UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

SÍNTESE DA SACAROSE NO AMADURECIMENTO DA BANANA.
ENVOLVIMENTO DA SACAROSE SINTETASE E
SACAROSE FOSFATO SINTETASE

Beatriz Rosana Cordenunsi

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

ORIENTADOR:
Prof. Dr. Franco M. Lajolo

SÃO PAULO

1989

11830

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Franco M. Lajolo pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.
- À FINEP e OEA, pelo apoio financeiro durante o período de desenvolvimento do trabalho.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.
- Aos Srs Gino e Vicente do CEASA, pelo fornecimento das bananas e pela atenção com que sempre nos receberam.
- Aos responsáveis pelos demais laboratórios, pelo empréstimo de reagentes.
- Aos vigias da FCF pela ajuda e atenção.
- Aos professores, funcionários, colegas e amigos, que direta ou indiretamente colaboraram na elaboração deste trabalho.
- Aos amigos Benê, Célia, Dalva, Flávio, Inés, Mário, Márcia, Marisa e Tullia.

Defendida em: 20/04/69

Em especial agradeço à

Ana

Antonia

Arlindo

Elizabeth

Edgar

Franco

Lais

Regina

Rosângela

e ao Arthur "in memorian",
pelo apoio, ajuda e carinho.

Esta tese é
dedicada ao
Vadinho

SUMÁRIO

1- Introdução	1
2- Revisão bibliográfica	3
Sacarose fosfato sintetase	5
Sacarose sintetase	7
3- Objetivos	18
4- Materiais e métodos	19
4.1- Materiais	
4.1.1- Frutos	19
4.1.2- Reagentes	19
4.2- Métodos	
4.2.1- Delineamento estatístico	20
4.2.2- Técnica de preparo do extrato	
enzimático	25
4.2.3- Avaliação da atividade da sacarose sintetase	
4.2.3.1- No sentido de síntese	26
4.2.3.2- No sentido de hidrólise	26
4.2.4- Avaliação da atividade da sacarose	
fosfato sintetase	27
4.2.5- Avaliação da atividade da invertase	27
4.2.6- Unidade de atividade	28
4.2.7- Doseamento dos carboidratos	28
4.2.8- Determinação de proteína	29
4.2.9- Localização da faixa de precipitação	
da proteína com sulfato de amônio	29
4.2.10- Purificação da sacarose sintetase	
Primeira técnica	
4.2.10.1- Fracionamento com sulfato	

de amônio	30
4.2.10.2- Cromatografia de peneira	
molecular	31
4.2.10.3- Cromatografia de troca	
iônica	31
Segunda técnica	
4.2.10.4- Fracionamento com sulfato	
de amônio	32
4.2.10.5- Cromatografia de troca	
iônica	32
4.2.11- Eletroforese em gel	
de poliacrilamida	33
4.2.12- Testes de estabilidade:	
Tempo x temperatura	34
4.2.13- Determinação do Km	34
5- Resultados e discussão	
5.1- Otimização da extração da sacarose	
sintetase	
5.1.1- Meio extrator	35
5.1.2- Estabelecimento do parâmetro de	
extração: relação massa, volume,	
pH e molaridade	37
5.2- Fracionamento com sulfato de amônio	44
5.3- Eliminação da pectina	44
5.4- Localização da sacarose sintetase na banana	45
5.5- Isolamento da sacarose sintetase	
5.5.1- Primeira técnica	47
5.5.2- Segunda técnica	52
5.6- Efeito da diluição na atividade	56
5.7- Ensaio de estabilidade das preparações	58

5.8- Propriedades cinéticas da sacarose sintetase ...	61
5.9- Variação da sacarose sintetase durante o amadurecimento da banana	65
5.10- Sacarose sintetase x sacarose fosfato sintetase	71
6- Conclusões	74
7- Referências bibliográficas	75
8- Resumo	86
9- Abstract	87

1- INTRODUÇÃO

A possibilidade de se controlar a senescência de vegetais, em geral, ou o amadurecimento dos frutos, em particular, é uma meta constantemente buscada pela sua aplicação na manutenção da qualidade e na extensão da vida útil desses alimentos.

Ao mesmo tempo em que existe a necessidade de desenvolver e aplicar aos vegetais novas tecnologias de armazenamento, transporte, colheita, produzir novas variedades mais adequadas à industrialização, é importante, também, a busca de novos conhecimentos sobre as transformações que sofrem e sobre os mecanismos que as controlam após a colheita, nas condições de "stress" representadas pelo armazenamento, enfim, os mecanismos de controle das células pós-colheita. Estudos sobre metabolismo respiratório, enzimologia da lamela média, metabolismo do etileno e mecanismos de sua biossíntese, são exemplos do sucesso da aplicação de conhecimentos básicos no desenvolvimento de tecnologias.

Durante o amadurecimento de frutos climatéricos, ricos em amido, o metabolismo dos carboidratos costuma sofrer profundas alterações que são importantes pela relação que tem com a qualidade e, também, devido à velocidade com que ocorrem, pela possibilidade de servirem como modelos para se estudar o amadurecimento em si, particularmente as mudanças em sistemas enzimáticos específicos, que venham auxiliar na explicação do fenômeno de forma global.

O "adoçamento" do fruto e o desaparecimento do amido são mudanças muito visíveis na banana que, por isso, se torna modelo interessante para esse tipo de estudo. Quando verde, apresenta em sua polpa cerca de 25% de amido que pode, em questão de horas, ser reduzido a menos de 1%. Paralelamente, dá-se o acúmulo de açúcares como a sacarose (cerca de 12%), glicose e frutose (cerca de 4%) que, entre outras substâncias, são responsáveis pelas propriedades organolépticas do fruto (5, 23, 37, 46, 59).

A formação e acúmulo de sacarose, de forma predominante, precedendo à de outros carboidratos, pode ser interpretada como indicação de que a transformação amido-sacarose é, provavelmente, uma via importante para a degradação do amido durante o amadurecimento da banana (68). Consequentemente, o estudo das enzimas que metabolizam a sacarose torna-se relevante para a compreensão desses mecanismos; daí o nosso interesse sobre o assunto.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O sistema enzimático envolvido na degradação do amido e formação da sacarose em vegetais é complexo. No quadro abaixo ilustramos as principais vias já descritas para os passos iniciais dessa transformação, obtidas a partir de estudos em órgãos vegetais diversos.

- (1) Sacarose sintetase
- (2) Invertase
- (3) Hexoquinase
- (4) Fosfoexoisomerase
- (5) Fosfoglicomutase
- (6) UDPG-pirofosforilase

- (7) Sacarose fosfato sintetase
- (8) Sacarose fosfato fosfatase
- (9) Fosforilase
- (10) NADPG-pirofosforilase
- (11) ADP-glicose:amido sintetase
- (12) Fosfofrutoquinase

A sacarose é um dos carboidratos predominantes nos vegetais e seu nível depende de três enzimas que estão diretamente envolvidas na sua síntese e degradação. São elas:

(1) a sacarose fosfato sintetase (UDP-glicose: D-frutose-6-fosfato 2-glicosiltransferase (EC 2.4.1.14));

(2) a sacarose sintetase (UDP-glicose:D-frutose 2-glicosiltransferase (EC 2.4.1.13));

(3) invertase (α -D-frutofuranosídio frutoidrolase (EC 3.2.1.26))

que catalisam as reações:

(1) UDP-glicose + frutose-6P ----- UDP + sacarose-P

(2) NDP-glicose + frutose ----- NDP + sacarose

(3) sacarose ----- frutose + glicose

onde N = uridina, adenosina, timidina, citidina ou guanosina.

Uma quarta enzima pode ser considerada, a sacarose fosfato fosfatase, que hidrolisa a sacarose-fosfato produzida na reação (1), tornando a reação praticamente irreversível e permitindo que a sacarose se acumule.

Lelloir, Cardini e Chiriboga em 1955 (12, 33) mostraram que os vegetais são capazes de sintetizar a sacarose por meio de duas vias distintas, ambas envolvendo a UDP-glicose (UDPG) como doadora de glicose. Desde então, numerosos trabalhos tem sido publicados, demonstrando que ambas: a sacarose sintetase (SS) e a sacarose fosfato sintetase (SPS), ocorrem amplamente em todo o reino vegetal.

A existência de dois mecanismos distintos para a síntese da sacarose tem suscitado muitas dúvidas sobre o real papel desempenhado por essas enzimas "in vivo". As evidências indicam que a sacarose fosfato sintetase e a correspondente fosfatase são as principais responsáveis pela biossíntese da sacarose em tecidos fotossintéticos (19, 50). Delmer e Albersheim (19), por exemplo, estudaram a distribuição da SPS e da SS em plântulas de feijão e encontraram atividade da SPS somente em cloroplastos intactos, onde a atividade da SS não foi detectada.

SACAROSE FOSFATO SINTETASE

Uma das principais evidências de que é a SPS e não a SS a responsável pela síntese da sacarose "in vivo" veio de estudos da constante de equilíbrio das reações que foi estimada entre 1 e 8 (a pH 7,4) para a síntese catalisada pela SS, e 320 para a reação catalisada pela SPS (a pH 7,5) (38). Esses resultados, aliados ao fato de que a reação é tornada praticamente irreversível pela fosfatase, fizeram com que Mendicino (38) concluísse que somente tal mecanismo de síntese da sacarose poderia levar às altas concentrações do açúcar encontradas em vegetais, especialmente em tecidos fotossintéticos. Presume-se que em tecidos não fotossintéticos a sacarose sintetase é a enzima que poderia ser a responsável pelo nível de sacarose.

A SPS tem sido isolada de grãos (38, 52, 55), tubérculos (56), algas (21, 51), frutos (29) e, principalmente,

de folhas (10, 22, 28, 42). A enzima, isolada do germe de trigo já foi purificada e estudada detalhadamente. O peso molecular, estimado por filtração em gel e por velocidade de sedimentação, está em torno de 380 kdaltons e o pH ótimo 6,5. Os tampões HEPES, PIPES e MES são ótimos para a atividade da enzima, enquanto que os tampões tris-maleato e fosfato a inibem consideravelmente (55, 56). A atividade também é reduzida por UDP (5-10mM), sendo esta perda parcialmente revertida quando Mg^{++} ou Mn^{++} são adicionados ao meio de reação (53). Só a enzima de germe de trigo é estimulada por esses cátions; a da folha de espinafre não o é (1). Outras SPS testadas (42) também não foram afetadas ou o estímulo foi baixo (10 a 23%). Nenhuma enzima de folhas foi estimulada por Mg^{++} ou Mn^{++} , nem afetados seus parâmetros cinéticos (1).

A curva de saturação da frutose-6-P para a SPS é sigmoideal e semelhante para as enzimas isoladas das folhas da espinafre (1), do trigo (55), da cevada e da uva (42), do germe de trigo (38), da batata doce e batata comum (42). Amir e Preiss (1) obtiveram resultados com a SPS extraída da folha de espinafre que sugerem ser ela uma enzima reguladora que é modulada pelas razões frutose/ P_i e UDPG/ P_i no citoplasma. Mais tarde, Salerno e Pontis (54) confirmaram que o fosfato inorgânico pode ser um inibidor para a SPS e mostraram que o seu mecanismo de reação é de primeira ordem. Também confirmaram ser a UDP inibidor competitivo com a UDPG e não competitivo com a frutose-6-P.

SACAROSE SINTETASE

A outra enzima importante, ao lado da SPS, é a SACAROSE SINTETASE (SS). A SS catalisa reversivelmente a reação de síntese/hidrólise da sacarose. Enquanto que a SPS caracteriza-se pela absoluta especificidade pela UDPG, a sacarose sintetase pode utilizar outros nucleotídeos, especialmente a ADPG.

Por ser reversível e ter pouca especificidade pelo nucleotídeo, a enzima é potencialmente capaz de catalisar a síntese de alguns dos maiores precursores de polissacarídeos vegetais ou, alternativamente, a síntese da sacarose. Não é muito clara, ainda, a sua função na maioria dos vegetais onde está presente; pareceria um desperdício da natureza colocar no mesmo tecido a UDPG-pirofosforilase, a sacarose sintetase e a sacarose fosfato sintetase produzindo nucleotídeos e catalisando a síntese de sacarose, e ainda, a invertase hidrolisando a mesma sacarose, sem um fim específico.

Estudos mostraram que a enzima está presente nas folhas onde existe uma UDPG-pirofosforilase muito ativa (32), é abundante em sementes em maturação, tubérculos e plântulas não expostas à luz, onde pode estar ligada à produção de nucleotídeos para a formação de amido e parede celular.

Por existirem poucos trabalhos sobre a SS em frutos, objeto do nosso estudo, procuramos buscar informações a respeito de suas características em outros tipos de tecidos, onde ela já foi estudada com algum detalhe.

Larsen e col. (32) compararam a SS extraída de folhas com a SS do germe de trigo. As duas enzimas apresentaram pH ótimo similar para a síntese (pH 8,0) e hidrólise (pH 7,3); não observando-se diferenças significativas nas constantes cinéticas e nos pesos moleculares (por volta de 380 kdaltons). Estes e outros resultados indicam que as enzimas são semelhantes independentemente da fonte e a sua função nas folhas parece ser a de regular a síntese e armazenamento da sacarose.

Nos últimos anos, diversos autores têm sugerido que a reação de síntese/hidrólise catalisada pela SS pode ser bem mais complexa que uma simples reação reversível (56, 58). Essas atividades diferem no que se refere a pH ótimo, tampões, efeito de cátions e inibição por nucleotídeos mas possuem idêntica estabilidade ao pH e temperatura (48, 56, 58, 61, 62). As diferenças observadas faziam supor que fossem enzimas diferentes a sintetizar e hidrolisar a sacarose. Porém, vários pesquisadores que já estudaram o assunto (66, 67, 72) não conseguiram separar uma da outra por processos de purificação, concluindo que talvez, se trate da mesma enzima com ambas as ações. A questão, na verdade, ainda está aberta.

Se ambas as atividades podem ser atribuídas à mesma enzima, o que poderia exercer ação reguladora na atividade de síntese ou de hidrólise da sacarose sintetase? Wolosiuk e Pontis (72) tentaram determinar quais metabólitos poderiam alterar a razão síntese/hidrólise e encontraram vários. Foram testados fenilglicosídeos, açúcares e cátions divalentes. A presença do β -fenilglicosídeo praticamente suprime a atividade hidrolítica, enquanto que perto de 50% da atividade de síntese

permanece. A glicose e a frutose, produtos da ação da invertase, são praticamente os únicos açúcares que inibem a atividade hidrolítica. E, finalmente, o $MgCl_2$ e o $CaCl_2$, que reverterem a inibição causada pelo UDP.

Gustafson e Gander (27) sugeriram que, na soja, a direção (síntese ou hidrólise) poderia ser regulada pela UDPG-pirofosforilase, se houvesse um mecanismo de controle da concentração intracelular dos íons magnésio. Assim, um aumento da concentração desses cátions poderia resultar num aumento da síntese de UDPG. Como consequência, a formação da sacarose também aumentaria, não somente pelo aumento da concentração de substrato (UDPG), mas também porque o aumento da concentração dos íons magnésio reverteria a inibição causada pelo UDP.

Wolosiuk e Pontis (72) conseguiram modificar a razão síntese/hidrólise tratando a SS com tripsina. A enzima reteve a atividade sintética e perdeu a atividade hidrolítica. Uma interpretação simples é que a ação da tripsina modifica a conformação do sítio ativo. Por outro lado, experimentos com extratos de alcachofra indicaram a presença de uma protease cálcio dependente que atua na sacarose sintetase de maneira similar à tripsina. Como se verifica, ainda é muito difícil assegurar quais são os fatores que determinam a atividade sintética ou hidrolítica da enzima.

O fato da reação catalisada pela SS ser realmente reversível, pode ser importante para a compreensão de diversos aspectos do metabolismo de vegetais, particularmente em tecidos de reserva. A transformação amido-sacarose, envolvendo a forma

ção de nucleotídeos, parece ocorrer também em sementes, como o milho e a ervilha, e em tubérculos, como a batata comum e a batata doce. Nesses alimentos, a transformação é especialmente importante para a manutenção da qualidade, que depende de teores altos (ervilha, milho) e teores baixos (batata) de açúcares solúveis e está ligada à temperatura de armazenamento. Baixas temperaturas (abaixo de 1°C) ativam o sistema de transformação do amido a sacarose, glicose e frutose (11, 44). A volta a temperaturas superiores provoca a transformação inversa. Trata-se portanto, de reação reversível provocada por mudanças de temperatura e cujo mecanismo de controle ainda não está claro.

Na tentativa de esclarecer a questão, Pollock e Rees (44) compararam as taxas de acúmulo de açúcares com a atividade catalítica máxima das principais enzimas envolvidas no metabolismo desses compostos, em batatas estocadas a 2°C . Estas informações poderiam indicar a via e o mecanismo do adoçamento da batata quando estocada nessas condições. Entre outras, mediram as atividades da SS e SPS e constataram não haver mudanças significativas nas atividades das duas enzimas, ao mesmo tempo em que havia a formação, principalmente, de sacarose. Concluíram que o acúmulo de sacarose na batata armazenada a 2°C não é devido a mudanças na atividade catalítica máxima de qualquer das enzimas, mas pode ser devido, à suscetibilidade das principais enzimas glicolíticas ao frio.

A irradiação de frutas e vegetais causa várias mudanças fisiológicas e uma das mais interessantes é o acúmulo de sacarose em batatas irradiadas. Hayashi e Kawashima (30) obser-

varam correlação entre este acúmulo e o aumento de atividade da SS e SPS em batatas irradiadas com 2KGy.

A rápida conversão de açúcares solúveis a polissacarídeos após a colheita tem sido um problema para manter a qualidade do milho doce. Parece ser possível regular esta conversão pelo tratamento do grão com pirofosfato, antes da colheita. Segundo Amir e col. (2) a inibição da conversão sacarose-amido, sugere que o PPI pode ser um produto final da síntese de ADPG.

A sacarose transportada para as células não fotos sintéticas pode, também, ser hidrolisada pela invertase, produzindo glicose e frutose. Altos níveis de invertase e de SS nos vegetais fazem supor que ambas podem atuar juntas no metabolismo da sacarose. Ao mesmo tempo, existem diferenças significativas no pH ótimo das duas :5,0-6,0 para a invertase e 6,0-8,0 para a SS, bem como na sua distribuição nas várias partes da planta. Delmer (18) encontrou altos níveis de atividade SS em regiões de alongamento e altos níveis de atividade invertásica abaixo das zonas de alongamento de plântulas de feijão. O fato da SS ser capaz de catalisar a síntese de nucleotídeos difosforados de glicose, que servem como precursores da parede celular, torna significativa essa distribuição.

Delmer e Albersheim (19) observaram que a hidrólise da sacarose pela invertase resulta em altas perdas de energia livre da ligação glicosídica. Quando a sacarose é convertida pela SS em nucleosídeos fosforados da glicose e frutose, esta energia é conservada na forma do glicosídeo e pode ser usada

diretamente na biossíntese dos polissacarídeos da parede celular ou na formação de outros nucleotídeos.

Tsai e col. (66) encontraram alta atividade invertásica em estágios precoces do desenvolvimento do endosperma do milho. Mais tarde, a atividade se reduzia a níveis negligenciáveis enquanto que a síntese do amido continuava. Ao mesmo tempo, a baixa atividade da SS existente nos primeiros estágios, aumentava acentuadamente nos estágios seguintes, dando a entender que a hidrólise da sacarose pela invertase é importante somente nos estágios iniciais do desenvolvimento do endosperma do milho.

A invertase parece ser especialmente importante em frutos como a uva, que possui altas porcentagens de glicose e frutose, em iguais proporções quando madura (29). e em frutos como a banana, que durante o climatério tem grande consumo de glicose no pico respiratório, coincidente com um aumento de atividade invertásica (68).

As características da sacarose sintetase descritas na literatura têm sido similares, independentemente da fonte ou do tecido. Em geral, o pH ótimo para a síntese é básico (por volta de 7,5) e para a hidrólise é ácido (por volta de 6,5) (6, 26, 40, 48, 61, 62) com exceção da SS da mandioca (7,5 em ambas as direções) (58), das algas verdes (7,8 e 8,3 para a hidrólise e síntese respectivamente) (21) e das folhas e germe de trigo (8,0 para síntese e 7,3 para hidrólise) (32).

As sacarose sintetases da batata (56) e da mandioca

(58) são inibidas pelo p-cloromercurobenzoato (p-CMB), mas são menos sensíveis do que as da cana de açúcar (57) ou do bambu (62), as quais perdem completamente a atividade na sua presença. Essa inibição sugere a existência de grupos sulfidrílicos essenciais à enzima.

Em geral (25, 32, 61, 62) o UDP é um potente inibidor da atividade hidrolítica da SS, inibição que pode ser parcial ou totalmente revertida por cátions como Mn^{++} , Mg^{++} ou Ca^{++} .

O peso molecular da enzima situa-se por volta de 400 kdaltons (18, 21, 32, 40, 61) com exceção da SS da batata e do bambu, que apresentam pesos moleculares de 290 kdaltons (48) e 280 kdaltons (62) respectivamente. Esse peso molecular refere-se à forma tetramérica da enzima, que parece ter monômeros variando de 80 (61) a 100 kdaltons (40). Su e Preiss (61) encontraram várias formas oligoméricas (tetramérica e octamérica) da SS do milho, variando de 400 a 2200 kdaltons.

A enzima parece não ser íon dependente, já que não tem sido encontrada na literatura consultada, referência alguma a esse respeito.

A SS já foi isolada de grãos como o trigo (36), feijão (19), milho (17, 61,66), arroz (13, 40) e ervilha (47). Foi também isolada de tubérculos como as da alcachofra (6, 47), da batata (48, 56) e da mandioca (58) e raízes de ervilha (20).

Em vegetais como o pepino (26), as algas verdes (21),

as uvas (29), o latex de seringueira (69), as bananas (68, 74), cana de açúcar (24) e frutos em geral, ainda não é clara a função da sacarose sintetase ou da sacarose fosfato sintetase, havendo poucas informações a respeito.

Apesar de terem sido estudadas com certo detalhe a natureza e as mudanças nos carboidratos durante o amadurecimento de frutos, muito pouco é conhecido sobre as enzimas ou vias envolvidas neste processo (9, 41). Uma das razões é a extrema dificuldade em se trabalhar com estes tecidos onde, em geral, existem elevados teores de fenóis, taninos, ácidos e pectinas que dificultam a extração e inativam parcial ou completamente a enzima em estudo. Hawker (29) pesquisou explorativamente uvas em desenvolvimento e detectou atividade da SS, SPS, invertase, sacarose fosfato fosfatase e hexoquinase. Nenhuma destas enzimas tinha sido, até então (1968), extraída de frutas frescas. O autor comenta as dificuldades que teve em comparar as atividades das enzimas extraídas de uvas imaturas e maduras, que tem natureza química e física tão diferentes, pelo alto teor de taninos da fruta. Em uvas, o acúmulo de açúcares redutores foi precedido por aumento da atividade invertásica e acompanhado por aumento das atividades da SS, SPS e fosfatase.

Alguns estudos foram feitos também em peras (42) tentando-se correlacionar o desaparecimento do amido, no decorrer da maturação e o aparecimento dos carboidratos solúveis com a atividade das enzimas α -amilase, sacarose sintetase e sacarose fosfato sintetase.

Marriot e col. (37), Shukla e col. (59), Yeh e Su

(74), em extratos brutos de bananas observaram a presença de glicose, frutose e sacarose e de enzimas como a sacarose sintetase, sacarose fosfato sintetase, invertase (neutra e ácida), fosforilase, amidofosforilase e fosfatase ácida. Dessas enzimas apenas a invertase foi estudada mais detalhadamente por Sum e col. (63) e a sacarose sintetase por Su e col. (64, 73, 74).

Alguns trabalhos já foram desenvolvidos em nossos laboratórios para se tentar esclarecer quais vias metabólicas são operantes na degradação do amido a sacarose, frutose e glicose, durante o amadurecimento da banana nanica (5, 23, 68) e da banana marmelo (14).

Arêas e Lajolo (5) verificaram que existe um aumento do teor de sacarose concomitante à degradação do amido e que esta transformação precede a formação de glicose e frutose. O fato indica que, provavelmente, a transformação amido-sacarose é importante via para a degradação do amido durante o amadurecimento. Constataram, também, que atividade da fosfatase aumentava significativamente durante o climatério enquanto que a da fosforilase aumenta pouco e antes do seu início. Esse aumento não era reduzido pela infiltração de inibidores da síntese protéica.

Garcia e Lajolo (23) detectaram, além de sete amilases, α -1,4 e α -1,6 glicosidases em todos os estágios do amadurecimento da banana. Observaram, também, que apenas a atividade da α -amilase sofria um aumento antes da ocorrência do pico climatérico e antes do início da redução do teor de

amido. As outras enzimas tinham também a sua atividade aumentada, mas concomitantemente ou mesmo após o desaparecimento do amido. Os autores sugeriram que tanto as glicosidases como as amilases poderiam estar envolvidas na transformação do amido.

Em trabalho posterior, Terra e Lajolo (68) verificaram que a atividade da UDPG pirofosforilase permanecia constante, durante o climatério, enquanto que as atividades da sacarose sintetase e da invertase aumentavam. Analisando bananas verdes não detectaram atividade da sacarose fosfato sintetase, passando a creditar, à sacarose sintetase, a catálise da síntese da sacarose. Demonstraram, também, que a infiltração em fatias de bananas de G-1-P marcada com C^{14} , levava à formação de sacarose radioativa. Tais resultados reforçaram a idéia da transformação do amido a sacarose via UDPG. Inibidores de síntese protéica agiam reduzindo essa incorporação.

Também Yeh e Su (74), apesar de encontrarem alguma atividade da SPS em extratos brutos de banana, relacionaram o acúmulo da sacarose durante o amadurecimento à sacarose sintetase e não à sacarose fosfato sintetase.

O quadro abaixo resume o que já foi proposto referente aos passos iniciais da transformação do amido durante o amadurecimento da banana (5, 23, 68).

- (1) amiloglicosidases
- (2) UDPG pirofosforilase
- (3) sacarose sintetase
- (4) invertase

Como se vê já existem hipóteses levantadas através de estudos iniciais havendo, porém, necessidade de se obter mais conhecimento sobre as várias enzimas para que o assunto possa ser melhor esclarecido.

Uma dessas enzimas é a sacarose sintetase, pelo seu papel já sugerido na banana e em outros tecidos vegetais onde pode ter uma função reguladora. Em vista disso, no presente trabalho, procuramos obter mais informações sobre essa enzima. Não se descartou, também, a possibilidade da importância de outras como a própria SPS.

3- OBJETIVOS

Dentro da idéia geral de conseguir mais informações sobre as vias de transformação do amido a sacarose durante o amadurecimento da banana, os objetivos específicos deste trabalho se voltaram para o estudo da sacarose sintetase.

Para isso procuramos isolar a enzima com o máximo possível de atividade, estudar a sua evolução e propriedades cinéticas durante o amadurecimento.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Materiais

4.1.1- Frutos

Foram utilizadas amostras de banana nanica (*Musa cavendishii*) obtidas no estágio pré-climatérico, no CEASA.

As bananas nos foram fornecidas em pencas recém-separadas do cacho e foram assim armazenadas em câmaras com temperatura controlada a 25°C.

4.1.2- Reagentes

ABTS (2,2'-Azinobis (ácido sulfônico 3-etilbenzo tiazolina) da da Sigma.

HEPES N-2-hydroxietyl ácido sulfônico piperazina-N'-2-etano, da Sigma.

PUP polivinilpirrolidona- (P.M. 20.0000 - 30.000).

Acrilamida

frutose

frutose-6-fosfato

sacarose

resorcinol

tiouréia

PEG, polietileno glicol (PM - 20.000)

UDPG (uridina difosfoglicose)
UDP (uridina difosfato)
ADPG (adenina difosfoglicose)
ADP (adenina difosfato)
NADP (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo)
ATP (trifosfato de adenosina)
Amiloglicosidase
glicose-6P-dehidrogenase
fosfoglicose isomerase
invertase
peroxidase
hexoquinase
glicose-oxidase
cisteína
tris (tris hidroximetil amino metano)
DEAE-celulose (Dietilaminoetil celulose), da Sigma
Sepharese-6B, da Pharmacia Fine Chemicals

Os demais reagentes foram todos de grau analítico

4.2- Métodos

4.2.1- Delineamento estatístico

A Metodologia da Superfície de Resposta (MSR) (31) foi usada para o delineamento estatístico dos experimentos que visavam otimizar as condições de extração da sacarose sintetase

na banana verde e madura.

Foi utilizado o delineamento fatorial incompleto desenvolvido pela Foremost Foods, Inc (Dublin, CA, USA) (*), que possui 13 tratamentos, sendo o ponto central repetido 3 vezes, totalizando 15 experimentos realizados ao acaso.

As variáveis independentes escolhidas estão no quadro I e as variáveis resposta foram: (y_1) atividade da sacarose sintetase; (y_2) teor de proteína no extrato enzimático e (y_3) atividade específica (atividade total/mg proteína total).

Quadro I. Variáveis independentes e níveis de variação utilizados no delineamento estatístico.

variáveis independentes		níveis		
		-1	0	1
X_1	pH do tampão de extração	7,0	7,5	8,0
X_2	concentração do tampão (M)	0,05	0,10	0,15
X_3	relação banana/volume da solução extratora (g/ml)	1:3	1:4	1:5

As variáveis independentes foram convenientemente codificadas com -1; 0 e +1. A transformação correspondente foi

$$x_1 = \frac{X_1 - X}{q} \quad \text{onde,}$$

X é a média (ponto central) nos níveis

X_1 é o valor real em unidades naturais

q é a amplitude entre as variáveis,

$$X_{i+1} - X = q$$

Os tratamentos com as variáveis codificadas estão no quadro II.

Quadro II. Variáveis originais e codificadas do delineamento estatístico

ensaio	variaveis originais			variaveis codificadas		
	X_1	X_2	X_3	x_1	x_2	x_3
1	7,0	0,05	1:4	-1	-1	0
2	8,0	0,05	1:4	1	-1	0
3	7,0	0,15	1:4	-1	1	0
4	8,0	0,15	1:4	1	1	0
5	7,0	0,10	1:3	-1	0	-1
6	8,0	0,10	1:3	1	0	-1
7	7,0	0,10	1:5	-1	0	1
8	8,0	0,10	1:5	1	0	1
9	7,5	0,05	1:3	0	-1	-1
10	7,5	0,15	1:3	0	1	-1
11	7,5	0,05	1:5	0	-1	1
12	7,5	0,15	1:5	0	1	1
13/1	7,5	0,10	1:4	0	0	0
13/2	7,5	0,10	1:4	0	0	0
13/3	7,5	0,10	1:4	0	0	0

Os experimentos foram sorteados para satisfazer a necessidade de aleatorização da análise de variância e foram realizados todos de uma só vez, de acordo com a figura 1.

Figura 1. Fluxograma das operações realizadas para a otimização da extração e avaliação do pH ótimo da sacarose sintetase.

4.2.2- Técnica de preparo do extrato enzimático

Todos os experimentos foram realizados extraíndo-se as enzimas segundo as condições otimizadas anteriormente (item 4.2.1). Isto é, tris-HCl (0,05M) pH 8,0, na proporção de 1:4 (g de banana/volume de solução extratora), onde a cisteína (0,02 M) e o PVP (1%), o EDTA (0,01 M) e o bissulfito de sódio (0,02 M) foram conservados nas mesmas proporções que as utilizadas por Terra (67), já que estaria em concordância com a maior parte dos autores consultados (7, 46, 50).

A homogeneização foi feita em homogeneizador POLYTRON por 4 minutos (com interrupções a cada 15 segundos por 15 segundos) e os homogenatos centrifugados a 13.200 x g por 1 hora. O sobrenadante foi considerado o extrato bruto das enzimas.

Todas essas operações foram feitas à temperaturas de 0 a 4°C.

4.2.3- Avaliação da atividade enzimática da sacarose sintetase

4.2.3.1- No sentido da síntese

A atividade da sacarose sintetase no sentido da síntese foi avaliada segundo Pontis et al (45), incubando-se em volume total de 0,1 ml, por 15 minutos a 37°C, 1,0 μ mol de frutose, 0,5 μ mol de UDPglicose, 10 μ moles de tris-HCl pH 7,6 e 0,05 ml do extrato enzimático. A reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de NaOH 1,0N. A frutose remanescente foi destruída pelo aquecimento em água fervente por 10 minutos. A sacarose formada foi determinada pelo método de ROE (49) modificado (item 4.2.7).

4.2.3.2- No sentido da hidrólise

A atividade da sacarose sintetase no sentido da hidrólise foi avaliada incubando-se um volume total de 0,1 ml por 15 minutos a 37°C, 2,0 μ moles de sacarose, 0,5 μ mol de UDP, 10 μ moles de HEPES e 0,05 ml do extrato enzimático. A reação foi interrompida pelo aquecimento em água fervente por 1 minuto (Pontis et al (46)). A frutose foi determinada enzimaticamente pelo método de Arêas & Lajolo (4).

4.2.4- Avaliação da atividade da sacarose fosfato sintetase

A atividade da sacarose fosfato sintetase foi avaliada da mesma maneira que a sacarose sintetase no sentido da síntese (item 4.2.3.1), apenas substituindo-se a frutose pela frutose-6-fosfato e o tampão tris-HCl pelo tampão HEPES pH 6,5 e acrescentando-se 2 mmoles de NaF.

A sacarose-6-fosfato formada também foi determinada pelo método de Roe (49).

4.2.5- Avaliação da atividade da invertase

A atividade invertásica foi avaliada com o mesmo procedimento adotado para a sacarose sintetase no sentido da hidrólise (item 4.2.3.2) omitindo-se a UDP do meio de reação. A frutose produzida foi avaliada pelo mesmo método.

Os brancos de cada reação foram preparados tendo os extratos enzimáticos sido inativados pelo aquecimento em água fervente por 1 minuto.

4.2.6- Unidade de atividade

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a atividade capaz de produzir 1 μmol de produto/minuto de reação.

4.2.7- Doseamento dos carboidratos

A extração e o doseamento do amido foram conduzidos segundo Arêas & Lajolo (4). O amido extraído foi hidrolisado com amiloglicosidase e a glicose liberada determinada com glicose oxidase/peroxidase/ABTS, segundo Bergmeyer (9).

A glicose, frutose e sacarose foram determinadas enzimaticamente através da produção de NADPH pelo sistema enzimático hexoquinase/glicose-6-fosfato dehidrogenase/fosfoglicose isomerase. A sacarose foi previamente hidrolisada com invertase e a frutose liberada utilizada para o cálculo do teor de sacarose, segundo Arêas & Lajolo (4).

O método original de determinação de sacarose desenvolvido por Roe (49), onde 0,25% de resorcinol e 0,1% de tiouréia são solubilizados em ácido acético glacial, foi modificado levando-se em conta as sugestões desenvolvidas por Rufty e col. (50) onde 0,1% de resorcinol são solubilizados em etanol 95%. Modificamos também o teor de ácido clorídrico adicionado para hidrolisação da sacarose, para posterior

determinação da frutose. O método utilizado por nós foi: 0,5 ml de resorcinol (0,1% em etanol 95) e 3 ml de ácido clorídrico (1:5 água/HCl) foram adicionados a cada amostra (0,3 ml) e aquecidos a 80°C por 10 minutos; após resfriamento mediram-se as absorbâncias a 520 nm.

O grau de correlação obtido por este método modificado foi de 99,8%; a omissão do ácido acético glacial facilitou as determinações.

4.2.8- Determinação de proteína

O teor de proteína de todas as fases da purificação foi determinado pelo método de Lowry (35) modificado por Peterson (43). A albumina sérica bovina foi usada como padrão.

A concentração de proteína das frações cromatográficas foi estimada pela medida da absorbância a 280 nm.

4.2.9- Localização da faixa de precipitação da proteína com sulfato de amônio

O extrato bruto das enzimas foi preparado de acordo com o item 4.2.2. Ao sobrenadante foram adicionadas quantidades de sulfato de amônio sólido para que fossem obtidas concentrações finais de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80%. A atividade e o

teor protéico do precipitado e do sobrenadante, após centrifugação e diálise, foram medidos após ser atingida cada uma das concentrações finais de sulfato de amônio acima mencionadas. Todas as operações foram realizadas tendo a temperatura (0 - 4°C) e o pH (7,5) controlados.

4.2.10- Purificação da sacarose sintetase

Durante o isolamento das enzimas observaram-se vantagens na realização de mudanças na técnica original, resultando em duas técnicas que foram utilizadas ao longo dos experimentos.

Primeira técnica

4.2.10.1- Fracionamento com sulfato de amônio

Cinquenta gramas de banana e 150 ml de solução extratora foram homogeneizados por 4 minutos. O homogenato foi centrifugado a 13.200 x g por uma hora (item 4.2.2).

Ao sobrenadante foi adicionado volume de sulfato de amônio em solução saturada para que a concentração final do sal fosse 30%. Após repouso por uma noite a 4°C, a suspensão foi centrifugada a 13.200 x g por 30 minutos. O precipitado descar-

tado e o sobrenadante levado a 50% de saturação com solução de sulfato de amônio. Decorridos 30 minutos de repouso a suspensão foi centrifugada novamente por 30 minutos a 13.200 x g. O precipitado foi retomado no menor volume possível de tampão tris-HCl 0,02M pH 7,5 contendo EDTA 0,002M e cisteína 0,005M, e dialisado contra este mesmo tampão que foi o mesmo adotado para todo o restante do processo de purificação.

4.2.10.2- Cromatografia de peneira molecular

Foi utilizado o gel de agarose, Sepharose-6B da Sigma, que fraciona proteína de peso molecular na faixa de 10^4 a 4×10^4 daltons. O gel foi preparado segundo instruções do fornecedor, com eliminação prévia dos "finos".

A coluna de 52,5 x 3,0 cm foi equilibrada com o tampão tris-HCl (ítem 4.2.10.1). O volume de exclusão (80 ml) foi determinado com azul de dextrana. O fluxo foi de 30 ml/hora e coletaram-se frações 3,2 ml. As frações contendo atividade de sacarose sintetase foram reunidos e aplicados na coluna de DEAE-celulose.

4.2.10.3- Cromatografia de troca iônica

A resina de troca iônica DEAE-celulose foi preparada de acordo com as normas do fabricante e equilibrada com o

tampão tris-HCl (item 4.2.10).

Após a aplicação do "pool" eluído da coluna de Sepharose-6B, a coluna foi lavada com o tampão de trabalho e as enzimas eluídas com gradiente linear de NaCl (0 a 0,45M). As frações que apresentaram absorbância a 280 nm foram testadas com relação a atividade da sacarose sintetase. As que apresentaram atividade foram reunidas.

Segunda técnica

4.2.10.4- Fracionamento com sulfato de amônio

A enzima foi extraída como descrito no item 4.2.9.1. Ao sobrenadante foi adicionado solução concentrada de sulfato de amônio para 30% de saturação. Após 1 hora de repouso, seguida de centrifugação (30 minutos a 13.200 x g), o precipitado foi descartado e o sobrenadante (250 ml) recolhido e dialisado contra o tampão de trabalho até não ser mais detectado sulfato de amônio no dialisado, que foi então aplicado em coluna de DEAE-celulose.

4.2.10.5- Cromatografia de troca iônica

Foram feitas 2 cromatografias consecutivas em DEAE

celulose. Na primeira coluna o volume de resina utilizado foi de 130 ml, e a coluna apresentava dimensões de 40 x 2,5 cm.

O dialisado (item 4.2.10.4) foi aplicado, lavado com tampão tris-HCl (item 4.2.10.1) e eluído com NaCl (0 a 0,45M). As frações que apresentaram atividade de sacarose sintetase foram reunidas e dialisadas contra o tampão de trabalho.

O dialisado foi aplicado na segunda coluna de DEAE-celulose, esta com um volume menor de resina (em torno de 50 ml) em coluna de 25,5 x 4,0 cm, lavado e eluído da mesma maneira descrita para a primeira coluna. As frações que apresentaram atividade foram reunidas.

4.2.11- Eletroforese em gel de poliacrilamida

As eletroforeses foram conduzidas segundo Davis (16) com 5% de acrilamida, aplicando-se 3 mA por coluna contendo aproximadamente 200 mg de proteína. A corrida foi feita em cuba cujo tampão teve sua temperatura controlada em cerca de 4°C.

Os géis foram feitos em duplicata; um foi corado para proteína e o outro, com base nas bandas protéicas reveladas na duplicata, foi cortado em fatias e cada uma imersa individualmente em 0,2 ml de tris-HCl 0,25M pH 7,6 contendo cisteína 0,002M. Após maceração e centrifugação (5.000 rpm/20 minutos), foi determinada a atividade da sacarose sintetase correspondente a cada banda (item 4.2.3.1).

4.2.12- Testes de estabilidade: tempo x temperatura

A estabilidade da sacarose sintetase nas diversas fases da purificação, foi estudada com preparações enzimáticas obtidas pela primeira técnica (item 4.2.10.1). Os extratos foram armazenados em porções individuais que, após análise, não voltaram a ser utilizados.

As diversas temperaturas utilizadas foram: -15°C (freezer), 0°C (câmara fria + banho de gelo), 4°C (câmara fria) e 8°C (geladeira).

4.2.13- Determinação do K_m

A determinação do K_m foi conduzida segundo métodos descritos por Whitaker (70) utilizando como substratos o UDP-glicose e a frutose na direção da síntese e UDP e sacarose na direção da hidrólise.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Otimização da extração da sacarose sintetase

5.1.1- Meio extrator

O meio extrator para enzimas e organelas subcelulares de tecidos vegetais exige cuidadosa formulação para que sejam recuperadas com rendimento e atividade máximos. Durante este processo, fenólicos endógenos como taninos, são rapidamente oxidados para quinonas e condensados a pigmentos escuros. Os produtos desta reação inibem enzimas e conduzem a falsos resultados (3). As enzimas extraídas de tecidos vegetais podem ser protegidas dos produtos do escurecimento enzimático, pela presença de agentes redutores solúveis e por inibidores específicos de fenolases (3, 7, 34).

Baijal e col. (7) otimizaram a extração de várias enzimas de diferentes partes da bananeira. A atividade máxima da sacarose sintetase foi obtida quando o meio extrator básico, composto por tris-HCl (0,05M) pH 7,0, cisteína (0,02M) e EDTA (0,01M) foi suplementado com 1% de PVP solúvel. Por outro lado, a sacarose fosfato sintetase, teve cerca de 70 a 85% de sua atividade inibida ao ser extraída em meio extrator acrescido do mesmo PVP.

Terra e Lajolo (67) otimizaram um meio específico

para a extração da sacarose sintetase, invertase e UDPG piro fosforilase, composto por tris-HCl (0,1M) pH 7,6, um quelante de metais (EDTA 0,01M), um complexante de fenóis (PVP solúvel 1%), agentes redutores (cisteína 0,01M e bissulfito de sódio 0,02M) e um inibidor da invertase (MnCl₂ 0,001M).

Nossos experimentos mostraram ser absolutamente necessário o uso de PVP solúvel no meio extrator, sem o qual não conseguimos, uma única vez, extrair as proteínas da banana, que devem ter sido precipitadas pelos fenólicos, abundantes no fruto (7).

O cloreto de manganês era adicionado ao extrato por Terra e Lajolo (67) para inibir eventuais invertases que fossem também extraídas; em experimentos prévios, porém não encontramos diferenças significativas na atividade da sacarose sintetase quando extraída na presença ou ausência do cátion que justificassem o seu uso. Assim, optamos por eliminá-lo do meio extrator resultando numa primeira modificação do meio desenvolvido por esses autores.

O meio extrator básico ficou assim constituído: tris-HCl, EDTA (0,01M), PVP solúvel (1%), cisteína (0,02M) e bissulfito de sódio (0,02M). A molaridade e o pH do tampão foram otimizados, juntamente com a proporção massa de banana/volume de solução extratora e os resultados são apresentados a seguir.

5.1.2- Estabelecimento dos parâmetros de extração: relação massa/volume, pH e molaridade

Além dos agentes redutores e de outros compostos que são utilizados para prevenir a ação das fenoloxidasas durante a extração de enzimas, para a obtenção de bons resultados, são muito importantes o pH, a força iônica do meio e a relação massa/volume da solução extratora.

Apesar de Terra e Lajolo (67) terem otimizado os fatores pH e molaridade do seu meio extrator resolvemos, em função da baixa atividade da SS assim obtida, e das diferenças existentes entre os tecidos de bananas verdes e maduras, fazer uma reavaliação dos procedimentos.

A intenção inicial era utilizar a Metodologia da Superfície de Resposta (MSR) para determinar as condições de pH e molaridade do tampão tris-HCl e a relação massa de banana/volume de solução extratora que maximizasse a variável resposta (atividade específica). Para isso, executou-se um experimento 3^3 incompleto, totalizando 15 experimentos (15) onde se procurou variar os fatores de controle dentro de toda a faixa de variação possível. Entretanto, o modelo de segunda ordem ajustado não se mostrou significativo. Isto mostra que na realidade não existe na região experimental considerada, pontos de máximo, mínimo ou inflexão, isto é, do ponto de vista do fenômeno, a variável resposta (atividade específica) variou em torno de valores médios. Desta forma, abandonou-se a abordagem

da M.S.R. e centrou-se a continuidade do estudo nas melhores condições dos ensaios apresentadas nas tabelas 3 e 4, condições que estão em concordância com a literatura.

Tabela 3. Atividades específicas da sacarose sintetase ensaiada nos pHs 7,0, 7,5 e 8,0 e extraída da banana verde.

No ensaio	variáveis originais			Atividade específica SS		
	pH	MOL.	Prop.	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
1	7,0	0,05	1:4	0,016	0,019	0,014
2	8,0	0,05	1:4	0,016	0,029	-
3	7,0	0,15	1:4	0,013	0,012	0,014
4	8,0	0,15	1:4	0,012	0,016	0,018
5	7,0	0,10	1:3	0,016	0,014	-
6	8,0	0,10	1:3	0,016	0,024	0,021
7	7,0	0,10	1:5	0,015	0,012	0,010
8	8,0	0,10	1:5	0,012	0,013	0,010
9	7,5	0,05	1:3	0,019	0,023	0,020
10	7,5	0,15	1:3	0,022	0,023	0,024
11	7,5	0,05	1:3	0,016	0,016	0,016
12	7,5	0,15	1:5	0,009	0,011	0,010
13.1	7,5	0,10	1:4	0,018	0,016	0,014
13.2	7,5	0,10	1:4	0,017	0,012	0,014
13.3	7,5	0,10	1:4	0,016	0,012	0,014

Tabela 4. Atividades específicas da sacarose sintetase ensaiada nos pHs 7,0, 7,5 e 8,0 e extraída da banana madura.

No ensaio	variaveis originais			Atividade específica SS		
	pH	MOL.	Prop.	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
1	7,0	0,05	1:4	0,014	0,013	0,010
2	8,0	0,05	1:4	0,024	0,020	0,014
3	7,0	0,15	1:4	0,014	0,009	0,009
4	8,0	0,15	1:4	0,022	0,014	0,012
5	7,0	0,10	1:3	0,014	0,011	0,009
6	8,0	0,10	1:3	0,026	0,017	0,015
7	7,0	0,10	1:5	0,019	0,016	0,016
8	8,0	0,10	1:5	0,020	0,016	0,016
9	7,5	0,05	1:3	0,034	0,016	0,014
10	7,5	0,15	1:3	0,020	0,015	0,014
11	7,5	0,05	1:3	0,017	0,011	0,010
12	7,5	0,15	1:5	0,018	0,012	0,012
13.1	7,5	0,10	1:4	0,017	0,012	0,011
13.2	7,5	0,10	1:4	0,020	0,015	0,012
13.3	7,5	0,10	1:4	0,017	0,012	0,012

Na tabela 3, que se refere ao extrato enzimático da banana verde, pode-se observar que os melhores resultados, em termos de atividade específica, foram obtidos com os ensaios de números 2, 6 e 9. Apesar de serem numericamente diferentes, tais valores são iguais se observarmos os valores das repetições no ponto central, que tem a mesma variação (em torno de 5) que a observada entre os dois ensaios. O ensaio número 2 (tris-HCl pH 8,0; 0,05M e proporção 1:4) foi o escolhido por serem as mesmas condições utilizadas pelos autores dos trabalhos mais recentes (Duram e Pontis, 1977, Larsen e col., 1985 e Su e Preiss, 1978 e Salerno, 1985).

Nos experimentos com extratos de bananas maduras (tab.4), as atividades máximas foram obtidas nas condições dos ensaios números 9, 6 e 2, que são os mesmos que para bananas verdes. Mas aqui, visivelmente, o ensaio de número 9 (tris-HCl, pH 7,5; 0,05M e proporção 1:3) resultou em maior atividade específica, condições escolhidas para a extração da enzima de bananas maduras.

Em resumo, a solução extratora que passou a ser adotada em nossos experimentos foi: tris-HCl, pH 8,0 - 0,05M para bananas verdes e pH 7,5 - 0,05M para bananas maduras), cisteína (0,02M), EDTA (0,01M), PVP solúvel (1%) e bissulfito de sódio (0,02M), na proporção de 1:4 para bananas verdes e 1:3 para bananas maduras. Entre os três pHs ensaiados para medir a atividade no extrato enzimático, os que resultaram na maior atividade foram: para banana madura pH = 7,0 e para banana verde pH = 7,5.

É oportuno ressaltar que o pH da solução extratora parece mostrar-se menos importante, para a atividade da enzima, do que a sua molaridade. Em geral, foram obtidos melhores resultados com tampões 0,05M do que com 0,15M. Além disso, em concordância com a literatura, os pHs obtidos de bananas verdes em geral são básicos e os obtidos de bananas maduras são ácidos (tabelas 5 e 6). Nas mesmas tabelas, pode-se notar que a concentração de proteína no extrato depende somente da proporção de banana/volume de solução extratora: quanto maior a proporção, mais proteína é extraída (dentro dos limites dos experimentos 1:3 e 1:5).

Os dados obtidos mostram a complexidade envolvida na extração da enzima e a necessidade de padronização criteriosa.

Tabela 5. Concentração de proteína e pH final do extrato bruto obtido no ensaio de otimização da extração da sacarose sintetase da banana verde.

No ensaio	variáveis originais			pH final extrato bruto	Proteína extrato bruto (mg/g ban.)
	pH	MOL.	Prop.		
1	7,0	0,05	1:4	6,3	12,8
2	8,0	0,05	1:4	7,8	13,3
3	7,0	0,15	1:4	6,7	18,0
4	8,0	0,15	1:4	7,9	17,4
5	7,0	0,10	1:3	6,2	9,1
6	8,0	0,10	1:3	7,4	8,9
7	7,0	0,10	1:5	6,8	19,6
8	8,0	0,10	1:5	8,0	21,3
9	7,5	0,05	1:3	6,2	8,7
10	7,5	0,15	1:3	7,2	9,7
11	7,5	0,05	1:3	7,1	15,1
12	7,5	0,15	1:5	7,6	24,3
13.1	7,5	0,10	1:4	7,4	13,9
13.2	7,5	0,10	1:4	7,4	15,0
13.3	7,5	0,10	1:4	7,3	14,8

Tabela 6. Concentração de proteína e pH final do extrato bruto obtido no ensaio de otimização da extração da sacarose sintetase da banana madura.

No ensaio	variáveis originais			pH final extrato bruto	Proteína extrato bruto
	pH	MOL.	Prop.		
1	7,0	0,05	1:4	5,9	13,1
2	8,0	0,05	1:4	7,1	9,6
3	7,0	0,15	1:4	6,4	15,3
4	8,0	0,15	1:4	8,0	12,7
5	7,0	0,10	1:3	5,6	7,9
6	8,0	0,10	1:3	7,0	7,1
7	7,0	0,10	1:5	6,3	14,9
8	8,0	0,10	1:5	7,9	14,1
9	7,5	0,05	1:3	5,8	6,8
10	7,5	0,15	1:3	6,6	7,9
11	7,5	0,05	1:3	6,7	18,7
12	7,5	0,15	1:5	7,5	16,8
13.1	7,5	0,10	1:4	6,9	14,6
13.2	7,5	0,10	1:4	6,8	12,3
13.3	7,5	0,10	1:4	6,9	13,6

5.2- Fracionamento com sulfato de amônio

Terra e Lajolo (67), em trabalho anterior ao nosso, estabeleceram a faixa de 30 a 70% para a precipitação da SS. Em nosso trabalho procuramos estreitar essa faixa para diminuir a quantidade de sulfato de amônio a ser dialisada posteriormente, não aumentar demasiadamente a força iônica do meio e tentar aumentar a eficiência do processo. De fato, conseguimos precipitar quase toda a atividade de SS na faixa de 30 a 50% de saturação.

5.3- Eliminação da pectina

A extração e purificação de enzimas é dificultada pela presença de substâncias pécticas (65).

As pectinas aumentam a viscosidade, reduzem a eficiência das colunas cromatográficas e alteram os resultados das análises químicas. Terra e Lajolo (67) tentaram removê-las com sais de cálcio e solventes orgânicos, sem bons resultados; optaram pelo cloreto de magnésio que em concentração 20 mM, eliminava parte da pectina mas causava redução de atividade da enzima. Em nosso caso, tentamos removê-la através de coluna de peneira molecular (Sephadex G-25); tivemos ótimos resultados em termos de redução da pectina mas tivemos também, diluição muito grande do extrato enzimático, o que tornava difícil conduzir as fases posteriores do isolamento. Tentamos, também,

utilizar pectinases, sem bons resultados. Essas enzimas tem pH ótimo por volta de 4 e temperatura ótima em 25°C e atuaram pouco em nossos extratos que deviam ser mantidos em pH 7,5 e não podiam ser aquecidos acima de 8°C sob pena de perderem atividade. Os melhores resultados foram conseguidos aliando-se baixas temperaturas à precipitação com sulfato de amônio. Ao adicionar o sal ate 30% de saturação e deixar o extrato em repouso por uma noite a 4°C, conseguimos eliminar grande parte da pectina que, precipitada, podia ser descartada por centrifugação.

5.4- Localização da Sacarose Sintetase na banana

Estudos feitos por Garcia e Lajolo (23) demonstraram que durante o amadurecimento da banana, o desaparecimento do amido se inicia no centro do fruto irradiando-se para as bordas. Por isso, resolvemos verificar se a atividade da SS era diferente nas regiões central e na periférica. Se tal fato ocorresse, a purificação seria mais rentável separando-se as duas porções. Os resultados (tabela 7), porém, foram idênticos para as duas regiões, demonstrando que não existem diferenças nas atividades da enzima.

Tabela 7. Comparação das atividades da SS extraída das bordas (1) e do centro (2) de bananas pré-climatéricas.

Fase	Amostra	Vol. (ml)	Ativ. total *	Prot. total (mg)	Ativ. espec. x 10 **
Extrato bruto	1	101	1,33	188,19	7,1
	2	103	1,36	191,58	7,1
Fracionamento c/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30 - 50%)	1	11	0,38	40,92	9,4
	2	11	0,40	41,58	9,7

* μmol sacarose/minuto

** μmol sacarose/minuto/mg de proteína

5.5- Isolamento da sacarose sintetase

Duas técnicas principais foram utilizadas durante o trabalho. A primeira usada nos passos iniciais, foi uma adaptação daquela desenvolvida por Terra e Lajolo (67). A segunda, foi desenvolvida a partir da experiência que foi sendo adquirida durante o trabalho e usada nas fases posteriores. Ambas estão descritas em material e métodos no item (4.2.10). Para facilitar o entendimento, os resultados são apresentados separadamente.

5.5.1 Primeira técnica

A enzima foi parcialmente purificada cerca de 5 vezes, com 22% de rendimento, quando o extrato bruto da banana verde (18% amido) foi fracionado com sulfato de amônio (30-50%), cromatografado em coluna de peneira molecular (Sephacrose-6B) seguindo-se a de troca iônica (DEAE-celulose). Perfis típicos de eluição das colunas cromatográficas podem ser vistos nas figuras 2 e 3. Os dados de pureza e rendimento em cada fase da purificação estão na tabela 8.

Terra e Lajolo (67), obtiveram purificação de 62 vezes ao longo de cinco etapas, com rendimento de 6%, trabalhando com bananas maduras. É importante referir que nas diversas tentativas efetuadas com a técnica desses autores, nenhuma vez conseguimos resultados parecidos aos que eles obtiveram

quanto à purificação, embora o grau de homogeneidade, avaliado pelos perfis eletroforéticos, tivessem sido semelhantes. É possível, como veremos adiante, (ao falar do efeito da diluição sobre a atividade) que a atividade tenha sido superestimada devido às mudanças nas propriedades da enzima durante a passagem na coluna de peneira molecular (Bio Gel). Outro fato que merece comentário é o de que nosso extrato bruto apresentou uma atividade de 1 u e o desses autores de apenas 0,15 u. Além disso, como veremos, esses valores dependem do estágio fisiológico do fruto. Tudo isso torna difícil uma comparação efetiva.

Su e Preiss (61) purificaram cerca de 42 vezes a sacarose sintetase do milho, com rendimento de 80 % em três etapas e, Nomura e Akazawa (40) obtiveram a SS do arroz homogênea, com 28% de rendimento, 11 vezes purificada, também em três etapas. Todos esses autores utilizaram o fracionamento com sulfato de amônio, seguido de cromatografia em peneira molecular e posteriormente de troca iônica.

Nossos resultados mostraram que o rendimento cai muito ao estendermos o número de etapas e também o tempo levado para a purificação da enzima. Além disso, quanto mais purificada ela está, mais instável se torna. Slabinik e col. (56) em seus experimentos, observaram que a SS (da batata) eluída de coluna de DEAE-celulose era tão instável que preferiram utilizá-la menos purificada para seus ensaios.

A primeira técnica de purificação que usamos parece ter bom rendimento, é rápida embora não resulte numa preparação homogênea como se pode verificar pelas eletroforeses (fig.4).

É porém, um compromisso aceitável entre nível de isolamento tempo gasto na purificação e a atividade que se obtém.

FIGURA 2. Perfil de eluição da coluna de Sepharose-6B (1ª técnica) onde (●) proteína e (▲) atividade da SS.

FIGURA 3. Perfil de eluição da coluna de DEAE-celulose (1ª técnica) onde (●—●) proteína e (▲—▲) atividade da SS.

FIGURA 4. Perfil eletroforético das frações obtidas com o 1º método de purificação. As setas indicam atividade SS.

Tabela 8 - Purificação da sacarose sintetase de bananas verdes
(primeira técnica)

Fase	Volume (ml)	Ativ. total *	Prot. total (mg/ml)	Ativ. espec. **	Pur.	Rendim. (%)
Extrato bruto	315	58,94	686,70	0,086	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30 - 50%)	30	19,71	263,10	0,075	0,9	33,4
Sepharose-6B	136	25,85	161,84	0,160	2,0	43,8
DEAE-celulose	50	13,09	31,50	0,420	5,0	22,2

* μmol sacarose/minuto

** μmol sacarose/minuto/mg de proteína

Resultados correspondentes a 100 g de banana.

5.5.2- Segunda técnica

Ao observar que, na primeira técnica a maior eficiência da purificação devia-se à coluna de DEAE-celulose, resolvemos utilizar apenas o fracionamento por troca iônica. Por outro lado, o fracionamento com sulfato de amônio, apesar de não resultar em aumento da atividade específica, é importante pela remoção das pectinas, mas é também uma fase demorada. Optamos, por isso, por duas modificações: a substituição do sulfato de amônio sólido pela solução concentrada do sal e também optamos por utilizar apenas uma precipitação entre 0 e 30% (remoção de pectinas) sem conduzir a fase seguinte que seria precipitar a enzima entre 30 e 50% de saturação. Esta etapa tornou-se assim mais rápida e fácil de ser conduzida.

Na tabela 9, pode-se notar que as modificações deram bons resultados. A SS é purificada 17 vezes com cerca de 20% de rendimento, quando o extrato bruto é fracionado com sulfato de amônio (0 a 30%), dialisado e aplicado em duas colunas consecutivas de DEAE-celulose. Perfis típicos de eluição destas colunas estão representadas nas figuras 5 e 6.

A passagem na segunda coluna resultou na resolução em dois picos, com atividade de SS, um com o dobro da atividade específica do outro. Acreditamos tratar-se de formas diferentes de agregação da mesma enzima. O assunto merece confirmação em estudos posteriores. As eletroforeses (fig. 7) indicam que a enzima presente no segundo pico está homogênea, já que as duas bandas que aparecem tem atividade de SS.

FIGURA 5. Perfil de eluição da 1ª coluna de DEAE-celulose (2ª técnica) onde (●—●) proteína e (▲—▲) atividade de SS

FIGURA 6. Perfil de eluição da 2ª coluna de DEAE-celulose (2ª técnica) onde (●—●) proteína e (▲—▲) atividade da SS

FIGURA 7. Perfil eletroforético das frações obtidas com o 2º método de purificação: (1) 1º DEAE-celulose, (2) 1º pico do 2º DEAE-celulose e (3) 2º pico do 2º DEAE celulose. As setas indicam atividade da SS.

Tabela 9. Purificação da sacarose sintetase de bananas verdes
- segunda técnica -

Fase	Vol.	Ativ.	Prot.	Ativ.	Pur.	Rend.
		total	total	esp.		
	(ml)	*	(mg/ml)	**		(%)
Extrato						
bruto	150	103,21	297,0	0,35	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0 - 30%	255	103,17	321,0	0,32	1	100
1º DEAE- celulose	65	29,66	29,9	1,00	2,8	28
2º DEAE- celulose 1 P	12	8,29	2,4	3,46	10,0	8
2P	18	11,00	1,8	6,11	17,5	11

* µmol sacarose/minuto

** µmol sacarose/minuto/mg proteína

Resultados correspondentes a 50g de banana.

5.6 Efeito da diluição na atividade

Como se vê na tabela 8, a precipitação com sulfato de amônio reduz ligeiramente a atividade enzimática, ao contrário do que se deveria esperar já que houve uma concentração da enzima.

Isto é devido, parcialmente, à redução real da atividade causada pelo processo de precipitação e à inerente labilidade da enzima. Por outro lado, porém, encontramos um efeito ligado à concentração da enzima que chamamos "efeito da diluição". Esse efeito leva, por simples diluição da fração obtida após precipitação, a um aumento de atividade que pode chegar até a 8 vezes. A fig. 8 ilustra uma das experiências realizadas.

FIGURA 8. Curvas de diluição de extratos concentrados (30-50% sulfato de amônio): (•) 15 minutos reação e (▲) 30 minutos reação.

Como os dados relativos à curva de 30 minutos de reação foram cerca de 25% inferiores aos da curva de 15 minutos, resolvemos investigar a possibilidade de haverem proteases agindo no meio, que com um tempo maior (30 minutos) teriam mais chance de agir sobre a enzima, diminuindo assim sua atividade. Para testar tal possibilidade, tentamos "proteger" a enzima com a adição complementar de albumina às diluições, de modo que todas tivessem o mesmo teor protéico. Os resultados mostraram não serem proteases as causadoras das diferenças entre as curvas da figura 8, uma vez que os extratos "protegidos" ou não com albumina, tiveram o mesmo comportamento em termos de atividade x diluição, em 30 minutos de reação.

Larsem e col. (32) comentaram em seu trabalho, que a SS do germe de trigo com peso molecular de 380 kdalton parece agregar-se em formas de alto peso molecular de 800 a 1000 kdaltons. O mesmo comportamento foi descrito para a SS do milho (61) que assume formas tetraméricas, hexaméricas, octaméricas e outras com mais de oito unidades. Su e Preiss (61) acham provável que o grau de polimerização dependa da força iônica e da composição do meio em que está a enzima. Eles notaram que a forma tetramérica presente em maior quantidade em seus extratos e de mais alta atividade específica pode ser a forma natural da enzima. Também Nomura e Akazawa (40) observaram que a SS do arroz tem forma tetramérica. Delmer (18) determinou o peso molecular, da SS do feijão, em 375 kdaltons possuindo 4 subunidades de 94 kdaltons cada.

Larsen e col. (32) observaram que formas de alto peso molecular, da SS do trigo, geralmente são encontradas em altas

concentrações protéicas e não se sabe se estas formas tem um papel fisiológico ou se são apenas um produto de agregação "in vitro".

Essas considerações auxiliam na explicação dos nossos resultados. Os extratos enzimáticos ficam altamente concentrados após o fracionamento com sulfato de amônio, assim, é possível que a enzima se agregue em formas diversas, menos ativas e que com a diluição posterior, ela assuma formas mais ativas, resultando no aumento da atividade específica que observamos.

Com estas informações pode-se tentar explicar os dois picos de atividade da SS eluída da segunda coluna de DEAE-celulose (fig. 6) como sendo formas oligoméricas diferentes. O primeiro pico tem o dobro da proteína do segundo e possui a metade de sua atividade específica, o que faz pensar que o primeiro possui formas de agregação com peso molecular maior, com menos atividade do que as formas existentes no segundo.

5.7- Ensaio de estabilidade das preparações

A estabilidade dos extratos enzimáticos, nos diversos estágios de purificação, foi ensaiada diariamente em experimentos onde armazenamos amostras individuais nas temperaturas de -15°C , 0°C , 4°C e 8°C por uma semana. Os resultados podem ser vistos na figura 9 e mostram que quanto mais pura, ou mais diluída a enzima, mais instável se torna. No extrato bruto, onde deve estar mais protegida, ela se mostra praticamente

estável a -15°C , perdendo apenas 20% de atividade em uma semana. Já o extrato eluído do DEAE-celulose, ao fim de 5 dias, havia perdido 80% da atividade. A exceção foi para o mesmo extrato, armazenado em 20 e 40% de glicerol, que após 10 dias de armazenamento a -15°C mantinham, respectivamente 57 e 43% da atividade inicial.

A temperatura parece ter menor influência na conservação da atividade do que a fase da preparação.

Fica difícil comparar a estabilidade da atividade da SS da banana com as de outras fontes, já que são armazenadas em diversas formas, temperaturas e fases de purificação. Por exemplo, a SS isolada do latex da seringueira (69), foi primeiro concentrada, com sulfato de amônio, depois armazenada em geladeira ($4-8^{\circ}\text{C}$) e após um mês não teve queda de atividade. Também Larsem e col. (32) não observaram perdas de atividade, da SS isolada do trigo, após uma semana em geladeira. Quando armazenada a -20°C em 50% de glicerol, a enzima conservou 80% da atividade após um ano. Também eles concentraram a proteína antes de armazená-la. Por outro lado, Slabinik e col. (56) tiveram perdas de 40% (da SS da batata) da atividade mesmo armazenando-a concentrada, seja refrigerada ($0-4^{\circ}\text{C}$), seja congelada (-15°C). Sung e Su (64) notaram uma correlação entre quantidade de glicerol adicionada e atividade retida, da SS de ervilhas, armazenadas sob as mesmas condições que Slabinik e col. (56).

FIGURA 9. Curvas de estabilidade das frações obtidas com o 1º método (tempo X temperatura).

5.8- Propriedades cinéticas da sacarose sintetase

As curvas de saturação para os quatro substratos utilizados pela enzima estão nas figuras 10, 11, 12 e 13. A determinação das constantes cinéticas (K_m) foram feitas pelos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. Os K_m e as velocidades máximas estão resumidos na tabela 10.

Tabela 10. Constantes cinéticas e velocidades máximas das reações catalisadas pela sacarose sintetase de bananas verdes.

	Substrato			
	hidrólise		síntese	
	sacarose	UDP	frutose	UDPG
K_m	22,7 mM	0,17mM	0,31mM	0,67mM
$V_{max.}$	0,24	0,19	0,8	1,25

Estes dados foram obtidos utilizando-se a enzima contida no segundo pico eluído da segunda coluna de DEAE-celulose (item 5.5.2). As constantes cinéticas no sentido de síntese de sacarose, não se diferenciaram para as reações

catalisadas pela SS dos picos 1 e 2.

A enzima parece ter baixa afinidade pela sacarose e alta afinidade pelos outros substratos. Este comportamento é coerente com os dados que temos da literatura (6, 32, 48, 62).

Em testes preliminares comparamos a afinidade da SS pela ADPG e UDPG, os resultados mostraram que a atividade da enzima é cerca de 3 vezes menor quando utiliza o primeiro nucleotídeo em lugar do segundo.

FIGURA 10. Efeito da concentração da frutose sobre a velocidade da reação de síntese catalisada pela SS. Inserido o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

FIGURA 11. Efeito da concentração da UDPG sobre a velocidade da reação de síntese catalisada pela SS. Inserido o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

FIGURA 12. Efeito da concentração da sacarose sobre a velocidade da reação de hidrólise catalisada pela SS. Inserido o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

FIGURA 13. Efeito da concentração de UDP sobre a velocidade da reação de hidrólise catalisada pela SS. Inserido o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

5.9- Variação da atividade da sacarose sintetase durante o amadurecimento da banana

Terra e Lajolo (68) observaram um aumento da atividade da sacarose sintetase durante o período climatérico da banana, coincidente com o decréscimo do teor de amido e com o acúmulo de sacarose não conseguindo, porém, detectar atividade da sacarose fosfato sintetase. Por isso, da mesma forma Yeh e Su (74), atribuíram à SS a conversão amido-sacarose na banana.

Nosso objetivo inicial era também o de caracterizar essa enzima nos diferentes estágios: pré-climatérico e climatérico. Notamos porém que, sistematicamente, nossos resultados eram contraditórios com os de Terra e Lajolo (68). Isto é, não detectávamos, como eles, aumento de atividade da enzima durante o amadurecimento e sim um declínio. Após diversos ensaios descobrimos, porém, que havia uma variável que não vinha sendo considerada que era o tempo decorrido após a colheita da banana ou a sua "idade" pós-colheita. Por isso realizamos um experimento para tentar correlacionar o teor de amido, a atividade da enzima e o tempo decorrido após sua colheita.

Os resultados podem ser vistos na figura 14, que mostra não haver correlação entre o teor de amido e a atividade da enzima, mas sim com o tempo transcorrido após sua colheita.

FIGURA 14. Variação da atividade da SS com o tempo pós-colheita X teor de amido

Devido à possibilidade da existência de vários artefatos, conduzimos diversos ensaios que nos permitissem ter mais segurança nos resultados. Entre eles :

- a- sabe-se que as fosfatases apresentam aumento de atividade durante o amadurecimento do fruto (5) e podem utilizar o mesmo substrato que a SS (UDPG), por isso, para inibir sua ação, adicionamos fluoreto de sódio ao meio de reação;
- b- adicionamos extrato de banana madura ao extrato de banana verde para que se algum fator (proteases, inibidores, fosfatases) estivesse presente no primeiro agisse sobre o segundo, tornando-se evidente;
- c- cátions como Mn^{++} e Mg^{++} foram adicionados tanto ao meio de extração quanto ao meio de reação, na tentativa de minimizar eventuais necessidades de cofatores que existissem "in vivo" e que não estivéssemos fornecendo.

Nenhum desses testes, porém, forneceu dados que contrariassem a suposição feita. Apesar disso, como todos os testes tivessem sido realizados com a enzima no extrato bruto ou na fração obtida com sulfato de amônio, conduzimos ensaios complementares com a enzima mais purificada. Para isso, foram utilizadas bananas pré-climatéricas (20% de amido) um dia após a colheita e bananas climatéricas (climatizadas no CEASA, com 8,6% de amido) quatro dias após a colheita e ainda outras com 12 dias após a colheita (10,6% de amido). Os resultados encontram-se nas tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11. Atividade da sacarose sintetase de bananas pré-climatéricas com 20% de amido (1 dia).

Fase	Vol. total (ml)	Ativ. total *	Prot. total (mg)	Ativ. espec. **	Purif.	Rend. (%)
extrato bruto	160	116,61	577,49	0,20	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄						
30-50%	15,8	13,57	72,56	0,19	0,9	11,6
1 Sepharose	65	15,55	27,70	0,63	3,1	13,3
2 Sepharose	44	6,85	3,15	2,17	10,8	5,8

* μmol sacarose/minuto

** μmol sacarose/minuto/mg de proteína

Tabela 12. Atividade da sacarose sintetase de bananas cli-
matéricas com 8,6% de amido (4 dias).

Fase	Vol. total (ml)	Ativ. total *	Prot. total (mg)	Ativ. Purif. espec. **	Rend. (%)
extrato bruto	166	24,58	244,20	0,10	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30-50%	15	9,49	117,00	0,08	38,6
1 Sepharose	36	2,90	15,43	0,19	11,8
2 Sepharose	3,8	0,55	0,99	0,55	2,2

* μmol sacarose/minuto

** μmol sacarose/minuto/mg de proteína

Tabela 13. Atividade da sacarose sintetase de bananas climáticas com 10,6% de amido (12 dias).

Fase	Vol. total (ml)	Ativ. total *	Prot. total (mg)	Ativ. espec. **	Purif.	Rend. (%)
extrato bruto	345	21,05	507,15	0,05	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30-50%	35	6,05	157,50	0,04	0,8	28,7
1 Sepharose	25	1,44	9,50	0,15	3,0	6,8
2 Sepharose	11,5	0,81	2,99	0,27	5,4	3,8

* μmol sacarose/minuto

** μmol sacarose/minuto/mg de proteína

Como se vê nas amostras com 12 dias o teor de amido (10,6%) é superior àquele das amostras com 4 dias (8,6%), mesmo assim, a atividade da SS tanto no extrato bruto como após a purificação foi menor reforçando nossa hipótese.

É possível que os níveis de SS sejam mantidos por algum fator veiculado pela planta (auxinas, por exemplo) que desaparecendo com o decorrer do tempo após a colheita

"desligue" ou reduza a sua velocidade de síntese. Isso fala em favor da ação da SS mais na síntese do amido mais do que na sua degradação; a hipótese merece trabalhos posteriores. Na literatura um único trabalho faz menção ao assunto; Pressey (48) notou que o nível da SS era muito maior em batatas recém colhidas que em batatas armazenadas. Para ele, esta foi mais uma evidência de que a enzima é importante na formação do amido na batata.

5.10- Sacarose sintetase x sacarose fosfato sintetase

Tendo em vista o aumento da síntese de sacarose durante o amadurecimento e a queda observada —até o virtual desaparecimento — da SS, enzima supostamente envolvida nessa síntese, a alternativa que se apresentava era a eventual participação da SPS no processo. Em experiências iniciais já havíamos observado que em bananas com poucos dias após a floração, a atividade da SS era elevada e a da SPS nula, ao passo que no fruto climatérico a situação se invertia. Assim, conduzimos uma experiência onde acompanhamos a evolução tanto da SS como da SPS em bananas em diferentes graus de maturidade fisiológica e amadurecimento hortícola. As atividades das enzimas foram, assim, relacionadas ao teor de amido e ao tempo pós-colheita. As figuras 15 e 16 ilustram os resultados obtidos.

Novamente, os dados parecem reforçar a hipótese de SS, mais importante na síntese do amido, com a formação

de nucleotídeos durante o desenvolvimento do fruto, e de ser, a SPS, a enzima envolvida na sua degradação e formação da sacarose, por ocasião do amadurecimento. No caso, a SPS (contrariamente à SS) teria a sua atividade regulada pela queda de fatores especiais (como as auxinas citadas) ou pelo aumento de outros (teor de etileno). Em síntese a SS é desativada e a SPS ativada durante o amadurecimento.

Além disso, nota-se que ambas as atividades, tanto de síntese como de hidrólise são resuzidas paralelamente (figura 16). Isso pode ser interpretado como mais uma evidência de que se trata de uma enzima só com ambas as ações, e não o de um complexo enzimático (56, 58).

FIGURA 15. Variação da atividade da SS e SPS com o teor de amido e o tempo após a colheita do fruto.

FIGURA 16. Variação das atividades de síntese/hidrólise da SS com o teor de amido e o tempo após a colheita do fruto.

6- CONCLUSÕES

- 1- A sacarose sintetase pode ser extraída de bananas pré-climatéricas em tampão tris-HCl pH 8,0 (0,05M), contendo cisteína (0,02M), EDTA (0,01M), PVP (1%) e bissulfito de sódio (0,02M) na proporção de 1:4 (massa de banana/volume de solução extratora). O seu isolamento pode ser efetuado por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia por peneira molecular seguida de troca iônica ou, alternativamente, por cromatografia apenas em troca iônica. Obtém-se assim preparações com atividade específica entre 0,42 e 6,11 e grau de purificação de 5 a 18 vezes. A enzima purificada tem elevada afinidade por UDPG ($K_m = 0,67$), UDP ($K_m = 0,17$), frutose ($K_m = 0,31$) e reduzida afinidade para a sacarose ($K_m = 22,7$).
- 2- A enzima está presente durante a fase de desenvolvimento do fruto até o período pré-climatérico, quando sua atividade sintética e hidrolítica tende a desaparecer a medida que aumenta o tempo decorrido após a colheita. Contrariamente, a sacarose fosfato sintetase não é detectada nas fases iniciais de desenvolvimento do fruto, mas tem sua atividade aumentada durante o amadurecimento, concomitantemente ao desaparecimento do amido. A sacarose fosfato sintetase e não a sacarose sintetase pode estar envolvida na transformação amido-sacarose durante o amadurecimento.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMIR, J. & PREISS, J. Kinetic characterization of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. Plant. Physiol., Lancaster, 69(5): 1027 - 30, 1982.
2. AMIR, J.; WRIGH, R.D. & CHERRY, J.H. Chemical control of sucrose conversion to polysaccharides in sweet corn after harvest. Agric. Food Chem., New York, 19: 954 - 57, 1971.
3. ANDERSON, J. W. Extration of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. Phytochem., Oxford, 7 : 1973 - 88, 1968.
4. ARÊAS J.A.G. & LAJOLO, F.M. Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas. An. Farm. Quim. S. Paulo, São Paulo, 20(1/2): 307 - 18, 1980.
5. ARÊAS, J.A.G. & LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: I- The phosphorylase and phosphatase behavior in Musa acuminata. J. Food Biochem., Westport, 5: 19 - 37, 1981.
6. AVIGADH, G. Sucrose-Uridine Diphosphate Glucosyl

- transferase from Jerusalem Artichoke tubers. J. Biol. Chem., Baltimore, 239(11): 3613 - 18, 1964.
7. BAIJAL, M.; SINGH, S.; SHUKLA, R.N.; SAMWAL, G.G. Enzymes of the banana plant: optimum conditions for extraction. Phytochem., Oxford, 11: 929 - 36, 1972.
 8. BARNELL, H.R. Studies in tropical fruits. VIII. Carbohydrate metabolism of the banana fruit during development. Ann. Bot. NS, London, 4: 39 - 65, 1940.
 9. BERGMAYER, H.U. (Ed.) Methods of Enzymatic Analysis, 2nd Engl. Ed. transl. 3rd Germ. Ed. Academic, New York, 1974, volume 3, p. 1212 - 5.
 10. BIRD, I.F.; CORNELIUS, M.J.; KEYS, A.J. & WHITTENGAM, C.P. Intracellular site of sucrose synthetase in leaves. Phytochem., Oxford, 13: 59 - 64, 1974.
 11. CALDERÓN, P. & PONTIS, H.G. Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chilling shock. Plant Sci., Limerick, 42: 173 - 76, 1985.
 12. CARDINI, C.E.; LELOIR, L.F. & CHIRIBOGA, J. The biosynthesis of sucrose. J. Biol. Chem., Baltimore, 214: 149 - 55, 1955.
 13. CHEN, H.J.; SUNG, H.Y. & SU, J.C. Role of sucrose synthetase in sucrose starch conversion in rice grains. Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC, Taipei, 5(2): 165 - 70,

1981.

14. CHITARRA, A.B. & LAJOLO, F.M. Phosphorylase, phosphatase, -amylase activity and starch breakdown during ripening of 'marmelo' banana ((Musa acuminata colla) x (Musa balbisiana colla) ABB group) whole fruit and thin slices. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 106(5): 579 - 84, 1981.

15. CORDENUNSI, B.R.; DA SILVA, R.S.S.F.; SRINASTAVIA, K.C.; FABRE-SANCHES, S.; PERRE, M.A. Mathematical model for the alcoholic fermentation in batch culture: Comparison between complete and incomplete factorial 3* designs. J. Biotech., Elsevier, 2 : 1 - 12, 1985.

16. DAVIS, B.J. Disc eletrophoresis - II - Method and application to human serum proteins. Ann. of the N.Y. Acad. Sci., New York, 121: 404 - 27, 1964.

17. DE FEKETE, M.A. & CARDINI, C.E. Mechanism of glucose transfer from sucrose into the starch granule of sweet corn. Arch. Biochem. Biophys., New York, 104: 173 - 184, 1964.

18. DELMER, D.P. The purification and properties of sucrose synthetase from etiolated Phaseolus aureus seedlings. J. Biol. Chem., Baltimore, 247(12): 3822 - 28, 1972.

19. DELMER, D.P. & ALBERSHEIM, P. The biosynthesis of sucrose and nucleoside diphosphate glucoses in

- Phaseolus aureus*. Plant. Physiol., Lancaster, 45: 782 - 86, 1970.
20. DICK, P.S. & REES, T. Sucrose metabolism by roots of *Pisum sativum*. Phytochem., Oxford, 15: 255 - 59, 1976.
21. DURAM, W.R. & PONTIS, H.G. Sucrose metabolism in green algae I. The presence of sucrose synthetase and sucrose phosphate synthetase. Mol. Cell. Biochem., Boston, 16(2-3): 149 - 52, 1977.
22. FRYDMAN, R.B. & HASSID, W.Z. Biosynthesis of sucrose with sugar cane leaf preparations. Nature, London, 382 - 83, 1963.
23. GARCIA, E. & LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. J. Food Sci., Chicago, 53(4): 1181 - 1186, 1988.
24. GLASZIOU, K.T. Accumulation & transformation of sugars in stalks of sugar cane. Origin of glucose & fructose in the inner space. Plant. Physiol., Massachussets, 36: 175 - 79, 1961.
25. GRIMES, W.J.; JONES, B.L. & ALBERSHEIM, P. Sucrose synthetase from *Phaseolus aureus* seedlings. J. Biol. Chem., Baltimore, 245(1): 188 - 97, 1970.
26. GROSS, K.C. & PHARR, D.M. Cucumber fruit sucrose synthase isozymes. Phytochem., Oxford, 21(6): 1241 - 44, 1982.

27. GUSTAFSON, G.L. & GONDER, J.E. Uridine diphosphate glucose pyrophosphorilase from Sorghum vulgare. J. Biol. Chem., Baltimore, 247(5): 1387 -92, 1972.
28. HAWKER, J.S. The activity of uridine diphosphate glucose-D-fructose 6 phosphate 2-glucosyltransferase in leaves. J. Biochem., Tokyo, 105: 943 - 46, 1967.
29. HAWKER, J.S. Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries, Phytochem., Oxford, 8: 9 - 17, 1969.
30. HAYASHI, T. & KAWASHIMA, K. Activities of enzymes of sugar metabolism i gamma-irradiated potato tubers. J. Food Sci., Chicago, 48(4): 1242 - 5, 1249, 1983.
31. HENIKA, R.G. & PALMER, G.H. Response surface methodology: revited. In: Annual Meeting, A. A. C. C., New Orleans, 1976, 14p.
32. LARSEN, A.E.; SALERNO, G.L. & PONTIS, H.G. Sucrose synthetase from wheat leaves. Comparison with the wheat germ enzyme. Physiol. Plant., Lund, 67: 37 - 42, 1985.
33. LELOIR, L.F. & CARDINI, C.E. The biosynthesis of sucrose phosfate. J. Biol. Chem., Baltimore, 214 : 157 - 65, 1955.

34. LOOMIS, W.D. & BATTAILE, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochem., Oxford, 5: 423 - 38, 1966.
35. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.C. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., Baltimore, 193: 265 - 75, 1951.
36. MACLACHLAN, G.A.; DATKO, A.H. ROLLIT, J. & STOKES, E. Sugar levels in the pea epicotyl regulation by invertase and sucrose synthetase. Phytochem., Oxford, 9: 1023 - 30, 1970.
37. MARRIOTT, J.; ROBINSON, M. & KARIKARI, S.K. Starch and sugar transformation during the ripening of plantains and bananas. J. Sci. Food Agric., London, 32: 1021 - 26, 1981.
38. MENDICINO, J. Sucrose Phosphate synthesis in wheat germ and green leaves. J. Biol. Chem., Baltimore, 235(12): 3347 - 3352, 1960
39. MURATA, T. Sucrose phosphate synthetase from various plant origins. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 36(11): 1877 - 84, 1972.
40. NOMURA, T. & AKAZAWA, T. Enzyme mechanism of starch synthesis in ripening rice grains. VII Purification and enzymic properties of sucrose synthetase. Arch. Biochem. Biophys., New York, 156 : 644 - 52, 1973.

41. PALMER, J.K. The banana. In HULME, A.C. (Ed) Biochemistry of fruits and their products. Academic, London, 1971, v.2, p. 65 - 105.
42. PECH, J.C. & LATCHÉ, A. Activities of enzymes involved in sugar metabolism in Passe-Crassane pears during cold storage. J. Sci. Food Agric., London, 23: 1499 - 1502, 1972.
43. PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. Anal. Bioch., New York, 83: 346 - 56, 1977.
44. POLLOCK, C.J. & REES, T. Activities enzymes of sugar metabolism in cold-stored tubers of Solanum tuberosum. Phytochem., Oxford, 14: 613 - 17, 1975.
45. PONTIS, H.G.; NABIO, J. & SALERNO, G. Reversible unidirectional inhibition of sucrose synthase activity by disulfides. Proc. Natl. Acad. Sci., 78(11): 6667 - 69, 1981.
46. PONTIS, H.G. & SALERNO, G.L. Inhibition of sucrose synthetase cleavage activity by protein factors. FEBS Lett., Amsterdam, 141(1), 120 - 123, 1982.
47. PONTIS, H.G. & WOLOSUK, R.A. Studies on sucrose synthetase I. Effect of trypsin on the cleavage activity. FEBS. Lett., Amsterdam, 28(1): 86 - 8, 1972.

48. PRESSEY, R. Potato sucrose synthetase: Purification, properties, and changes in activity associated with maturation. Plant. Physiol., Lancaster, 44: 759 - 64, 1969.
49. ROE, J.H. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. J. Biol. Chem., Baltimore, 107: 15 - 22, 1934.
50. RUFTY, T.W.; KERR, P.S. & HURBER, S.C. Characterization of diurnal changes in activities of enzymes involved in sucrose biosynthesis.. Plant. Physiol., Lancaster, 73: 428 - 33, 1983.
51. SALERNO, G.L. Occurrence of sucrose and sucrose metabolizing enzymes in achlorophyllous algae. Plant. Sci., Limerick, 42: 5 - 8, 1985.
52. SALERNO, G.L. Relationship between sucrose and starch in developing maize endosperm: UDP-glucose phosphorylase activity. Plant Sci., Limerick, 44: 111 - 17, 1986.
53. SALERNO, G. & PONTIS, H.G. Studies on sucrose phosphate synthetase: reversal of UDP inhibition by divalent ions. FEBS Lett., Amsterdam, 64(2): 415 - 18, 1976.
54. SALERNO, G. & PONTIS, H.G. Studies on the sucrose phosphate synthetase kinetic mechanism. Arch. Biochem. Biophys., New York, 580: 298 -302, 1977.

55. SALERNO, G. & PONTIS, H.G. Sucrose phosphate synthetase. Separation from sucrose synthetase and a study of its properties. Planta, Berlin, 142: 41 - 8, 1978.
56. SLABNIK, E.; FRYDMAN, R.B. & CARDINI, C.E. Some properties of potato tuber UDPG: D-fructose-2-glucosyl transferase (E.C. 2.4.1.14) and UDPG: D-fructose-6-phosphate-2-glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.13). Plant. Physiol., Lancaster, 43: 1063 - 68, 1968.
57. SLACK, C.R. Inhibition of UDP-glucose: D-fructose 2-glucosyltransferase from sugar cane stem tissue by phenol oxidation products. Phytochem., Oxford, 5: 397 - 403, 1966.
58. SHUKLA, R.N. & SANWAL, G.G. Studies on UDP-glucose: D-fructose 2-glucosyltransferase from tapioca tuber. Arch. Biochem. Biophys., New York, 142: 304 - 309, 1971.
59. SHUKLA, R.N.; SINGH, S.; DAS, N.; BAIJAL, M. & SANWAL, G.G. Carbohydrate metabolism in Musa paradisiaca. Phytochem., Oxford, 12: 979 - 85, 1973.
60. SU, J.C. Some aspects of sucrose metabolism in plants (invited review paper). Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC, Taipei, 6(2): 172 - 180, 1982.
61. SU, J.C. & PREISS, J. Purification and properties of sucrose synthase from maize kernels. Plant. Physiol.,

Lancaster, 61: 389 - 93, 1978.

62. SU, J.C.; WU, J.L. & YANG, C.L. Purification and characterization of sucrose synthetase from the shoot of bamboo Leleba oldhami. Plant. Physiol., Lancaster, 60: 17 - 21, 1977.
63. SUM, W.F.; ROGERS, P.J.; JENKINS, I.D. & GUTHRIE, R.D. Isolation of invertase from banana fruit (Musa cavendishii). Phytochem., Oxford, 19: 399 - 401, 1980.
64. SUNG, H.Y. & SU, J.C. Sucrose synthetase isozymes of pea seedlings - purification and general properties. J. Chin. Biochem. Soc., Taipei, 6(2): 22 - 37, 1977.
65. SUNG, Y.H. & WANG, S.H. Studies on the transformation of starch to sucrose in post-ripening banana. J. Chin. Agric. Chem. Soc., Taipei, 32 - 41, 1967.
66. TSAI, C.Y.-YIN. Sucrose-UDP Glucosyltransferase of Zea mays endosperm. Phytochem., Oxford, 13 : 885 - 91, 1974.
67. TERRA, N.N. & LAJOLO, F.M. Extração e avaliação da sacarose sintetase, invertase e UDPG-pirofosforilase de bananas com prevenção de danos causados por fenóis e derivados. Ciênc. Tec. Aliment., Campinas, 1(1) : 23 - 38, 1981.

68. TERRA, N.N. & LAJOLO, F.M. Starch-sugar transformation during banana ripening: the behavior of UDP glucose pyrophosphorylase, sucrose synthetase and invertase. J. Food Sci., Chicago, 48(4): 1097 - 1100, 1983.
69. TUPY, J. & PRIMOT, L. Sucrose synthetase in the latex of Hevea brasiliensis Muell. Arg. J. Exp. Bot., Oxford, 33(136): 988 - 95, 1982.
70. WHITAKER, J.R. Enzyme purification in WHITAKER, J.R. (Ed), Principles of enzymology for the Food Sciences, New York, Marcell Dekker, 1972, pg 175 - 209.
71. WOLOSUIK, R.W. & PONTIS, H.G. Evidence of the existence of two forms of sucrose synthetase. FEBS Lett., Amsterdam, 16(4): 237 - 40, 1971.
72. WOLOSUIK, R.A. & PONTIS, H.G. The role of sucrose and sucrose synthetase in carbohydrate plant metabolism. Mol. Cell. Biochem., Boston, 4(2): 115 - 23, 1974.
73. YANG, C.L. & SU, J.C. Quaternary structure of sucrose synthetase from banana fruits. J. Chin. Biochem. Soc., Taipei, 9(2): 100 - 101, 1980.
74. YEH, D.B. & SU, J.C. Purification and characterization of sucrose synthetase from banana fruits. J. Chin. Biochem. Soc., Taipei, 1(1): 37 - 52, 1972.

RESUMO

A sacarose sintetase pode ser extraída de bananas pré-climatéricas em tampão tris-HCl pH 8,0 (0,05M), contendo cisteína (0,02M), EDTA (0,01M), PVP (1%) e bissulfito de sódio (0,02M) na proporção de 1:4 (massa de banana/volume de solução extratora). O seu isolamento pode ser efetuado por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia por peneira molecular seguida de troca iônica ou, alternativamente, por cromatografia apenas em troca iônica. Obtém-se assim preparações com atividade específica entre 0,42 e 6,11 e grau de purificação de 5 a 18 vezes. A enzima purificada tem elevada afinidade por UDPG ($K_m = 0,67$), UDP ($K_m = 0,17$), frutose ($K_m = 0,31$) e reduzida afinidade para a sacarose ($K_m = 22,7$). A enzima está presente durante a fase de desenvolvimento do fruto até o período pré-climatérico, quando sua atividade sintética e hidrolítica tende a desaparecer a medida que aumenta o tempo decorrido após a colheita. Contrariamente, a sacarose fosfato sintetase não é detectada nas fases iniciais de desenvolvimento do fruto, mas tem sua atividade aumentada durante o amadurecimento, concomitantemente ao desaparecimento do amido. A sacarose fosfato sintetase e não a sacarose sintetase pode estar envolvida na transformação amido-sacarose durante o amadurecimento.

SUMMARY

Banana sucrose synthetase can be purified almost to homogeneity by extraction with tris-HCl pH 8.0 (0.05M) buffer containing cystein (0.02M), EDTA (0.01M), PVP (1%) and NaHSO₃ (0.02M), ammonium sulfate precipitation, followed by cromatography on DEAE-cellulose (or alteratively on Sepharose-6B followed by DEAE-cellulose). The purified enzyme activities has high affinity for UDPG ($K_m = 0.67$), UDP ($K_m = 0.17$), fructose ($K_m = 0.31$) and low affinity for sucrose ($K_m = 22.7$). The sucrose synthetase is present during all stages of fruit development until the climateric when its activity tends to disappear, as the time after harvesting decurs contrarily the activity of sucrose phosphate synthetase is not detected in the initial stages of development but its activity increases during ripening following starch disappearance. Sucrose phosphate synthetase instead of sucrose synthetase may be involved in starch-sucrose conversion in post-harvest bananas.