

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA FOSFATASE ÁCIDA DE *Enterobacter* sp. ISOLADA DE ORQUÍDEA****KINETIC CHARACTERIZATION OF ACID PHOSPHATASE OF *Enterobacter* sp. ISOLATED FROM ORCHID** <https://doi.org/10.63330/aurumpub.012-044>**Gustavo Bonagamba Sandrini**

Msc.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/1166738754975597>**Vanessa Sayuri Sato**

Dra.

Secretaria Estadual de Educação de São Paulo

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/3448395268032557>**Renato Fernandes Galdiano Júnior**

Dr.

Ayettac Multiplicação Vegetal Ltda

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/2592199574112612>**Eliana Gertrudes Macedo Lemos**

Dra.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/3902020936480943>**Anna Carolina de Souza**

Dra.

Escola Técnica Estadual Bento Carlos Botelho do Amaral – Guariba – São Paulo

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/3489602585225522>**Luiz Flávio José dos Santos**

Dr.

Faculdade de Tecnologia de Ribeiro Preto – São Paulo

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5888302973425312>**Joao Martins Pizauro Junior**

Dr.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/3958124498479090>**RESUMO**

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento vegetal, porém sua disponibilidade no solo é frequentemente limitada devido à sua predominância de formas orgânicas insolúveis. Microrganismos associados às raízes, como as bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), desempenham um papel crucial na solubilização do fósforo por meio da produção de enzimas hidrolíticas, como as fosfatases.



Este estudo teve como objetivo caracterizar cineticamente a fosfatase ácida produzida por uma cepa de *Enterobacter* sp. (C45), isolada de raízes da orquídea *Cyrtopodium paludicolum*. A enzima foi produzida em meio de cultivo com diferentes concentrações de fosfato, sendo a atividade máxima observada na concentração de 5 mM. A fosfatase apresentou pH ótimo aparente de atividade em 3,5 e mostrou capacidade de hidrolisar diversos substratos fosforilados, como *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NFF), ATP e pirofosfato, com cinética michaeliana para *p*-NFF e cooperatividade positiva para os demais. Os estudos de inibição revelaram sensibilidade a metais ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e análogos de fosfato (arsenato, vanadato), com modos de inibição competitiva e não competitiva. A enzima demonstrou estabilidade térmica até 45°C, com rápida inativação em temperaturas superiores. Os resultados indicam que a fosfatase ácida de *Enterobacter* sp. possui propriedades catalíticas distintas e potencial biotecnológico para aplicação em processos de solubilização de fósforo em condições ácidas, como na agricultura sustentável e na indústria de rações animais.

**Palavras-chave:** Solubilização de fósforo; Rizobactérias; Enzimas microbianas; Fosfomonohidrolases.

#### ABSTRACT

Phosphorus is an essential nutrient for plant growth, but its availability in soil is often limited due to the predominance of insoluble organic forms. Root-associated microorganisms, such as plant growth-promoting bacteria (PGPR), play a crucial role in phosphorus solubilization through the production of hydrolytic enzymes, such as phosphatases. This study aimed to kinetically characterize the acid phosphatase produced by a strain of *Enterobacter* sp. (C45), isolated from the roots of the orchid *Cyrtopodium paludicolum*. The enzyme was produced in culture media with different phosphate concentrations, with maximum activity observed at 5 mM. The phosphatase exhibited an apparent optimum pH of 3.5 and demonstrated the ability to hydrolyze various phosphorylated substrates, such as *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NFF), ATP, and pyrophosphate, with Michaelian kinetics for *p*-NFF and positive cooperativity for the others. Inhibition studies revealed sensitivity to metals ( $\text{Cu}^{2+}$ ) and phosphate analogs (arsenate, vanadate), with competitive and non-competitive inhibition modes. The enzyme demonstrated thermal stability up to 45°C, with rapid inactivation at higher temperatures. The results indicate that acid phosphatase from *Enterobacter* sp. has distinctive catalytic properties and biotechnological potential for application in phosphorus solubilization processes under acidic conditions, such as in sustainable agriculture and the animal feed industry.

**Keywords:** Phosphorus solubilization; Rhizobacteria; Microbial enzymes; Phosphomonohydrolases.



## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para todos os organismos vivos, desempenhando papéis fundamentais em diversas moléculas vitais, como DNA, RNA, fosfolipídios e adenosina trifosfato (ATP), além de participar de processos metabólicos cruciais, como a regulação enzimática, a manutenção do equilíbrio ácido-base e a fosforilação da glicose (LEHNINGER, 2002; PIZZOLANTE, 2000). Apesar de sua abundância na natureza, a maior parte do fósforo no solo encontra-se na forma de compostos orgânicos insolúveis, como o fitato, indisponíveis para absorção direta pelas plantas (NARLOCH et al., 2002; LÓPEZ-BUCIO et al., 2002). Esta limitação torna o fósforo um dos principais fatores restritivos para o crescimento vegetal, afetando processos como fotossíntese, respiração e metabolismo geral (SÁNCHEZ; SALINAS, 1983; GARCIA-SÁNCHEZ et al., 1996).

Para superar essa deficiência, as plantas estabelecem associações simbióticas com microrganismos do solo, particularmente na rizosfera, onde bactérias e fungos atuam na solubilização e mineralização de formas indisponíveis de fósforo (JEFFRIES; BAREA, 2000; BAREA et al., 2005). Entre esses microrganismos, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) destacam-se por sua capacidade de melhorar a nutrição vegetal por meio de diversos mecanismos, incluindo a produção de enzimas hidrolíticas, como as fosfatases (KLOEPPER et al., 1989; PÉREZ et al., 2007).

As fosfatases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres fosfóricos, liberando fosfato inorgânico (Pi) para assimilação pelas plantas (FEDER, 1973). Podem ser classificadas de acordo com seu pH ótimo de atividade em ácidas, neutras ou alcalinas, e quanto à localização em intracelulares ou extracelulares (LEE, 1998). As fosfatases ácidas (FA), em particular, são amplamente distribuídas na natureza e exibem atividade catalítica ótima em pH ácido (2,5–6,0), sendo produzidas por uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas (ROSSOLINI et al., 1998; OH et al., 2004). Sua atividade é frequentemente induzida em condições de baixa disponibilidade de fósforo, representando uma resposta adaptativa para a aquisição desse nutriente (GILBERT et al., 1999; RHAGHOTHAMA, 1999).

Do ponto de vista bioquímico, as FAs são fosfomonohidrolases que atuam removendo grupos fosfato de moléculas orgânicas por hidrólise. Podem ser específicas ou inespecíficas em relação ao substrato e variar em massa molecular, sensibilidade a inibidores e mecanismos de regulação (ARAUJO et al., 1976; ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). Em microrganismos, essas enzimas podem ser constitutivas ou induzidas (sintetizadas em condições de restrição de fósforo) (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). Além do papel na nutrição, as fosfatases estão envolvidas em processos celulares fundamentais, como sinalização, regulação metabólica e expressão gênica, por meio de reações de fosforilação e desfosforilação (TONKS; NEEL, 1996; JIA, 1997).

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* são conhecidas por sua capacidade de produzir fosfatases, embora existam variações significativas nos padrões de atividade entre diferentes cepas (LEE et al., 1989;



THALLER et al., 1995). O gênero *Enterobacter*, em particular, inclui espécies frequentemente isoladas de associações endofíticas com plantas, como milho, arroz e orquídeas (HALLMANN et al., 1997; VERMA et al., 2001; ROBERTS; DIXON, 2008). Essas bactérias não apenas promovem o crescimento vegetal pela solubilização de nutrientes, mas também atuam como agentes de biocontrole e biorremediação (MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006; SHENG et al., 2008).

Apesar do potencial biotecnológico, as informações sobre a produção e a atividade de fosfatases em espécies de *Enterobacter* ainda são escassas e contraditórias na literatura. A caracterização enzimática detalhada incluindo parâmetros cinéticos, estabilidade, pH e temperatura ótimos, e sensibilidade a inibidores é essencial para compreender o funcionamento dessas enzimas e explorar suas aplicações.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar cineticamente a enzima fosfatase ácida produzida por uma cepa de *Enterobacter* sp. isolada de raízes da orquídea *Cyrtopodium paludicolum*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA *ENTEROBACTER* SP.

A cepa bacteriana utilizada neste estudo, designada SIC45, foi isolada a partir de raízes da orquídea *Cyrtopodium paludicolum* e mantida no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP. A identificação foi realizada por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (GALDIANO JÚNIOR, 2008). A sequência obtida foi comparada com as disponíveis no Banco de Dados do NCBI utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). O alinhamento múltiplo das sequências homólogas foi realizado com o programa Clustal W 1.8 (THOMPSON et al., 1994), e o ajuste fino foi feito com o BioEdit (HALL, 2001). A análise filogenética foi conduzida pelo método neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) com suporte estatístico de bootstrap para 5.000 replicações (SWOFFORD et al., 1996), e a árvore filogenética foi visualizada com o programa MEGA4 (KUMAR et al., 1996).

#### 2.1.1 Meio de manutenção do microrganismo

O isolado bacteriano foi mantido em meio sólido DYGS (pH 6,8), contendo: glicose (2 g/L), peptona (1,5 g/L), extrato de levedura (2 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L), ácido glutâmico (1,5 g/L) e ágar (9 g/L). As culturas foram incubadas a 30°C em estufa B.O.D.

#### 2.1.2 Meio para produção de fosfatase

Para a produção da enzima, a bactéria foi pré-cultivada em meio Czapezk líquido, contendo: glicose (20 g/L),  $\text{NaNO}_3$  (2 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L),  $\text{KCl}$  (0,5 g/L), extrato de levedura (0,5 g/L),  $\text{FeSO}_4$  (0,01 g/L) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 g/L). A cultura foi incubada a 30°C sob agitação (140 rpm) até atingir densidade óptica



de 0,8 nm. Em seguida, 1 mL desse cultivo foi transferido para meio de produção sem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , suplementado com solução mãe de fosfato (0,05 mM), variando-se a concentração final de fósforo entre 0 e 7 mM. O cultivo foi mantido por 24 h nas mesmas condições de temperatura e agitação.

### 2.1.3 Obtenção da fração enzimática de fosfatase ácida

Após a incubação, as células foram separadas por centrifugação a  $10.000 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . O precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6,0) e submetido à ruptura celular por ultrassonicação (Branson Sonifier 250, 50 micropulsos/s, ciclos de 1 min). O material resultante foi centrifugado a  $10.000 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensionado no mesmo tampão e submetido à ultracentrifugação a  $100.000 \times g$  por 1 h a  $4^\circ\text{C}$ . O precipitado resultante, contendo a fração membranar, foi ressuspensionado em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6,0), alíquotado e armazenado a  $-70^\circ\text{C}$  para análises posteriores.

### 2.1.4 Ensaio enzimático da fosfatase ácida

A atividade da fosfatase ácida foi determinada utilizando *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NFF) como substrato. O meio de reação continha: tampão glicina 85 mM (pH 3,5),  $\text{MgCl}_2$  4 mM e *p*-NFF 4 mM, em volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima, incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 10 min e interrompida com 1 mL de NaOH 1 M. A liberação de *p*-nitrofenol foi quantificada por espectrofotometria a 410 nm ( $\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH 13). Uma unidade de atividade enzimática ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de *p*-nitrofenol por minuto sob essas condições.

### 2.1.5 Determinação das atividades de pirofosfatase e ATPase

A atividade de pirofosfatase e ATPase foi determinada pelo método de Heinonen e Lahti (1981), quantificando a liberação de fosfato inorgânico (Pi). O meio de reação continha: tampão glicina 100 mM (pH 3,5),  $\text{MgCl}_2$  100 mM e pirofosfato ou ATP em concentrações variando de 0,01 a 10 mM, em volume final de 0,4 mL. Após 45 min de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , a reação foi interrompida com 100  $\mu\text{L}$  de TCA 50%. As amostras foram centrifugadas a  $10.000 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ , e o Pi liberado foi quantificado conforme Pizauro et al. (1995), utilizando molibdato de amônio e ácido cítrico, com leitura a 355 nm.

### 2.1.6 Efeito do pH na atividade enzimática

A influência do pH na atividade da fosfatase ácida foi avaliada utilizando os seguintes compostos (100 mM): ácido maleico (pH 2,0–4,5), ácido cítrico (pH 2,0–4,5), glicina (pH 2,0–5,0), ácido acético (pH 3,5–6,0) e ácido fórmico (pH 2,0–4,0). Os ensaios foram realizados em intervalos de 0,5 unidades de pH, conforme descrito no item 3.5.



### 2.1.7 Estabilidade térmica

Alíquotas de 100  $\mu$ L da enzima foram incubadas a 45, 50, 55 e 60°C. Em intervalos de tempo pré-determinados, as amostras eram resfriadas em gelo e a atividade residual era determinada conforme o item 3.5.

### 2.1.8 Efeito de íons sobre a atividade enzimática

Foram testados os efeitos de diversos compostos na atividade *p*-NFFásica: MgCl<sub>2</sub> (0,5–2,5 mM), CuSO<sub>4</sub> (0,5–2,5 mM), CoCl<sub>2</sub> (5–25  $\mu$ M), MnCl<sub>2</sub> (5–25  $\mu$ M), ZnCl<sub>2</sub> (5–25  $\mu$ M), teofilina (1–10 mM), levamisol (1–10 mM), PHMB (0–1 mM), fosfato (1–10 mM), arsenato (1–10 mM), metavanadato (1–10 mM) e EDTA (1–10 mM). Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.5.

### 2.1.9 Dosagem de proteína

A concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

### 2.1.10 Análises cinéticas

Os parâmetros cinéticos ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $K_{0,5}$  e  $n$ ) foram determinados utilizando o programa Origin 8.0, a partir de dados de velocidade inicial em função da concentração de substrato. A linearização foi feita pelo método de Lineweaver-Burk (1933).

### 2.1.11 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) após verificação de normalidade (teste de Cramer-Von Mises; EVERITT, 1998) e homocedasticidade. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o software SAS versão 9.0.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

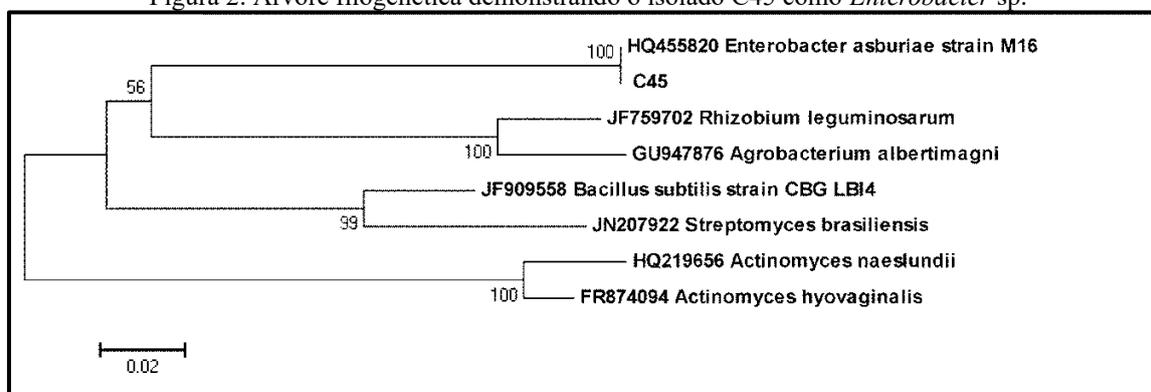
A cepa bacteriana C45, isolada de raízes da orquídea *Cyrtopodium paludicolum* (Figura 1), foi identificada por análise filogenética do gene 16S rRNA como pertencente ao gênero *Enterobacter*, apresentando 98–99% de similaridade com sequências do banco de dados do NCBI (Figura 2). Este isolado foi selecionado para estudos enzimáticos devido ao seu potencial na produção de fosfatase ácida.

Figura 1. *Cyrtopodium paludicolum*.



Fonte: Próprio autor.

Figura 2. Árvore filogenética demonstrando o isolado C45 como *Enterobacter* sp.



Fonte: Próprio autor.

A produção da fosfatase ácida membranar foi regulada pela concentração de fósforo no meio de cultivo. A atividade enzimática máxima ( $29,26 \text{ U.mg}^{-1}$ ) e o maior conteúdo proteico ( $15,77 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram observados na concentração de 5 mM de fosfato (Tabela 1).



Tabela 1. Atividade específica da fosfatase ácida ligada a membrana de *Enterobacter* sp. em meio de cultura contendo diferentes concentrações de fosfato.

Concentrações de fosfato (mM)	Proteína Total (mg.ml <sup>-1</sup> )	Fosfatase ácida (U.mg <sup>-1</sup> )
0,05	2,49 <sup>B</sup>	6,16 <sup>G</sup>
0,10	2,35 <sup>B</sup>	9,58 <sup>F</sup>
0,15	2,36 <sup>B</sup>	6,89 <sup>G</sup>
0,20	2,05 <sup>B</sup>	11,60 <sup>E</sup>
0,30	2,17 <sup>B</sup>	11,95 <sup>E</sup>
0,50	3,11 <sup>B</sup>	15,39 <sup>D</sup>
1,00	3,46 <sup>B</sup>	18,10 <sup>B</sup>
5,00	15,77 <sup>A</sup>	29,26 <sup>A</sup>
7,00	7,30 <sup>B</sup>	17,15 <sup>C</sup>
CV%	41,43	2,15

Nota: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Fonte: Próprio autor.

Concentrações mais baixas ou mais altas resultaram em redução significativa da atividade, indicando que a enzima é induzida sob condições limitantes de fósforo, mas reprimida em excesso, um padrão consistente com a regulação reportada em outros microrganismos e plantas (YASHPHE et al., 1990; BERNARD et al., 2002; LUNG; LIM, 2006).

Além da influência da disponibilidade de fósforo, as características bioquímicas da enzima também foram avaliadas. O pH ótimo aparente para a atividade da fosfatase ácida foi estabelecido em 3,5, com tampão glicina proporcionando a maior atividade (22,25 U.mg<sup>-1</sup>) (Tabela 2). Este valor é mais ácido do que o reportado para muitas outras fosfatases microbianas, que tipicamente exibem pH ótimo entre 5,0 e 6,5 (BERNARD et al., 2002; KANG et al., 2006), mas é semelhante ao de enzimas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* (TOH-E, 1973; GOLOVAN, 1999). A escolha do tampão glicina para ensaios subsequentes baseou-se na sua eficiência e amplo uso na literatura enzimológica.

Tabela 2. Médias e coeficientes de variação da atividade ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) da fosfatase ácida em diferentes tampões.

pH	Ác. Fórmico	Glicina	Ác. Maléico	Ác. Cítrico	Ác. Acético
2,0	1,21 <sup>E</sup>	0,88 <sup>EF</sup>	0,04 <sup>E</sup>	0,44 <sup>E</sup>	nd
2,5	6,54 <sup>D</sup>	1,19 <sup>E</sup>	0,31 <sup>E</sup>	1,09 <sup>D</sup>	nd
3,0	14,90 <sup>B</sup>	15,38 <sup>B</sup>	1,57 <sup>D</sup>	1,85 <sup>C</sup>	nd
3,5	20,43 <sup>A</sup>	22,25 <sup>A</sup>	14,31 <sup>A</sup>	5,04 <sup>A</sup>	20,51 <sup>A</sup>
4,0	19,05 <sup>A</sup>	15,45 <sup>B</sup>	14,07 <sup>A</sup>	2,91 <sup>B</sup>	19,02 <sup>A</sup>
4,5	nd	12,34 <sup>C</sup>	12,69 <sup>B</sup>	0,39 <sup>E</sup>	13,92 <sup>B</sup>
5,0	nd	9,39 <sup>D</sup>	11,12 <sup>C</sup>	nd	11,79 <sup>C</sup>
5,5	nd	nd	nd	nd	10,14 <sup>C</sup>
6,0	nd	nd	nd	nd	7,20 <sup>D</sup>
CV%	5,04	3,09	1,66	4,25	5,04

Nota: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna, diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ); nd – não definido.  
Fonte: Próprio autor.

A enzima demonstrou capacidade de hidrolisar diferentes substratos fosforilados: *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NFF), ATP e pirofosfato (Tabela 3). Os parâmetros cinéticos revelaram que a maior velocidade máxima ( $V_{\max} = 30,67 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) e menor afinidade ( $K_m = 0,55 \text{ mM}$ ) foram observadas para o PNFF (Tabela 3). A hidrólise do *p*-NFF seguiu cinética michaeliana ( $n = 1,1$ ), enquanto a hidrólise do ATP ( $n = 1,8$ ) e do pirofosfato ( $n = 2,8$ ) exibiram cooperatividade positiva, sugerindo interações alostéricas e possíveis sítios regulatórios adicionais. Tais características de inespecificidade substrato são comuns em fosfatases ácidas de origem microbiana e podem refletir adaptações fisiológicas para aquisição de fósforo em ambientes complexos (ZHANG et al., 2008; WANG et al., 2009).

Tabela 3. Parâmetros cinéticos para a hidrólise *p*-NFF, ATP e do pirofosfato para a fosfatase ácida ligada a membrana de *Enterobacter* sp., em pH 3,5.

Substrato	Parâmetros cinéticos		
	V ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	n	(mM)
ATP	11,2	1,8	$K_{0,5} = 0,62$
<i>p</i> -NFF	30,67	1,1	$K_m = 0,55$
Pirofosfato	15,64	2,8	$K_{0,5} = 0,89$

Fonte: Próprio autor.

O perfil de inibição por diferentes compostos mostrou que a atividade da fosfatase foi significativamente inibida por  $\text{Cu}^{2+}$  (inibição não competitiva), fosfato, arsenato e vanadato (estes três com inibição competitiva). O vanadato, inibidor conhecido de tirosina fosfatases, suprimiu fortemente a atividade, mas a resistência relativa ao PHMB (inibidor de cisteína fosfatases) sugere que a enzima não pertence a essa classe enzimática (LAU, 1985).  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  atuaram como moderados ativadores, enquanto



EDTA (quelante de metais) causou inibição dose-dependente, indicando possível dependência de íons metálicos para atividade ou estabilidade (PIZAURO, 1995).

Além do efeito de íons e inibidores sobre a atividade, a estabilidade da fosfatase em diferentes condições também foi investigada. A análise térmica revelou que a enzima se manteve estável a 45 °C ( $t_{1/2}$  = 520 min), mas foi rapidamente inativada a 55 °C ( $t_{1/2}$  = 12,5 min) e 60 °C ( $t_{1/2}$  = 27,5 seg). A cinética de inativação seguiu um modelo de primeira ordem, consistente com desnaturação térmica irreversível (Tabela 4). A sensibilidade térmica acima de 50 °C é característica de muitas enzimas mesofílicas e pode estar relacionada à perda de flexibilidade conformacional ou desestabilização de resíduos críticos no sítio ativo (TSOU, 1986; ZHANG et al., 2008).

Tabela 4. Constantes de inativação térmica da fosfatase ácida de membrana de *Enterobacter* sp. e respectivos tempos de meia vida

<u>Temperatura (°C)</u>	<u>K x 10<sup>-4</sup> (seg<sup>-1</sup>)</u>	<u>T<sub>1/2</sub> (min)</u>	<u>T<sub>1/2</sub> (seg)</u>
45°C	0,222	520	31200
50°C	0,442	260	15600
55°C	9,24	12,5	750
60°C	252	0,45	27,5

Fonte: Próprio autor

Como pode ser observado ao longo do texto, os resultados obtidos estão em consonância com estudos prévios em outras espécies de *Enterobacter* e fungos, corroborando o papel adaptativo das fosfatases na nutrição fosfatada e seu potencial biotecnológico em processos de solubilização de fósforo em condições ácidas.

#### 4 CONCLUSÃO

A fosfatase ácida membranar de *Enterobacter* sp. C45 mostrou-se uma enzima induzível, cuja expressão é rigidamente regulada pela disponibilidade de fósforo no meio de cultivo. A enzima exibiu pH ótimo de atividade em 3,5 e ampla especificidade por substratos fosforilados, com cinética michaeliana para *p*-NFF e cooperatividade para ATP e pirofosfato. Os estudos de inibição revelaram que a enzima é sensível a metais (Cu<sup>2+</sup>), análogos de fosfato (arsenato, vanadato) e ao próprio produto (fosfato), com modos de inibição competitiva e não competitiva dependendo do composto. A estabilidade térmica foi satisfatória até 45°C, com rápida inativação em temperaturas superiores.

Essas características indicam que a fosfatase ácida de *Enterobacter* sp. possui propriedades catalíticas e regulatórias distintas, com potencial aplicação em processos biotecnológicos que envolvam hidrólise de fosfato em condições ácidas, como na produção de bioinoculantes para solos tropicais ou na indústria de rações animais.



## AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Jaboticabal pela infraestrutura cedida.

A Fapesp e ao CNPq pelo suporte financeiro.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ARAÚJO, P. A.; MIES, V.; MIRANDA, A. Subcellular distribution of low and high molecular weight acid phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 452, n. 1, p. 121-130, 1976.
- AVIS, T. J.; GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v.40, n.7, p.1733–1740, 2008.
- BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 417, p. 1761–1778, 2005.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. P. 451-490, Educ, Caxias do Sul, 2004.
- EVERITT, B. S. *The Cambridge Dictionary of Statistics*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 360, 1998.
- FEDER, J. The phosphatases. In: GRIFITH, E. J.; BECTEN, A.; SPENCER, J. M.; MITCHEL, D. T. *Environmental Phosphorus Handbook*. New York: John Wiley, p.475-507,1973.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F. Isolamento, Identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- GARCIA-SÁNCHEZ, M. J.; FERNÁNDEZ, J. A.; NIELL, F. X. Photosynthetic response of P-deficient *Gracilaria tenuistipitata* under two different phosphate treatments: *Physiologia Plantarum*, v. 96, n. 4, p.601-606, 1996.
- GILBERT, G. A.; KNIGHT, J. D.; VANCE, C. P.; ALLAN D. L. Acid phosphatase activity in phosphorus-deficient white lupin roots. *Plant, Cell and Environment*, v. 22, n. 7, p. 801–810, 1999.
- GOLOVAN, S.; WANG, G.; ZHANG, J.; FORSBERG, C. W. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 59–71, 1999.
- HALL, P. BioEdit – version 5.0.6. Raleigh. North Carolina State University, Department of Microbiology, p. 192, 2001.
- HALLMAN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial entophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, n. 10, p.895-914, 1997.
- HARTREE, E. F. Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v. 48, n. 2, p.422-427, 1972.



HEINONEN, J. K.; LAHTI, R. J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical Biochemistry*, v.113, n. 2, p.313-317. 1981.

JEFFRIES, P.; BAREA J. M. Arbuscular Micorriza – A key component of sustainable plant-soil ecosystems. *The Mycota*, v. 4, p. 95-113, 2000.

JIA, Z. Protein phosphatases: structures and implications. *Biochemistry and Cell biology*, v. 75, n. 1, p. 17-26, 1997.

KANG, S. H. et al. Cloning, Sequencing and Characterization of a Novel Phosphatase Gene, *phoI*, from Soil Bacterium *Enterobacter* sp. 4. *Current Microbiology*, v. 52, p. 243–248, 2006.

KLOEPPER J. W.; LIFSHITZ K.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 3943, 1989.

LAU, K. H. W.; FARLEY, J. R.; BAYLINK, D. J. Phosphotyrosyl-specific protein phosphatase activity of a bovine skeletal acid phosphatase isoenzyme. Comparison with the phosphotyrosyl protein phosphatase activity of skeletal alkaline phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, v.260, n. 8, p.4653– 4660, 1985.

LEE, T.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Phosphate Regulon in Members of the Family Enterobacteriaceae: Comparison of the *phoBphoR* Operons of *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, and *Klebsiella pneumonia*. *Journal of Bacteriology*, v. 171, n. 12, p. 6593-6599, 1989.

LEE, R. B. Phosphate influx and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells. *New Physiology*, v. 109, p. 141-148, 1998.

LEHNINGER, A. L. *Princípios da Bioquímica*. São Paulo: Sarvieri, p. 37, 1994.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Bureau of Chemistry and soil*, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1933.

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.

LUNG, S. C.; LIM, B. L. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate. *Plant and Soil*, v. 279, n.1-2, p. 187-199, 2006.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 18, n. 1, p. 43-48, 1994.

NARLOCH, C.; OLIVEIRA, V. L.; ANJOS, J. T.; SILVA FILHO, G. N. Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 6, p. 841-845, 2002.



OH, B. C.; CHOI, W. C.; PARK, S.; KIM, Y. O.; OH, T. K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, n. 4, p. 362–372, 2004.

PÉREZ, E.; SULBARAN, M.; BALL, M.; YARZABAL, L. A. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 39, n. 11, p. 2905-2914, 2007.

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*, v.152, n. 2, p.121-129, 1995.

PIZZOLANTE, C. C. Estabilidade da fitase e sua utilização na alimentação de frangos de corte. 2000. 117f. Tese Doutorado – Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

RHAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Stanford, v. 50, p. 665-693, 1999.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. *Current Biology*, v. 18, p. 325-329, 2008.

ROSSOLINI, G. M.; SCHIPPAB, S.; RICCIOA, M. L.; BERLUTTIB, F.; MACASKIEC, L. E.; THALLERD, M. C. Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology CMLS, *Celular and Molecular Life Science*, v. 54, n. 8, p.833–850, 1998.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SÁNCHEZ, P.; SALINAS, G. Suelos ácidos y estratégias para su manejo con bajos insumos en América Tropical. SCCS. Bogota, Colombia. 93 p. 1983.

SATO, V. S. Indução da expressão in vivo e caracterização cinética da fosfatase ácida de *Enterobacter* sp. Isolada de raízes de orquídeas. 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

SHENG, X.; CHEN, X.; HE, L. Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 62, n. 2, p. 88–95, 2008.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic Inference. In Hillis, D. M.; Moritz, D.; Mable, B. K. editors, *Molecular Systematics*, p. 407-514, 1996.

THALLER, M. C.; BERLUTTI, F.; SCHIPPA, S. IORI, P.; PASSARIELLO, C.; ROSSOLINI, G. M. Heterogeneous Patterns of Acid Phosphatases Containing Low-Molecular-Mass Polypeptides in Members of the Family *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45, n. 2, p. 255-261, 1995.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.



TOH-E, A.; UEDA, Y.; KAKIMOTO, S. I.; OSHIMA, Y. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, v. 113, n. 2, p. 727-738, 1973.

TONKS, N. K.; NEEL, B. G. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases, *Cell*, v. 87, n. 3, p. 365-368, 1996

TSOU, C. L. Location of the active sites of some enzymes in limited and flexible molecular regions. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 11, n. 10, p. 427-429, 1986.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, v. 91, n. 2, p. 127-141, 2001.

WANG, Y.; MENG, F.; ZHANG, Y. Expression, purification and characterization of recombinant protein tyrosine phosphatase from *Thermus thermophilus* HB27. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 41, n. 8, p. 689-698, 2009.

YASHPHE, J.; CHIKARMANE, H.; IRANZO, M.; HALVORSON, H. O. Phosphatases of *Acinetobacter lwoffii*. Localization and regulation of synthesis by orthophosphate. *Current Microbiology*, v. 20, n. 4, p. 273-280, 1990.

ZHANG, Y.; YANG, Z.; HUANG, X.; PENG, J. FEI, X.; GU, S.; XIE, Y.; JI, C.; MAO, Y. Cloning, Expression and Characterization of a Thermostable PAP2L2, a New Member of the Type-2 Phosphatidic Acid Phosphatase Family from *Geobacillus*.

Toebii, T. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 72, n. 12, p. 31343141, 2008