



## CARACTERIZAÇÃO DE UMA FOSFATASE ÁCIDA PRODUZIDA POR *Trichoderma harzianum*

LIMA, Rhalcia Cristina de Melo<sup>1</sup> ; ULHOA, Cirano José<sup>2</sup> .

Palavras-chave: controle biológico, *Trichoderma harzianum*, fosfatases ácida.

### 1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* é descrito como um agente de controle biológico utilizado contra alguns fitopatógenos, tais como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium sp* (Herrera-Estrella & Chet, 1998). Um dos mecanismos de antagonismo deste fungo é denominado de micoparasitismo e se caracteriza pela produção de enzimas hidrolíticas, como quitinases (EC. 3.2.1.14) e N-acetilglucosaminidase (EC. 3.2.1.30), responsáveis pela quebra da parede celular do fungo hospedeiro. Existem evidências de que o micoparasitismo ocorre através de eventos seqüenciais, que vão desde o reconhecimento até o contato direto com o hospedeiro com a expressão de genes específicos (Herrera-Estrella & Chet, 1998). Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos com produtores de uma grande variedade de enzimas de interesse biotecnológico. Além disso, são capazes de promover o crescimento de plantas, quando inoculados em associação com sementes. Um dos fatores que contribui para esta característica é a capacidade deste fungo solubilizar e liberar fosfato do solo para as raízes (Harman & Kubicek, 1998). Existe também um grande interesse em aplicação de enzimas com estas características em nutrição animal. Fosfatases ácidas (E.C. 3.1.3.2) são enzimas que catalisam a hidrólise de uma variedade de compostos fosfatados orgânicos, com a produção de fósforo solúvel, contribuindo para o metabolismo energético, transdução de sinal (Dickman & Yarden, 1999) ou a aquisição de fósforo com propósito nutricional (Walsh *et al.*, 1994). São enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza, e têm sido encontradas em bactérias (Jeong & Macaskil, 1999), fungos (Tarafdar *et al.*, 1988) e plantas (Kawarasaki *et al.*; 1996). Grande parte do fósforo (P) que é aplicado no solo como fertilizante, rapidamente se torna indisponível para as plantas, acumulando-se em frações de fósforo inorgânico (Sanyal & De Datta, 1991). O aumento da atividade de fosfatase ácida pode ajudar às plantas a usarem fosfatos de fontes orgânicas (Tarafdar & Claassen, 1988).

Portanto, devido à grande importância do fungo *Trichoderma* para controle biológico, a solubilização de P no solo e o papel relevante que as enzimas produzidas por ele representam para a biotecnologia, foi nosso interesse neste trabalho estudar a produção e caracterização das enzimas fosfatases ácidas produzidas por fungos da espécie *T. harzianum*.

### 2. METODOLOGIA

2.1 - Manutenção do fungo Os isolados *Trichoderma harzianum* ALL-42 da Coleção do Laboratório de Enzimologia / UFG, serão mantidos com repiques periódicos em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocado a 4°C.

### 2.2 – Produção de Enzimas

Esporos dos isolados de *Trichoderma harzianum* ALL-42 ( $10^7$  mL<sup>-1</sup>), foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 25 mL de meio de TLE composto por: 1g/L de bactotripton, 0,3g/L de uréia, 2,0g/L de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 1,4g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,3g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,3g/L de CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e solução de elementos traços; suplementado com 0,5% de farelo de milho como indutor. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28°C e velocidade de 140 rpm. Após 48 horas de incubação o sobrenadante foi coletado e utilizado como fonte de enzimas.

### 2.3 – Atividade Enzimática

A atividade de fosfatase ácida foi determinada segundo metodologia descrita por Bessey *et al.*, (1946), usando-se *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) (Sigma Chemical Company®) como substrato, na concentração de 5 mmol.L<sup>-1</sup>, em tampão citrato trissódico 250 mmol.L<sup>-1</sup> pH 4,8.

### 2.4 – Determinação de Proteína

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina bovina (Sigma-Co) como padrão.

### 2.5 – Determinação da purificação de fosfatase ácida em eletroforese, sob condições desnaturantes

Para análise do perfil de proteínas secretadas no meio de cultura será utilizado um sistema de eletroforese (MiniGel-Sigma) em gel de poli(acrilamida) 10% em condições desnaturantes, SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Ao final da corrida o gel foi corado pelo método de coloração com nitrato de prata segundo metodologia descrita por Blum *et al.*, 1987.

### 2.6 – Purificação da fosfatase ácida de *T. harzianum* ALL- 42

O extrato bruto de *T.harzianum* foi aplicado numa coluna de troca phenyl-Sepharose High Performance (1,0 cm x 17,0 cm) (Amershan Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com o tampão A, com um fluxo de 120 mL.h<sup>-1</sup>. A coluna foi lavada com 80 mL do tampão A e em seguida aplicado um gradiente variando a concentração do tampão A de 2 a 0 mol.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e posteriormente lavada novamente com 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5,0. Frações de 2 mL foram coletadas e usadas para determinação de proteínas a 280 nm e atividade de fosfatase ácida. (Figura 1). As frações que apresentaram maior atividade de fosfatase ácida foram reunidas (6 mL), dialisadas contra água a 4°C, e concentradas por liofilização. O material liofilizado foi diluído em 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5,0 contendo 100 mmol.L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio e aplicado numa coluna de gel filtração, Sephacryl S-200 (44,3 x 2,6 cm) (Amershan Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com este mesmo tampão. O fluxo utilizado foi de 20 mL.h<sup>-1</sup> e frações de 1 mL foram coletadas e utilizadas para determinação de proteínas a 280 nm e atividade de fosfatase ácida. (Figura 2)

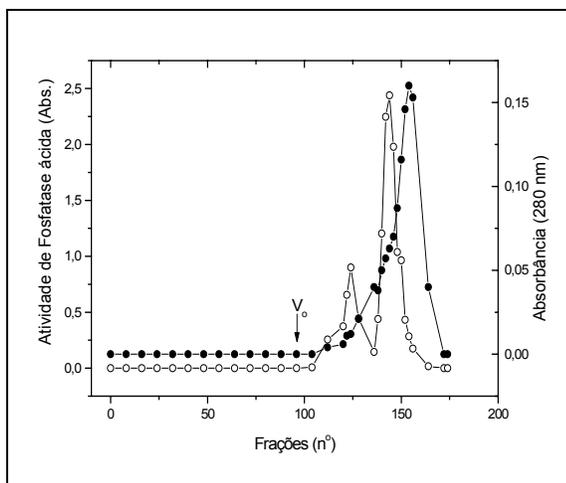
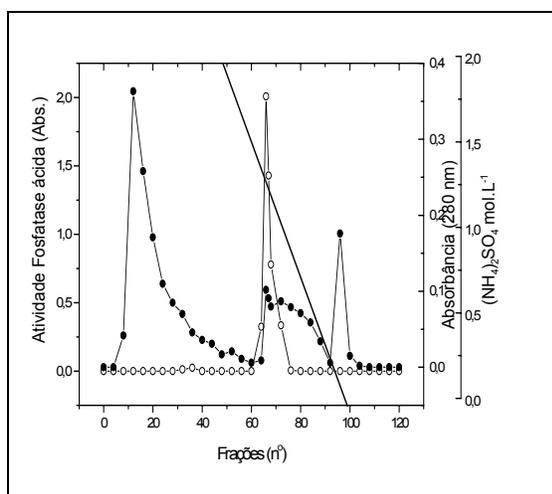
### 2.7 – Caracterização da fosfatase ácida de *T. harzianum* ALL- 42

Determinação da massa molecular, pH ótimo, temperatura ótima, termoestabilidade, efeito de íons metálicos e alguns compostos na atividade

enzimática, determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e Velocidade máxima da reação ( $V_{máx}$ ).

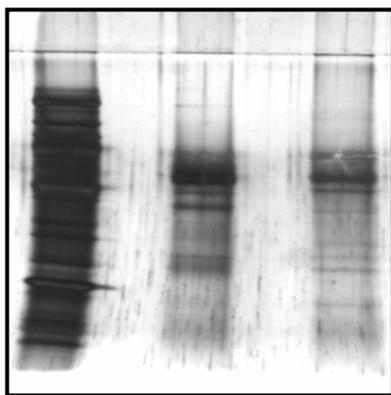
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Trichoderma harzianum* ALL-42 produziu duas fosfatases ácidas após crescimento em meio TLE contendo farelo de milho. A fosfatase ácida de menor massa molecular foi parcialmente purificada por cromatografia em colunas de phenyl-Sepharose (Figura 1) e Sephacryl S-200 (Figura 2). O fator de purificação encontrado foi de 4,31 vezes com um rendimento de 44,8 %. A massa molecular da enzima parcialmente purificada foi de 72 kDa determinada por filtração em gel em Sephacryl S-200. O pH ótimo encontrado foi de 5,0 e temperatura de 45°C (Tabela 1). A enzima apresentou maior estabilidade em pH 5,8 e temperatura de 40°C. NaF (5 mmol.L<sup>-1</sup>), β-mercaptoetanol (5 mmol.L<sup>-1</sup>) e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5, 10 e 15 mmol.L<sup>-1</sup>) inibiram fortemente a atividade da enzima (Tabela 2). Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram de 838,5 μmol.mL<sup>-1</sup> e 129,6 U.min<sup>-1</sup>, respectivamente. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> altera os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$ , sugerindo uma inibição da enzima do tipo incompetitiva.



**Figura 1.** Perfil cromatográfico do sobrenadante da cultura de *T. harzianum* ALL 42 aplicado em coluna de interação hidrofóbica, phenyl-Sepharose -●- Proteína ( $A_{280nm}$ ); -○- Atividade de fosfatase ácida; \_\_\_ gradiente de  $(NH_4)_2SO_4$  (2 - 0 mol.L<sup>-1</sup>)

**Figura 2.** Perfil cromatográfico do pico de atividade de fosfatase ácida proveniente da cromatografia de interação hidrofóbica, aplicado à coluna de filtração em gel Sephacryl S-200. -○- Atividade fosfatase ácida; -●- Proteína ( $A_{280 nm}$ );  $V_0$  = volume vazio.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%), corada pela metodologia da prata, de amostras de *T.*

*harzianum* ALL 42. Amostras – 1. extrato bruto; 2. frações com atividade de fosfatase ácida provenientes da coluna de interação hidrofóbica ; 3. frações com atividade de fosfatase ácida correspondente ao pico II da coluna de gel filtração.

**Tabela 01.** Propriedades bioquímicas da fosfatase ácida produzida por *T. harzianum*

Massa molecular (kDa)	72
pH ótimo	5,0
Temperatura ótima	45°C
Termoestabilidade	
pH 5,0/40°C/60 min	95
pH 5,0/50°C/60 min	70
pH 5,0/60°C/30 min	0
$K_m$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	838,5
$V_{\text{máx}}$ (U)	129,6

**Tabela 02.** Influência dos vários compostos sobre a atividade de fosfatase ácida produzida por *T. harzianum* ALL 42

Compostos	Concentração ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Atividade Residual (%)
Controle		100
EDTA	5	101
Azida sódica	5	95
$\text{CuSO}_4$	5	92
$\text{HgCl}_2$	5	91
$\beta$ -mercaptoetanol	5	61
NaF	5	47
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	5	59
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	10	46
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	15	31

#### 4. CONCLUSÃO

◆ Otimização da produção desta enzima através de estudos de fontes de carbono e nitrogênio;

◊Desenvolvimento da metodologia da purificação parcial da fosfatase ácida produzida por *T. harzianum*;

◊Caracterização bioquímica da fosfatase ácida produzida por *T. harzianum*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESSEY, O. A.; LOWRY, O. H.; BROCK, M. J. (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with 5 cubic millimeters of serum. **Journal of Biological Chemistry**, 164(1): 321 – 329.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROOS, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93 – 99.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248 – 254.

DICKMAN, M. B., YARDEN, O. (1999). Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in Filamentous Fungi. **Fungal Genetic Biology**, 26: 99 – 117.

HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (1998). **Trichoderma and Gliocladium**, Vol. 2, Enzymes biological control and commercial application. Taylor and Francis, London, p. 153 – 171.

HERRERA-ESTRELLA, A. & CHET, I (1998). Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. In **Agriculture Biotechnology**. Ed. Arien. Dekker, Inc. New York. Pp. 263-282.

JEONG, B. C.; MACASKIL, L. E. (1999). Production of two phosphatases by a *Citrobacter* sp. grown in batch and continuous culture. **Enzyme and Microbial Technology**, 24: 218 – 224.

KAWARASAKI, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. (1996). Purification and some properties of wheat germ acid phosphatases. **Plant Science** 119: 67 – 77.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature** (London), 227: 680 – 685.

SANYAL, S. K.; De DATTA, S. K. (1991). Chemistry of phosphorus transformation in soil. **Advances in Soil Science**, 16: 1 – 120.

TARAFDAR, J. C.; RAO, A. V.; BALA, K. (1988). Production of phosphatases by fungi isolated from desert soil. **Folia Microbiologica**, 33: 453 – 457.

TARAFDAR, J. C.; CLAASSEN, N. (1988). Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, 5:

WALSH, G. A.; POWER, R. F.; HEADSON, D. R. (1994). Enzymes in the animal feed industry. **TIFS**, 5: 81 – 82.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/Capes

<sup>1</sup> Bolsista de pós - graduação. Instituto de Ciências Biológicas-Laboratório de Enzimologia / UFG, [rhalcia@bol.com.br](mailto:rhalcia@bol.com.br)

<sup>2</sup> Orientador/Instituto de Ciências Biológicas /UFG, [ulhoa@icb.ufg.br](mailto:ulhoa@icb.ufg.br)

