

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA DE  
*Penicillium implicatum***

**Vanessa de Souza Nakagi**  
Bióloga

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL  
2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA DE  
*Penicillium implicatum***

**Vanessa de Souza Nakagi**

**Orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Jr**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das Exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL  
Março de 2007**

Nakagi, Vanessa de Souza  
N163p Purificação da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum* / Vanessa de Souza Nakagi. –  
– Jaboticabal, 2007  
vii, 36 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Banca examinadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro e Pietro Ciancaglioni

Bibliografia

1. Fosfatase Ácida. 2. Purificação. 3. Parâmetros cinéticos. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.466

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço  
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**VANESSA DE SOUZA NAKAGI** - nascida em Ribeirão Preto aos 08 de dezembro de 1979, filha de Sergio Nakagi e Izildinha Aparecida de Souza Nakagi. Graduada em Biologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá em Ribeirão Preto no ano de 2003.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me abençoar mais uma vez.

Em segundo lugar, ao Professor Doutor João Martins Pizauro Junior pela orientação, competência, cooperação, paciência e dinamismo. Estou grata pela liberdade de ação, que foi decisiva para o meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço imensamente à Fátima Aparecida Ribeiro Harnich, acima de tudo pela amizade, carinho, ensinamentos; além da imensa colaboração na execução dos diversos experimentos.

Gostaria ainda de agradecer a Gisele Regina Rodrigues, que me acompanhou todo o período do experimento, e por compartilhar tantas experiências juntas. Aos companheiros do Laboratório de Enzimologia Aplicada: Flávio, Gustavo, Diogo, Carol, Verônica, Márcia, Marcy e tantos outros que estagiaram por lá; e contribuíram de diversas formas.

Deixo também uma palavra de agradecimento aos funcionários do Departamento de Tecnologia: Tânia, Renata, Beth, Andréia, Fátima. Às professoras doutoras: Maria Inês e Lúcia pela atenção e sugestões sempre pertinentes.

São também dignos de uma nota de apreço aos amigos: Gisele, Luciana, Cristiane, Luiz, Aline, Tábata, Talita, Breno, Carolina; e primos: Luciana, Missao, William e Thaís que mesmo não terem trabalhado comigo diariamente, compartilharam de tantos momentos importantes na minha vida.

Imprescindíveis também: Minha avó, meu padrinho Antônio Carlos e tia Luzia que sempre me deram forças pra lutar. Meus sobrinhos Luiz Felipe, Guilherme e Vinícius que me proporcionam tantos momentos felizes.

Agradeço carinhosamente meu namorado Tiago, que sempre esteve presente nos momentos bons e difíceis dessa e outras tantas etapas da minha vida. À sua família, que me apoiou em todos os momentos.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>03</b>
<b>2.1. Fosfatases – Aspectos Gerais.....</b>	<b>03</b>
<b>2.2. Fosfatase em Microrganismos.....</b>	<b>05</b>
<b>2.3. Aplicações das fosfatases.....</b>	<b>08</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Microrganismo: manutenção e suspensão.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Efeito da concentração de fosfato na secreção da fosfatase ácida de <i>P. implicatum</i> em meio estacionário e agitado.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3. Determinação da atividade enzimática.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3.1. Determinação de atividade paranitrofenilfosfatásica.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3.2. Determinação da atividade pirofosfatásica .....</b>	<b>12</b>
<b>3.4. Determinação da proteína.....</b>	<b>12</b>
<b>3.5. Purificação da fosfatase ácida de <i>P. implicatum</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>3.5.1. Cromatografia em Phenyl-Sepharose.....</b>	<b>12</b>
<b>3.5.2. Recromatografia em Phenyl-Sepharose.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5.3. Diálise.....</b>	<b>13</b>
<b>3.6. Determinação da Massa Molecular.....</b>	<b>14</b>
<b>3.6.1. Eletroforese da fosfatase ácida em gel de poliacrilamida na ausência de SDS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.6.2. Eletroforese da fosfatase ácida em gel de poliacrilamida na ou presença de</b>	

<b>SDS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.6.3. Determinação da massa molecular da fosfatase ácida por filtração em gel.....</b>	<b>14</b>
<b>3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.7.1. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da fosfatase ácida.....</b>	<b>15</b>
<b>3.7.2. Efeito do pH sobre a atividade PNFFásica e pirofosfatásica da fosfatase ácida.....</b>	<b>15</b>
<b>3.7.3. Inativação Térmica da Fosfatase Ácida.....</b>	<b>16</b>
<b>3.7.4. Efeito de efetores sobre a atividade PNFFásica da fosfatase ácida.....</b>	<b>16</b>
<b>3.7.5. Estudo da hidrólise dos substratos paranitrofenilfosfato e pirofosfato pela enzima fosfatase ácida de <i>Penicillium implicatum</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>

## ABREVIações UTILIZADAS

<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	Acido ribonucleico
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>P-NFF</b>	Para-nitrofenil fosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetra-acético
<b>PPi</b>	Pirofosfato
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>TCA</b>	Acido tricloacético
<b>PMSF</b>	Fenil Metil Sulfonil Fenazina

## RESUMO

A produção de fosfatase ácida extracelular pelo fungo *Penicillium implicatum* foi estudada em diferentes concentrações de fosfato no meio de cultivo e na presença e ausência de agitação. A produção de fosfatase ácida extracelular repressível foi cerca de 15 vezes maior em meio agitado e na presença de 50  $\mu$ M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  quando comparada ao tratamento controle. A enzima foi purificada 19 vezes em Fenil Sepharose CL-4B, e apresenta uma atividade específica de 27,3U/mg. A enzima é um monômero de massa molecular (Mr) da ordem de 45KDa. O pH ótimo aparente das atividades p-NFFásica e de pirofosfatase é de 5,5. Os íons Zn, Mg, e Co; EDTA, tartarato e iodoacetamida exerceram pouca ou nenhuma influência sobre a atividade da fosfatase ácida de *P. implicatum*; enquanto que a enzima foi inibida por molibdato e arsenato. A enzima apresenta atividade pirofosfatásica de 297,78U/mg a 4mM de pirofosfato e pH 5,5. A cinética de hidrólise simultânea dos substratos PNFF e PPI mostrou que ambos os substratos ligaram-se ao mesmo sítio. A aplicação da fosfatase na hidrólise de fitato em ração animal sugere uma forma de disponibilizar fosfato para o organismo e também minimizar o impacto ambiental.

**Palavras chave:** Fosfatase ácida, purificação, parâmetros cinéticos.

## ABSTRACT

The extracellular production of acid phosphatase by *Penicillium implicatum* was studied at different concentrations of phosphate and in the presence and absence of agitation growth medium. The production of extracellular repressible acid phosphatase was about 15-fold highest in agitated medium with 50 μM of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  when compared to the control treatment. The enzyme was purified 19-fold on Phenyl Sepharose CL-4B and showed specific activity of 27,3U/mg. The enzyme is a monomer with molecular weight ( $M_r$ ) of ~ 45KDa. The optimum pH of the p-NPP and pyrophosphate activities was 5,5. The Zn, Mg, Ca, Mn and Co ions, EDTA and tartarate had no effects; but it was inhibited by arsenate and molybdate. The pyrophosphate activity was 298U/mg at 4mM and pH 5,5. The kinetics data of simultaneous p-NPP and pyrophosphate hydrolysis, showed that both substrates had bound the same active site. The phosphatase application on fitate hydrolysis in animal food suggests a mean to dispose phosphate to the organism and also to minimize the environmental impact.

**Key words:** acid phosphatase, purification, kinetics parameters.

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos de fósforo são essenciais aos seres vivos, participam das funções de crescimento e diferenciação celular, da composição do DNA, RNA, dos fosfolipídios, do ATP, da regulação da atividade de várias enzimas e do controle gênico. Além de participar da formação de metabólitos fosforilados durante os processos anabólicos e catabólicos, ele é o segundo mineral mais abundante no corpo animal e é um nutriente requerido em alto nível pelos seres vivos.

O processo de mineralização consiste na transformação da forma orgânica em fósforo solúvel pela ação de hidrolases liberadas pelas raízes de plantas e microrganismos (NAHAS, 1994).

O interesse na utilização de microrganismos para a produção de enzimas para fins industriais, é devido à facilidade do controle nas condições de cultivo e da enorme biodiversidade em relação às enzimas extraídas de tecidos animais e vegetais; soma-se também o emprego de técnicas de engenharia genética para aprimorar tal processo. (SAID & PIETRO, 2004).

As fosfatases são hidrolases que agem sobre compostos de fósforo, e encontra-se em diversas formas moleculares, podendo ser classificadas em ácidas, neutras e alcalinas, dependendo do pH necessário para o desenvolvimento de sua atividade ótima.

Segundo SAID & PIETRO (2004), a utilização de enzimas em processos industriais, substituindo catalisadores químicos, deve-se ao fato da diferença nas condições de pH e temperatura exigidas para cada catalisador. E também quanto ao benefício econômico devido à redução de tempo e energia elétrica gasta; assim como a preservação de tanques reacionais e redução de rejeitos industriais, que podem comprometer o meio ambiente.

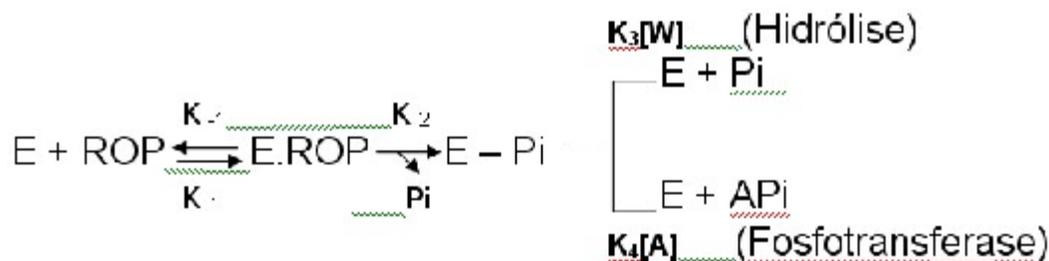
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. FOSFATASES – ASPECTOS GERAIS

As fosfatases são hidrolases que se encontram amplamente distribuídas na natureza, em diversas formas moleculares e utilizam como substratos fosfoésteres. Podem ser classificadas em ácidas, neutras e alcalinas, dependendo do seu pH de atuação.

A catálise enzimática, em geral, é caracterizada pela interação entre o substrato e o sítio ativo. A atividade das enzimas depende de uma série de fatores, como a concentração de substrato e da enzima, a composição do meio de reação, temperatura, pH, íons, inibidores, entre outros.

O centro ativo é constituído por grupos funcionais presentes, como cadeias laterais de aminoácidos específicos, íons metálicos e coenzima; importantes para a ligação do substrato ao sítio catalítico por interações iônicas, pontes de hidrogênio e o posicionamento preciso para a otimização da energia de ligação no estado de transição. A presença de metais na molécula enzimática auxilia na orientação do substrato ou estabilização dos estados de transição (LEHNINGER, 2002).



ROP: substrato; E.ROP: complexo; E-Pi: fosforil enzima; E: enzima livre

Segundo o esquema apresentado, o substrato liga-se à enzima e assim, observa-se a formação do complexo do Michaelis-Menten (E.ROP). A quebra do complexo promove a liberação do álcool P1 e do intermediário fosforilado E-Pi. Então, esta molécula é atacada pela água (W) liberando

o Pi e a enzima livre; realizando a reação de hidrólise. Se for adicionado ao meio de reação um aceptor (A), ocorre a transferência do fosfato inorgânico formando assim, um novo éster de fosfato (APi); reação de transfosforilação.

As fosfatases podem ser constitutivas ou repressíveis por fosfato. As fosfatases constitutivas são sintetizadas independentemente da composição do meio em que atuam; sendo a repressível sintetizada apenas na presença de concentrações limitantes de fosfato (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

A atividade da fosfatase ácida foi detectada em 1931, quando ROCHE observou a presença de uma enzima em eritrócitos capaz de hidrolisar a ligação ésterfosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato com um pH ótimo entre 5,6 e 6,0; muito diferente da fosfatase encontrada nos glóbulos brancos, que apresentou atividade ótima com um pH de 8,8 a 9,0 a partir de então conhecida como fosfatase alcalina.

A fosfatase ácida é uma enzima de grande importância no diagnóstico de determinadas doenças que acometem os seres humanos. A fosfatase ácida derivada da próstata é a que tem maior importância clínica, a presença da enzima no soro foi muito utilizada como diagnóstico do câncer prostático; atualmente utiliza-se o antígeno específico da próstata (PSA), pois é um marcador sensível nos primeiros estágios da doença, enquanto que a fosfatase ácida prostática (PAP) é utilizada no monitoramento do tratamento e também em investigações forenses (BULL et al., 2002). Além disto, é encontrada nos eritrócitos, plaquetas, leucócitos, fígado, baço, ossos e rins.

Existe sob diversas formas isoenzimáticas, distintas quanto à massa molecular, especificidade quanto ao substrato, sensibilidade a inibidores, presença e número de carboidratos ligados à cadeia polipeptídica; e por essas e outras propriedades vários autores tentam classificá-las.

ARAUJO et al. (1976) admitem que as fosfatases ácidas de diferentes origens podem ser classificadas em relação ao seu tamanho molecular, como de baixa (< 50KDa) e de alta massa molecular (> 90KDa). As de baixa massa molecular são sensíveis aos agentes sulfidril, insensíveis ao tartarato e possuem especificidade variável. Já as fosfatases ácidas de alta massa molecular possuem subunidades entre 50 e 60KDa, são estritamente hidrolases monoéster-fosfórico, sensíveis ao tartarato e insensíveis ao grupo sulfidril.

Já em mamíferos, as fosfatases ácidas são classificadas em: alta massa molecular - APM (80-200 KDa), sensíveis ao fluoreto e tartarato, resistentes ao formaldeído e reagente com grupo sulfidril e com resíduo de histidina no sítio ativo; baixa massa molecular - BPM (10-30 KDa), sendo inibidas por reagentes que bloqueiam o grupo sulfidril e formaldeído, enquanto que não é afetada pelo fluoreto e tartarato e enfim as de intermediária massa molecular - IPM (35-50 KDa) apresentam propriedades ora como as de BPM, ora as de APM (NAZ et al., 2006).

## 2.2. FOSFATASE EM MICRORGANISMOS

As atividades fosfatásicas têm sido estudadas em vários microrganismos, desde bactérias como, por exemplo, *Lactobacillus curvatus* (MAGBOUL & McSWEENEY, 1999), *Mycobacterium tuberculosis* (SALEH & BELISLE, 2000) e em fungos como *Aspergillus ficuum* (SHIEH et al., 1969), *Aspergillus nidulans* (HARSANYI & DORN, 1972), *Aspergillus fumigatus* (BERNARD et al., 2002). Segundo YADAV e TARAFDAR (2003), *A. niger* liberou elevada quantidade de fosfatases seguida pelo gênero *Penicillium*, demonstraram também que o fungo *Penicillium sp* tem habilidade para secretar quantidades máximas de 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.

A secreção de enzimas extracelulares é diretamente correlacionada com a extensão e crescimento das hifas (HIDAYAT et al., 2006).

Os microrganismos do solo são responsáveis por transformações de compostos nitrogenados, mineralização e solubilização do fósforo, oxidação, redução e a precipitação do ferro, entre outras. Segundo NAHAS et al. (1994), as fosfatases liberadas pelas raízes das plantas e microrganismos catalisam a conversão da forma orgânica em fósforo solúvel. Em fungos, a hidrólise, absorção e armazenamento de nutrientes depende da síntese e da secreção de enzimas específicas para cada nutriente (TORRIANI-GORINI, 1994). TARAFDAR et al. (2001), demonstraram que a fosfatase ácida de origem microbiana é mais eficiente na hidrólise dos compostos orgânicos: fitina, lecitina e glicerofosfato; presentes no solo, quando comparada com a enzima de origem vegetal.

Na maioria dos fungos estudados, as fosfatases ácidas estão sujeitas à repressão por altas concentrações de fosfato inorgânico (ALEKSIEVA & MICHEVA-VITEVA, 2000 e BERNARD et al., 2002). Em *Aspergillus nidulans*, foram identificadas quatro fosfatases e seus correspondentes genes estruturais, dois deles codificam a forma ácida e os outros dois a alcalina; são também enzimas repressíveis (NOZAWA et al., 1998).

Ferreira-Nozawa et al. (2003) relatam que em fungos, a síntese e secreção de fosfatase além de estar diretamente relacionada com os mecanismos adaptativos como a condição de fósforo limitante, é influenciada pela presença de outros elementos como o nitrogênio, fonte de carbono e circuito reguladores do pH. Estes mecanismos reguladores asseguram que as enzimas extracelulares somente serão sintetizadas em pH onde possam ter atividade hidrolítica efetiva.

## PURIFICAÇÃO, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CINÉTICAS

Inúmeros trabalhos têm se referido à purificação da fosfatase àcida de diversas fontes, porém a grande variabilidade de formas, com características próprias, impede a utilização de uma técnica única.

Vários estudos revelam que a maioria das fosfatases ácidas de origem microbiana não apresenta especificidade quanto ao tipo de substrato, e além do pH ótimo na região ácida essa característica muda conforme o tipo e a concentração do substrato utilizado no meio de reação (SHIEH et al., 1969; HARSANYI & DORN, 1972; NOZAWA et al., 1998; MAGBOUL & McSWEENEY, 1999; BERNARD et al., 2002).

O arsenato e molibdato são análogos estruturais do fosfato e atuam como inibidores competitivos potentes ligando-se à enzima com maior afinidade que a do próprio fosfato.

GUIMARÃES et al. (2004) sugerem em seu estudo com *Aspergillus caespitosus*, que as fosfatases ácidas não sofrem tanta influência pela adição de íons.

Enquanto que em *Aspergillus fumigatus*, a fosfatase ácida de é uma glicoproteína cuja síntese é reprimida em altas concentrações de fosfato. Em relação às suas propriedades, ela não é inibida por altas concentrações de tartarato (inibidor competitivo da enzima no tecido ósseo), porém sofre inibição por fluoreto de sódio, molibdato e vanadato. Além disso, a enzima não apresenta especificidade quanto ao substrato, pois hidrolisa tanto ésteres mono quanto difosfato (BERNARD et al., 2002)

SALEH & BELISLE (2000) admitem que a atividade da fosfatase ácida de *Mycobacterium tuberculosis* foi inibida em baixas concentrações de vários metais como cloreto de zinco, molibdato de sódio, cloreto de magnésio e sulfato de cobre; moderadamente em altas concentrações de EDTA e apresentou resistência ao tartarato.

Em *Lactobacillus curvatus*, a fosfatase ácida foi insensível aos íons metal divalentes, com exceção do zinco; enquanto que foi ativada na presença de EDTA e *o*-phenantrolina (MAGBOUL & McSWEENEY, 1999).

A enzima purificada de *Aspergillus nidulans* foi sensível ao molibdato e tartarato, apesar de que para o fluoreto apresentou efeito variável (HARSANYI & DORN, 1972).

### 2.3. APLICAÇÕES DAS FOSFATASES

O interesse pelas enzimas iniciou na década de 1830, com a preparação de um complexo enzimático extraído do malte de cevada na hidrólise do amido. Neste período a pepsina foi isolada do extrato de tecido estomacal, sendo responsável pela digestão da albumina. Na década de 1880, iniciou a produção comercial de uma amilase de origem fúngica. Posteriormente avanços no estudo bioquímico de enzimas foram realizados; assim como estudos teóricos sobre catálise e cinética das reações. Apenas na década de 1970 que a aplicação industrial de enzimas tornou-se uma realidade; sendo na década seguinte, realizadas intensas pesquisas na área de engenharia genética visando otimizar a produção em escala industrial (SAID & PIETRO, 2004).

Em alimentos vegetais é encontrado o fitato, forma que o fósforo se encontra estocado. É considerado um fator anti-nutricional devido ao ácido fítico, que é um agente quelante polianiônico que forma complexos com diferentes cátions de importância nutricional, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ; podendo também formar complexos com proteínas e aminoácidos (HAEFNER et al., 2005).

O interesse na aplicação biotecnológica de enzimas em ração, é principalmente devido ao custo das matérias primas tradicionais. Além disso, a utilização de enzimas que hidrolisam o fitato na ração, e atuam melhorando a digestibilidade e a disponibilidade do fósforo pelos animais, é uma forma de reduzir a contaminação ambiental. A poluição das águas pela lixiviação do fósforo a partir de excretas pode provocar a eutrofização, ou seja, o crescimento exacerbado de matéria orgânica; e conseqüente morte dos seres vivos daquele ecossistema (ABELSON, 1999). Nesse sentido, a utilização da fosfatase ácida para hidrolisar o fitato presente na ração, sugere uma forma de disponibilizar o fosfato para o consumidor, além do efeito adicional que pode apresentar. Em função disto, o objetivo deste trabalho foi estudar as melhores condições para obtenção da fosfatase ácida do fungo *Penicillium implicatum*, assim como purificar e estudar suas propriedades estruturais e cinéticas, visando uma possível aplicação biotecnológica.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes químicos usados foram de grau analítico.

O microorganismo *Penicillium implicatum* a ser utilizado no presente projeto foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ely Nahas.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Enzimologia Aplicada – Departamento de Tecnologia, FCAV-UNESP/ Jaboticabal-SP.

#### 3.1 Microrganismo: manutenção e suspensão

O fungo *Penicillium implicatum* foi mantido em meio Sabourand, contendo: peptona 1%, glicose 4% e agar 1,5%. O meio foi acondicionado em tubos de ensaio, autoclavados por 20 minutos a 1 atm e colocados em posição inclinada à temperatura ambiente para solidificação, possibilitando um aumento da superfície de cultivo; em que o fungo *Penicillium implicatum* foi mantido.

A suspensão do fungo foi inoculada em ambiente estéril (fluxo laminar) em frascos (placas de Petri e erlenmeyer) contendo 50mL do meio de cultura líquido proposto por NAHAS et al. (1994). Após incubação a 30°C durante 72 horas, o meio de cultura foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1 (previamente seco em estufa), com o auxílio de funil de Büchner e bomba de vácuo. O crescimento do fungo foi determinado através da pesagem do micélio após secagem à temperatura de 105°C por 24 horas. O filtrado fúngico foi considerado o extrato bruto.

#### 3.2. Efeito da concentração de fosfato na secreção da fosfatase ácida de *P. implicatum* em meio estacionário e agitado.

O estudo do efeito da concentração de fosfato na produção de fosfatase, o *P. implicatum* foi cultivado em meio líquido proposto por NAHAS et al. (1994) com concentrações de fosfato variando de 0 a 5mM e sob condições estacionária (placas de Petri) e de agitação orbital a 107 ciclos por minutos (erlenmeyer), a 30°C, durante 72 horas.

#### 3.3. Determinação de atividade enzimática:

As atividades enzimáticas mensuradas foram: PNFF e PPI.

### **3.3.1 Determinação da atividade paranitrofenilfosfatásica**

A atividade paranitrofenilfosfatásica da fosfatase ácida foi determinada a 37°C, de acordo com o método de Nyc (1967). A reação foi iniciada pela adição da amostra ao meio de reação contendo tampão acetato 0,1M, pH 5,4 e P-NFF (E. Merck, Darmstadt, Alemanha) 4mM em um volume final de 1mL. A reação foi interrompida pela adição de 1mL de NaOH 1M em intervalos de tempo previamente estabelecidos. O paranitrofenolato ( $\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH 13) liberado foi quantificado pela leitura da absorbância em 410nm em um espectrofotômetro Hitachi U-2000.

A unidade da atividade enzimática foi definida como sendo 1 $\mu$ moles de paranitrofenolato liberado por mg de proteína por minuto, sob as condições padrões do ensaio. Em cada experimento foram incluídos controles, sem adição da amostra estimando assim, a hidrólise espontânea do substrato.

### **3.3.2 Determinação da atividade pirofosfatásica:**

A atividade de pirofosfatase da fosfatase ácida foi determinada descontinuamente a 37°C, através da dosagem do fosfato liberado segundo o método descrito por HEINONEN & LAHTI (1981).

A reação foi iniciada pela adição da amostra ao meio de reação e em tempos pré-estabelecidos a reação foi interrompida pela adição de solução gelada de TCA 10% (concentração final).

Em cada experimento foram incluídos controles, sem a enzima, para se estimar a hidrólise espontânea do substrato. As determinações foram feitas em duplicatas.

Uma unidade (U) de enzima foi definida arbitrariamente como sendo 1  $\mu$ mol de fosfato liberado por minuto, nas condições padrões do teste.

### **3.4. Determinação da proteína:**

As determinações de concentração de proteína foram realizadas utilizando o Kit BioRad de Análise de proteínas (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), utilizando Soro Albumina Bovina 99%, fração V, como proteína padrão (Sigma, Saint Louis, MO, EUA.).

### **3.5. Purificação da fosfatase ácida de *P. implicatum*.**

### 3.5.1. Cromatografia em Phenyl-Sepharose

Ao extrato bruto de proteínas obtido pela filtração do meio de cultura pelo fungo *Penicillium implicatum* foi adicionado sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) até se obter 55% (p/v) de saturação, após adicionar o sal, deixou-se a solução sob agitação por 15 minutos.

Utilizando a resina de Phenyl-Sepharose montou-se uma coluna (2mL), a qual foi equilibrada com Tampão TRIS.HCl 5mM, pH 6,5, contendo 55% de saturação de sulfato de amônio. Após aplicação da solução com sal a uma coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B. A eluição das proteínas ligadas à resina foi efetuada utilizando-se um gradiente descontínuo a 55, 40, 25 e 0% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> previamente preparados em tampão TRIS.HCl 5mM e pH 6,5.

Frações de 1,5mL foram coletadas e o perfil de eluição foi acompanhado determinando-se a absorvância em 280 nm e a atividade paranitrofenilfosfatásica de cada fração.

### 3.5.2. Recromatografia em Phenyl-Sepharose

As frações com atividade enzimática eluídas da cromatografia foram reunidas, e novamente adicionado sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) até se obter 50% (p/v) de saturação, permanecendo sob agitação durante 15 minutos.

A solução protéica adicionada sulfato de amônio, foi recromatografada em Phenyl-Sepharose CL-4B, nas mesmas condições descritas acima. Frações de 1,5mL foram coletadas e o perfil de eluição protéico foi determinado em 280nm e atividade paranitrofenilfosfatásica de cada fração em 410nm.

### 3.5.3. Diálise

As frações com atividade, foram reunidas e dialisadas contra tampão TRIS.HCl 5mM pH 6,5 durante 4 horas, perfazendo um total de 3 trocas.

A enzima parcialmente purificada através desse procedimento foi congelada em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C, e utilizada em todos os experimentos do presente trabalho.

## 3.6. Determinação da Massa Molecular:

### **3.6.1. Eletroforese da fosfatase ácida em gel de poliacrilamida na ausência SDS:**

A eletroforese da fosfatase ácida nativa em gel de poliacrilamida, foi realizada segundo a metodologia descrita por DAVIS (1964) em gel a 10%, desenvolvida a 4°C, sob voltagem constante de 200 volts, durante 2 horas. Após a corrida, os géis foram removidos, fixados, corados e descorados de acordo com o procedimento descrito por BLUM et al. (1987).

### **3.6.2. Eletroforese da fosfatase ácida em gel de poliacrilamida na presença de SDS:**

Na presença de SDS, a eletroforese em gel de poliacrilamida segundo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970) foi desenvolvida em gel 9%, temperatura ambiente sob a voltagem constante de 150Volts durante 40 minutos. Como padrões de massa molecular foram usadas as proteínas  $\alpha$  Lactoalbumina (14,2 kDa); Inibidor da tripsina (20kDa); Tripsinogênio (24kDa); Anidrase Carbônica (29kDa); Gliceraldeído-3-fosfo-desidrogenase (36 kDa); Ovoalbumina (45 kDa) e Albumina Bovina (66kDa). Os géis foram corados conforme BLUM et al. (1987).

### **3.6.3. Determinação da massa molecular da fosfatase ácida por filtração em gel:**

A massa molecular da fosfatase ácida de *P. implicatum* foi estimada por cromatografia de filtração em gel de Sephacryl S-200 HR, em coluna previamente equilibrada e eluída com tampão TRIS.HCl 5mM, pH 6,5 contendo KCl 100 mM. Os padrões de proteínas foram: Citocromo C (12 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Soroalbumina bovina (66 kDa), Desidrogenase Alcoólica (150 kDa),  $\alpha$ -amilase (200 kDa) dissolvidas nesse mesmo tampão e aplicado 2mL de cada padrão separadamente.

Foram coletadas frações de 2,5 mL e o perfil de eluição foi acompanhado através de determinação em Absorbância 280 nm. A fosfatase ácida foi detectada através de sua atividade paranitrofenilfosfatásica, conforme descrito anteriormente.

### **3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos:**

Os parâmetros cinéticos da reação catalisada pela fosfatase ácida de *Penicillium implicatum* foram determinados utilizando o PNFF e PPi como substratos.

### **3.7.1. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da fosfatase ácida:**

O efeito da concentração do PNFF sobre a atividade da fosfatase ácida foi realizado em concentrações do substrato compreendidas entre 0,01 a 10mM, conforme a metodologia da atividade da fosfatase ácida descrita anteriormente.

Em cada experimento foram incluídos controles sem a adição da amostra para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato.

### **3.7.2. Efeito do pH sobre a atividade PNFFásica e pirofosfatásica da fosfatase ácida.**

O estudo do efeito do pH ótimo sobre a atividade da fosfatase ácida do *P. implicatum* foi realizado utilizando-se Tampão Acetato 0,1M (pH 4,0 a 6,0), TRIS.HCl 5mM (entre pH 6,5 a 7,5). A concentração final de PNFF variou de 0,001 mM a 5 mM, e de pirofosfato variou de 0,002 a 10 mM. A metodologia utilizada para a atividade da fosfatase ácida de cada substrato foi descrita anteriormente.

### **3.7.3. Inativação Térmica da fosfatase ácida**

A amostra foi incubada a 45°C, 50°C, 55°C e 60°C em tempos previamente estabelecidos, utilizando alíquotas de 60µL e a atividade foi determinada conforme descrito anteriormente, sendo considerada apenas a atividade residual.

### **3.7.4. Estudo de efetores sobre a atividade PNFFásica da fosfatase ácida.**

O efeito da concentração dos cátions de Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, e Co<sup>2+</sup> sobre a atividade da fosfatase ácida de *P. implicatum* foi realizada em tampão acetato 0,1M, pH 5,4 contendo PNFF 1mM. Todos os cátions foram usados na forma de cloretos. Além destes íons metálicos também foi testado o tartarato de sódio, EDTA, PMSF e iodoacetamida.

### **3.7.5. Estudo da hidrólise dos substratos paranitrofenilfosfato e pirofosfato pela enzima fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*.**

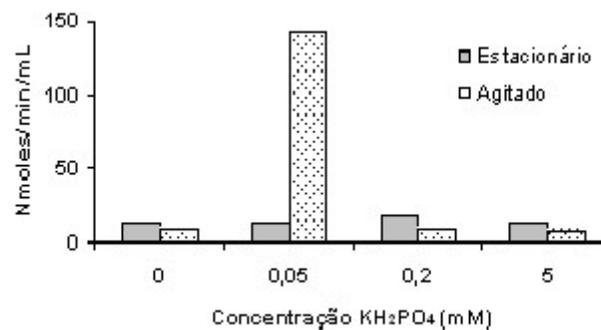
O estudo da influência dos substratos paranitrofenilfosfato e do pirofosfato sobre a atividade da fosfatase ácida parcialmente purificada foi realizado nas mesmas condições descritas acima, utilizando-se isoladamente e simultaneamente os substratos: 0,2 mM paranitrofenilfosfato e 2.0 mM pirofosfato.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na Figura 1 é mostrada a produção de fosfatase ácida pelo fungo *P. implicatum* cultivado em diferentes concentrações de fósforo, sob condições estacionária ou de agitação. Observa-se que a produção de fosfatase ácida em meio estacionário permanece praticamente constante independentemente da concentração de fósforo utilizado no meio de cultivo. Por outro lado, em meio agitado e na presença de 50 μM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  no meio de cultura, há um aumento de cerca de 15 vezes

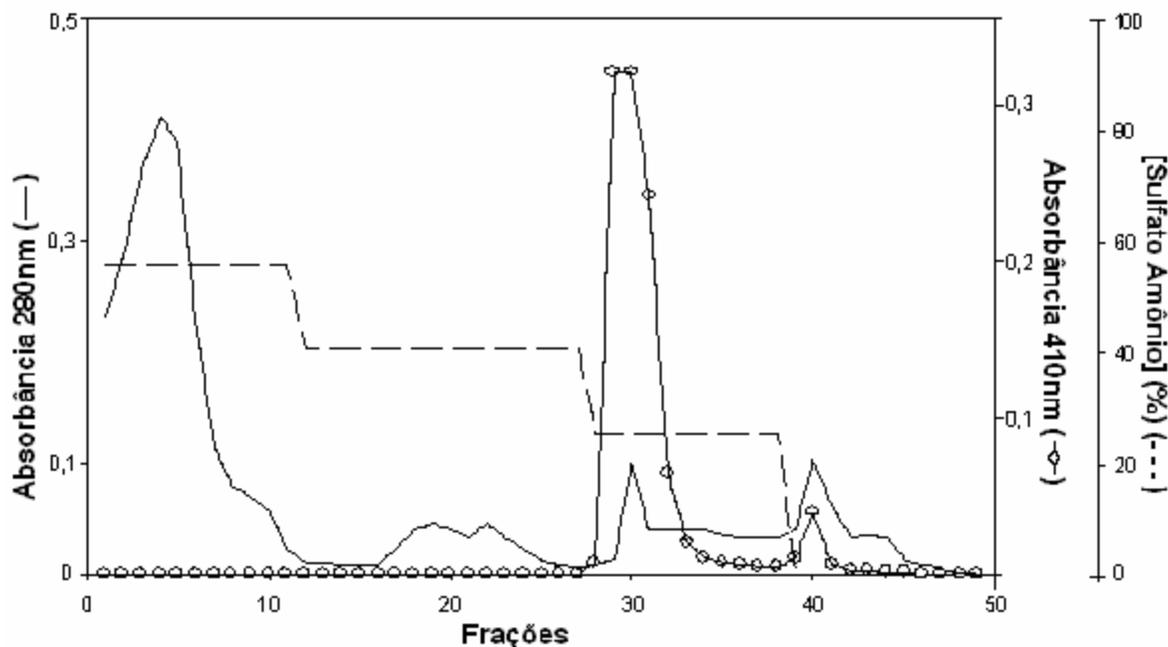
em relação ao controle e cerca de 10 vezes em relação ao meio estacionário. Sugerindo que a agitação favorece o contato da célula com os nutrientes facilitando a dispersão dos nutrientes e a homogeneização do meio, essas condições foram utilizadas para se obter filtrado fúngico rico em atividade fosfatásica.

Resultados similares foram obtidos em cultura agitada de *Neurospora crassa* (JACOBS et al., 1971), *Candida albicans* (ODDS & HIERHOLZER, 1973), *Schizosaccharomyces pombe* (DIBENEDETTO & COZZANI, 1975), *Penicillium chrisogenum* (HAAS et al., 1991), *Candida lypholitica*, (VASILEVA-TONKOVA et al., 1993), *Humicola lútea* (ALEKSIEVA & MICHEVA-VITEVA, 2000); sugerindo que a aeração é essencial para aumentar a excreção da fosfatase ácida.



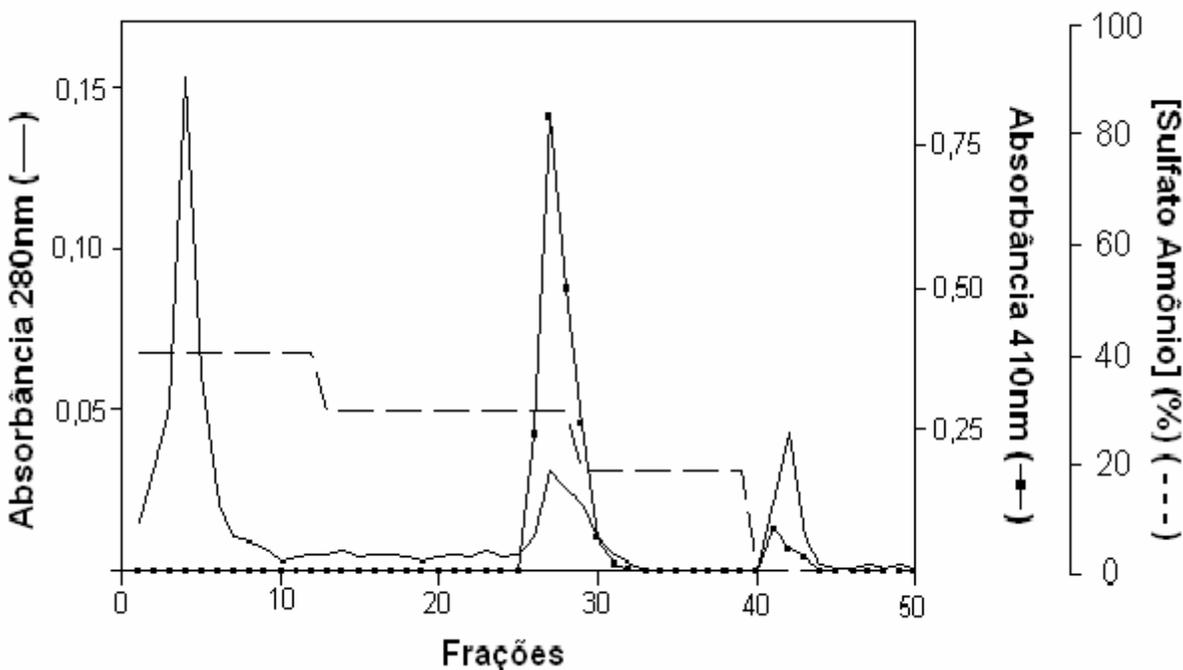
**Figura 1.** Atividade PNFFásica em diferentes condições de cultivo: meio estacionário e agitado, e com diferentes concentrações de fosfato (0 – 5mM).

A Figura 2 mostra o perfil da eluição de uma preparação escolhida ao acaso e que é representativa das demais realizadas. Observa-se a existência de três frações protéicas diferentes onde apenas as eluídas nos picos I e II apresentam atividade PNFFásica (Figura 2). Os resultados obtidos mostram ainda que cerca de 93% da atividade total é eluída com sulfato de amônio 25% de saturação (pico I) e apenas uma pequena fração (<7%) é eluída no pico II.



**Figura 2.** Cromatografia em coluna Phenyl-Sepharose CL-4B, previamente equilibrada em tampão TRIS.HCl 5mM, pH 6,5; contendo 55% de Sulfato de amônio. A eluição foi realizada com tampão TRIS.HCl 5 mM, pH 6,5 contendo concentrações decrescentes de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . O perfil protéico foi acompanhado determinando-se a absorbância em 280nm e o de atividade paranitrofenilfosfatásica a 410nm.

As frações com atividade PNFFásica eluídas com 25% de saturação em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , foram reunidas e adicionado sulfato de amônio até obtenção de 50% de saturação. Após esse procedimento, a mistura obtida foi recromatografada (Figura 3), conforme descrito anteriormente.



**Figura 3.** Recromatografia em coluna Phenyl-Sepharose CL-4B, equilibrada com tampão TRIS.HCl 5mM, pH 6,5 contendo 55% de Sulfato de amônio. A eluição foi realizada com TRIS.HCl 5mM, pH 6,5 contendo concentrações decrescentes (step-wise) de sulfato de amônio. (—) Concentração de proteína, leitura a 280nm; (---) atividade para nitrofenilfosfatásica para fosfatase ácida, leitura a 410nm; (····) gradiente de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (55%-0).

Após a eluição, as frações do Pico I com atividade PNFFásica, foram reunidas e dialisadas contra Tampão TRIS.HCl 5mM, pH 6,5. Neste método, a separação das proteínas presentes é devida à interação entre as regiões hidrofóbicas da molécula protéica com os grupos hidrofóbicos da resina. A escolha desse tipo de cromatografia para a purificação da fosfatase ácida foi baseada no sucesso obtido por PIZAURO et al. (1995) na purificação da fosfatase alcalina que surge associada ao processo de calcificação ectópica.

A Tabela 1 mostra os dados da purificação da fosfatase ácida de *P. implicatum*. Observa-se que a atividade PNFFásica apresenta uma atividade específica de 27,13 U/mg e a purificação foi da ordem de 19 vezes maior que a do extrato bruto; a recuperação protéica foi de 2,6% e de atividade foi de 21,06%.

**Tabela 1.** Purificação da enzima fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*.

<b>Passos</b>	<b>Vol (mL)</b>	<b>Prot (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Recup (%)</b>		<b>Ativ Total</b>	<b>(U/mg)*</b>	<b>Recup (%)</b>	<b>Purif (x)</b>
<b>Extrato Bruto</b>	10	90,2	100		128,8	1,43	100	1
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 55% Fração</b>	12	7,5	9,98		80	8	62,11	5,6
<b>Atividade Crom F.S.</b>	6,9	,4	5		97,9	15,21	11,81	10,7
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25% Fração</b>	7,4	5,4	4,4		62,1	11,57	48,21	8,1
<b>Atividade Recrom.</b>	10,9	2,2	2,6		58,3	27,13	21,06	19

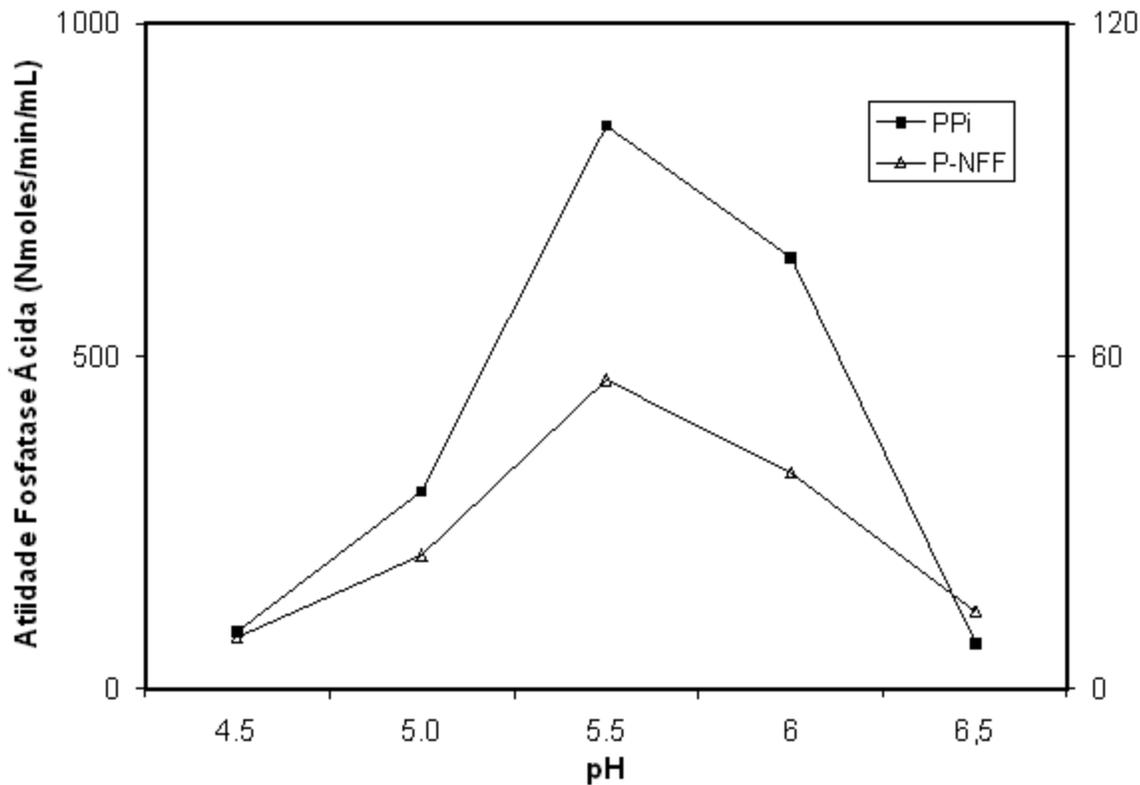
\* U/mg: atividade específica em  $\mu$ Mol/min/mg.

A eletroforese em gel de poliacrilamida da fosfatase ácida nativa revelou a existência de pequenas quantidades de outros contaminantes protéicos antes da recromatografia (Figura 4 – linha 2), os quais foram removidos durante a recromatografia (Figura 4 – linha 3).

A análise dos parâmetros cinéticos obtidos mostra que o pirofosfato foi o substrato que apresentou a maior velocidade máxima (Tabela 2 e Figura 5). Além disso, verifica-se que o pH ótimo de atuação da enzima independe do substrato, pois para ambos é de pH 5,5. Em relação ao coeficiente de Hill, os resultados indicam que a enzima apresenta características "Michaelianas" para as interações em relação ao PNFF (0,001 a 5mM) e o pirofosfato (0,002 a 10mM). Embora esse valor seja maior que o pH 4,5 obtido por MAGBOUL & MCSWEENEY (1999) para a enzima de *Lactobacillus curvatus*; ele é menor que o observado em *Aspergillus nidulans* (6,0 a 6,5) por NOZAWA et al. (1998). Entretanto ele é similar á faixa de pH ótimo (4 e 6) estimada para a enzima de *Aspergillus fumigatus* (BERNARD et al., 2002).

**Tabela 2.** parâmetros cinéticos da hidrólise do PNFF e do pirofosfato pela fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*.

SUBSTRATO	pH	V (U.mg-1)	nH	K05(mM)	V/K05
	4.5	9,1	1,07	0,02	431,3
<b>PNFF</b>	5.0	34	0,8	0,13	253,24
<b>PNFF</b>	5.5	55,7	0,91	0,60	93.1
<b>PNFF</b>	6,0	38,8	1,07	1,3	29,6
<b>PNFF</b>	6,5	25,00	0,75	6,6	3,8
<b>Pirofosfato</b>	4	54	1,2	0,03	1.637,0
<b>Pirofosfato</b>	4,5	84	1,01	0,08	1.078,0
<b>Pirofosfato</b>	5	166	1,2	0,12	1.302,0
<b>Pirofosfato</b>	5,5	845	0,9	1.4	576,00
<b>Pirofosfato</b>	6.0	649	1,07	0.8	781,00
<b>Pirofosfato</b>	6,5	42	1,07	0,2	233

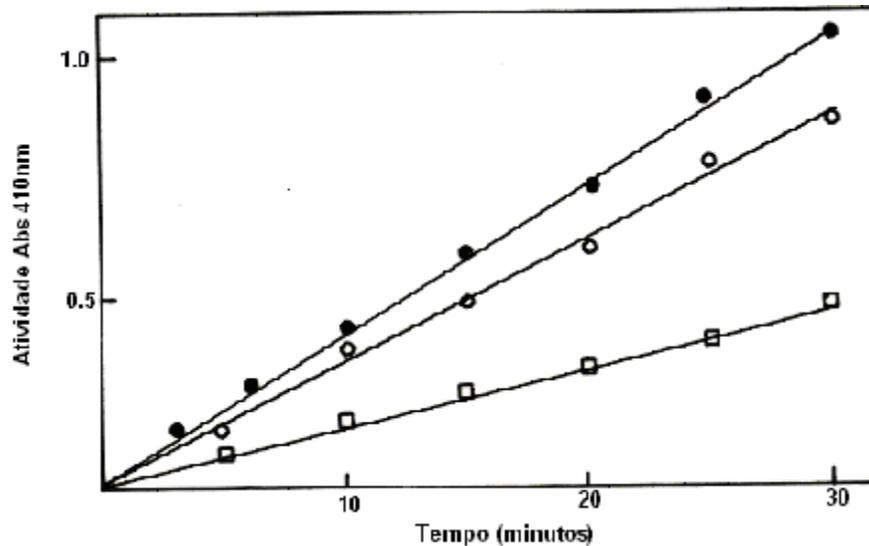


**Figura 5.** Efeito do pH na Atividade PNFFásica e Pirofosfatásica da fosfatase ácida do fungo *Penicillium implicatum*.

O estudo da cinética de hidrólise do PNFF e do pirofosfato isoladamente ou presentes simultaneamente no meio de reação mostram (Figura 6), que a hidrólise destes ésteres de fosfato ocorre através de uma única classe de sítios de fixação do substrato à enzima. Essa interpretação é baseada no fato que o produto liberado pela hidrólise dos substratos não é aditiva e localiza-se entre as velocidades obtidas para cada substrato isoladamente. Comportamento similar ao encontrado na enzima de *Aspergillus fumigatus* que hidrolisa tanto ésteres mono quanto difosfato (BERNARD et al., 2002).

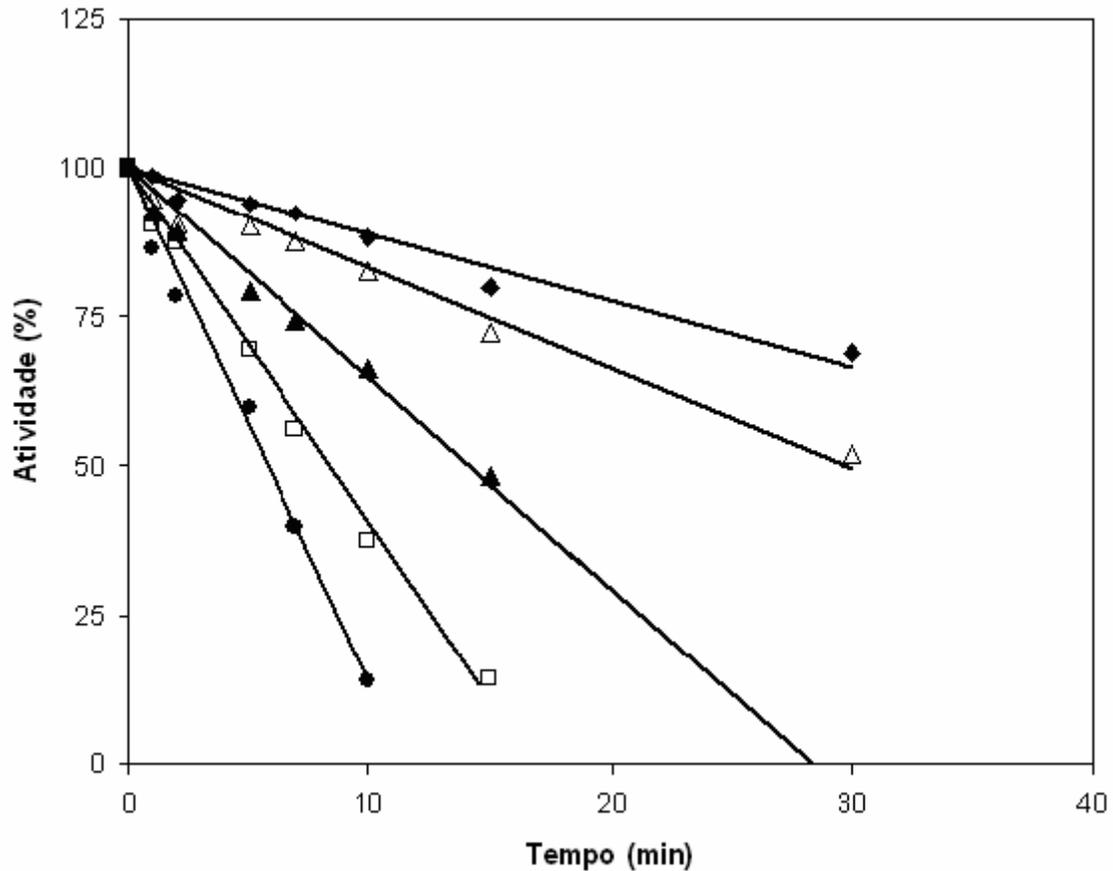
As fosfatases de baixa massa molecular possuem especificidade variável. A inespecificidade observada para a hidrólise dos substratos PNFF e pirofosfato pela fosfatase de *P. implicatum* é

similar àquela obtida para a enzima de diferentes microorganismos.



**Figura 6.** Cinética de hidrólise do pirofosfato e do paranitrofenilfosfato pela fosfatase ácida purificada. A reação foi iniciada pela adição da amostra ao meio de reação contendo acetato 100 mM, pH 5,4. As concentrações de substratos usadas foram: (●) 0.2 mM paranitrofenilfosfato. (□) 2 mM de pirofosfato. e (▲) 0.2 mM paranitrofenilfosfato mais 2,0 mM de pirofosfato independentes.

O efeito da temperatura é mostrado na Figura 7, observa-se que a 45°C a fosfatase ácida de *Penicillium implicatum* apresentou perda de atividade na ordem de 50% em relação à atividade controle, quando foi incubada durante 30 minutos. Já a 60°C a inativação térmica da enzima é bastante acelerada, sendo que em 10 minutos apresenta uma atividade residual de 14%.



**Figura 7.** Inativação térmica da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*. (Δ) 40°C; (▲) 45°C; (●) 50°C; (□) 55°C e (●) 60°C. A atividade relativa foi determinada através da adição de 60μL da mistura de incubação ao meio reacional contendo Tampão Acetato 100mM pH 5,4 e PNFF 4mM.

O estudo da estabilidade térmica é importante pelo fato de que a temperatura afeta dois processos independentes: o aumento da velocidade de reação e a estabilidade térmica da enzima. Dependendo da aplicabilidade, a enzima deve igualmente suportar a temperatura inerente ao processamento; no caso do uso de enzimas na alimentação animal durante o processo de fabricação da ração e da peletização os constituintes são umedecidos e aquecidos em altas temperaturas.

**Tabela 3.** Termoestabilidade da enzima fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*, incubada em diferentes temperaturas. A atividade foi realizada adicionando ao meio de reação contendo Tampão Acetato 10mM pH 5,4 e PNFF 4mM, 60µL da mistura incubada.

Temperatura incubação (°C)	Atividade (%)
40	88
45	82
50	66
55	38
60	14

\*10 minutos de incubação da amostra parcialmente purificada

O estudo do efeito de diferentes substâncias sobre a atividade da fosfatase ácida é mostrado na Tabela 4, os resultados obtidos mostram claramente que a fosfatase ácida de *P. implicatum* é insensível ao tartarato, EDTA e aos íons: zinco, cobalto e magnésio. Na presença de Iodoacetamida e PMSF, a enzima apresentou pouca ou nenhuma influência sobre a atividade da fosfatase ácida, enquanto que foi inibida na presença de arsenato e molibdato. O fato de o tartarato, EDTA e PMSF não afetarem a atividade da fosfatase mostra que a enzima não é uma metaloenzima. E a inibição na presença de arsenato e molibdato deve-se ao fato de que estas substâncias apresentam semelhanças à estrutura da molécula de fosfato, sendo assim inibidores competitivos.

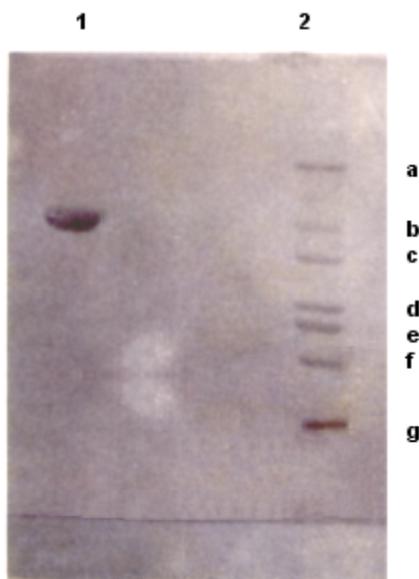
Esse comportamento é semelhante ao da enzima isolada de outros microrganismos como de *Mycobacterium tuberculosis* (SALEH & BELISLE, 2000) e de *Aspergillus fumigatus* (BERNARD et al., 2002), em que a fosfatase ácida não sofreu influência por altas concentrações de tartarato, mas sofrendo inibição pelo molibdato. Além disso, a fosfatase ácida de *Aspergillus fumigatus* não apresenta especificidade quanto ao substrato, pois hidrolisa tanto ésteres mono quanto difosfato; comportamento esse também observado para a fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*.

**Tabela 4.** Efeito de diferentes substâncias e íons sobre a atividade da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*.

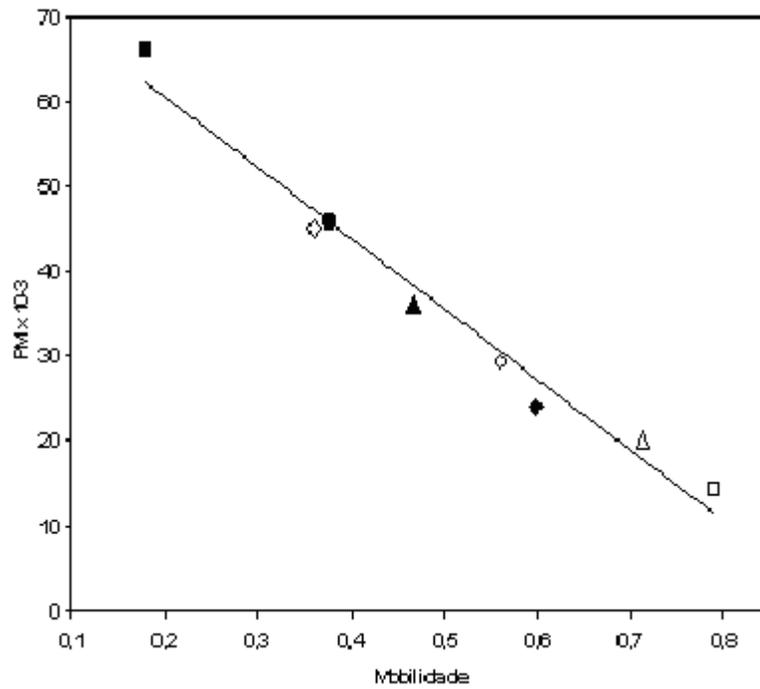
Efetores	Porcentagem (%)
Controle	100
Zn <sup>2+</sup>	103
Mg <sup>2+</sup>	102
Co <sup>2+</sup>	100
Tartarato de Sódio	104
EDTA	102
Iodoacetamida	83
Arsenato de Sódio	10
Molibdato de Sódio	0,8
PMSF	96

A massa molecular da enzima foi estimada como sendo de 45KDa por cromatografia de filtração em gel e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 8 e 9). Estes dados são similares aos obtidos para a fosfatase ácida extracelular de *Penicillium chrisogenum*, que é da ordem de 55KDa (HAAS, 1991).

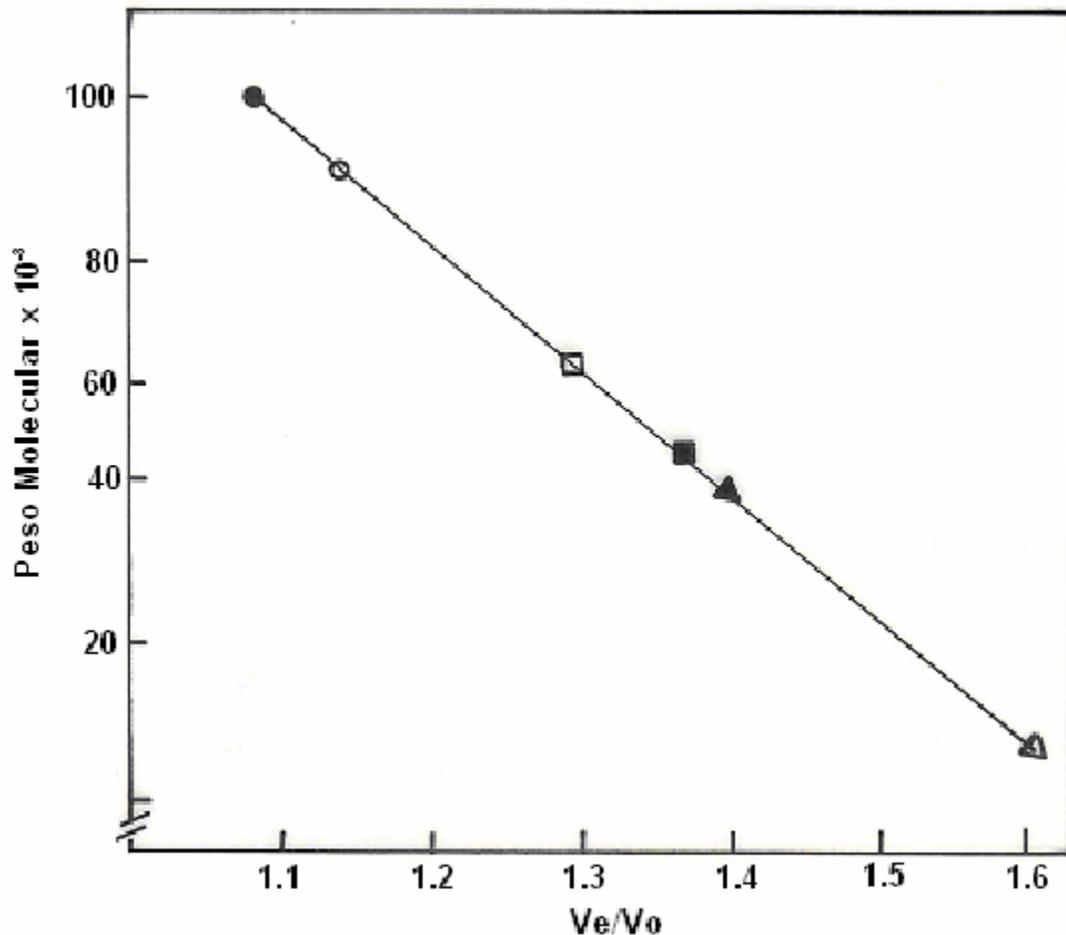
O fato do valor da massa molecular obtida para a enzima na forma nativa (cromatografia de filtração em gel) ser igual à obtida para a enzima desnaturada (SDS-PAGE), vem confirmar a hipótese de que a enzima parcialmente purificada é um monômero (Figura 10).



**Figura 8.** Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS. A eletroforese foi desenvolvida em temperatura ambiente, sob voltagem constante. Linha 1- Fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*. Linha 2- proteínas: g ( $\alpha$  Lactoalbumina-14,2 kDa); f (Inibidor da tripsina-20kDa); e (Tripsinogênio-24kDa); d (Anidrase Carbônica-29kDa); c (Gliceraldeído-3-fosfo-desidrogenase-36 kDa); b (Ovoalbumina-45 kDa) e a (Albumina Bovina-66kDa).



**Figura 9.** Determinação da massa molecular da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*, em gel de poliacrilamida-SDS. (i) Soroalbumina bovina - 66KDa; (○) Ovoalbumina - 45Kda; (?) Gliceraldeído-3fosfo-desidrogenase - 36Kda; (?) Anidrase Carbônica - 29KDa; (◆) Tripsinogênio - 24KDa; (△) Inibidor da Tripsina - 20KDa; (?) á Lactoalbumina - 14,2KDa e (?) Fosfatase Ácida de *Penicillium implicatum*.



**Figura 10.** Determinação da massa molecular da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*, por cromatografia de filtração em gel de Sephacryl S-200 HR. (●) α-amilase (200 kDa); (○) Desidrogenase Alcoólica (150 kDa), (□) Soroalbumina bovina (66 kDa), (■) fosfatase ácida de *P. implicatum* (?) Anidrase Carbônica (29 kDa), (Δ) Citocromo C (12 kDa).

Além disso, a fosfatase ácida de *P. implicatum* é insensível ao tartarato, EDTA, magnésio e zinco (Tabela 4), confirmando que se trata de uma enzima de baixa massa molecular, visto que as fosfatases ácidas de alta massa molecular são estimuladas por EDTA (MAGBOUL & McSWEENEY, 1999).

Desta forma, o estudo da fosfatase ácida do *Penicillium implicatum* é de interesse não apenas para o conhecimento dos processos de produção da enzima e sua secreção, mas também para o conhecimento das propriedades cinéticas e estruturais da enzima. A purificação da enzima permitiu-nos conhecer melhor o mecanismo de produção da enzima pelo fungo, que é de fácil cultivo em laboratório; visando uma possível aplicação biotecnológica. Sabendo ainda que íons metálicos usualmente utilizados na ração animal, não exercem nenhum efeito na enzima; a possível utilização da fosfatase ácida para hidrolisar o fitato presente na ração, sugere uma forma de disponibilizar o fosfato para o organismo, visando minimizar o impacto ambiental, além do efeito adicional que a enzima pode apresentar.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

ABELSON, PHILIP H. A potencial Phosphate Crisis. **Science**. 283- 5410: 2015, 1999.

ALEKSIEVA, P. & MICHEVA-VITEVA, S. Regulation of extracellular acid phosphatase biosynthesis by phosphates in proteinase producing fungus *Humicola lútea* 120-5. **Enzyme And Microbial Technology** 27: 570-575, 2000.

ARAUJO, P.A.; MIES, V. & MIRANDA, A. Subcellular distribution of low and high molecular weight acid phosphatases. **Biochim. Biophys. Acta**, 452: 121-130, 1976.

BERNARD, M.; MOUYNA, I.; DUBREUCQ, G.; DEBEAUPUIS, J.P.; FONTAINE, T.; VORGAS, C.; FUGLSANG, C.; LATGÉ, J.P. characterization of a cell-wall acid phosphatase (phoap) in *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**. 148: 2819-2829, 2002.

BLUM, H.; BEIER, H. AND GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels electrophoresis 8:93-99, 1987.

BULL, H.; MURRAY, P.G.; THOMAS, D.; FRASER, A.M.; NELSON, P.N. Acid phosphatases. **J Clin Pathol: Mol Pathol**; 55:65-72, 2002.

DAVIS, B.J. Disc Electrophoresis – “Method and application to human serum proteins”. **Ann. N.Y. Acad. Science**, 121: 404-427, 1964.

DIBENEDETTO G.; COZZANI, I. Nonspecific Acid Phosphatase from *Schizosacharomyces pombe*: Purification and physical chemical properties. **Biochemistry**, 14n 13: 2847 – 52, 1975.

ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: **Educs**, p.11, 2004.

FERREIRA-NOZAWA, M.S.; NOZAWA, S.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. & ROSSI, A. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **Braz. J. Microbiol.**, 34: 161-164, 2003.

GUIMARÃES, L.H.S.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; LEONE, F.A. & POLIZELI, M.L.T.M. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 39, 201-207, 2004.

HAAS, H.; REDL, B.; LEITNER, E.; STÖFFLER G. *Penicillium chrysogenum* extracellular acid

- phosphatase: purification and biochemical characterization. **Biochem Biophys Acta.** 074 (3): 392-397, 1991.
- HAEFNER, S.; KNIETSCH, A.; SCHOLTEN, E.; BRAUN, J. LHSCEIDT, M. & ZELDER, O. Biotechnological production and applications of phytases. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 68: 588-597, 2005
- HARSANYI, Z; DORN, G.L. Purification And Characterization of acid phosphatase v from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, 246- 255, 1972.
- HEINONEN, J.K. AND LAHTI, R.J. A new convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analyt Biochem** 113: 313-317, 1981.
- HIDAYAT, B.J.; ERIKSEN, N.T. & WIEBE, M.G. Acid phosphatase production by *Aspergillus niger* N402A in continuous flow culture. **FEMS Microbiol Lett** 254, 324-331, 2006.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, 227: 680-685, 1970.
- NELSON, D.L. & COX, M.M. Enzimas. In: Lehninger Princípios de Bioquímica, 3ªed. São Paulo, 2002.
- MAGBOUL, A.A.A.; MCSWEENEY, P.L.H. Purification and properties of an acid phosphatase from *Lactobacillus curvatus* Dpc2024. **International Dairy Journal.** 9: 849-885, 1999
- NAHAS, E; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, 18: 49-53, 1994.
- NAHAS, E; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, 18: 43-48, 1994.
- NAZ, R.; SAEED, A. & SAEED, A. An 18 KDa Acid Phosphatase from Chicken Heart Possesses Phosphotransferase Activity. **The Protein Journal**, 25, nº2, 2006
- NOZAWA, S.R.; MACCHERONI, W.; STABELI, R.G.; THEDEI, G. AND ROSSI, A. Purification and properties of pi-repressible acid phosphatases from *Aspergillus nidulans*. **Phytochemistry**, 49: 6/1517-1523; 1998.

- NYC E.F. A repressible acid phosphatase in *Neurospora crassa*. **Biochim, Biophys Res. Communication**, 27: 183.-188, 1967.
- ODDS, F.C. & HIERHOLZER, J.C. Purification and properties of a glycoprotein acid phosphatase from *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, 144: 257- 266, 1973.
- PIZAURO, J.M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F.A. Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase c-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. **Molecular and Cellular Biochemistry** 152: 121-129, 1995.
- ROSSI, A.; NOZAWA, S.R.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Fosfatase Alcalina. In: **Enzimas como agentes Biotecnológicos**, p. 150-158. Editado por SAID, S. & Pietro, R.C.L.R. Editora Legis Summa, 2004
- SAID, S. & PIETRO, R.C.L.R. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**, p. 1-7. Editado por SAID, S. & Pietro, R.C.L.R. Editora Legis Summa, 2004
- SALEH, M.T.; BELISLE, J.T. Secretion of an acid phosphatase (sapm) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. **Journal of Bacteriology**, 6850-6853, 2000.
- SHIEH, T.R., WODZINSKI, R.J., WARE, J.H. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspegillus ficuum*. **Journal of Bacteriology**, 1161-1165, 1969.
- TARAFDAR, J.C.; YADAV, R.S. AND MEENA, S.C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** 164, 279-282, 2001.
- TORRIANI-GORINI, A. Regulation of phosphate metabolism and transport. In: Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology, pp. 1-4. Edited by: Torriani-Gorini, A., Yagil, E. & Silver, S. Washington, DC. **American Society for Microbiology**, 1994.
- VASILEVA-TONKOVA, E.S.; GALABOVA, D.N.; BALASHEVA, M.A.; SOTIROVA, A.V. Purification and partial characterization of acid phosphatase from *Candida lipolytica*. **Journal of General Microbiology**, 139: 479-483, 1993.
- 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 & Biochemistry** 35: 1-7, 2003.