

OBTENÇÃO DE GIBBERELINAS EM ESCALA LABORATORIAL ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO POR FUNGOS DO GÊNERO *FUSARIUM*

Brás Heleno de Oliveira

Centro Politécnico - Departamento de Química - Universidade Federal do Paraná - CP 19081 - 81531-990 - Curitiba - PR

Claro Tadayoshi Sato*

Departamento de Química - Universidade Estadual de Maringá - PR

Recebido em 8/12/94; aceito em 29/4/95

Gibberellins are very useful compounds which occur naturally in minute quantities in plants. They can be produced via fermentation, using suitable microorganisms. In this work we describe the screening of some fungi strains of the genus *Fusarium*. The best results were obtained for the strain *F. moniliforme* CMI 112801, which was then used for development of better culture media, using cheap and readily available components. After improvements, the concentration of gibberellins reached 236 mg/L.

Keywords: gibberellic acid; *Fusarium*; fermentation.

1. INTRODUÇÃO

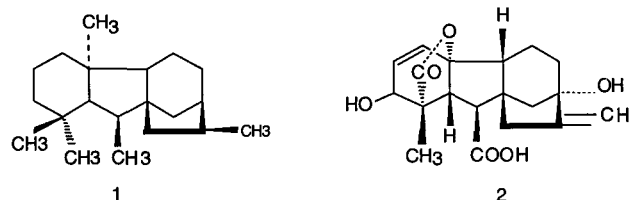
As giberelinas constituem um grupo de hormônios vegetais, contendo o núcleo gibano [1]. São hoje conhecidos, pelo menos 90 compostos desta classe que são representados pela sigla GA_n , onde n é um número inteiro¹.

A ação biológica destes compostos em plantas varia de acordo com a espécie vegetal em que ocorrem naturalmente, ou onde são aplicados. Por exemplo: efeito sobre o crescimento vegetal², especialmente sobre o crescimento de mutantes anãs³; quebra da dormência de algumas sementes⁴; indução da floração em algumas espécies⁵; efeito sobre o desenvolvimento de frutos⁶; aumento substancial do teor de açúcar da cana-de-açúcar⁷.

O uso prático mais intenso de giberelinas, inclusive no Brasil, é o de auxiliar no processo de produção de malte. As indústrias do setor, maltarias, utilizam ácido giberélico (GA_3) [2] na concentração de 0,05 ppm. O efeito é o de uma germinação mais rápida e homogênea da cevada e a produção de malte de melhor qualidade. Estima-se que só esta indústria consome, pelos menos, 30 Kg anuais de ácido giberélico⁸. Outro uso bastante comum no Brasil é o de auxiliar na germinação da batata e na cultura da uva para aumentar o tamanho dos engaços e pedicelos, proporcionando a formação de cachos mais soltos. No Brasil, o uso de giberelinas é ainda restrito, apesar do enorme potencial da utilização, devido ao alto preço deste produto, sendo ele totalmente importado. Por isso, decidimos desenvolver uma metodologia de obtenção com a utilização de matérias-primas abundantes no país para composição dos meios de cultura.

Em outros países, especialmente nos EUA e no Japão, o seu uso constitui-se numa prática cultural auxiliar utilizada em grande escala⁹.

Giberelinas são produzidas em vários países¹⁰, tais como Estados Unidos, Hungria, Polônia e Japão. Os primeiros trabalhos sobre produção comercial de ácido giberélico foram desenvolvidos na Inglaterra, à partir de 1954, pelo grupo da Imperial Chemical Industries, através do uso do fungo fitopatogênico *Gibberella fujikuroi*, o qual é a forma periticial de *Fusarium moniliforme*.



2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Avaliação das Cepas de *Fusarium* e *Gibberella*

Vários microorganismos (bactérias, actinomicetos e fungos) têm sido avaliados quanto à habilidade de produzir giberelinas¹¹, mas nenhum outro, exceto fungos do gênero *Fusarium*, tem mostrado produtividade relevante do ponto de vista comercial¹².

Neste trabalho, os microorganismos utilizados foram: *Fusarium moniliforme* CMI 112801; *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278; *Gibberella* sp 1; *Fusarium* sp 1 (fornecido pelo Departamento de Agronomia - UEM); *Fusarium* sp 2; *F. moniliforme* IOC 3326; *Fusarium verticilloides* IOC22; *Fusarium verticilloides* IOC33 (fornecidos pelo Instituto Oswaldo Cruz).

Os fungos acima foram comparados quanto à habilidade de produzir giberelinas, utilizando uréia como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono (meio de cultura nº 1).

Nas fermentações com as cepas *Fusarium* sp 1, *Fusarium* sp 2 e *Gibberella* sp 2, *Fusarium verticilloides* I33 e *Fusarium moniliforme* IOC 3326, o ácido giberélico não foi detectado após 230 horas de fermentação.

A cepa de *F. moniliforme* IOC 3326 não produziu GAs após 307 horas.

As cepas de *G. fujikuroi* NRRL 2278 e *Gibberella* sp 1 tiveram níveis de produção de GA_3 próximos. A produção máxima alcançada foi de 7 mg/L e 10 mg/L, respectivamente, após 420 horas.

O fungo *F. moniliforme* IOC 3326 foi utilizada por Sanchez-Marroquin¹³ usando diversos meios de cultura. A não detecção de GA_3 foi surpreendente, uma vez que o pior resultado encontrado por Sanchez-Marroquin, de 190 mg/L, foi com meio utilizando alta concentração inicial de sacarose, o que inibe o desenvolvimento do fungo. A possível explicação pode ser devido à ausência de algum fator ou micronutriente contido no "corn steep liquor".

* Endereço atual: Instituto de Tecnologia do Paraná-TECPAR).

Com a cepa *F. moniliforme* CMI 112801 a produção máxima alcançada foi de 90 mg/L após 300 horas sendo, portanto, a mais produtiva. Esta cepa foi, então, utilizada para otimização dos meios de cultura (Fig. 2), e o trabalho com as demais foi descontinuado.

A comparação entre as três cepas melhores produtoras pode ser vista na figura 1.

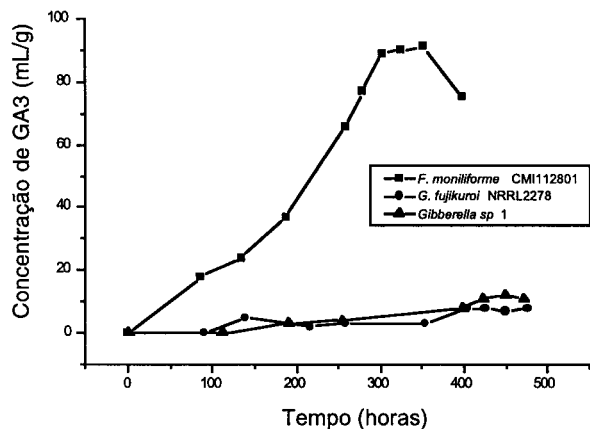


Figura 1. Comparação entre as três melhores cepas.

2.2 Otimização da Produtividade do *F. moniliforme* CMI 112801

Para melhorar a produtividade do *F. moniliforme* CMI 112801, realizamos algumas alterações no meio de cultura e registramos os valores de GA³ produzidos em cada caso.

Na composição do meio de cultura, desde a fase anterior, a glicose e o nitrato de amônio utilizada por Borrow *et al.*¹⁵, foram substituídos por sacarose e uréia respectivamente, com a finalidade de diminuir os custos. A substituição da glicose por sacarose parece não ter sido tentada anteriormente, enquanto que a substituição do nitrato de amônio por uréia, por nós realizada, produziu resultados equivalentes àqueles obtidos por Borrow *et al.*¹⁶. O molibdato de potássio foi substituído por heptamolíbato de amônio, por questão de disponibilidade. Os resultados estão resumidos na figura 2.

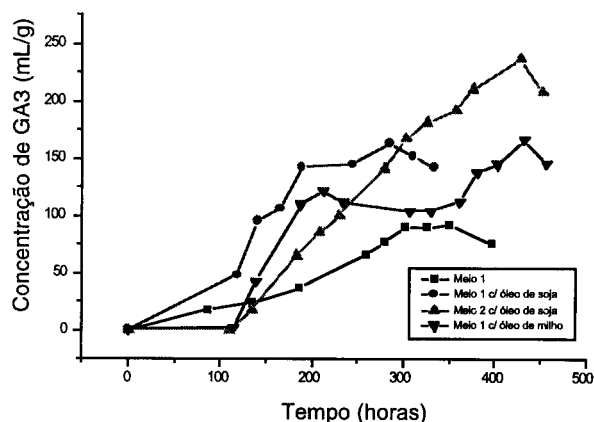


Figura 2. Fermentações com diferentes meios utilizando *F. moniliforme* CMI 112801.

A curva nº 1 mostra os teores obtidos de GA₃, utilizando o mesmo meio de cultura da fase anterior (meio nº 1). O teor de sacarose foi mantido entre 2 e 3 % através de adições periódicas. Obteve-se um máximo de 91 mg/L de GA₃ após 351 horas de fermentação.

A tentativa seguinte foi a de, mantendo o mesmo meio de cultura anterior, adicionar óleo de soja após o consumo da sacarose. O resultado, mostrado pela curva nº. 2, indicou aumento do teor de GA₃ que atingiu um máximo de 180 mg/L após 263 horas.

O experimento seguinte foi semelhante ao anterior, agora com adição de óleo de milho após o consumo da sacarose, e está representado pela curva nº 3. O resultado foi ligeiramente inferior e o máximo obtido foi de 166 mg/L após 432 horas.

Finalmente, foi realizada uma tentativa agora utilizando farelo de soja desoleificado como fonte de nitrogênio e adição de óleo de soja após consumo da sacarose inicial. O resultado, representado pela curva nº 4, foi o melhor obtido. Após 428 horas o teor de GA₃ atingiu o máximo de 236 mg/L.

O *F. moniliforme* CMI 112801 foi utilizado por Hernandez e Mendoza¹⁴ e fizeram uso de subprodutos da industrialização da azeitona para composição do meio de cultura. Um rendimento de aproximadamente 260 mg/L de GA₃ foi obtido por aqueles autores. O rendimento de 236 mg/L por nós obtido neste trabalho, utilizando farelo e óleo de soja, está dentro dos valores esperados.

As fermentações com utilização de óleo como fonte secundária de carbono foram iniciadas com sacarose e, após a concentração cair abaixo de 4%, o óleo foi adicionado em volumes de 20 mL, mantendo a quantidade de óleo de tal forma que uma fina camada de óleo, sob a superfície do meio de cultura, pudesse ser observada.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e materiais

As fermentações foram conduzidas no microfermentador "New Brunswick Scientific Co.", modelo MF-202F, com capacidade útil de um litro de meio de cultura. As leituras espectrofotométricas foram feitas no aparelho Varian modelo 634.

Cromatografias em camada delgada foram desenvolvidas em placas cromatográficas de sílica G PF₂₅₄, "Merck", de 0,2 mm de espessura.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto sacarose. A uréia utilizada foi da marca "Petrofértil", o óleo de soja foi da marca "Cocamar", o óleo de milho foi da marca "Mazolla" e o farelo de soja foi fornecido pela "Cocamar". O acetato de etila e o etanol comerciais foram purificados.

3.2 Métodos analíticos

a) Análise qualitativa do ácido giberélico

As análises qualitativas do ácido giberélico foram executadas em cromatografia de camada delgada, utilizando-se uma amostra autêntica como padrão, com mistura eluente composta de clorofórmio: acetato de etila: ácido acético¹⁷ na proporção 40:60:5. As visualizações das manchas foram feitas com a lâmpada ultravioleta a 366 nm, após a pulverização das placas com mistura ácido sulfúrico/metanol 1:1 e posterior aquecimento com pistola de ar quente, até o aparecimento das manchas.

b) Análise quantitativa de ácido giberélico

Foi utilizado o método espectrofométrico de Holbrook, Edge e Bailey¹⁸.

Dentro deste método duas variantes foram usadas:

- i) Pré-clarificação do caldo fermentativo com acetato de zinco e ferrocianeto de potássio: alíquota de 20 mL do caldo filtrado foi transferida para balão volumétrico de 50 mL juntamente com 10 mL de etanol. Foram adicionados 2 mL de solução de acetato de zinco (21,9 g/100 mL), o balão foi agitado e depois deixado em repouso por 3 minutos. A seguir

foram adicionados 2 mL de solução de ferrocianeto de potássio (10,6 g/100 mL), o balão foi novamente agitado e deixado em repouso por 5 minutos, e a seguir a solução foi filtrada. Uma alíquota de 10 mL deste filtrado foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, ao qual foram adicionados 8 mL de etanol e o volume foi completado com HCl a 30%. Imediatamente foi feita leitura da absorvância a 254nm, usando cubeta de quartzo. Os reagentes foram deixados em banho-maria a 20 °C por 75 minutos e, então, foi feita nova leitura. A concentração de GA₃ foi obtida através da curva de calibração previamente preparada.

Quando o meio de cultura era complexo, a clarificação pelo método anterior não foi satisfatória, e a seguinte variação foi empregada.

- ii) Extração direta com acetato de etila: alíquota de 20 mL de caldo filtrado foi acidificada com solução de HCl 0,1 M em, pH 2,5 e submetida a partições com porções de 40, 30, 30 mL de acetato de etila. As giberelinas foram reextraídas com solução tampão fosfato a pH 7,4, com porções de 40, 30 e 20 mL, e as porções combinadas em um balão de 100 mL e completadas com o mesmo tampão. Uma alíquota de 20 mL foi transferida para outro balão de 100 mL, com a adição de 10 mL de etanol. O volume do balão foi completado com solução de HCl a 35% e lida imediatamente a absorvância a 254 nm. Após deixado em banho a 20°C por 80 minutos foi feita nova leitura. A leitura no tempo zero foi considerada como branco. A concentração de ácido giberélico foi determinada através de curva de calibração previamente preparada.

c) Determinação de açúcares

O método adotado foi o de Dubois *et al.*¹⁹ (1956). Uma alíquota de 1 mL foi retirada do fermentador, diluída para 20 mL em balão volumétrico e filtrada. O filtrado foi diluído para um volume adequado para faixa de leitura da curva de calibração. Em um tubo de ensaio 15 x 1,5 cm, foram adicionados 1 mL da amostra diluída, 1 mL de fenol 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi deixada em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente e depois resfriada em água corrente, antes da leitura espectrofotométrica. Para o branco, o procedimento foi o mesmo, exceto que a amostra foi substituída por água destilada.

3.3 Meios de cultura

3.3.1 Agar Batata Glicosado (PDA)

Batata inglesa pré-cozida	20 %
Glicose	1,5 %
Agar	2 %

3.3.2 Meio de Cultura 1

O meio de cultura utilizado foi uma modificação daquele descrito por Borrow *et al.*¹⁵:

Sacarose	10 %
Diidrogeno fosfato de potássio	0,5 %
Sulfato de magnésio	0,1 %
Uréia	0,3 %
Solução de elementos-traço	0,2 %

A solução de traços tem a seguinte composição (em mg/100 mL):

Sulfato ferroso heptahidratado	100
Sulfato de cobre pentahidratado	15
Sulfato de zinco heptahidratado	100
Sulfato de manganês heptahidratado ...	10
Molibdato de potássio	10
Nitrato de cobalto	10

Foram efetuadas as seguintes alterações no meio de cultura de Borrow *et al.*: glicose 10% para sacarose 10%; nitrato de amônio 0,4% para uréia 0,3%; molibdato de potássio para heptamolibdato de amônio; adição de nitrato de cobalto, 10 mg.

3.3.3 Meio de Cultura 2

Sacarose	10 %
Diidrogeno fosfato de potássio	0,5 %
Sulfato de magnésio	0,1 %
Farelo de soja	1,91 %
Solução de elementos-traço	0,2 %

3.4 Microorganismos

Os microorganismos utilizados foram: *Fusarium moniliforme* CMI 112801; *F. moniliforme* IOC 3326; *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278; *Gibberella sp 1*; *Fusarium sp 1* (cedida pelo Dep. de agronomia - UEM); *Fusarium sp 2*; *Fusarium verticilloides* I33 (cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz).

Os microorganismos foram cultivados à temperatura ambiente, em tubos de ensaio contendo o meio Agar Batata Glicosado (PDA), e guardados em geladeira a 10 °C.

3.5 Técnica fermentativa

A técnica fermentativa adotada, foi a de batelada alimentada, descrita por Borrow *et al.*^{15,16}.

Em todas as fermentações, o volume de meio utilizado foi de 1 litro e o pH inicial foi ajustado para a faixa 3,5-3,6 com solução de HCl 5%. Após autoclavagem a 120°C por 20 minutos e depois de resfriado, foi adicionado o inóculo. O inóculo foi preparado a partir do tubo de ensaio contendo a cultura do fungo, após adição de água destilada e esterilizada.

Após o início da fermentação, foram deixados decorrer 3 dias para o início da monitoração do teor de açúcar. A determinação do ácido giberélico foi iniciada após o teor inicial de açúcar cair para valores abaixo de 4%.

Neste trabalho foi utilizada a temperatura de 29°C.

A taxa de aeração adotada foi de 1 volume de ar por volume de meio (v.v.m.) enquanto que a velocidade de rotação do agitador foi de 200 rotações por minuto (r.p.m.), exceto para a fermentação com *F. moniliforme* IOC 3326, que foi de 800 rpm.

3.6 Avaliação das Cepas de *Fusarium* e *Gibberella*

Os microorganismos utilizados foram: *Fusarium moniliforme* CMI 112801; *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278; *Gibberella sp 1*; *Fusarium sp 1* (fornecido pelo Departamento de Agronomia - UEM); *Fusarium sp 2*; *F. moniliforme* IOC 3326; *Fusarium verticilloides* IOC22; *Fusarium verticilloides* IOC33. As cepas foram mantidas em tubos de PDA, na geladeira. Os inóculos foram transferidos assepticamente para o vaso de fermentação, contendo o meio n° 1, e o desenvolvimento da fermentação foi monitorado quanto ao consumo de açúcares e produção de giberelinas.

3.7 Otimização da Produtividade do *F. moniliforme* CMI 112801

Experimento 1: foi utilizado o meio de cultura n° 1 (1 litro) e o teor de açúcar foi mantido entre 2 e 3 % através de adições periódicas. Foram monitorados os teores de açúcares e de ácido giberélico.

Experimento 2: foi utilizado o meio de cultura n° 1 (1 litro) e, após o consumo da sacarose foi adicionado óleo de soja esterilizado (20 mL). Foram monitorados os teores de açúcares e de giberelinas.

Experimento 3: foi utilizado o meio de cultura nº 1 (1 litro) e, após o consumo da sacarose foi adicionado óleo de milho esterilizado (20 mL). Foram monitorados os teores de açúcares e de giberelinas.

Experimento 4: foi utilizado o meio de cultura nº 2 (1 litro) e, após o consumo da sacarose foi adicionado óleo de soja esterilizado (20 mL). Foram monitorados os teores de açúcares e de giberelinas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação Oswaldo Cruz (Manguinhos) pelo fornecimento dos fungos *Fusarium moniliforme* IOC 3326, *Fusarium verticilloides* IOC22 e *Fusarium verticilloides* IOC33, ao CNPq pelo auxílio financeiro e ao Prof. Carlos Kemmelmeier (Dep. Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá) pela ajuda no início do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. a) Para uma revisão sobre cromatografia de giberelinas, contendo as estruturas de GA₁ a GA₉₀ veja Pearce, D. W.; Koshioka, M.; Pharis, R. P.; *J. Chromat.*, (1994), **658**, 91; b) Para uma revisão sobre química de giberelinas veja Takahashi, N.; ed., *Chemistry of Plant Hormones*, pp 57-151, CRC Press; Boca Raton (1986).
2. Leopold, A. C.; Kriedemann, P. E; *Plant Growth and Development*, 2nd edit., pp 139-153, McGraw-Hill; London (1975).
3. a) Phinney, B. O.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1956), **42**, 185; b) McComb, A. J.; *Nature*, (1958), **181**, 1548.
4. Kahn, A. J.; Goss, A.; Smith, D. E.; *Science*, (1957), **125**, 645.

5. Lang, A.; Reinhard, E.; *Adv. Chem.*, (1961), **28**, 71.
6. a) Jackson, D. I.; *Aust. J. Biol. Sci.*, (1968), **21**, 209; b) Coggins, C. W.; Hield, H. Z.; Garber, M. J.; *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, (1960), **76**, 193.
7. Alexander, A. G.; Montalvo-Zapata, R.; Kumar, A.; *J. Agric. Univ. Puerto Rico*, (1970), **54**, 477.
8. Comunicação pessoal de Frank Noel, gerente industrial da Agromalte S.A., (Guarapuava, PR).
9. Tonietto, J.; Efeitos do ácido giberélico no cacho de uva e na qualidade do mosto das cultivares S. millon (*Vitis vinifera* L.) e Isabel (*Vitis labrusca* L.) Tese de mestrado (1980).
10. Kumar, P. K. R.; Lonsane, B. K.; *Advances in Applied Microbiology*, (1989), **34**, 29.
11. a) Borrow, A.; Brian, P. W.; Chester, V. E.; Curtis, P. J.; Hemming, H. G.; Henehan, C.; Jefferys, E. G.; Lloyd, P. B.; Nixon, I. S.; Norris, G. L. F.; Radley, M. J.; *Sci. Food Agric.*, (1955), **6**, 340; b) Curtis, R. W.; *Science* (1957), **125**, 646.
12. Jefferys, E. G.; *Adv. Appl. Microbiol.* (1970), **13**, 283.
13. Sanchez-Marroquin, A.; *Appl. Microbiol.* (1963), **11**, 523.
14. Hernandez, E.; Mendoza, Rev. *Agroquim. Tecnol. Aliment.* (1976), **16**, 357.
15. Borrow, A.; Jefferys, G. E.; Nixon, I. S.; Patent Specification 838033, London (1958).
16. Borrow, A.; Brown, S.; Jefferys, E. G.; Kessell, R. H. J.; Lloyd, E. C.; Lloyd, P. B.; Rothwell, A.; Rothwell, B.; Swait, J. C.; *Can. J. Microbiol.*, (1964), **10**, 407.
17. Stahl, E.; *Thin Layer Chromatography*, Springer-Verlag (1969).
18. Holbrook, A. A.; Edge, W. J. W.; Bailey, F.; *Adv. Chem. Journal* (1961), **28**, 159.
19. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F.; *Anal. Chem.* (1956), **28**, 350.