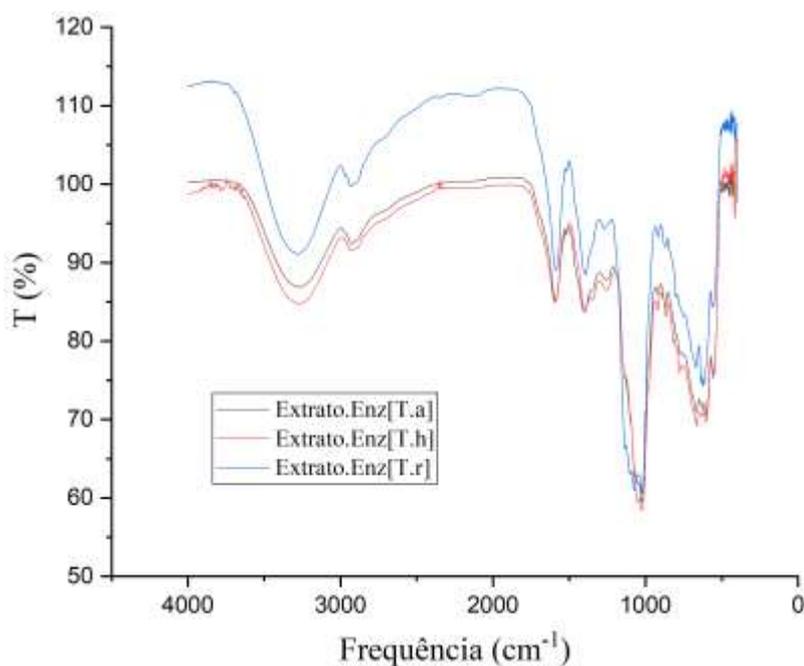
*Trichoderma reesei*

Tempo (h)	pH (MS25)	pH (MS50)	pH (MS75)	pH (MS100)
0	5,52±0,014	5,44±0,021	5,46±0,007	5,51±0,021
24	6,15±0,285	5,70±0,191	5,52±0,035	5,43±0,071
48	6,02±0,177	5,58±0,212	5,29±0,042	5,12±0,156

PECIN (2018) avaliou a utilização do melão de soja bruto e submetido à hidrólise química, como substrato alternativo para a produção da lasiodiplodana ((1-6)- $\beta$ -D-glucana) pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Obteve a máxima produção de lasiodiplodana de 0,41 g/L, após 72 h, nos cultivos com melão não hidrolisado. Concluiu, também, que a hidrólise do melão não contribuiu para maior produção do exopolissacarídeo, produzindo 0,36 g/L, em 24 h e 48 h, e nem para um maior crescimento micelial. O maior conteúdo de biomassa foi verificado em 96 h (2,86 g/L) em meio não hidrolisado quando comparado ao meio hidrolisado (1,88 g/L).

Foram realizadas análises de FTIR, de todos extratos enzimáticos, para confirmação da presença de grupos químicos, importantes para a etapa de imobilização (Figura 4.40). Os espectros são semelhantes para ambos, mostrando picos em torno de 3300  $\text{cm}^{-1}$  que indicam a presença do grupo (-OH), também relatada por KALITA e AMBASHT, (2019). Os picos em torno de 1640  $\text{cm}^{-1}$  podem ser referentes à vibração de stretchung -NH, 1560  $\text{cm}^{-1}$  mostrou a formação de ligações de etileno (C=C), outro pequeno pico em torno de 1420  $\text{cm}^{-1}$  teria surgido para ligação C-N, e um pico muito significativo cerca de 1000  $\text{cm}^{-1}$  em ambos os espectros são devidos à presença de estruturas de sacarídeo no extrato. SHIVASTAVAD e ANAND (2014)

estudando a ativação de grânulos de quitosana relataram quase todos esses picos em seu artigo. As bandas observadas em torno de  $530\text{ cm}^{-1}$  estão na região da impressão digital, não indicando nenhum grupo funcional, também encontrado no trabalho de (KALITA e AMBASHT, 2019).



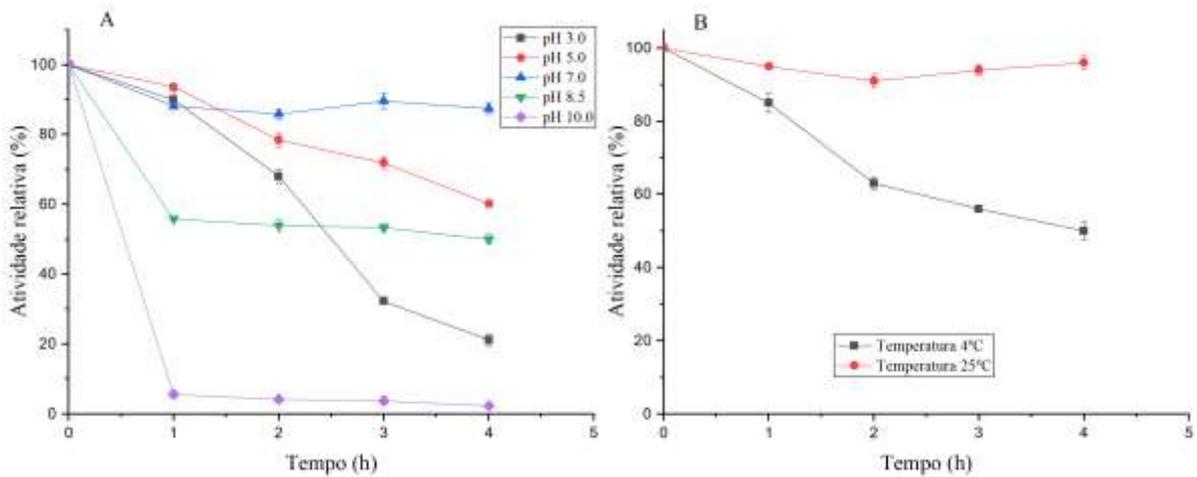
**Figura 4.40** – FTIR dos extratos enzimáticos produzido pelas cepas de *Trichoderma*: [T.a] *Trichoderma asperellum*, [T.h] *Trichoderma harzianum*, [T.r] *Trichoderma reesei*.

#### 4.4 Estudo da imobilização das fosfatases ácidas

##### 4.4.1 Caracterização e imobilização das fosfatases comerciais em diferentes suportes

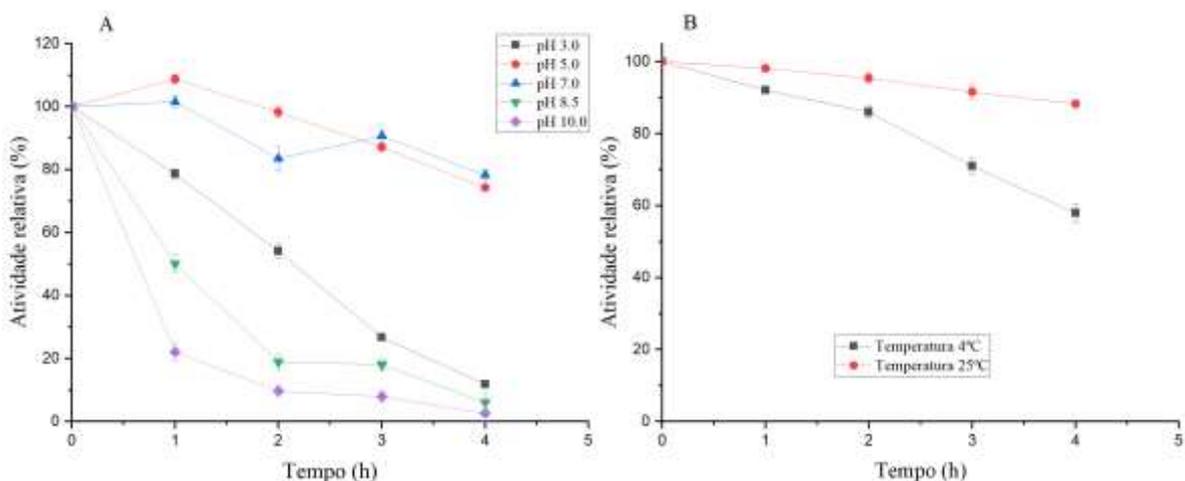
As imobilizações foram realizadas com as enzimas comerciais fosfatase ácida de trigo germinado (ACPase Trigo) e fosfatase ácida de batata (ACPase Batata), adquiridas da empresa Sigma Aldrich. Para identificar as melhores condições de imobilização, testes de estabilidade da enzima livre foram realizados em diferentes valores de pH e em duas temperaturas: 4 °C (câmara fria) e 25 °C (temperatura ambiente). A Figura 4.41 (A) mostra que a ACPase de trigo germinado é mais estável à temperatura ambiente com, aproximadamente, a mesma atividade inicial nesse período de 4 horas. Nos valores de pH 7 e 5 (Figura 4.41 (B)) a enzima apresentou bom desempenho nas primeiras horas, com destaque para o pH 7, com queda de 10% na primeira hora e manteve-se constante durante o restante do período analisado. Outro fator

relevante a se considerar é que em pH 10 a enzima precipitou e mudou de cor, passando de marrom escuro para preto.



**Figura 4.41:** Estabilidade da ACPase livre de trigo germinado em função do pH (A) e da temperatura (B).

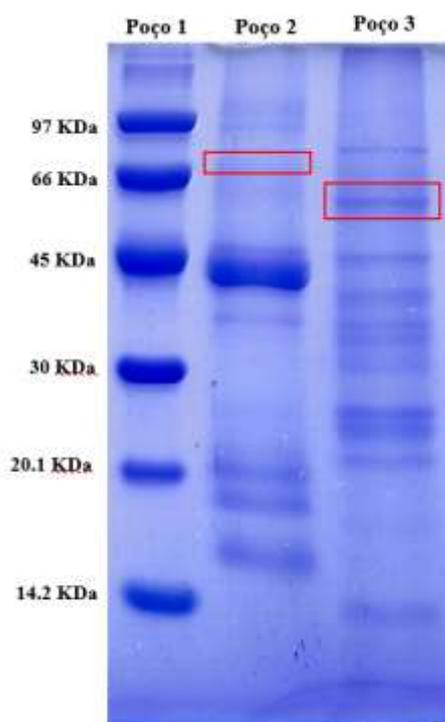
Resultados parecidos foram obtidos com a ACPase da batata. A Figura 4.42 mostra que essa enzima é mais estável em temperatura ambiente, e os melhores valores de pH para fazer a imobilização são pH 5,0 e 7,0 em 4 horas. O pH e temperatura ótima de uma ACPase de trigo germinado (Tipo 1) estudada por KALITA e AMBASHT (2019) foram de 5,0 e 50 °C, respectivamente.



**Figura 4.42:** Estabilidade da ACPase livre de batata em função do pH (A) e da temperatura (B).

SOUZA et al. (2016) estudaram a estabilidade térmica da ACPase II de *Trichoderma harzianum* como potencial para aplicações industriais. A ACPase II foi estável por, pelo menos, 120 min a 50 °C e 55 °C, respectivamente, retendo 60% da atividade máxima a 50 °C, e 45% da atividade máxima a 55 °C. A faixa de pH ideal desta enzima foi 3,5 - 4,5 retendo mais de 90% da atividade. LEITÃO et al. (2010) relataram que a ACPase de *T. harzianum* permaneceu estável por, pelo menos, 60 minutos a 45 °C, e reteve 67% da atividade máxima a 50 e 55 °C. O pH ótimo dessa enzima estava na faixa de 4,5 - 6,0.

Os pesos moleculares destas enzimas foram verificados por SDS-PAGE. As ACPases apresentaram várias bandas para ambas enzimas, indicando que o produto não foi purificado. Segundo a empresa Sigma Aldrich, a banda destacada na Poço 3 da Figura 4.43 com aproximadamente 58 KDa é a que corresponde à ACPase de trigo germinado. A banda destacada na Poço 2 da Figura 4.43 com aproximadamente 69 KDa corresponde à ACPase de batata, embora no gel possui outra banda mais evidente.



**Figura 4.43** - SDS-Page (8-18%) das fosfatases ácidas comerciais - Linha 1: proteínas padrão; Linha 2: ACPase de batata; Linha 3: ACPase de trigo germinado.

LEITÃO et al. (2010) purificaram e caracterizaram uma fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum*, também, com 58 KDa é semelhante a duas ACPases distintas produzidas por *Aspergillus oryzae* (FUJITA et al., 2003). SDS-PAGE também revelou uma nova ACPase II

térmica de *Trichoderma harzianum* de  $90 \pm 5$  KDa (SOUZA et al., 2016), distinta das fosfatases ácidas de fungos, anteriormente caracterizados, como *Mucor hiemalis* (45 kDa) e *Metarhizium anisopliae* (44 kDa) (BOYCE e WALSH, 2007; LI et al., 2006).

Foram testados suportes de interações iônicas e covalentes, e para cada imobilização foi feito um controle com a mesma quantidade de enzima, no mesmo ambiente reacional e com a mesma solução tampão. A Tabela 4.7 mostra os resultados obtidos após imobilização de tais enzimas.

**Tabela 4.7** – Imobilização das fosfatases ácidas em diferentes suportes.

Suportes	ACPase Trigo		ACPase Batata	
	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Expressada (%)	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Expressada (%)
1) Manae Ag. 6BC	$98,08 \pm 0,77$	$3,21 \pm 1,04$	$91,70 \pm 0,88$	$4,74 \pm 1,13$
2) DEAE Sephose	$99,15 \pm 0,40$	$2,76 \pm 1,49$	$95,50 \pm 1,20$	$5,63 \pm 0,97$
3) DEAE Toyopearl 650s	$97,34 \pm 0,34$	$96,28 \pm 3,18$	$95,68 \pm 2,59$	$85,27 \pm 2,26$
4) Glioxil Agarose 4BCL/ PEI 10KDa	$99,00 \pm 1,33$	$8,67 \pm 2,49$	$96,50 \pm 1,28$	$2,54 \pm 0,67$
5) Glioxil Agarose 6 BCL/ PEI 600-1000 KDa	$91,24 \pm 1,97$	$41,15 \pm 1,59$	$86,00 \pm 2,26$	$47,34 \pm 1,32$
6) Sulfopropil Agarose (pH 5,0)	$98,00 \pm 2,10$	$1,47 \pm 0,92$	$95,7 \pm 1,33$	$2,56 \pm 0,80$
7) Glioxil Agarose 6 BCL (pH 8,5)	$1,79 \pm 0,84$	$64,13 \pm 3,67$	$0,95 \pm 0,33$	$39,1 \pm 2,69$
8) Glioxil Agarose 6 BCL (pH 10,0)	Nq	Nq	Nq	Nq

\*Nq: não quantificado.

É importante salientar que o Rendimento de Imobilização (%) e a Atividade Expressada (%) devem sempre ser analisados em conjunto. O primeira quantifica o percentual de enzima que o suporte atraiu, e a segunda quantifica a atividade enzimática percentual do conjunto suporte/enzima, levando em consideração o rendimento (item 3.6.2).

Pode-se observar que os melhores resultados foram encontrados para ACPase Trigo. O suporte com maior destaque para ambas enzimas foi o DEAE Toyoperl 650s. ACPase de Trigo atingiu um rendimento de imobilização de  $97,34 \pm 0,34\%$ , conservando, aproximadamente, 96% da atividade inicial, enquanto ACPase de Batata teve um rendimento de  $95,68 \pm 2,59\%$ , e conservou  $85,27 \pm 2,26\%$  da atividade inicial (Tabela 4.7). A imobilização neste suporte é mais

branda, porque os grupos reativos do mesmo estão na superfície externa, tal fato promove uma atração rápida (em média de 15 minutos para ambas as enzimas) e eficiente.

Os outros suportes aniônicos, MANAE Ag. 6BC e DEAE Sefarose, não foram eficientes para as enzimas. Elas apresentaram rendimentos com valores superiores a 98%, porém apresentaram atividade relativa inferiores a 2,7%, no final do processo. Os dois suportes aniônicos atraíram as duas enzimas, pois a atividade do sobrenadante no final da imobilização foi praticamente zero. Porém, isso apresenta pouca relevância, pois a atividade da suspensão enzima/suporte final também foi praticamente zero. Tal fato pode ser explicado pela mudança da configuração estrutural ocasionada pela dificuldade de encontro reacional entre os grupos entre o substrato e o sítio ativo da enzima.

O Sulfopropil agarose, suporte catiônico, também não foi eficiente na imobilização. O controle apresentou estável para todo tempo da imobilização, tal fato comprova que o ambiente reacional não afetou a enzima. A atividade expressada no final da suspensão enzima/suporte foi de  $1,47 \pm 0,92\%$  para ACPase de Trigo, e para ACPase de Batata foi de  $2,46 \pm 0,80\%$ , mesmo o processo ocorrendo em pH ácido, ou seja, na faixa de maior estabilidade das fosfatases ácidas.

Com objetivo de obter diferentes orientações das enzimas, e levando em consideração uma imobilização mais suave mediante ligações covalentes, foram utilizados os suportes Glioxil Agarose 6BC com duas estratégias. A primeira imobilização foi realizada em pH 8,5 e temperatura ambiente, para que a ligação covalente fosse unipontual, e a segunda em pH 10,0, e nas mesmas condições de temperatura, porém, com esta ocorreria uma intensa união covalente multipontual entre as lisinas da superfície da enzima e os grupos glioxil do suporte (GUISAN et al., 2001).

Ambas as enzimas não tiveram resultados satisfatórios nesses suportes, em pH 8,5 o rendimento foi de  $1,79 \pm 0,84\%$  para ACPase de Trigo, e  $0,95 \pm 0,33\%$  para ACPase de Batata, depois de 24 h de imobilização. Também foi notada uma redução na atividade expressada final de 36% e 61% para as ACPases de Trigo e Batata, respectivamente. A segunda estratégia, cujas imobilizações foram feitas em pH 10, houve precipitação e mudança de cor para ambas enzimas. Não foi possível quantificar as atividades do controle nem da suspensão enzima/suporte, fato que deixa comprovado que o pH 10 degradou a fosfatase ácida. Os pesquisadores KALITA e AMBASHT (2019) imobilizando a ACPase de trigo germinado Tipo-1 em gel de agarose estudaram a estabilidade frente ao pH da enzima solúvel e imobilizada. Os pH ótimos observados foram 5,0 e 5,5, para as enzimas solúvel e imobilizada, respectivamente. Este aumento no pH ótimo também foi observado nos trabalhos de (HUANG et al., 2005; BELHO et al., 2014).

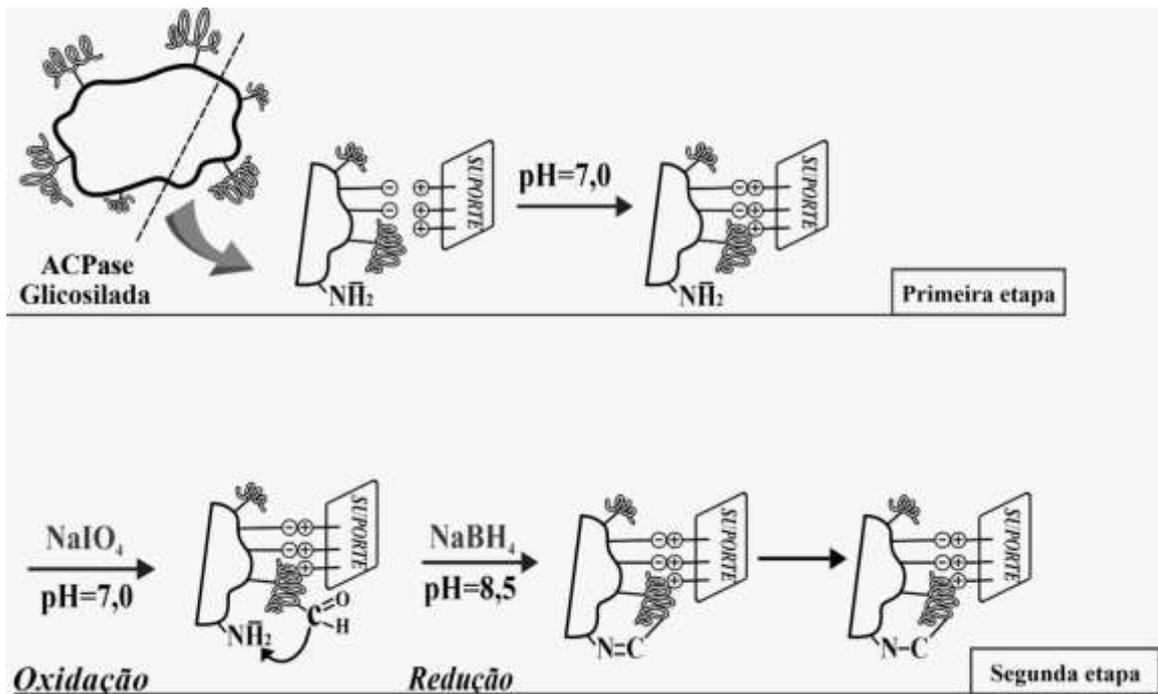
Também foram testados suportes Glioxil agarose, porém agora com dois diâmetros de poros (esferas de agarose de 4BCL e 6BCL) revestida com PEI (polietilenoimina) também de diferentes tamanhos. Aproximadamente, 91% de ACPase de trigo foi imobilizada em Ag6-PEI, retendo 41% de sua atividade catalítica inicial (Tabela 4.7). Ao usar suportes de agarose com um diâmetro de poro menor, o rendimento de imobilização permaneceu próximo de 96%, porém, a atividade recuperada reduziu para  $8,5 \pm 2,45\%$ . A imobilização da ACPase de batata mostrou a mesma tendência, porém, com atividade recuperada menor que a de trigo. Esses piores resultados, provavelmente, decorrem do maior tamanho do ACPase de batata (96 kDa), que dificulta a difusão dentro da estrutura porosa.

A fim de coimobilizar as enzimas glicosiltransferase (UGT) e sacarose sintase (SuSy) usando suportes Glx.Ag-PEI (mesma metodologia deste trabalho, mas com 25kDa PEI), TROBO-MASEDA et al., 2020 relatam 76% de imobilização, e 90% de recuperação de atividade inicial, após 2 horas para UGT, e, aproximadamente, 90% de SuSyAc foi imobilizado, com 100% de retenção de sua atividade catalítica inicial. Também, evidenciaram que ao usar suportes de agarose com um diâmetro de poro menor, o rendimento da imobilização diminui de 90% para 30% e a atividade recuperada foi desprezível para a SuSyAc. Este resultado provavelmente se deve ao grande tamanho do SuSyAc (homotetrâmero de 367 kDa), que dificulta a difusão dentro da estrutura porosa.

#### **4.4.2 Melhoramento dos derivados imobilizados**

Uma segunda etapa foi introduzida para aprimorar o biocatalisador Toyopearl visando melhor estabilidade em condições de alta temperatura (60 °C) (Figura 4.44). O derivado enzimático foi submetido à oxidação com periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ), por 60 minutos, e redução com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) por 30 minutos nesta etapa. A oxidação da enzima com periodato não interfere negativamente na atividade enzimática, mas o borohidreto, em concentrações superiores a 0,1 mg/mL, pode causar perda de atividade da enzima em estudo.

A presença de grupos aldeídos e amina foram analisados no derivado de Toyopearl bruto, oxidado e reduzido. Para avaliar a presença de grupos amina no biocatalisador foram realizados alguns tratamentos com solução picrilsulfônica. O tingimento do biocatalisador com pigmentação laranja-amarelo foi indicativo de grupos amina livres na superfície da enzima. O reagente de Schiff também foi utilizado para verificar grupos aldeídos, quando o tingimento do derivado com pigmentação roxo-rosa indicava grupos aldeídos livres na superfície da enzima.

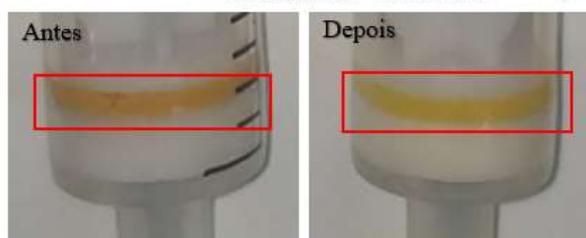


**Figura 4.44** – Mecanismo de adsorção iônica das ACPases no suporte Toyopearl DEAE-650s. A imobilização da primeira etapa foi realizada usando 25 mM, pH 7,0 de tampão cloridrato de Triza. A segunda etapa foi a oxidação e redução das cadeias glicosídicas da ACPase no derivado.

Uma vez que a solução picrilsulfônica adicionada aos derivados imobilizados de ambas as ACPases foi observada, uma cor laranja indicou grupos amino primários livres na superfície de suporte (Figura 4.45). Ambos os produtos pareceram amarelos após a etapa de oxidação e redução, indicando que os grupos amina formaram os crosslinks aldeído-amina.

Depois de adicionar o reagente de Schiff (Figura 4.46), os derivados imobilizados antes da oxidação não mostraram nenhum tingimento em rosa / roxo devido à ausência de grupos aldeído na superfície da enzima, seja para ACPase de trigo germinado ou para a de batata. Após oxidação das cadeias de glicosila com periodato, estabeleceu-se roxo intenso em ambos os casos, indicando presença significativa de grupos aldeídos. Após a redução com borohidreto, os derivados enzimáticos foram fracamente tingidos de rosa, mostrando que esta etapa converte o aldeído não ligado remanescente em grupos hidroxila. Os resultados mostram que a etapa de oxidação e redução após a imobilização das ACPases estudadas no suporte Toyopearl contribui para a estabilidade térmica dos derivados devido à formação de reticulações aldeído-amina.

A - Derivado de Toyopearl - ACPase de trigo germinado



B - Derivado de Toyopearl - ACPase de batata



**Figura 4.45** – ACPases imobilizadas em Toyopearl tratadas com solução de pycrilsulfonic. A: ACPase de derivado de trigo germinado antes e depois de oxidado e reduzido; B: ACPase de derivado de batata antes e depois de oxidado e reduzido.

A – Derivado de Toyopearl - ACPase de trigo germinado



B – Derivado de Toyopearl - ACPase de batata

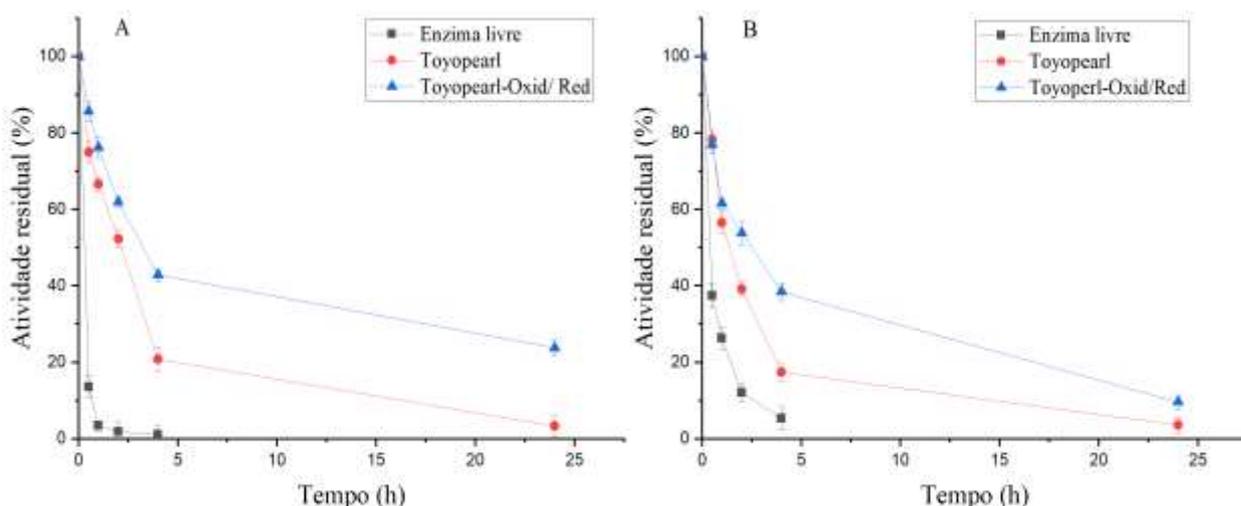


**Figura 4.46** - ACPases imobilizadas em Toyopearl tratadas com reagente de Schiff. A: ACPase de trigo germinado; B: ACPase de batata. 1: derivados de ACPases imobilizados; 2: derivados de ACPases oxidados; 3: Derivados de ACPases oxidados e reduzidos.

Considerando que ambas as enzimas solúveis (trigo germinado e batata) são muito instáveis a esta temperatura, com meia-vida inferior a 10 minutos, esta estratégia mostra um

aumento da estabilidade térmica após a imobilização (Figura 4.47). Uma melhoria significativa foi observada para o derivado enzimático de trigo germinado, (Figura 4.47 (A)). Ambos os biocatalisadores apresentaram atividade residual, após 1 hora de inativação, fato não observado para a enzima livre. O derivado ACPase de trigo germinado apresentou atividades residuais de 66,7% e 76,2%, para o derivado imobilizado e para o derivado oxidados/reduzidos, respectivamente. O derivado oxidado/reduzido foi o melhor para ambos os casos, apresentando considerável atividade após 24 horas a 60 °C.

A Figura 4.47 (B) mostra os resultados relativos à imobilização da ACPase de batata. Os biocatalisadores de batata também apresentaram resultados produtivos, mas ligeiramente inferiores quando comparados ao trigo germinado. Após uma hora de inativação a 60 °C, o derivado imobilizado exibiu 56,5% de atividade residual, e o derivado posteriormente oxidado e reduzido 61,5%. Também é perceptível que em todos os momentos analisados a atividade do biocatalisador oxidado e reduzido foi maior do que o biocatalisador apenas imobilizado. Uma possível explicação para a maior estabilidade do derivado, após oxidação e redução, seria devido ao *crosslink* entre os grupos aldeído gerados na oxidação e os grupos amino das enzimas.



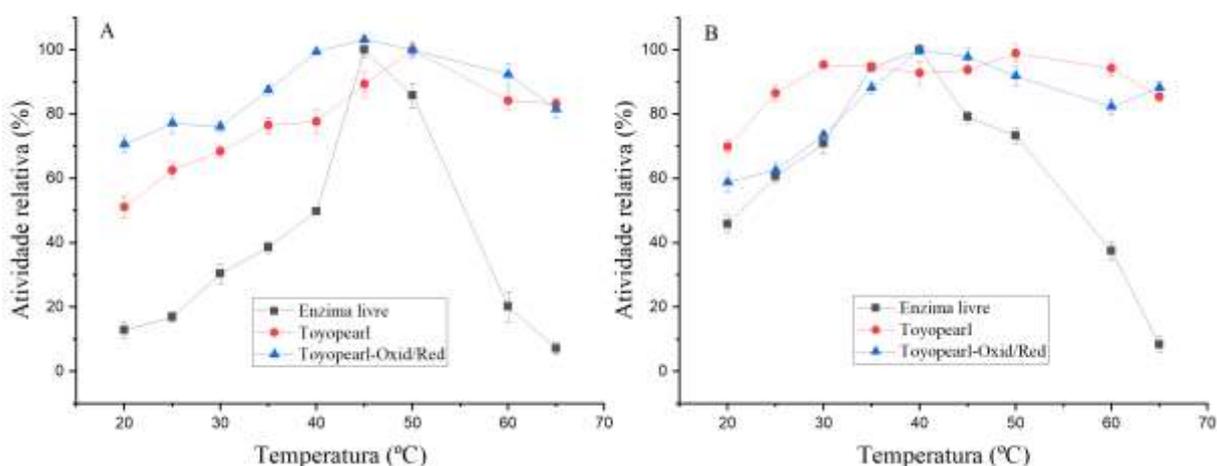
**Figura 4.47** – Perfil de inativação térmica a 60 °C e pH 7,0 do biocatalisador: (A) ACPase de trigo germinado e (B) ACPase de batata - (■) enzima livre, (●) enzima apenas imobilizada em Toyopearl DEAE-650s, (▲) enzima imobilizada em Toyopearl DEAE-650s e também oxidada e reduzida.

PINOTTI et al. (2020) observaram o mesmo comportamento com  $\beta$ -glucosidase glicosilada. No entanto, a oxidação e redução da enzima foram feitas antes da imobilização. Esses autores também notaram que após a oxidação com periodato e redução com borohidreto,

as cadeias de glicosídeos foram convertidas em poli-hidroxila, com baixo efeito na estabilidade da enzima.

Quando as reações enzimáticas foram realizadas em diferentes condições de temperatura, a ACPase imobilizada de trigo germinado apresentou temperatura ótima, em torno, de 50 °C para ambos, derivado imobilizado e oxidado/reduzido (Figura 4.48 (A)). Essas temperaturas ótimas são superiores às obtidas para a enzima livre, e apresentaram atividade relativa de 70%, ou mais, em temperaturas acima de 40 °C. O mesmo comportamento foi observado por KALITA e AMBASHT (2019), os pesquisadores relataram um aumento de 50 °C (enzima solúvel) para 60 °C (enzima imobilizada), na temperatura ótima de uma ACPase de trigo germinado. Para a ACPase de batata, a temperatura ótima para o derivado oxidado e reduzido foi igual à observada para a enzima livre, em torno de 45 °C. Para o derivado imobilizado, a temperatura ótima foi aumentada em 5 °C (Figura 4.48 (B)).

O biocatalisador ACPase de batata também apresentou maior atividade relativa em temperaturas acima de 35 °C. O aumento na temperatura ótima da ACPase imobilizada em relação a ACPase livre, também foi relatado na literatura por ZHU et al. (2010) e SRIVASTAVA e ANAND (2014). O motivo da maior temperatura ótima da ACPase imobilizada pode ser devido a mudanças na conformação da enzima, após a imobilização ou limitações difusional do substrato para o sítio ativo da enzima (REDDY e KAYASTHA, 2006).



**Figura 4.48** – Influência da temperatura na atividade de: (A) ACPase de trigo germinado e (B) ACPase de batata - (■) enzima livre; (●) enzima apenas imobilizada em Toyopearl DEAE-650s; (▲) enzima imobilizada em Toyopearl DEAE-650s e também oxidada e reduzida.

#### 4.4.3 Imobilização das ACPases produzidas pelas cepas de *Trichoderma*.

Nesta seção estão os resultados referentes a imobilização dos extratos enzimáticos produzidos pelas cepas de *Trichoderma* em meios de cultivo sintético e também a base de melaço de soja. Os suportes com melhores desempenhos testados na seção 4.4.1, foram utilizados para imobilizar as fosfatases ácidas dos extratos enzimáticos que tiveram melhores resultados de atividade enzimática das seções 4.2 e 4.3.

**Tabela 4.8** – Imobilização das fosfatases produzidas pelas cepas de *Trichoderma* nos suportes de troca iônica.

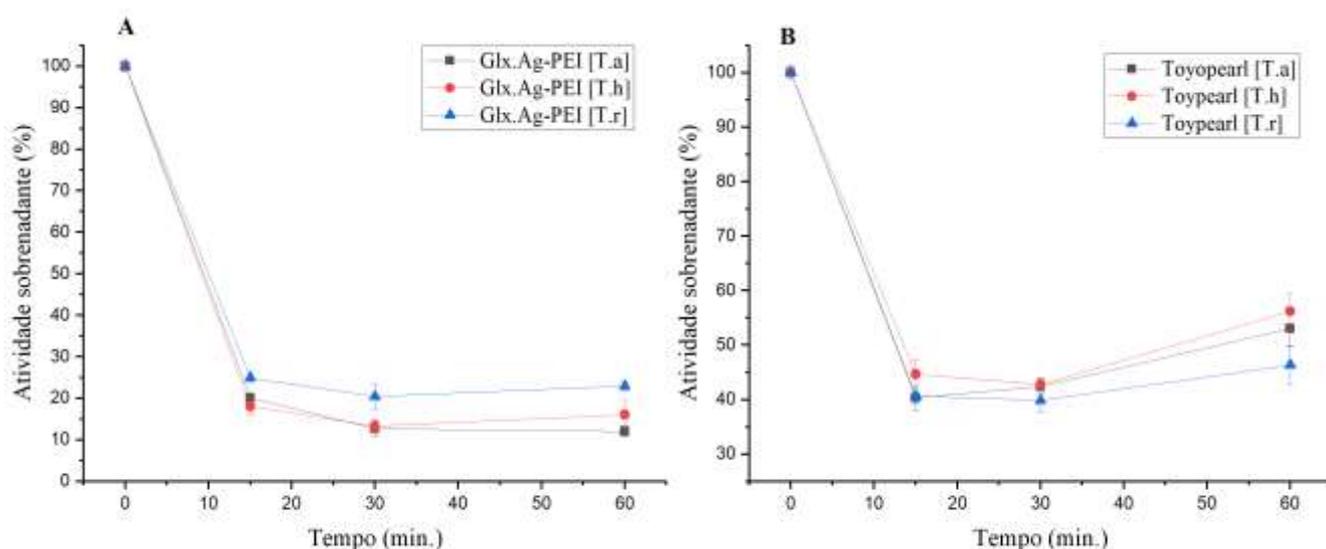
Microrganismos	Meio de cultivo	Tempo de incubação (min)	TOYOPEARL <sup>1</sup>		GLX.AG-PEI <sup>2</sup>	
			IMOBILIZAÇÃO		IMOBILIZAÇÃO	
			Rendimento (%)	Atividade expressada (%)	Rendimento (%)	Atividade expressada (%)
<i>Trichoderma asperellum</i>	MS75	30 <sup>1</sup> e 60 <sup>2</sup>	57,56	52,06	88,03	81,07
<i>Trichoderma harzianum</i>	MS100	30 <sup>1</sup> e 60 <sup>2</sup>	55,26	52,64	83,62	73,79
<i>Trichoderma reesei</i>	MS75	30 <sup>1</sup> e 60 <sup>2</sup>	60,16	54,29	77,06	63,95
<i>Trichoderma asperellum</i>	Sintétic. Ta*	30 <sup>1</sup> e 30 <sup>2</sup>	72,34	73,88	90,24	85,84
<i>Trichoderma harzianum</i>	Sintétic. Th*	30 <sup>1</sup> e 30 <sup>2</sup>	68,75	53,71	91,38	31,51
<i>Trichoderma reesei</i>	Sintétic. Tr*	60 <sup>1</sup> e 60 <sup>2</sup>	39,84	45,13	90,55	51,34

Notação: (1) refere a imobilização com no suporte DEAE Toyopearl 650s; (2) refere a imobilização no suporte Glyoxyl agarose com PEI 600-1000KDa; (\*) Meio de cultivo Sintético (seção 4.2.4) otimizados pelo PCC para cada microrganismo.

Primeiramente foram apresentados os resultados da imobilização dos extratos enzimáticos de melaço de soja. É possível notar que a imobilização por troca iônica tem uma grande vantagem relacionada ao tempo de imobilização. Tal fato é observado na (Figura 4.49 (A)), mostrando a atividade enzimática do sobrenadante durante 1 hora do processo, tempo suficiente para a imobilização em ambos os suportes. O suporte Glx.Ag-PEI, em geral, foi mais eficiente e estável do que Toyopearl para todos os extratos enzimáticos produzidos, com destaque para o extrato enzimático de *Trichoderma asperellum* (Tabela 4.8) que apresentou rendimento de 88% e recuperação de 81% do inicial atividade. Este fato pode ser explicado pelo fato desse suporte possuir uma longa cadeia do polímero PEI (600-1000 KDa), com os grupos amina e dois espaçadores de carbono alifáticos como unidade repetitiva (monômeros).

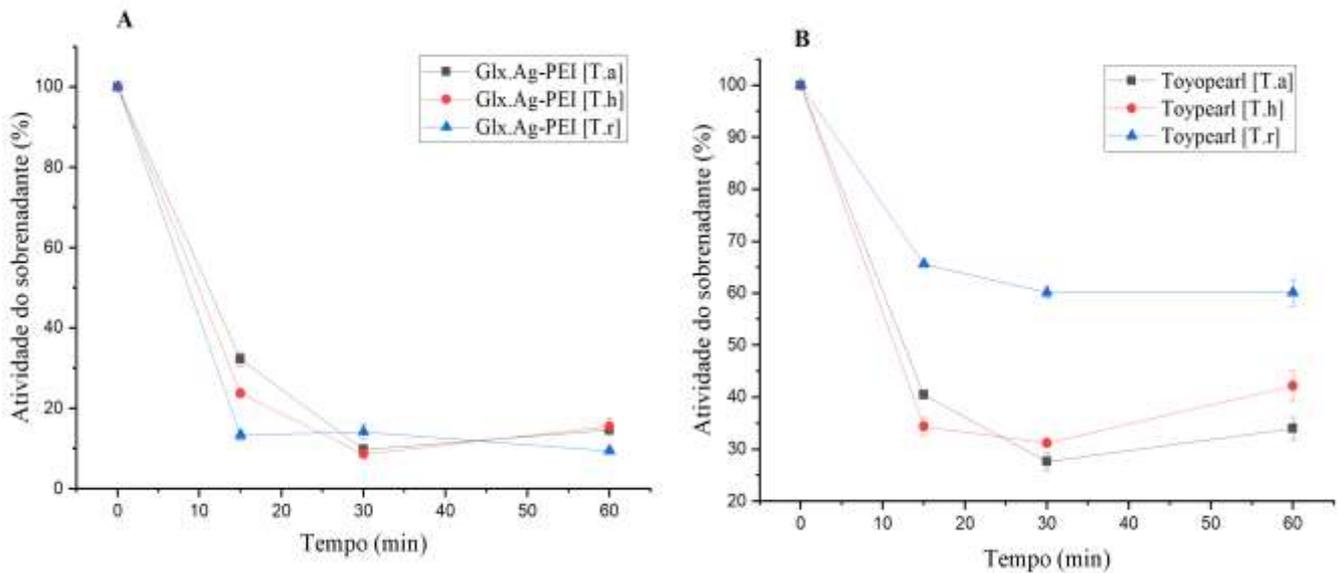
Esta longa cadeia se entrelaça, facilitando o encontro iônico das cargas positivas do polímero com as negativas da enzima.

As imobilizações com o suporte DEAE Toyoperl 650s ocorrem na superfície externa, onde cargas positivas são ativadas quando está em pH 7. O processo foi estável nos primeiros 30 minutos (Figura 4.49 (B)) e então ocorreu uma dessorção, aumentando assim a atividade do sobrenadante para todos os casos testados. O melhor resultado foi para o extrato enzimático de *Trichoderma reesei* com rendimento de 60,16% e atividade recuperada de 54,29% (Tabela 4.8).



**Figura 4.49** – Perfil de imobilização do extrato enzimático de meloço de soja nos suportes: (A) Glioxil Agarose PEI (600-1000KDa); (B) DEAE Toyoperl 650s.

As imobilizações dos extratos enzimáticos provenientes das fermentações submersas com os meios de cultivo sintéticos (seção 4.2.4) tiveram resultados parecidos com às imobilizações dos extratos enzimáticos do meloço de soja. O suporte Glx.Ag-PEI também foi o mais eficiente e estável para todos extratos dos meios sintéticos quando comparado com o Toyoperl. Destaque para *Trichoderma asperellum* que apresentou rendimento maior que 90% e atividade final recuperada de aproximadamente 85%. A imobilizações deste extrato enzimático com o suporte Toyoperl também apresentaram dessorção depois de 30 minutos (Figura 4.50 (B)) para *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*. Destaque para este último, com rendimento e atividade recuperada em torno de 70% (Tabela 4.8). O *Trichoderma reesei* teve o pior desempenho apresentado, visto nitidamente na (Figura 4.50 (B)), com rendimento de aproximadamente 40% e atividade recuperada de 45%.



**Figura 4.50** – Perfil de imobilização do extrato enzimático dos meios sintéticos nos suportes: (A) Glioxil Agarose PEI (600-1000KDa); (B) DEAE Toyopearl 650s.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- Os testes preliminares foram fundamentais para definir os meios de cultivo específicos para produção da fosfatase ácida, e, também, condições para Planejamento Composto Central. Nessa etapa foi possível verificar o potencial de produção enzimática das três cepas de *Trichoderma*. Observou-se o halo hidrolítico para protease, celulase e pectinase em todos microrganismos. Apenas no meio seletivo para amilase não foi observado este halo, porém, houve crescimento micelial para todos fungos. Também, foi analisado o potencial de produção da fosfatase ácida, e definiu-se o meio MC-2 com o reagente  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para ser otimizado pelo PCC, para cada cepa de *Trichoderma*.
- Com o Planejamento Composto Central foi possível desenvolver equações de atividade da fosfatase ácida (U/mL) para cada microrganismo, usando como parâmetro os 3 reagentes do meio de cultivo que são: sacarose (g/L), extrato de levedura (g/L) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L).
- Os melhores resultados foram para o *Trichoderma reesei*. O meio de cultura que maximiza a atividade enzimática estava nas faixas de concentrações (g/L): [20,0 – 26,0] de sacarose, [6,0 – 9,5] de extrato de levedura e [1,6 – 2,0] de fosfato de potássio monobásico. Optou-

se por trabalhar com o meio composto de 23,4 g/L de sacarose, 8,0 g/L de extrato de levedura e 1,84 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . O crescimento da biomassa celular e a atividade enzimática chegaram a um valor final médio de  $5,32 \pm 0,48$  g/L, e  $1,96 \pm 0,14$  U/mL, respectivamente. O consumo da sacarose e glicose ocorreu por completo, e depois de decorridas 48h de fermentação enquanto a frutose registrou resíduos mínimos de aproximadamente 0,5 g/L no final do processo.

- Conforme o PCC, o fungo *Trichoderma harzianum* teve potencial de produção da enzima intermediário, quando comparado com os outros microrganismos. As maiores atividades da fosfatase ácida produzidas por este microrganismo foram para as faixas de concentrações (g/L): [14,5 – 22,0] de sacarose, [3,5 – 7,0] de extrato de levedura e [0,6 – 1,1] de fosfato de potássio monobásico. Portanto, o meio selecionado foi composto de 18,0 g/L de sacarose, 5,0 g/L de extrato de levedura e 0,8 g/L de fosfato de potássio monobásico. As cinéticas de crescimento celular e atividade enzimática chegando a um valor final médio de  $3,58 \pm 0,27$  g/L e  $0,81 \pm 0,05$  U/mL, respectivamente.
- O meio de cultivo para *Trichoderma asperellum*, que maximiza a atividade da fosfatase ácida, estava nas faixas de concentrações (g/L): [11,0 - 17,5] de sacarose, [6 - 10,5] de extrato de levedura e [0 - 0,2] de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Optou-se por trabalhar com o meio de cultura suplementado composto de 15,0 g/L sacarose, 8,0 g/L de extrato de levedura e 0,2 g/L de fosfato de potássio monobásico. As cinéticas de crescimento celular e atividade enzimática chegaram a um valor final médio de  $3,81 \pm 0,35$  g/L e  $0,76 \pm 0,12$  U/mL.
- Os resultados referentes a fermentação utilizando o melaço de soja (sem tratamento), como única fonte nutritiva, mostraram que os microrganismos, de modo geral, preferiram os meios MS50 e MS75, com 50 e 75 g/L de melaço de soja. O *Trichoderma reesei* apresentou melhor desempenho para crescimento celular médio final com  $6,55 \pm 0,09$  (g/L) e  $6,82 \pm 0,43$  (g/L) para os meios MS50 e MS75, respectivamente. As maiores atividades enzimáticas foram nas fermentações utilizando os meios de cultura MS75 e MS100 e o microrganismo que mais se destacou foi *Trichoderma harzianum* apresentando atividade enzimática final média de  $3,16 \pm 0,08$  (U/mL) e  $4,15 \pm 0,14$  (U/mL), respectivamente.

- Os resultados referentes ao tratamento ácido de precipitação do melaço de soja, mostraram comportamento similar às fermentações sem tratamento. O microrganismo *Trichoderma asperellum* destacou-se por apresentar biomassa celular média final de  $5,52 \pm 0,085$  (g/L) no meio MS50 e  $5,43 \pm 0,533$  (g/L) no meio MS75. Os maiores valores de atividade da fosfatase ácida foram para os meios de cultivo MS75 e MS100 com destaque para os microrganismos *T. harzianum* e *T. reesei* que apresentaram resultados próximos a 2,50 U/mL no meio MS100.
- As ACPases comerciais de trigo germinado e de batata mostraram estáveis nas suas formas livres em pH 7,0 e 5,0 e temperatura de 25 °C. Outro fator relevante a se considerar é o pH 10,0 que ocasionou a desnaturação das enzimas, fazendo com que elas mudassem de cor e precipitassem. Esses parâmetros facilitaram a escolha do suporte, e condições de imobilização.
- Pode-se observar que os melhores resultados de imobilização foram encontrados para ACPase Trigo. O suporte com maior destaque para ambas enzimas foi o DEAE Toyoperl 650s. ACPase de Trigo atingiu um rendimento de imobilização de  $97,34 \pm 0,34\%$ , conservando aproximadamente 96,00% da atividade inicial, enquanto ACPase de Batata teve um rendimento de  $95,68 \pm 2,59\%$ , e conservou  $85,27 \pm 2,27\%$  da atividade inicial. A imobilização neste suporte é mais branda, porque os grupos reativos dele estão na superfície externa, tal fato promove uma atração rápida (em média de 15 minutos para ambas as enzimas) e eficiente.
- A segunda etapa da imobilização (oxidação com  $\text{NaIO}_4$  e redução com  $\text{NaBH}_4$ ) melhorou ambos biocatalisadores em relação a resistência térmica a 60 °C. Ambos os biocatalisadores apresentaram atividade residual após 1 hora de inativação, fato não observado para a enzima livre.
- O derivado ACPase de trigo germinado apresentou atividades residuais de 66,7% e 76,2% para o derivado imobilizado, e para o derivado oxidados/reduzidos, respectivamente.
- Os biocatalisadores de batata também apresentaram resultados produtivos, mas ligeiramente inferiores quando comparados ao trigo germinado. Após uma hora de

inativação a 60 °C, o derivado imobilizado exibiu 56,5% de atividade residual, e o derivado posteriormente oxidado e reduzido 61,5%.

- As temperaturas ótimas para ambos derivados são superiores às obtidas para a enzima livre. O biocatalisador de trigo germinado destacou-se apresentando atividade relativa de 70%, ou mais, em temperaturas acima de 40 °C.
- A imobilização dos extratos enzimáticos produzidos pelas cepas de *Trichoderma* tiveram melhor desempenho no suporte Glioxil Agarose com PEI de 600-1000 KDa. O destaque foi para o *Trichoderma asperellum* com rendimento de 88% e atividade da ACPase recuperada de 81% para os extratos de melão de soja e rendimento de 90% com atividade de ACPase recuperada de 85% para os extratos dos meios de cultivo sintético.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a produção de ACPases em grão de trigo, milho e soja germinados.
- Estudar a produção de ACPases das cepas de *Trichoderma* em fermentação no estado sólido, utilizando o trigo, milho, batata, batata doce e concentrado de soja.
- Estudar técnicas de extração e purificação das ACPases produzidas por FES.
- Aplicar as ACPases produzidas pelas cepas de *Trichoderma*, e também os derivados imobilizados no crescimento de raízes, como por exemplo, no crescimento de raízes de *Arabidopsis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, S. B. P.; MARCHIORO, M. L. K.; SANTOS, V. A. Q.; CALEGARI, G. C.; LAFAY, C. B. B.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CUNHA, M. A. A. Valorization of soybean molasses as fermentation substrate for the production of microbial exocellular  $\beta$ -Glucan. *Journal of Polymers and the Environment*, 28:2149-2160, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01758-z>

AGUIRRE-GARCÍA, M. M.; OKHUYSEN, C. P. *Cryptosporidium parvum*: identification and characterization of an acid phosphatase. *Parasitology Research*, v.101, p. 85-89, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0457-8>

AKUJOBI, C. O.; ODU, N. N.; OKORONDU, S. I.; IKE, G. N. Production of protease by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from abattoir environment. *Journal of Research in Biology*. 2012; 2(2):077-082.

ALEKSIEVA, P.; SPASOVA, D.; RADOEVSKA, S. Acid phosphatase distribution and localization in the fungus *Humicola lutes*. *Z Naturforsch C*. 2003; 58:239-243. PMID: 12710735. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-3-417>

ALMEIDA, A. F. D.; TERRASAN, C. R. F.; TERRONE, C. C.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support. Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. *Process Biochem*, v.65, p.71-80, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.019>

ALMEIDA, E. C. C.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; BRANCO, L. R. R. C.; PINHO, R. T. Método e kit aplicados à detecção de Doença de Chagas em saliva. Patente número: PI0000886-9, 2000.

AL-OMAR, M. A. Purification and Biochemical Characterization of acid phosphatase from *Vigna aconitifolia*. *Plant Physiol*. v.5, p.361-370, 2010 <https://doi.org/10.3923/ajpp.2010.361.370>

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* sp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002; 33(4):325-330. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000400009>

AMBASHT, P. K.; KALITA, T. Immobilization and characterization of acid phosphatase from wheat germ (Type I) in agarose gel. *Journal of Proteins and Proteomics*, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42485-019-00023-9>

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

AMOOZADEH, M.; BEHBAHANI, M.; MOHABATKAR, H.; KEYHANFAR, M. Analysis and comparison of alkaline and acid phosphatases of Gram-negative bacteria by bioinformatic and colorimetric methods. *Journal of Biotechnology*, 308, 56-62, 2020. ISSN 0168-1656. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.11.002>

ANAND, A.; SRIVASTAVA, P. K. A Molecular Description of Acid Phosphatase. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012; 167(8):2174-97. doi: 10.1007/s12010-012-9694-8 PMID: 22684363. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9694-8>

ANAND, A.; SRIVASTAVA, P. K. A. Immobilization of acid phosphatase from *Vigna aconitifolia* seeds on chitosan beads and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.64, p. 150-154, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.11.023>

ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; DOS SANTOS, J. C.; MILESSI, T. S. S.; PERES, G.F. D.; DA SILVA, S. S. Hemicellulosic ethanol production in fluidized bed reactor from sugar cane bagasse hydrolysate: interplay among carrier concentration and aeration rate. *ACS Sustainable Chemistry e Engineering*; v. 5, n. 9, p. 8250-8259, 2017. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01916>

ARAÚJO, T. R. Reaproveitamento de glicerol para produção de bioprodutos: biopolímeros. 82f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

ARAÚJO, T. R. Reaproveitamento de glicerol e casca de manga Tommy Atkins para produção de biopolímeros. Dissertação de doutorado. Universidade federal de Uberlândia. Uberlândia, 2019.

AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatase: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*. v. 26, n. 6 p. 896-900. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600019>

- AZEEM, M. R. A.; CHAUDHARY, A. N.; HAYAT, R.; HUSSAIN, Q.; TAHIR, M. I.; IMRAN, M. Microbial phytase activity and their role in organic P mineralization. Archives of Agronomy and Soil Science. 2014; 6:751-766. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.963796>
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology. v. 3, p. 1-36, 2001. <https://doi.org/10.2225/vol3-issue1-fulltext-4>
- BADER, A. N.; SALERNO, G. L.; COVACEVICH, F.; CONSOLO, V. F. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Journal of King Saud University - Science, v. 32, p. 867-873, 2020, ISSN 1018-3647, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>
- BALI, A. e SATYNARAYNA, T. Microbial phytases in nutrition and combating phosphorus pollution. Everyman`s Science, v. 4, p. 207-209, 2001.
- BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. Waste Management, v.32, p.1341-1346, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>
- BARROSO, C.B.; PEREIRA, G.T.; NAHAS, E. Solubilization of  $\text{CaHPO}_4$  and  $\text{AlPO}_4$  by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. Brazilian Journal of Microbiology, v. 37. p. 434-438, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400006>
- BATALLA, P., FUENTES, M., MATEO, C., GRAZU, V., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUIBAN, J. M. Covalent immobilization of antibodies on finally inert support surfaces through their surface regions having the highest densities in carboxyl groups. Biomacromolecules, 9(8): p. 2230-2236, 2008. <https://doi.org/10.1021/bm8003594>
- BAYRAMOGLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAŞ, G.; ARICA, M.Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. Process Biochemistry, v. 46, p. 372 - 378, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.014>
- BEHERA, B. C.; YADAV, H.; SINGH, S. K.; MISHRA, R. R.; SETHI, B. H.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated

from mangrove soil of Mahanadi river delta, Oisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v.15, p.169-179, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>

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. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>

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. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>

BECKER, D., RODRIGUEZ-MOZAZ, S., INSA, S., SCHOEVAART, R., BARCELÓ, D., DE CAZES, M., et al. Removal of endocrine disrupting chemicals in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccases. *Org. Process. Res. Dev.* v.21, p. 480-491. 2017 <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00361>

BELHO, K.; NONPIUR, S. R.; AMBASHT, P. K. Immobilization of acid phosphatase (Type I) from wheat germ on glutaraldehyde activated chitosan beads: optimization and characterization. *J Proteins Proteom* v.4, p. 177–183, 2014.

BERNARD, M.; MOUYNA, I.; DUBREUCQ, G.; DEBEAUPUIS, J-P.; FONTAINE, T.; VORGIAS, C.; FUGLSANG, C.; LATGE, J-P. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, v. 148, p. 2819-2829, 2002. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2819>

BIZ, A.; FINKLER, A. T. J.; PITOL, L. O.; MEDINA, B. S.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 111, 54-62, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.007>

BOLIVAR, J.M., LÓPEZ-GALLEGO, F., GODOY, C., RODRIGUES, D. S., RODRIGUES, R. C., BATALLA, P., ROCHA-MARTÍN, J., MATEO, C., GIORDANO, R. L. C. AND GUISÁN, J. M. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent

attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 477-483, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.001>

BOTTINI, N.; GLORIA-BOTTINI, F.; BORGIANI, P.; ANTONACCI, E.; LUCARELLI, P.; BOTTINI, E.; *Metab. Clin. Exp.* 2004, 53, 995. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.03.006>

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p.93-99, 1987.  
<https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>

BON, E. P. S.; COSTA, R. B.; DA SILVA, M. V. A.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; FREITAS, S. P.; FERRARA, M. A. Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M.L. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, p. 433-488.

BOYCE, A.; WALSH, G. Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis*. *J Biotechnol.* 2007; 132(1):82-87.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.028>

BUCHERT, J.; HEIKINHEIMO, L. New cellulase processes for the textile industry. EU—project report. *Carbohydr Eur.*1998; 22:32–34.

BUCHHOLZ, K. *Characterization of Immobilized Biocatalysts*. Weinheim: VCH, 1979.

BULL, H.; MURRAY, P. G.; THOMAS, D.; FRASER, A. M.; NELSON, P. N. Acid phosphatase. *J. Clin. Pathol: Mol Pathol*, v. 55, p. 65-72, 2002.  
<https://doi.org/10.1136/mp.55.2.65>

CABRAL, B. V. Biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática por *Trichoderma harzianum* em diferentes reatores. Dissertação de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

CALDAS, E. M., NOVATZKY, D., DEON, M., DE MENEZES, E.W., HERTZ, P. F., COSTA, T. M. H. Pore size effect in the amount of immobilized enzyme for manufacturing carbon ceramic biosensor. *Micropor. Mesopor. Mat.* v. 247, p. 95-102. 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.03.051>

- CAMEOTRA, S. S., MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, p.520-529, 1998. <https://doi.org/10.1007/s002530051329>
- CAO, L. Immobilized enzymes: science or art. *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 9, p. 217-226, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.014>
- CASAL, E.; CORZO, N.; MORENO F.J.; OLANO, A. *Journal Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1201. <https://doi.org/10.1021/jf040256e>
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p.181-188, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031>
- CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; DIAS, F. F.G.; SATO, H. H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.4, p.678-684, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.010>
- CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology*, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>
- CHAFIK, A.; ESSAMADI, A.; ÇELIK, S. Y.; MAVI. A. A novel acid phosphatase from cactus (*Opuntia megacantha* Salm-Dyck) cladodes: Purification and biochemical characterization of the enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 991-999, 2020. ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.175>.
- CHANG, R.; GOLDSBY, K. *Química*. AMGH EDITORA LTDA, uma parceria entre GRUPO A EDUCAÇÃO S.A. e MCGRAW-HILL EDUCATION, 2013.
- CHEN, B.; WU, Q.; XU, Y. Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid-state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*, v.179, p.80-84, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.011>

CHEN, C. C.; GU, Y. Enhancing the sensitivity and stability of HRP/PANI/Pt electrode by implanted bovine serum albumin. *Biosensors and Bioelectronics*, v.23, n.6, p.765 - 770, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.08.014>

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T.; MORY, T. Introduction. In: *Immobilized Enzymes – Research and Development*, New York: John Wiley e Sons, cap 1, p. 1-8, 1978.

CLELAND, W. Enzyme kinetics. *Annual review of biochemistry*, 36(1), p. 77-112, 1967.

<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.36.070167.000453>

DALSENTER, F. D. H. Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido. Universidade Federal do Paraná (UFPR), (Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica), 123p. 2005.

DAMASO, M.C.T., et al. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 39, p. 676, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000400015>

DAS, M., HARIDAS, M., SABU, A. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*v17, p. 177-183, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.021>.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.021>

DEB, P.; TALUKDAR, S. A.; MOHSINA, K.; SARKER, P. K.; SAYEM, S. M. A. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer plus*. 2013; 2:154-166. doi:10.1186/2193-1801-2-154.

<https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-154>

DENG, S.; LU, L.; LI, J.; DU, Z.; LIU, T.; LI, W.; XU, F.; SHI, L.; SHOU, H.; Wang, C. Purple acid phosphatase 10c encodes a major acid phosphatase that regulates plant growth under phosphate deficient conditions in rice. *J. Exp. Bot.* 71, 4321-4332, 2020. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa179>

<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa179>

DHILLON, G. S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products*, v. 34, n.1, p.1160-1167, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.001>

- DHILLON, G. S., KAUR, S., BRAR, S. K. In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using lac-case from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. *International Biodeterioration e Biodegradation*, v.72, p.67-75, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.012>
- DICKMAN, M. B. e YARDEN, O. Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in filamentous Fungi. *Fungal Genetic Biology*, v. 26, p. 99 - 117, 1999. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1118>
- DUFF, S. M. G.; SARATH, G.; PLAXTON, W. C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plant*, v.90, p.791-800, 1994. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1994.900424.x>
- DUTTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnology*, v.3 p.1-9, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- EL-BATAL, A. I.; ELKENAWY, N. M.; YASSIN, A. S.; AMIN, M. A. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnology Reports*, v.5, p.31-39, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.11.001>
- FARINAS, C. S. et al. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. In: NAIME, J. de M. et al. *Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura*. 1ed. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 211-241, 2014.
- FEDER, D.; MCGEARY, R. P.; MITIĆ, N.; LONHIENNE, T.; FURTADO, A.; SCHULZ, B. L.; HENRY, R. J.; SCHMIDT, S.; GUDDAT, L. W.; SCHENK, G. Structural elements that modulate the substrate specificity of plant purple acid phosphatases: Avenues for improved phosphorus acquisition in crops. *Plant Science*, 294, 2020, ISSN 0168-9452, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110445>.
- FERNANDES, L. A. ET AL. Frações de fosforo e atividade de fosfatase ácida em plantas de feijoeiro cultivadas em solo de várzea. *Ver. Bras. Ciência do Solo*. Brasília, v. 24, n. 3. P. 561-571, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000300010>

FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, (Tese de Doutorado), 2006.

FERNANDES, M. L. P.; VERÍSSIMO, L. A. A.; SOUZA, A. C.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Low-cost agro-industrial sources as a substrate for the production of l-asparaginase using filamentous fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 34, 2021, 102037, ISSN 1878-8181. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102037>

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de imobilização de enzimas. *Revista Processos Químicos*, v. 1, p. 53 - 58, 2010. <https://doi.org/10.19142/rpq.v4i7.107>

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; RUEDA, N.; BARTOLOME-CABRERO, R.; RODRIGUEZ, M. D.; ALBUQUERQUE, T. L.; DOS SANTOS, J. C. S.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUNTE, R. Improved immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl<sub>2</sub>. *Process Biochem* v.51, p.48-52, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.015>

FERRAREZI, A. L.; OHE, T. H. K.; BORGES, J. P.; BRITO, R. R.; SIQUEIRA, M. R.; VENDRAMINI, P. H. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.107, p.106-113, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.05.012>

FISHER, J. Hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada por reator de leito fixo. Pós-graduação em engenharia química, Universidade Federal de Uberlândia, (Tese de Mestrado), 2010.

FLORENCIO, C. et al. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. *Química Nova*, v. 40, n. 9, 2017.

FOY, R. H. e WITHERS, P. J. A. The contribution of agricultural phosphorus to eutrophication. *The Fertilizer Society Proceeding*, v. 365, p. 1-32, 1995.

FUJITA, J.; YAMANE, Y.; FUKUDA, H.; KIZAKI, Y.; WAKABAYASHI, S.; SIGHETA, S.; SUZUKI, O.; ONU, K. Production and properties of phytase and acid phosphatase from a sake

koji mold, *Aspergillus orisae*. Journal Bioscience and Bioengineering, v. 95(40), p. 348-353, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80066-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80066-X)

FURLANI, A. M. C. Nutrição mineral. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452p., 2004.

GARCÍA, T. A. N.; OLIVEIRA, M.; IRIBARNE, C.; LLUCH, C. Partial purification and characterization of a non-specific acid phosphatase in leaves and root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry, v.42, p.585-591, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.04.004>

GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Plant uptake of phosphorus from sparingly available P-source as affected by *Trichoderma asperellum* T34. Agricultural and Food Science, v. 24, p. 249-260, 2015. <https://doi.org/10.23986/afsci.49532>

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in oil-line high performance liquid chromatography: A review. Journal of Chromatography B, v. 819, n. 1, p. 3 -16, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.01.031>

GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O.L. T.; FREIRE, D. M. G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: Production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.38, p.945-953, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0865-8>

GOMES, E. V.; COSTA, M. N.; PAULA, R. G. AZEVEDO, R. R. SILVA, F. L.; NORONHA, E. F. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self-cell wall protection. Scientific Reports. 2015 Dec 9. doi: 10.1038/srep17998. <https://doi.org/10.1038/srep17998>

GRIFFIN, E. G.; NELSON, J. M. The influence of certain substances on the activity of invertase, J. Amer. Chem. Soc. V.38, p.722, 1916. <https://doi.org/10.1021/ja02260a027>

GUERRERO, C.; VERA, C.; SERNA, N.; ILLANES.; A. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. Bioresour Technol, v.232, p.53-63, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.003>

GUIMARÃES, L. H. S.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A.; LEONE, F. A.; POLIZELI, M. de L. T. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 40, p. 201-207, 2004. <https://doi.org/10.1042/BA20030208>

GUISAN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 1988. 10(6): p. 375-382. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90018-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90018-X)

GUISAN, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells*; Guisan J. M., ed.; Humana Press: Totowa, cap. 1, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9>

GUPTA, R., GAUTAM, S.; SHUKLA, R.; KUHAD, R.C. Study of charcoal detoxification of acid hydrolysate from corncob and its fermentation to xylitol. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 5, p. 4573- 4582, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.07.073>

GYANESHWAR. P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, v. 245, n.1, p.83-93, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1020663916259>

HAAS, H.; REDL, B.; LEITNER, E.; STOFFLER, G. *Penicillium chrysogenum* extracellular acid phosphatase: purification and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1074(3):392-397. PMID: 1909579. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90090-4)

HARMAN, GE, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I, LORITO M. *Trichoderma* sp.-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(1):43-56. PMID: 15035008. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>

HERCULANO, P. N.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S.; NEVES, R. P.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. F. Isolation of cellulolytic Fungi from Waste of Castor (*Ricinus communis* L.) *Current Microbiology*, v. 62, No. 5, p. 1416-1422, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9879-3>

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, v. 33, p. 163–173, 2008.

HUANG Q; LIANG W; CAI P. Adsorption, desorption and activities of acid phosphatase on various colloidal particles from an Ultisol. *Colloid Surf B* 45:209-214, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.08.011>

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride* IR05 in solid-state fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v.7, p.317-326, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.04.004>

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology*, v. 63, p. 1-91, 2009. <https://doi.org/10.3114/sim.2009.63.01>

JAKUBÍKOVÁ, L. et al. Conidiation of *Trichoderma atroviride* during submerged cultivation in a laboratory stirred-tank fermenter. *Folia Microbiologica, Praha*, v. 52, n. 3, p. 209-213, 2006. <https://doi.org/10.1007/BF02932124>

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. *Critical reviews in biotechnology*, v. 28, n. 4, p. 253 - 64, 2008. <https://doi.org/10.1080/07388550802428392>

JING, G.; LI, L.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Purification and partial characterization of two acid phosphatase forms from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 143, p. 229-235, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.11.008>

JUANG, R. S.; WU, F. C.; TSENG, R. L. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. *Bioresour. Technol.* v.80, p. 187-193, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00090-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00090-6)

KALITA, T.; P.K. AMBASHT. Immobilization and Characterization of acid phosphatase from wheat germ (Type 1) in agarose gel. *Journal of Protein and Proteomics*, v.10, p. 291-297, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42485-019-00023-9>

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazil J. Microbiol.*2010; 41(3):787-795. PMID: 24031556. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010005000001>

KAUR, S.; DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; CHAUHAN, V. B. Carbohydrate degrading

enzyme production by plant pathogenic mycelia and microsclerotia isolates of *Macrophomina phaseolina* through koji fermentation. *Industrial Crops and Products*, v.36, p.140-148, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.08.020>

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. N. Immobilization of enzymes on transition metal-activated supports. *Methods in Enzymology*. V. 135, p. 117, 1987.

[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)35069-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)35069-4)

KUJAWA, J.; GŁODEK, M.; LI, G.; AL-GHARABLI, S.; KNOZOWSKA, K.; KUJAWSKI, W. Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes, *Science of The Total Environment*, v. 801, 149647, 2021. ISSN 0048-9697.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149647>

KUSUDO, T.; SAKAKI, T.; INOUE, K. Purification and characterization of purple acid phosphatase PAP1 from dry powder of sweet potato. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 67, p. 1609-1611, 2003.

<https://doi.org/10.1271/bbb.67.1609>

LEITÃO, V. O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol Lett*. 2010;

32(8):1083-1088. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0264-2>

LI, L.; DIXON, J. E. Form, function and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Semin. Immunol*, v.12, p.75-84, 2000.

<https://doi.org/10.1006/smim.2000.0209>

LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 43, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.05.004>

LI, Z.; WANG, Z.; PENG, G.; YIN, Y.; ZHAO, H.; CAO, Y. Purification and characterization of a novel thermostable extracellular protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70(8):1961-1968. PMID: 16926509.

<https://doi.org/10.1271/bbb.60136>

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

LIMA, V. M. G. et al. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. Food Technology and Biotechnology, v. 41, p.105-110, 2003.

LIMAYEM, A.; STEVEN C. R. "Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects." Progress in Energy and Combustion Science 38, 449-467, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2012.03.002>

LIU, D., ZHANG, R., YANG, X., WU, H., XU, D., TANG, Z. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state. International Biodeterioration e Biodegradat-ion, v.65, p.717-725, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.005>

LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* solid state fermentation. Fuel Processing Technology, v.106, p.303-309, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.08.013>

LÓPEZ-BUCIO, J.; HERNADÉZ-ABREU, E.; SÁNCHEZ-CALEDERÓN, L.; NIETOJACOBO, M. F.; SIMPSON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root systems. Plant Physiology, v.129, n. 1, p.244-256, 2002. <https://doi.org/10.1104/pp.010934>

LOUREIRO, E. S. et al. Viabilidade de conídios e blastósporos de *Sporothrix insectorum* (Hoog e Evans) armazenados em diferentes temperaturas. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 89-90, jan./mar. 2003.

LEI, G. X. e PORRES, M. J. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. Biotechnology Letters, v. 25, p. 1787-1794, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1026224101580>

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; J. Biol. Chem., 193, 265, 1951. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

LIU, J. et al. Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation. International journal of biological macromolecules, 152, 288-294, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.256>

LU, S.Y.; SKORY, C. D.; HESHAM A.; ENSHASY, E.; LIU, S. Fermentative Production of Alternative Antimicrobial Peptides and Enzymes, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021, 102189, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102189>.

MAGBOUL, A. A. A.; Mc SWEENEY, P. L. H. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. International Dairy Journal, v. 9, p. 849-885, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00010-8)

MAN-JIN, I.; SUNG-WON, S.; KIM, D. C.; NAM-SOON, O. Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY staim. Process Biochemistry, v. 44(1), p. 122-126, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.10.006>

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. Biomacromolecules, v. 1, n. 4, p. 739 – 45, 2000. <https://doi.org/10.1021/bm000071q>

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 1451 - 1463, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>

MATHUR, G.; MATHUR, A.; SHARMA, B. M.; CHAUHAN, R. S. Enhanced production of laccase from *Coriolus* sp. using Plackett-Burman design. Journal of Pharmacy Research, v.6, p.151-154, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2012.11.031>

MARTINEZ, D., BERKA, R.M., HENRISSA, B. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (Syn.Hypocrea jecorina). Nature Biotechnol. DOI: 10.1038/nbt1403, 2008. <https://doi.org/10.1038/nbt1403>

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid-state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. Biochemical Engineering Journal, v.80, p.76-82, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.016>

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. DE; RODRIGUES, D. D. S. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *Journal of industrial microbiology e biotechnology*, v. 38, n. 8, p. 1055 – 66, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0880-9>

MISRA, C. S.; APPUKUTTAN, D.; KANTAMREDDI, V. S.; RAO, A. S. APTE, S. K. Recombinant *D. radiodurans* cells for bioremediation of heavy metals from acidic/neutral aqueous wastes. *Bioeng Bugs*. 2012; 3:44–48. doi: 10.4161/bbug.3.1.18878 PMID: 22179144. <https://doi.org/10.4161/bbug.3.1.18878>

MORAIS JR., W. G. Produção de lipase por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* empregando melão de soja. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2013.

MORAIS JR., W. G. Purificação e Imobilização de lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* produzidas em melão de soja. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, 2016.

MORAIS JR, W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. *Protein Expression and Purification*, v.123, p. 26-34, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.04.001>

MOURA, V. M. B. D. et al. Mensuração de hormônios andrógeno, estrógeno, fosfatase ácida prostática e antígeno prostático específico em cães adultos com próstata normal e hiperplásica. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v 43, p 65-73, 2006. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26519>

MUNIYAN, S.; CHATURVEDI, N. K.; DWYER, J. G.; LAGRANGE, C. A.; CHANEY, W. G.; LIN, M. F. Human prostatic acid phosphatase: structure, function and regulation. *Int J Mol Sci*. 2013; 14: 10438–10464. doi: 10.3390/ijms140510438 PMID: 23698773. <https://doi.org/10.3390/ijms140510438>

NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; KUHAD, R. C.; GUPTA, V. K. Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. *New Biotechnology*, v.28, p.581-587, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.12.004>

NAHAS, E.; ASSIS, L.C. Efeito da concentração de fosfato na solubilização de fluorapatita por *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Microbiologia*, v. 23, p. 37-42, 1992.

NAKAGI, V. S. Caracterização da atividade da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal, f.32, 2007.

NEVES, M. C. P. Como os microrganismos do solo obtêm energia e nutrientes. In: CARDOSO, E. J. N. B.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Eds.) *Microbiologia do solo*. SBCS. Campinas, p. 17-31, 1992.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3- glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol.* 1996; 42:1039-1044. <https://doi.org/10.1139/m96-133>

PALACIOS, M. C.; HAROS M.; ROSELL, C. M.; SANZ, Y. Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p. 229-237, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02447.x>

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3636, p. 1-4, 2002.

PANDEY, A. K.; EDGARD, G.; NEGI, S. Optimization of concomitant production of cellulase and xylanase from *Rhizopus oryzae* SN5 through EVOP-factorial design technique and application in Sorghum Stover based bioethanol production. *Renewable Energy*, v.98, p.51-56, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.05.071>

PANT, A. et al.  $\beta$ - Caryophyllene modulates expression of stress response genes and mediates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*, v. 57, p. 81- 95, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.05.007>

PANYACHANAKUL, T.; KITPREECHAVANICH, V.; TOKUYAMA, S.; KRAJANGSANG, S. Poly(dl-lactide)-degrading enzyme production by immobilized *Actinomadura keratinilytica* strain T16-1 in a 5-L fermenter under various fermentation processes, *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 30, p. 71-76, 2017. ISSN 0717-3458. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.09.001>

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.*, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>

PASHA, K. M.; ANURADHA, P.; RAO, D. S. Screening of a pectinolytic fungal strain; *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 for the production of multiple enzymes of industrial importance. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 4(2), p.1205-1209, 2013.

PECIN, S. B. Melaço de soja como substrato para produção microbiana de (1-6)- $\beta$ -D-glucana: avaliação do melaço bruto e do hidrolisado químico. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, (UTFPR) Universidade Tecnológica federal do Paraná, Pato Branco, PR-Brasil, 2018.

PLAXTON, W.C.; LAMBERS, H. Phosphorus Metabolism in Plants. Wiley Blackwell, Oxford, UK (2015). 449 pp., EUR 202.50, GBP 150.00, ISBN: 978-1-118-95885-8 poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. v. 84, p. 187-189, 2002.

PINOTTI, L. M.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ORREGO, A. H.; GUIBAN, J. M.; PESSELA, B. C. Stabilization of Glycosylated  $\beta$ -Glucosidase by Intramolecular Crosslinking Between Oxidized Glycosidic Chains and Lysine Residues. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03321-x> .

PURCENA, L. L. A.; DI MEDEIROS M. C. B.; LEANDRO W. M.; FERNANDES K. F. Effects of Organic and Conventional Management of Sugar Cane Crop on Soil Physicochemical Characteristics and Phosphomonoesterase Activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, p 1456–1463, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf403141w>

QUILLES JR, J. C. Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e a aplicação em biocatálise. Dissertação de Mestrado, UNESP – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP – Brasil, 2015.

QUINTERO, I. B.; HERRALA, A. M.; ARAUJO, C. L.; PULKKA, A. E.; HAUTANIEMI, S.; OVASKA, K. Transmembrane Prostatic Acid Phosphatase (TMPAP) Interacts with Snapin and Deficient Mice Develop Prostate Adenocarcinoma. PLoS One. 2013 Sept 10. 8(9): e73072. PMID: 24039861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073072>

QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. Journal of Biotechnology, v.87, p. 147-159, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00237-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00237-1)

RAMADA, M. H.; STEINDORFF, A. S.; BLOCH, C. J. R.; ULHOA, C. J. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. Proteomics, 2015. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400546>

RAMAMOORTHY, N. K.; SAMBAVI, T. R.; RENGANATHAN, S. A study on cellulase production from a mixture of lignocellulosic wastes. Process Biochemistry, 83, 148-158, 2019.

RASTOGI, S.; SONI, R.; KAUR, J.; SONI, S. K. Unravelling the capability of *Pyrenophora phaeocomes* S-1 for the production of ligno-hemicellulolytic enzyme cocktail and simultaneous bio-delignification of rice straw for enhanced enzymatic saccharification. Bioresource Technology, v.222, p.458-469, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.012>

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Review – Microencapsulation of microbial cells. Journal of Food Engineering, v. 110, n. 2, p. 208 – 213, 2012.

RAWAT, R.; TEWARI, L. Effect of Abiotic Stress on Phosphate Solubilization by Biocontrol Fungus *Trichoderma* sp. Curr Microbiol. 2011; 62(5):1521-1526. PMID: 21327557. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9888-2>

REDDY, P. L.; SREERAMULU, A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2012; 1(3):186-193.

RODRIGUES, M.S.; MOREIRA, F. S.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. R. Soy molasses as a fermentation substrate for the production of biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Environ Sci Pollut Res*, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9492-5>

ROMBOLA, T. H.; NASCIMBEM, E. A.; LEMOS, E. G.; MARQUES, A.; JOSÉ DOS SANTOS, L. F.; MARTINS, J. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. *BioMed Central Research Notes*, v. 7: 221, 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-221>

ROMÃO, B. B. Hidrólise e fermentação de melão de soja. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Miriam Maria de Resende.

ROTTAVA I., et al. Screening of microorganisms for bioconversion of (-)  $\beta$ -pinene and R (+)-limonene to  $\alpha$ -terpineol. *LWT - Food Science and Technology*. 2010; 43(7):1128-1131. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.001>

SAHNOUN, M.; KRIAA, M.; ELGHARBI, F.; AYADI, D. Z.; BEJAR, S.; KAMMOUN, R. *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: Optimization of culture conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.75, p.73-80, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.026>

SALEH, M. T.; BELISLE, J. T. Secretion of an acid phosphatase (sapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatase. *Journal of Bacteriology*, v. 182(83), p.6850-6853, 2000. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6850-6853.2000>

SAMPAIO, R. et al. Estudo da Solubilidade de Fosfato de Rocha Tipo “Tapira” por Fungos do gênero *Aspergillus*. *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações*. Anais. Florianópolis: 2003.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advance*, v.27, n.2, p.185-94, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

SANROMAN, M. A.; COUTO, S. R. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. *Journal of Food Engineering, Essex*, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>

SEBASTIAN, S.; TOUCHBURB, S. P.; CHAVEZ, E. R.; LAGUE, P. C. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broilers chickens fed corn-soybean diets. *Poult Sci.* 1996; 75:720-736. <https://doi.org/10.3382/ps.0750729>

SETHI, B. K.; JANA, A.; NANDA, P. K.; MOHAPATRA, P. K. D.; SAHOO, S. L. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. *Journal of Taibah University for Science*, v.10, p.571-583, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.11.001>

SCHENK, G.; MITIC, N.; HANSON, G. Purple acid phosphatase: a journey into the function and mechanism of a colorful enzyme, *Coord Chem Rev* 257, 473-482, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.020>

SHARMA, R., CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v.19 n.8, p.627-662, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00086-6)

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42, 6223-6235, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>

SHEN, J.; YUAN, L.; ZHANG, J.; LI, H.; BAI, Z.; CHEN, X.; ZHANG, W.; ZHANG, F. Phosphorus dynamics: from soil to plant, *Plant Physiol.* 156, 997-1005, 2011. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>

SRIVASTAVA, P. K.; ANAND, A. Immobilization of acid phosphatase from *Vigna aconitifolia* seeds on chitosan beads and its characterization. *Int J Biol Macromol* 64, 150-154, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.11.023>

SIAR, E-H.; ZAAK, H.; KORNECKI, J. F.; ZIDOUNE, M. N.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUNTE, R. Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl-agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. *Process Biochem* v.58, p.98-104, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.009>

SIDDIQUA, A.; REHMAT, M.; SAEED, A.; AMIN, S.; NAZ, R.; SHERAZI, M.; KHAN, G. M.; SAEED, A. Acid phosphatase from the liver of *Labeo rohita*: purification and characterization. *Biol. Pharm. Bull.* v. 31, p. 802-808, 2008. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.802>

SIGURDARDÓTTIR, S.B., LEHMANN, J., OVTAR, S., GRIVEL, J.-C., NEGRA, M.D., KAISER, A. Enzyme immobilization on inorganic surfaces for membrane reactor applications: mass transfer challenges, enzyme leakage and reuse of materials. *Adv. Synth. Catal.* v. 360, p. 2578-2607, 2018. <https://doi.org/10.1002/adsc.201800307>

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

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LE\_ ON, J. A.; THOLOZAN, J. C.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales, *Bioresour. Technol.*, v.99, p.8156-8163, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.037>

SILVA, A. F. V. et al. Cellulase production to obtain biogas from passion fruit (*Passiflora edulis*) peel waste hydrolysate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, n. 6, p. 103510, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103510>

SILVA, F. B.; ROMÃO, B. B.; CARDOSO, V. L.; COUTINHO FILHO, U.; RIBEIRO, E. J., Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. *Biochemical Engineering Journal*, v. 69, p. 61-68, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.009>

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001001200007>

SILVA, F. B.; ROMÃO, B. B.; CARDOSO, V. L.; COUTINHO FILHO, U.; RIBEIRO, E. J., Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. *Biochemical Engineering Journal*, v. 69, p. 61-68, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.009>

SILVA, R.; SOUZA, R.; SANTANA, J.; TAMBOURGI, E. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 3, p. 642 - 648, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300021>

SINGH, M. K.; SINGH, J.; KUMAR, M.; THAKUR, I. S. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.110, p.92-99, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.10.010>

SINGH, R. P. e AGRAWAL, M. Potential Benefits and Risks of Land Application of Sewage Sludge. *Waste Manage*, 28, 347-358, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.010>

SOUZA, A. A. Produção e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum* (ALL42). 2011.82f. Dissertação (Mestre em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2011.

SOUZA, A. A.; LEITÃO, V. O.; RAMADA, M. H.; MEHDAD, A.; GEORG, R. C.; ULHÔA, C. J.; FREITAS, S. M. *Trichoderma harzianum* Produces a New Thermally Stable Acid Phosphatase, with Potential for Biotechnological Application, *PLOS ONE*, March 3, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150455>

SOUZA, A. A.; REIS, V. C.; RAMADA, M. S. H.; OLIVEIRA, G. M.; MEHDAD, A.; TORRES, F. A.; ULHOA, J. C.; GEORG, R. C.; FREITAS, S. M. The Functional Characterization of the Heterologous Acid Phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biophysical Journal*, v. 114, p. 567a, 2018. ISSN 0006-3495. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.3100>

SLIVINSKI, J. Estudo da produção de biopolímero e biomassa pelo fungo *L. theobromae* MMPI em meio à base de melão de cana-de-açúcar empregando delineamento fatorial. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

SMECK, N, E. Phosphorus dynamics in soils and landscapes. *Geoderma*, v. 36, n. 3-4, p. 185-199, 1985. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(85\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0016-7061(85)90001-1)

STEC, B.; HOLTZ, K. M.; KANTROWITZ, E. R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *Journal Molecular Biology*, v. 299, p. 1303 - 1311, 2000. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3799>

STUBBERUD, E. H.; HONSI, G. T.; STENERSEN, J. Purification and partial characterization of tentatively classified acid phosphatase from the earthworm *Eisenia venata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 126, p. 487-494, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00209-1](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00209-1)

TANASOVA, M.; STURLA, S. J. Chemistry and biology of acylfulvenes: sesquiterpene-derived antitumor agents. *Chem. Rev.*, v. 112, n. 6, p. 3578- 3610, 2012. <https://doi.org/10.1021/cr2001367>

TARAFDAR, J. C. e CLAASSEN, N. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases production by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of soil*, v. 5, p. 308 - 312, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF00262137>

TARDIOLI, P. W.; VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M. S.; ZANIN, S. M.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M. Immobilization-stabilization of glucoamylase: chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Process Biochem*, v.46, p.409-412, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.011>

THEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Applied and environmental microbiology*, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982. <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982>

TRAN, T. H.; HURLEY, B. A.; PLAXTON, W. C. Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatase in phosphate nutrition. *Plant Science*, v. 179, p. 14-27, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.005>

TROBO-MASEDA, L., ORREGO, A. H., GUIBAN, J. M., ROCHA-MARTIN, J. Coimmobilization and colocalization of a glycosyltransferase and a sucrose synthase greatly improves the recycling of UDP-glucose: Glycosylation of resveratrol 3-O- $\beta$ -D-glucoside. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, pp. 510-521, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.120> .

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. *Curr Microbiol.* 1992; 23:285–289.

ULLAH, A. H. J.; PHILLIPPY, B. Q. Substrate selectivity in *Aspergillus ficcum* phytase and acid phosphatase using myo-inositol phosphates. *Journal Agric. Food Chem.* v.42, p. 423-425, 1994. <https://doi.org/10.1021/jf00038a034>

VAIDYANATHAN, S. et al. Monitoring of submerged bioprocesses. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 19, p.277-316, 1999. <https://doi.org/10.1080/0738-859991229161>

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem Eng J.* 2007; <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>

VICHENEWSKI, W.; Em: Introdução a Métodos Cromatográficos. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; 6.ed.; Editora da UNICAMP: Campinas, p. 59, 1995.

VIEIRA, C. D. Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 4, 8, 25, 2009.

VIEIRA, P.A.; FARIA, S.; VIEIRA, R.B.; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. 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, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9907-z>

WANNET, B. J. W.; WASSENAAR, R.W.; JORISSEN, H. J. M. M.; DRIFT, C. V. D.; CAMP, O. D. Purification and characterization of an acid phosphatase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 77, p. 215-220, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1002450221778>

WEETALL, H. H. Immobilized Enzymes and their Applications in the Food and Beverage Industry. *Process Biochemistry.* p.3-30, 1975.

WHESTHEIMER, F. H. Why nature chose phosphates. *Research article. Science*, v. 235, p. 1173-1178, 1987. <https://doi.org/10.1126/science.2434996>

XIA, Y.; YANG, L.; XIA, L. High-level production of a fungal  $\beta$ -glucosidase with application potentials in the cost-effective production of *Trichoderma reesei* cellulase. *Process Biochem.* v. 70, p. 55–60, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.031>

YADAV, R. S.; TARAFDAR, J. C. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. *Soil Biology e Biochemistry*, v. 35, p. 1-7, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00089-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00089-0)

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Assessment of pro-tease activity in hydrolyzed extracts from SSF of hair waste by and indigenous consortium of microorganisms. *Waste Management*, v.49, p.420-426, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.045>

ZAAK, H.; SIAR, E-H.; KORNECKI, J. F.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; VIRGEN-ORTIZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads. *Process Biochem*, v.56, p.117–123, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.02.024>

ZHANG, G. Q.; DONG, X. F.; WANG, Z. H.; ZHANG, Q.; WANG, H. X.; TONG, J. M. Purification, characterization and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Bioresourse Technology*, v.101, p. 4125-4131, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.001>

ZHANG, G. Q.; CHEN, Q. J.; SUN, J.; WANG, H. X.; HAN, C. H. Purification and characterization of a novel acid phosphatase from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. *J Basic Microbiol.* 2013; 53:1–8. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200218>

ZHAO, L.; LIU, Q.; ZHANG, YA-QING; CUI, QING-YU; LIANG, YUAN-CUN. Effect of acid phosphatase produced by *Trichoderma asperellum* Q1 on growth of *Arabidopsis* under salt stress, *Journal of Integrative Agriculture* 2017, 16(6): 1341–1347. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61490-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61490-9)

## ANEXO 1

### Curva de calibração para Fosfatase ácida

Para construção da curva foi comprada um fosfatase ácida de trigo germinado da empresa Sigma Aldrich™ e utilizada a metodologia descrita na seção 3.7.4.

