

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

Enzima desramificadora de amido tipo-isoamilase  
durante o amadurecimento de bananas  
(*Musa acuminata* AAA, Grupo Cavendish, cv. Nanicão)

Jacqueline Dettmann Bierhals

Tese para obtenção de grau de  
DOUTOR

Orientadora  
Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

Co-orientador  
Prof. Dr. João Roberto O. do Nascimento

São Paulo  
2003

---

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005478

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bierhals, Jacqueline Dettmann  
B588e Enzima desramificadora de amido tipo-isoamilase  
durante o amadurecimento de bananas (*Musa acuminata*  
*AAA*, Grupo Cavendish, cv. Nanicao) / Jacqueline Dettmann  
Bierhals. -- São Paulo, 2003.  
93p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos  
e Nutrição Experimental.  
Orientador: Cordenunsi, Beatriz Rosana  
Co-orientador: Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Banana : Bioquímica de alimentos 2. Biologia molecular  
I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador. III. Nascimento,  
João Roberto Oliveira do, co-orientador  
641.3477 CDD

Jacqueline Dettmann Bierhals

Enzima desramificadora de amido tipo-isoamilase  
durante o amadurecimento de bananas  
(*Musa acuminata* AAA, Grupo Cavendish, cv. Nanicão)

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Beatriz Rosana Cordenunsi  
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi  
1<sup>o</sup> examinador

Prof. Dr. Ricardo Alfredo Kluge  
2<sup>o</sup> examinador

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge  
3<sup>o</sup> examinador

Prof. Dr. Franco Maria Lajolo  
4<sup>o</sup>. examinador

São Paulo: 02/07/03

## **AGRADECIMENTOS**

Foi bom perceber que a lista de agradecimentos seria longa... sinal de que pude contar com muitos amigos. A todos àqueles que, de uma forma ou outra, contribuíram na realização desse trabalho, deixo meu profundo agradecimento.

Agradeço sinceramente à Prof<sup>ª</sup> Beatriz Rosana Cordenunsi, minha orientadora. Sua motivação, incentivo e força foram determinantes na realização desse trabalho. Fica aqui registrado o meu reconhecimento e admiração por uma grande pesquisadora que tem o mais importante dos atributos de um cientista: humanidade.

Ao Prof. João Roberto, pela oportunidade de conhecer o fascinante, porém ingrato mundo da Biologia Molecular. Os conhecimentos partilhados, especialmente sobre disciplina e perseverança, serão levados como bagagem preciosa.

Ao Prof. Franco Lajolo, pela oportunidade de realizar o doutorado junto ao Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos e pela excelência de sua sabedoria, que é espelho para todos nós.

De forma muito especial, agradeço a todos meus colegas de laboratório, sejam pós-graduandos (Ana Cristina, Ana Paula, Janaína, Neuza, Ricardo, Maurício, Tânia, Eliana, Giselli, Paola, Malu, Rose, Adriana, João Paulo, Guillermo, Renata, Priscila, Anderson, Patrícia, Stella, Marisa), estagiários (Márcia, Renato), professores (Inés, Bete, Eduardo), funcionários (Márcia, Lúcia, Alberto). Vocês foram minha família enquanto estive aqui, amenizando a saudade pela distância de casa e tornando o dia-a-dia sempre uma grande festa.

Tenho que mencionar a amizade de quatro pessoas excepcionais: Malu, Lúcia, Eduardo e Adair. Se hoje esse trabalho existe, é porque vocês me ajudaram.

Agradeço também às amigas Vanessa, Cris e Rosângela, por dividirem comigo não só a casa, os armários, a geladeira, mas por partilharem das suas vidas. Estou certa de que os laços que se formaram não se desvanecerão, nem com o tempo, nem com a distância.

Obrigada a toda minha família que ficou no Rio Grande do Sul, que sempre me estimulou na continuidade dos meus estudos e me encorajou a vir pra uma cidade tão diferente da minha realidade. Da mesma forma, agradeço ao Prof. César Rombaldi, meu grande amido e maior incentivador, com quem iniciei a vida científica.

Também agradeço com carinho, aos amigos Paulo e Kátia que me deram a guarida inicial em São Paulo.

Especialmente, agradeço ao meu noivo, Adelson, pela sua presença sempre tão amorosa e compreensiva e acima de tudo por seu companheirismo. Obrigada por tudo!

Ao pessoal do Biotério, pelo suporte técnico durante a produção dos anticorpos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

E finalmente, agradeço a Deus, por ser o alicerce da minha vida, a força motriz que me deu o ânimo e a coragem de começar e concluir mais essa etapa. Sem Ele, nem a própria Ciência teria sentido pra mim.

---

**À minha mãe Elair e minha avó Frida,  
pelo maior aprendizado: amor**

---

*Você vê coisas e diz: Por que?*

*Mas eu sonho coisas que nunca existiram e digo: Por que não?*

*(George Bernard Shaw)*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>AMADURECIMENTO DE FRUTOS</i> .....	1
1.2. <i>METABOLISMO AMIDO-SACAROSE</i> .....	5
1.2.1. O grânulo de amido .....	5
1.2.2. A degradação enzimática do amido .....	12
1.3. <i>ENZIMA DESRAMIFICADORA DE AMIDO</i> .....	15
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1. <i>MATERIAL VEGETAL</i> .....	22
3.2. <i>MÉTODOS</i> .....	22
3.2.1. Medidas de CO <sub>2</sub> e etileno.....	22
3.2.2. Determinação de amido e proteína solúvel.....	23
3.2.3. Determinação de açúcares solúveis.....	24
3.2.4. Extração e atividade enzimática de isoamilase.....	24
3.2.5. Extração do RNA total.....	25
3.2.6. Obtenção de cDNA (DNA complementar).....	26
3.2.7. Planejamento dos primers.....	26
3.2.8. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	30
3.2.9. Clonagem e transformação de bactérias.....	31
3.2.10. Mini-preparação de DNA plasmidial e sequenciamento .....	32
3.2.11. Northern blot .....	33

3.2.12. Obtenção da sequência de cDNA de isoamilase .....	34
3.2.12.1. Varredura em biblioteca de cDNA ( <i>Screening</i> ).....	34
3.2.12.4. RACE (Rapid Amplification cDNA Ends).....	36
3.2.13. Expressão de isoamilase em <i>Escherichia coli</i> e purificação de proteína recombinante .....	39
3.2.14. Produção de anticorpo policlonal anti-isoamilase .....	40
3.2.15. Extração de proteína total e Western blot .....	41
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
4.1. <i>PERFIS DE RESPIRAÇÃO, ETILENO, AMIDO, AÇÚCARES         SOLÚVEIS.....</i>	42
4.2. <i>ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOAMILASE.....</i>	46
4.3. <i>AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE         ISOAMILASE .....</i>	51
4.4. <i>EXPRESSÃO DE ISOAMILASE EM E.coli E PRODUÇÃO DE         ANTICORPOS POLICLONAIS .....</i>	66
4.5. <i>EXPRESSÃO DE ISOAMILASE DURANTE O AMADURECIMENTO         DE BANANAS.....</i>	70
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>87</b>
<b>9. RESUMO.....</b>	<b>92</b>
<b>10. ABSTRACT.....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Conversão de sacarose em amido, nos órgãos de estocagem de plantas .....	7
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ e da estrutura semi-cristalina do amido .....	9
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da formação da pré-amilopectina e posterior ação da enzima desramificadora de amido (DBE) .....	17
<b>Figura 4:</b> Alinhamentos parciais de aminoácidos de pululanase e isoamilase de diferentes espécies vegetais .....	27
<b>Figura 5:</b> Formação das combinações de linhas e colunas em placa de microtitulação utilizada em varredura em biblioteca de cDNA .....	34
<b>Figura 6:</b> Fluxograma da técnica RACE .....	38
<b>Figura 7:</b> Medidas de etileno, respiração, % de amido e açúcares solúveis de bananas controle e tratadas com 10 ppm de etileno durante o amadurecimento.....	43
<b>Figura 8:</b> Atividade de isoamilase de bananas controle e tratadas com 10 ppm de etileno durante o amadurecimento, utilizando glicogênio como substrato.....	48
<b>Figura 9:</b> Atividade de isoamilase de bananas controle e tratadas com 10 ppm de etileno durante o amadurecimento, utilizando $\beta$ -dextrina limite como substrato.....	49
<b>Figura 10:</b> Comparação do perfil de atividade de isoamilase utilizando $\beta$ -dextrina limite e glicogênio como substrato em bananas controle e tratadas com 10 ppm de etileno, durante o amadurecimento.....	51
<b>Figura 11:</b> Tamanhos esperados de produtos de PCR das combinações de primers Sense e Reverso para pululanase e isoamilase .....	52
<b>Figura 12:</b> Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de reações de PCR em cDNA de bananas climatéricas .....	53
<b>Figura 13:</b> Seqüência parcial de bases do clone ISO-250 de isoamilase e aminoácidos deduzidos .....	54

---

<b>Figura 14:</b> Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de reações de PCR com primers <i>S<sub>esp1</sub></i> e <i>R<sub>esp1</sub></i> a partir da biblioteca de cDNA.....	55
<b>Figura 15:</b> Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de reações de PCR com primers Sense e Reverso Especifico 1 e digestão do clone de isoamilase contido em fagemídeo pBK-CMV, com enzimas de restrição <i>Sac</i> e <i>Kpn</i> I.....	56
<b>Figura 16:</b> Representação esquemática da produção do cDNA de bananas para a técnica de RACE.....	57
<b>Figura 17:</b> A) Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR (1400 pb) da RACE realizada com cDNA de bananas. B) Eletroforese em gel de agarose (1,5%) da digestão do clone ISO-1400 com <i>Eco</i> <i>RI</i> .....	59
<b>Figura 18:</b> A) Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR (900 pb) da RACE realizada com cDNA de bananas. B) Eletroforese em gel de agarose (1,5%) da digestão do clone ISO-900 com <i>Eco</i> <i>RI</i> .....	59
<b>Figura 19:</b> Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto da 2 <sup>a</sup> rodada de PCR da RACE realizada com cDNA de bananas, utilizando DNA molde da 1 <sup>a</sup> rodada em diferentes diluições.....	60
<b>Figura 20:</b> Sequência parcial de bases do cDNA de isoamilase de banana e seus respectivos aminoácidos deduzidos .....	62
<b>Figura 21:</b> Alinhamento de aminoácidos da sequência deduzida da isoamilase de banana com outras espécies vegetais .....	64
<b>Figura 22:</b> Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos de PCR, com cDNA de bananas climatéricas .....	67
<b>Figura 23:</b> Eletroforese de proteínas das expressões piloto de isoamilase em <i>E.coli</i> , em géis de poliacrilamida.....	68
<b>Figura 24:</b> Eletroforese da proteína recombinante em gel de poliacrilamida 12%, após purificação .....	69
<b>Figura 25:</b> Western blot de proteínas totais de bananas tratadas com 10 ppm de etileno aos 5 DPC.....	70
<b>Figura 26:</b> Perfil de expressão de isoamilase de bananas controle durante o amadurecimento.....	72

<b>Figura 27:</b> Perfil de expressão de isoamilase de bananas tratadas com 10 ppm de etileno durante o amadurecimento.....	73
---	----

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Relação de primers utilizados em PCR para amplificação de insertos de DBE .....	28
<b>Tabela 2:</b> Relação de primers utilizados em PCR para amplificação de insertos de isoamilase, com base no sequenciamento de bases .....	29
<b>Tabela 3:</b> Sequência de bases de primers flanqueadores utilizados em sequenciamento .....	30
<b>Tabela 4:</b> Sequência de bases dos primers utilizados na técnica RACE .....	37

---

## Abreviaturas

ABTS	2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AIA	ácido indol acético
AMV-RT	transcriptase reversa do vírus da mieloblastose avícola
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BE	enzima ramificadora
B.O.D.	demanda bioquímica de oxigênio
cDNA	DNA complementar
DBE	enzima desramificadora
DNA	ácido desoxiribonucléico
DNS	ácido dinitrosalicílico
dNTP	2'-desoxinucleotídeo 5'-fosfato
DPC	dias pós colheita
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
F-6-P	frutose-6-fosfato
G-1-P	glicose-1-fosfato
IPTG	isopropil tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobases
LB	Lúria-Bertani
O.D.	densidade ótica
pb	pares de bases
p.f.u.	unidades formadoras de colônia
PPi	pirofosfato
ppm	partes por milhão
PVP	polivinilpirrolidona
RNA	ácido ribonucléico
SDS	lauril sulfato de sódio
SPS	sacarose-fosfato sintase

---

SuSy	sacarose sintase
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TPE	Tris-fosfato-EDTA
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
UDP	uridina 5'-difosfato
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil galactopiranosídeo
2-ME	2-mercaptoetanol
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	citidina 5'-trifosfato

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. AMADURECIMENTO DE FRUTOS**

As mudanças ocorridas no amadurecimento das frutas envolvem uma multiplicidade de vias bioquímicas que afetam todos os compartimentos celulares. Tanto reações de degradação, quanto de síntese acontecem nesse período, evidenciando que se trata de um processo dinâmico e altamente coordenado. As alterações mais perceptíveis são referentes à textura, cor, sabor e aroma dos frutos. Vários hormônios estão envolvidos na iniciação e regulação do amadurecimento, ocasionando um aumento no nível de mRNAs específicos e síntese *de novo* de proteínas que caracterizam as transformações nesse estágio (Seymor, 1993).

O amadurecimento, como qualquer outra etapa do desenvolvimento das plantas, está sob o controle hormonal. As auxinas, giberelinas e citocininas geralmente atuam retardando o amadurecimento, enquanto o etileno e o ácido abscísico aceleram o processo. A evidência da ação hormonal no controle do amadurecimento é percebida pelo fato de que frutos ligados à planta-mãe amadurecem de forma mais lenta que aqueles amadurecidos fora da planta (Abeles e col., 1992, Seymor, 1993, Cordenunsi e Lajolo, 1995).

Apesar dos frutos serem classificados em climatéricos e não climatéricos, em função do seu padrão respiratório, é a presença de etileno que parece determinar as alterações fisiológicas mais importantes no amadurecimento, tanto que esse fitorregulador endógeno é considerado o

“hormônio do amadurecimento”. Frutos climatéricos que apresentam um pico de respiração após atingirem a maturidade fisiológica, também possuem uma elevação na produção de etileno, que precede o incremento respiratório. Os frutos não climatéricos, por sua vez, não apresentam um aumento brusco nos níveis de CO<sub>2</sub> provenientes da respiração, e também não produzem uma quantidade elevada de etileno. Contudo, o hormônio, mesmo em um nível basal, atua na regulação do metabolismo desses frutos (Abeles e col., 1992).

Além do etileno, outros hormônios também parecem estar envolvidos nas transformações decorrentes do amadurecimento dos frutos, como as auxinas e giberelinas. O ácido indol-3-acético (AIA) tem sido reconhecido como a principal auxina encontrada nas plantas. Davies (1995) relatou que, dentre outros efeitos, o ácido indol acético (AIA) pode influenciar no amadurecimento de frutos. Ele é capaz de retardar algumas transformações como amolecimento, climatério respiratório, degradação de clorofila da casca, formação de antocianinas, degradação do amido, síntese de sacarose em frutos de abacate, banana, pêra e uva (Tingwa e Young, 1975; Vendrell, 1969; Frenkel e Dyck, 1973; Davies e col., 1997. Apud: Purgatto, 2001). As giberelinas também atuam como reguladores hormonais do amadurecimento. Elas preponderantemente são encontradas em sementes, porém Gillaspay e col. (1993. Apud: Rossetto, 2001) verificaram que frutos partenocárpicos (sem sementes) continham uma quantidade maior de giberelinas, apresentando textura mais firme e maior teor de sólidos solúveis, quando comparados a frutos com semente.

---

Sendo uma fruta climatérica, a banana tem seu metabolismo influenciado pela presença de etileno (Abeles e col., 1992). Dentre as alterações que este hormônio influencia durante o amadurecimento, o metabolismo de carboidratos tem especial destaque, por ser um importante atributo de qualidade pós-colheita.

Os carboidratos presentes nos frutos provêm da translocação de sacarose produzida nas folhas pela fotossíntese, e são armazenados na forma de amido ou açúcares solúveis, os quais podem ser rapidamente metabolizados conforme a demanda energética da planta. Esse processo é mediado pela ação sincronizada de várias enzimas, que são transcritas e/ou ativadas em momentos específicos do ciclo de vida da planta. A glicose e frutose provenientes da hidrólise da sacarose, via sacarose sintase e invertases, são transportadas do citosol ao interior dos amiloplastos, para servirem de substrato às enzimas de síntese de amido (amido-sintases e enzimas ramificadoras) num processo dependente de ATP. Durante o amadurecimento, o amido acumulado é mobilizado através de enzimas fosforolíticas e hidrolíticas (fosforilases, amilases, glicosidases e enzimas desramificadoras) liberando resíduos de glicose que podem ser interconvertidos em frutose, e utilizados na síntese de sacarose, pela ação da sacarose fosfato sintase, ou poderão ser distribuídos entre as diferentes vias catabólicas presentes no amadurecimento como a respiração, via glicolítica e via das pentoses-fosfato.

A banana é um bom modelo de estudo da transformação amido-sacarose, já que acumula grandes quantidades de amido (de 16 a 33%), durante o desenvolvimento do fruto, o qual é rapidamente convertido,

durante a fase de amadurecimento pós-colheita, a cerca de 18% de açúcares no fruto maduro. A degradação do amido é iniciada logo após o climatério respiratório, que pode ser acelerada pela aplicação exógena de etileno (Cordenunsi e Lajolo, 1995; Sivak e Preiss, 1998). As enzimas  $\alpha$ -amilase (Garcia e Lajolo, 1988; Bassinello, 2000),  $\beta$ -amilase (Garcia e Lajolo, 1988; Medina-Suárez e col., 1997),  $\alpha(1-4)$  e  $\alpha(1-6)$  glicosidades (Garcia e Lajolo, 1988; Konish e col., 1991), amido-fosforilases (Mota, 2001), sacarose sintase e sacarose fosfato sintase (Cordenunsi e Lajolo, 1995; Nascimento e col., 1997; Nascimento e col., 2000) já foram identificadas em banana. Conjuntamente, Purgatto e col. (2001) e Rossetto (2001) verificaram a influência das auxinas e giberelinas na expressão e atividade de algumas dessas enzimas no metabolismo amido-sacarose de bananas.

Nesta vasta gama de processos decorrentes do amadurecimento, muitos genes passam a ser expressos e outros suprimidos, de acordo com uma regulação gênica ainda não bem compreendida. O acompanhamento da transcrição e síntese de novas proteínas, bem como a caracterização dos genes envolvidos (promotores, reguladores, estrutura) constituem ferramentas importantes no estudo das bases moleculares do amadurecimento, visando o desenvolvimento de estratégias para manter a qualidade pós-colheita dos frutos.

## **1.2. METABOLISMO AMIDO-SACAROSE**

### **1.2.1. O grânulo de amido**

Praticamente, todas as frutas contém amido, mas na maioria delas somente traços são detectados e em muitas o amido está restrito à camadas ricas em cloroplastos. Algumas frutas, como a banana e a maçã, acumulam grandes quantidades de amido durante o desenvolvimento, o qual é degradado a açúcares simples durante o amadurecimento. O tomate, quando verde, armazena um teor relativamente baixo de amido, enquanto abacaxi, melão e uvas apresentam uma quantidade ínfima ou nenhum traço desse polissacarídeo (Tucker e Grierson, 1987). O amido apresenta uma importante função fisiológica para vários órgãos vegetais. Seu acúmulo em tecidos fotossintéticos previne períodos de limitação no fornecimento de carbono pela fotossíntese, além de servir como fonte de energia e reserva de carbono em órgãos de armazenamento, atuando em momentos com condições de desenvolvimento desfavoráveis (Kossmann e Lloyd, 2000).

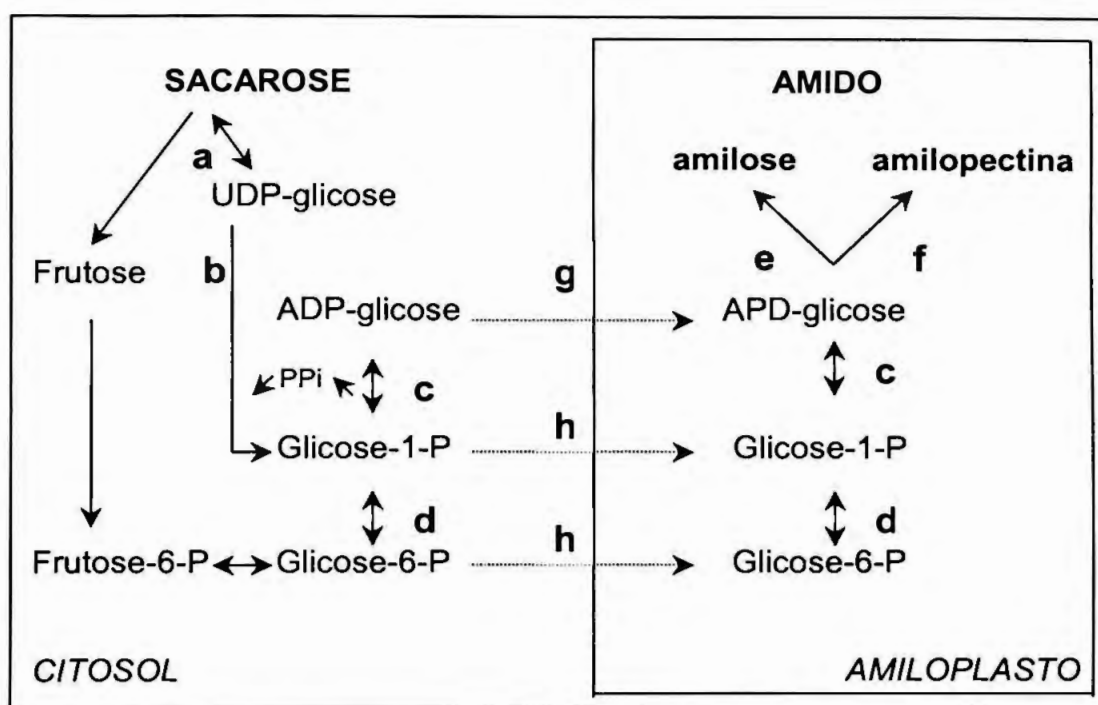
O amido é um homopolissacarídeo formado por resíduos de  $\alpha$ -D-glicopiranosil que estão unidos por ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$  e  $\alpha(1-6)$  e está presente em vários tipos de tecidos como folhas, frutos, pólen, raízes, tubérculos e grãos. Ele é composto por duas macromoléculas: amilose e amilopectina. A amilose é uma molécula linear, formada por resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$ , podendo apresentar na sua estrutura cerca de 0,1% de ligações  $\alpha(1-6)$ . A amilopectina, por sua vez, é um polímero altamente ramificado, composto por centenas de cadeias de

$\alpha(1-4)$  glicanos, que são interligadas por ligações glicosídicas  $\alpha(1-6)$ , ramificando a molécula em vários pontos de sua estrutura. A amilopectina representa cerca de 72 a 82% do grânulo de amido, enquanto a amilose 18 a 38%. Alguns mutantes de cereais podem apresentar até 70% de amilose na sua composição, entretanto outros genótipos contêm menos de 1% desse mesmo polímero (Buléon e col. 1998, Kossmann e Lloyd, 2000).

O modelo atualmente aceito da síntese de amido envolve uma série de enzimas e está representado na Figura 1. A sacarose, produzida nas folhas pela fotossíntese é translocada através do floema, sendo hidrolisada em glicose e frutose pela ação da sacarose sintase. Acredita-se que esses 2 monossacarídeos, através das enzimas UDG-glicose pirofosforilase, fosfoglicomutase, fosfoglicose isomerase e ADP-glicose pirofosforilase, são convertidos a hexoses-fosfato e assim atravessam a membrana do plastídeo. Estudos recentes evidenciaram que a sacarose e outros carboidratos não fosforilados também podem ser importados para o interior dos plastídeos, onde posteriormente são fosforilados (Gerrits e col., 2001). Dentro do plastídeo, as hexoses-fosfato são convertidas em ADP-glicose, que é o substrato específico para as amido-sintases. Essas enzimas são capazes de adicionar resíduos de glicose a pequenos glicanos pré-existentes no plastídeo, através de ligações  $\alpha(1-4)$ , formando a amilose.

As amido-sintases vêm dando suporte para o estudo de enzimas ligadas ao grânulo de amido. Foi percebido em espécies vegetais que acumulam muito pouca ou nenhuma amilose (espécies *waxy* ou *cerosas*), que a amido-sintase ligada ao grânulo (Granule-bound starch synthase I – GGBSI) perdia sua atividade, levantando a hipótese de que ela

é responsável pela formação da amilose, enquanto outras isoformas da amido-sintase se encarregariam de produzir a porção linear da amilopectina. Juntamente com as amido-sintases, as enzimas ramificadoras (Branching Enzyme – BE) também são necessárias à síntese do amido, pois elas são responsáveis pela adição das ligações  $\alpha(1-6)$  na molécula de amilopectina (Kossmann e Lloyd, 2000).



**Figura 1:** Conversão de sacarose em amido, nos orgãos de estocagem de plantas. Enzimas: (a) sacarose sintase, (b) UDP glicose pirofosforilase, (c) ADP glicose pirofosforilase, (d) fosfoglicomutase, (e) amido sintase (GBSSI), (f) amido sintase e enzima ramificadora de amido, (g) ADP glicose transportadora, (h) hexose fosfato transportadora, (P<sub>i</sub>) fósforo inorgânico (Smith *et al.*, 1999).

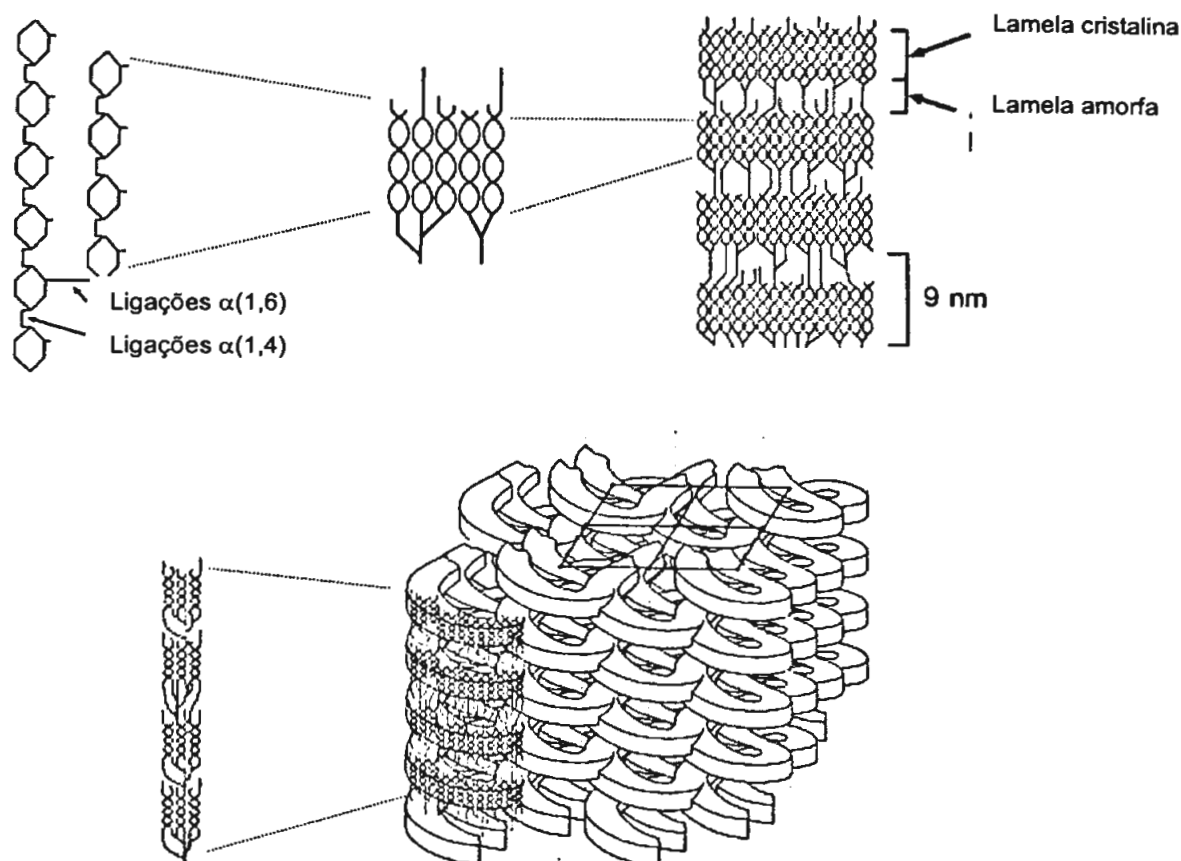
O amido é biossintetizado na forma de um grânulo semi-cristalino, com uma organização muito complexa que está intimamente ligada à espécie botânica. No decorrer de muitas décadas de pesquisa sobre a ultraestrutura do amido, muitas questões permanecem em aberto, como a

respectiva contribuição da amilose e amilopectina na sua cristalinidade, a distribuição de áreas ordenadas e desordenadas no grânulo, o tamanho dessas áreas ou a organização do conjunto de cadeias (Buléon e col., 1998). Os grânulos de amido são formados e armazenados nos amiloplastos, quando trata-se de uma estocagem por maiores períodos, ou nos cloroplastos, quando o amido servirá como reserva temporária de energia e carbono (Sivak e Preiss, 1998).

Foi observado através de microscopia eletrônica, que após hidrólise ácida, o grão de amido apresenta uma estrutura em camadas concêntricas. Acredita-se que as lamelas mais resistentes sejam a parte cristalina do grânulo, visto que a área menos organizada, comumente chamada de 'amorfa', é mais suscetível ao ataque ácido, sendo hidrolisada primeiro (Buléon e col., 1998). Outra observação que corrobora com essa afirmação, é o fato que grãos de amido de espécies mutantes, que sintetizam pouca ou nenhuma amilose, não apresentam diferenças na sua cristalinidade (Kossmann e Lloyd, 2000).

Aparentemente, dentro do grânulo de amido, as moléculas de amilopectina são radialmente arranjadas, com seus terminais não redutores apontando para fora, em direção a superfície do grânulo. As ramificações da amilopectina formam aglomerados (*clusters*) com intervalos de 9-10 nm ao longo do eixo mais longo das moléculas, formando assim lamelas cristalinas e amorfas alternadamente. Ramificações adjacentes dentro dos cachos formam duplas hélices, que são empacotadas conjuntamente, resultando numa estrutura cristalina, representada na Figura 2. É provável que a amilose exista numa forma menos organizada e sua localização em relação

a amilopectina, dentro do grânulo, não é totalmente compreendida (Smith e col., 1995).



**Figura 2:** Representação esquemática das ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$  e  $\alpha(1-6)$  e da estrutura semi-cristalina do amido (Buléon *et al*, 1998).

O material cristalino, definido pelo seu volume, morfologia, distribuição e tipo define a taxa e a extensão da hidrólise enzimática. O tamanho do grânulo pode variar de 1  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ . No entanto, a característica mais interessante está na forma. A biossíntese do amido irá ocorrer de acordo com as características físicas encontradas durante a deposição celular, sofrendo influência da presença de outros componentes

subcelulares, bem como da forma assumida pela membrana do amiloplasto (Buléon e col., 1998).

Grânulos de amido de milho, de milho, de sorgo, de trigo e de cevada foram observados por microscopia eletrônica e apresentaram poros na sua superfície. Esses poros nem sempre estão uniformemente distribuídos, ou seja, enquanto alguns grânulos apresentam muitos poros, outros possuem muito poucos ou nenhum. De qualquer forma, o grânulo de amido é considerado um material poroso com área superficial externa e interna (Buléon e col., 1998).

Em alguns casos, a degradação do amido ocorre a partir do interior do grão, em poucos sítios distintos, formando pequenas cavidades na parte central da sua estrutura. Esse comportamento foi observado na degradação *in vivo* durante a germinação de sementes de cevada. Porém na degradação *in vitro*, especialmente em grânulos pequenos, observou-se uma erosão superficial, o que sugere que existem diferenças estruturais entre os grânulos de amido na mesma espécie (Sivak e Preiss, 1998).

Em tubérculos de batata, o início da degradação do amido é caracterizado por poucos poros e depressões na superfície do grânulo, que tem forma oval e diâmetro médio de 40  $\mu\text{m}$  (Buléon e col., 1998). A degradação do amido da batata ocorre de forma lenta, porém gradual, através de uma exo-corrosão, por isso ele é considerado resistente ao ataque enzimático (Gallant e col., 1997). Essa exo-corrosão foi verificada por Smith, 1999 em grânulos de batata incubados *in vitro* com  $\alpha$ -amilase, os quais apresentaram estriações paralelas. Já grânulos de amido do fruto de kiwi, apresentam uma forma elíptica esferoidal no centro do pericarpo e

elíptica na região mais extrema do pericarpo. Durante o desenvolvimento, os grânulos aumentam de 3 a 4  $\mu\text{m}$  para 10 a 12  $\mu\text{m}$  e no amadurecimento eles passam a ter entre 6 e 8  $\mu\text{m}$ . Em frutos imaturos, os grânulos de amido foram descritos como grandes e com bordas pontiagudas. Durante a degradação *in vivo*, os grânulos tanto do centro do fruto, como da camada externa ao pericarpo, apresentaram tamanhos menores e margens difusas, sem evidências de poros, camadas ou perfurações. A degradação *in vitro*, feita através da incubação dos grânulos com um coquetel de enzimas amilolíticas não apresentou resultados diferentes da degradação *in vivo* (Hallett e col., 1995).

No caso de bananas, Garcia e Lajolo (1988) verificaram que o grão de amido da polpa do fruto possuía superfície lisa e formato variável, com grânulos esféricos, ovais ou alongados e dimensões variando entre 10 e 60  $\mu\text{m}$  (predominando grânulos entre 10 e 20  $\mu\text{m}$ ), em frutas imaturas. Em frutas maduras, houve a predominância de grânulos com menos de 10  $\mu\text{m}$  e a superfície com estriações paralelas, indicando uma exo-corrosão.

Essas diferenças estruturais e a possível ligação de algumas enzimas ao grânulo irão favorecer mais ou menos a degradação enzimática do amido.

### 1.2.2. A degradação enzimática do amido

Várias enzimas fosforolíticas e hidrolíticas atuam sincronizadamente na degradação total do amido, dentre as quais destacam-se as amido-fosforilases, as amilases, as  $\alpha(1-4)$  glicosidases e as  $\alpha(1-6)$  glicosidases, atualmente denominadas enzimas desramificadoras (Garcia e Lajolo, 1988).

As amido-fosforilases (E.C. 2.4.1.1) atuam tanto no sentido de síntese quanto na degradação do amido. Elas são responsáveis pela clivagem fosforolítica do polímero, atuando nas ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$  das suas extremidades não redutoras, liberando glicose-1-fosfato. Essa enzima já foi detectada em bananas durante o amadurecimento em duas isoformas (Mota, 2001).

A  $\alpha$ -amilase (E.C. 3.2.1.1) hidrolisa aleatoriamente as ligações  $\alpha(1-4)$  tanto da amilose quanto da amilopectina, gerando uma mistura de oligossacarídeos, dextrinas e glicose. Em bananas, Garcia e Lajolo (1988) detectaram atividade de 3  $\alpha$ -amilases durante o amadurecimento, que apresentaram, um sensível aumento de atividade no climatério. Existe um consenso na literatura de que a degradação do amido é iniciada pelas endoamilases (Sivak e Preiss, 1998). Beck e Ziegler (1989) afirmaram que a  $\alpha$ -amilase é responsável pelo início da degradação, cuja velocidade é extremamente dependente, das propriedades das  $\alpha$ -amilases e demais enzimas degradativas, da fonte e tamanho do grânulo. Estudos

recentes (Witt e col., 1995) sobre degradação de amido de '*Poplar wood*', mostraram que parece haver a necessidade de uma ligação prévia da amilase ao grânulo de amido, para que seja iniciada sua degradação. Foi mostrado também que essa ligação é dependente de dois fatores principais: a) dos produtos de degradação do amido, especialmente, maltose, que inibe o sítio de ligação da enzima ao grânulo, e b) da temperatura do complexo enzima-amido, que quanto mais alta, menor a quantidade de enzima ligada. Os autores concluíram que deve haver um sítio específico de ligação no grânulo de amido nativo, responsável pela interação dessas enzimas ao amido granular, diferente do sítio ativo enzimático. Jespersen e col. (1991) verificaram esse sítio de ligação em bactérias e fungos, e em cevada, para uma isoforma de  $\alpha$ -amilase.

A  $\beta$ -amilase (E.C. 3.2.1.2), por sua vez, cliva somente a penúltima ligação glicosídica  $\alpha(1-4)$  da extremidade não redutora de glicanos lineares liberando apenas moléculas de maltose. Purgatto e col. (2001) infiltraram ácido indol acético em fatias de bananas e verificaram que a expressão de  $\beta$ -amilase foi atrasada em 4 dias, assim como o pico de atividade, em relação às bananas controle. A  $\alpha(1-4)$  glicosidase (E.C. 3.2.1.10) atua sobre a maltose, produzindo 2 moléculas de glicose, provavelmente, de forma sincronizada com a  $\beta$ -amilase, já que não se detectou maltose durante a fase de amadurecimento da banana (Garcia e Lajolo, 1988). Tanto a  $\beta$ -amilase quanto a  $\alpha(1-4)$  glicosidase também foram detectadas em polpa de frutas de banana (Garcia e Lajolo, 1988, Konish e col., 1991) e a primeira vem sendo considerada como uma das mais

---

importantes enzimas degradativas do amido em bananas. Estudos desenvolvidos por Garcia e Lajolo (1988), Medina-Suárez e col. (1997) e Purgatto e col, (2001) demonstraram que a atividade enzimática e o nível de transcrito de  $\beta$ -amilase aumentaram no início do amadurecimento de forma mais pronunciada que a  $\alpha$ -amilase, indicando a necessidade dessa enzima no processo de degradação do amido da banana.

À medida que a degradação do amido avança, os monômeros de glicose podem ser convertidos em glicose-6P pela ação da hexoquinase (E.C.2.7.1.1) ou frutose 6-P, pela fosfoglicomutase (E.C.5.4.2.5). A glicose-6P pode ainda ser interconvertida em frutose-6P, pela fosfoglicose isomerase (E.C.5.3.1.9), fornecendo substrato para que a enzima sacarose fosfato sintase (SPS - E.C. 2.4.1.14) produza sacarose, a partir de UDP-glicose e frutose-6P. As enzimas fosfoglicose isomerase e SPS já foram identificadas e caracterizadas em frutos de banana ao longo do amadurecimento (Hubbard e col., 1990; Cordenunsi e Lajolo, 1995; Cordenunsi e col, 2001).

Nenhuma dessas enzimas, no entanto, é capaz de degradar as ligações glicosídicas do tipo  $\alpha(1-6)$ , sendo necessária a presença de uma enzima desramificadora de amido (E.C.3.2.1.41 e E.C.3.2.1.68), que atue sobre as dextrinas limite e oligossacarídeos ramificados produzidos pela ação das demais enzimas de metabolização do amido.

---

### 1.3. ENZIMAS DESRAMIFICADORAS DE AMIDO

As enzimas desramificadoras (DBE – *Debranching enzymes*), atuam na desramificação de polímeros que apresentem ligações glicosídicas tipo  $\alpha(1-6)$ . Elas foram divididas em duas classes, segundo Manners (1989), de acordo com a sua especificidade por substrato em: **pululanases** (microrganismos) ou também chamadas de **dextrinases limite** (vegetais) (E.C. 3.1.2.41), que atuam sobre ligações  $\alpha(1-6)$  de pululano, amilopectina, e suas dextrinas, mas não sobre o glicogênio; e as **isoamilases** (E.C. 3.1.2.68), que clivam ligações  $\alpha(1-6)$  de amilopectina e glicogênio, porém não atuam sobre pululano. O pululano é um polímero formado por resíduos de maltotrioses unidos por ligações  $\alpha(1-6)$ , existente somente em microrganismos.

O primeiro trabalho relatado sobre DBE foi feito com tubérculos de batata (Ishizaki e col., 1983). Os autores constataram no extrato protéico bruto, a presença de 3 tipos de DBEs, das quais uma foi identificada como isoamilase e as outras duas como pululanases ou dextrinases limite. A isoamilase foi separada das demais proteínas através de precipitação isoelétrica em pH 5,0, fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de filtração em gel em Sepharose 6B e cromatografia de afinidade em Sepharose 4B-amido solúvel e apresentou duas isoformas, com peso molecular de 95 e 83 KDa.

Alguns autores, em trabalhos realizados com cereais, como arroz (Fujita e col., 1999), milho (Rhaman e col., 1999, Pan e Nelson, 1984)

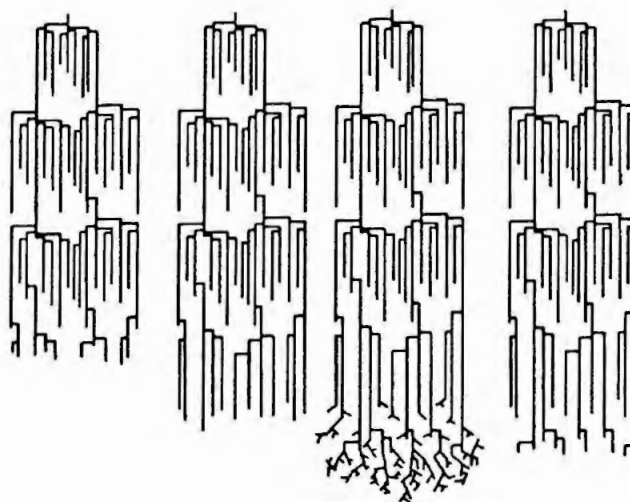
e cevada (Sun e col., 1999) purificaram e caracterizaram a DBE tanto do tipo-isoamilase quanto tipo-pululanase, especialmente durante o período de síntese do amido. Paralelamente, essas enzimas foram clonadas e sequenciadas e apresentaram 60-70% de homologia entre seus aminoácidos. Entretanto, em frutas, elas ainda não foram pesquisadas.

A hipótese de que a DBE atue também durante a síntese de amido provém do estudo de mutantes *sugary (su1)* de milho. Esses mutantes não são capazes de produzir amilopectina, mas acumulam cerca de 35% do seu peso seco em fitoglicogênio, um polissacarídeo altamente ramificado, solúvel em água. O fitoglicogênio tem de 7 a 10% do total de suas ligações glicosídicas na forma  $\alpha(1-6)$  e portanto, possui uma estrutura mais ramificada que a amilopectina, que apresenta entre 4 e 5% de ramificações (Manners, 1985). Pan e Nelson (1984) verificaram que todos os mutantes *su1* não apresentaram atividade enzimática para DBE tipo-pululanase, sugerindo que a deficiência bioquímica na atividade desramificadora é que leva a formação de fitoglicogênio. As DBEs de endospermas normais de milho foram separadas em 3 picos de atividade numa coluna de hidroxapatita e foi visto que os mutantes *su1* perdem um desses picos de atividade com pululano, embora os outros 2 picos também tenham tido sua atividade muito reduzida. A observação que a deficiência de DBE estava associada com a presença de fitoglicogênio em mutantes *su1* (Pan e Nelson, 1984), reviveu a hipótese de Erlander (1958. Apud: Smith, 1999), que propôs que primeiramente o fitoglicogênio (funcionando como uma pré-amilopectina) era formado via amido-sintase e enzima ramificadora

(BE) e em seguida era desramificado pela DBE até formar a amilopectina (Figura 3).

Outra teoria afirma que o fitoglicogênio pode não ser o intermediário normal na síntese de amilopectina, ou seja, ela pode ser formada a partir de um glicano  $\alpha(1-4)$  altamente ramificado que é sintetizado via ação da amido sintase e isoformas de BE. Se a atividade da DBE fosse insuficiente, então esse glicano altamente ramificado, solúvel em água, poderia ser acumulado com um concomitante decréscimo no conteúdo de amilopectina do grânulo e possivelmente, com um aumento no conteúdo de amilose (Sivak e Preiss, 1998).

A hipótese de que a mutação *sugary 1* afeta o gene estrutural da DBE foi comprovada pelo isolamento do cDNA do gene *su1*. Entretanto, foi verificado que sua sequência deduzida de amino-ácidos apresenta maior similaridade com isoamilase e não com pululanase, conforme pensava-se anteriormente (James e col., 1995; Sivak e Preiss, 1998).



**Figura 3:** Representação esquemática da formação da pré-amilopectina e posterior ação da enzima desramificadora de amido (DBE), Smith (1999).

Zeeman e col. (1998) verificaram que em plantas mutantes *dbe 1* de *Arabidopsis thaliana*, os cloroplastos eram capazes de armazenar tanto fitoglicogênio, quanto uma amilopectina aparentemente normal ao mesmo tempo, o que levantou a questão da DBE não estar envolvida na síntese de amido. Eles sugeriram que a DBE, juntamente com outras enzimas amilolíticas, apresentam uma função "*scavenging*" no estroma, degradando qualquer glicano solúvel produzido para a ação posterior da amido-sintase e BE. Na ausência da DBE, a amido-sintase e a BE seriam capazes de elaborar glicanos solúveis e ramificados, resultando no acúmulo do fitoglicogênio e reduzindo a quantidade dessas duas enzimas, necessárias para a síntese de amilopectina.

Ambos modelos descritos para o envolvimento da DBE na síntese de amido são extremamente difíceis de serem testados de forma rigorosa, direta e indubitável, permanecendo ainda aberta a real função dessa enzima na etapa de síntese do amilopectina.

Fujita e col. (1999) verificaram a presença de uma isoamilase em endospermas de arroz em desenvolvimento, que apresentava peso molecular de 83 KDa em SDS-PAGE e peso de enzima nativa de 340 e 490 KDa, quando submetidas a cromatografia de filtração em gel, sugerindo que ela exista como homotetrâmero ou homohexâmero. O pH ótimo para sua atividade enzimática foi entre 6,5 a 7,0 a 30°C. A sequência de aminoácidos da isoamilase foi deduzida a partir da leitura de bases obtida de uma biblioteca de cDNA de arroz, que foi submetida a *screening* com uma sonda de 1,2 Kb, gerada por PCR. O cDNA completo apresentou 2288 pb, presente

---

em uma única cópia. A sequência deduzida de aminoácidos apresentou 4 regiões de consenso (I, II, III e IV) com outras enzimas da super família das amido-hidrolases, as quais apresentam uma estrutura típica, denominada  $(\alpha/\beta)_8$ -barril (Jespersen e col., 1991).

Sun e col. (1999) em estudos com cevada, indicaram que o gene codificador para isoamilase possa ser modulado por sacarose. Ishiguro e Nakamura (1994. Apud: Sun e col., 1999) mapearam 2 regiões no genoma de tubérculos de batata, denominadas de *SP8a* (ACTGTGTA) e *SP8b* (TACTATT), que induzem a expressão de  $\beta$ -amilase, na presença de sacarose. Além do fato da região promotora de gene de isoamilase de cevada ter apresentado a sequência *SP8a*, homóloga à batata, as folhas das plantas de cevada foram tratadas com quantidades crescentes de sacarose endógena (0-200 mM) e apresentaram nível de transcrito de isoamilase proporcional à quantidade de sacarose adicionada. Em contraste, a expressão de amilase, foi suprimida na presença de sacarose em cevada e arroz (Perata e col., 1997; Sheu e col., 1994. Apud: Sun e col., 1999).

Trabalhos feitos em trigo (Genschel e col., 2002) e batata (Hussain e col., 2003) permitiram a expressão de clones de isoamilase, obtidos em bibliotecas de cDNA, em *Escherichia coli*. O anticorpo produzido a partir da proteína recombinante de trigo reconheceu uma proteína de 80 kDa, a qual estava quase que exclusivamente na fração solúvel da célula, indicando uma fraca associação da enzima ao grânulo de amido. Já no estudo feito em batata, três isoformas da isoamilase foram identificadas, com tamanhos aproximados de 84 (forma 1), 94 (forma 2) e 79 kDa (forma 3). Foram testados diversos substratos com cada uma das formas -

amilopectina,  $\beta$ -dextrina limite, fitoglicogênio, pululano e amido de batata. A forma 1 apresentou maior atividade com fitoglicogênio, seguida por amilopectina, enquanto a forma 3 teve preferência pela  $\beta$ -dextrina. Já a isoforma 2 não apresentou atividade com nenhum dos glicanos testados. Os autores acreditam que as formas 1 e 2 possam estar envolvidas na síntese de amido, enquanto a forma 3 atuaria na fase de degradação.

Garcia e Lajolo (1988) foram os únicos autores que detectaram a presença de uma enzima capaz de degradar ligações  $\alpha(1-6)$  em frutos. Eles verificaram a atividade de uma  $\alpha(1-6)$  glicosidase em polpa de bananas, utilizando isomaltose como substrato, a qual tem sua atividade aumentada em estágios mais avançados do amadurecimento.

Apesar da bibliografia pouco consistente a respeito da função da DBE durante o amadurecimento de frutos, acredita-se que ela seja muito importante nesse período, visto que na molécula de amido, a quantidade de amilopectina é cerca de 4 vezes maior que a de amilose e que um grande número de ligações  $\alpha(1-6)$  precisam ser hidrolisadas. Uma vez que todo amido presente nas frutas desaparece, concomitante ao aumento de hexoses, e não restando dextrinas remanescentes, acredita-se que pelo menos uma DBE esteja presente no processo de transformação amido-sacarose da banana.

Dentro desse contexto, este trabalho tem como objetivo, obter maiores conhecimentos sobre a enzima desramificadora de amido, tais como: tipo de enzima presente na banana, especificidade por substrato, regulação, cinética, síntese e expressão, visando uma melhor compreensão

da conversão do amido em sacarose durante o amadurecimento de bananas e o papel desempenhado por essa enzima no processo.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi identificar, caracterizar e purificar a enzima desramificadora de amido de bananas, visando desenvolver estudos de expressão durante o amadurecimento e investigar a sua participação no metabolismo amido-sacarose.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAL VEGETAL**

Bananas do cv. Nanicão com 1 dia pós colheita (DPC), provenientes do CEASA-SP, foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 0,1%, para uma desinfestação superficial. Metade do cacho foi tratado com 10 ppm de etileno, por 12 horas, constituindo os frutos tratados e a outra metade não recebeu tratamento, constituindo os frutos controle. Os frutos foram mantidos em câmaras de B.O.D. com temperatura ( $18^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa controladas ( $75\%\pm 5\%$ ) durante o amadurecimento. Nesse período, amostras foram coletadas periodicamente, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para análises posteriores.

#### **3.2. MÉTODOS**

##### **3.2.1. Medidas de CO<sub>2</sub> e Etileno**

A respiração (CO<sub>2</sub>) e o etileno foram medidos por cromatografia gasosa em cromatógrafo HP 6890 acoplado com detector de condutividade térmica (TCD) para CO<sub>2</sub> e detector de ionização de chama (FID) para etileno. A coluna utilizada foi a HP-PLOT com comprimento de 30 m, espessura do filme de 40 μm e diâmetro interno de 0,53 mm. Aproximadamente 300g de bananas foram acondicionadas em frascos

herméticos. Após 1 hora, amostras do gás liberado foram retiradas e injetadas manualmente no cromatógrafo com o auxílio de seringa *GAS Tight*.

Condições cromatográficas para medida de CO<sub>2</sub>:

Temperatura isotérmica (forno): 30°C

Temperatura do injetor e detector: 250°C ambos

Fluxo: 4 mL/min

Modo de injeção: *split*, Taxa de *split*: 50:1

Volume de injeção: 1 mL

Condições cromatográficas para medida de etileno:

Temperatura isotérmica (forno): 30°C

Temperatura do injetor e detector: 200 °C e 250°C, respectivamente

Fluxo: 1 mL/min

Modo de injeção: *pulsed split*, Taxa de *split*: 12,5:1

Volume de injeção: 5 mL

Foram calculadas as medidas de CO<sub>2</sub> e etileno com base no volume livre dos frascos, levando em consideração a massa de banana contida nos frascos e o tempo de respiração. Os valores foram expressos em mg de CO<sub>2</sub>.Kg PF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e µL de etileno.Kg PF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

### **3.2.2. Determinação de amido e proteína solúvel**

O amido foi determinado conforme o método descrito por Arêas e Lajolo (1981). O amido foi solubilizado com NaOH 0,5 N, precipitado com etanol 80% e hidrolisado com amiloglicosidase (28 U/mL). A glicose resultante foi quantificada através do sistema glicose oxidase-peroxidase-ABTS (GOD-POD-ABTS), a 450 nm, utilizando glicose como padrão.

As proteínas foram determinadas pelo método descrito por Bradford (1976), a 595 nm, usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

### **3.2.3. Determinação de açúcares solúveis**

Para determinação dos açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram feitas 3 extrações sucessivas com etanol 80% a 80°C. Os sobrenadantes obtidos foram juntados, o volume ajustado, o etanol evaporado em *speed vac* a 45°C, seguida de reconstituição do volume com água. Os açúcares foram dosados por HPAE-PAD. Uma alíquota de 25 µL de extrato, devidamente diluída, foi injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Dionex modelo DX 500, com coluna Carbopac PA 1 (4 x 250 mm) e detector amperométrico de pulso modelo ED 40. A fase móvel foi constituída de 100% de NaOH 18 mM em um fluxo de 1,0 mL/min.

### **3.2.4. Extração e atividade enzimática de isoamilase**

A extrato enzimático foi preparado conforme Fujita e col. (1999) com modificações. O meio extrator consistiu de tampão Imidazol-HCl pH 7,4 50mM, contendo cisteína 20 mM (neutralizada no momento do uso), benzamidina 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM e 1% polivinilpirrolidona-40 (PVP), numa proporção 1:4 (g/mL). Após centrifugação a 15000 x g por 40 minutos, 0,25 mL do homogenato foi dessalinizado em coluna Hi-Trap Sephadex G-25 (Amersham Biosciences). O ensaio de atividade foi realizado na fração (1 mL) que apresentou maior concentração de proteína (Bradford, 1976) e menor teor de açúcares (Dubois, 1956)

A medida de atividade foi baseada na determinação de açúcares redutores formados durante a degradação de polímeros glicanos, medidos através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Bernfeld (1955), utilizando maltose como padrão.

O meio de reação consistiu de 100  $\mu\text{L}$  de tampão Imidazol-HCl pH 7,4 100 mM, contendo  $\text{MgCl}_2$  16 mM e 2% de glicogênio e 100  $\mu\text{L}$  de amostra dessalinizada. Após 2 h de incubação a 30°C, a reação foi finalizada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de DNS, fervura por 10 minutos, seguida de adição de 900  $\mu\text{L}$  de água, totalizando um volume de 1200  $\mu\text{L}$  por tubo (Sigma). A absorbância foi lida a 540 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  maltose. $\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>. $\text{gPF}^{-1}$ . $\text{h}^{-1}$ . Este ensaio também foi realizado utilizando-se  $\beta$ -dextrina limite como substrato, nas mesmas condições.

### **3.2.5. Extração de RNA total**

A extração de RNA total foi realizada segundo López-Gómez e Gómez-Lim (1992), com modificações. Três gramas de polpa de banana foram trituradas em gral de porcelana com nitrogênio líquido e adicionadas de 10 mL de solução extratora, que continha tampão Tris-HCl pH 7,5 150 mM, 2% SDS, 1% 2-ME e EDTA 50 mM. Após homogeneização do material até o descongelamento, com auxílio de gral e pistilo, e centrifugação a 12.000 x g por 10 min, adicionou-se ao sobrenadante 0,25 volumes de etanol absoluto e 0,11 volumes de acetato de potássio 5M, com agitação por 1 minuto. A essa mistura foi adicionado 1 volume de clorofórmio. Após centrifugação a 12.000 x g por 10 min, a fase aquosa (superior) foi recolhida,

adicionada de 1 volume de fenol/clorofórmio e centrifugada por 10 min a 12.000 x g, novamente extraída com 1 volume de clorofórmio e centrifugada a 12.000 x g por 10 min.

A fração aquosa obtida foi cuidadosamente transferida para tubo e o RNA contido foi precipitado por adição de 0,43 volumes de cloreto de lítio 10 M, à -20°C por 12h. Após centrifugação a 12.000 x g por 1 h, o RNA precipitado foi recuperado e solubilizado em 2 mL de tampão TE. Novamente o RNA foi precipitado pela adição de 3 volumes de etanol e 0,1 volumes de acetato de potássio 5 M, mantido à -20°C por 2 h, centrifugado por 1 h a 12.000 x g e retomado em 200 µL de tampão TE. A concentração do RNA foi determinada a 260 nm, sendo que 40 µg de RNA por mL correspondem a 1,0 unidade de O.D. O material foi dividido em alíquotas, precipitado em 3 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de potássio 5M e armazenado em freezer -80°C.

### **3.2.6. Obtenção de cDNA (DNA complementar)**

A primeira fita do cDNA foi obtida, a partir do RNA total de bananas climatéricas, pela atividade da *Transcriptase Reversa*, utilizando primer Oligo dT<sub>(12-18)</sub> através do *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Amersham Biosciences).

### **3.2.7. Planejamento dos primers**

Através dos aplicativos *Pileup* e *Pretty* (Wisconsin-Package, 1997), as sequências de DNA e aminoácidos, referentes a enzimas desramificadoras, disponíveis para acesso remoto através da Embrapa -

Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia - Bioinformática  
 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br> e  
<telnet://asparagin.cenargen.embrapa.br>), foram alinhadas e a partir das  
 regiões de consenso (Figura 4) construiu-se os primers relacionados na  
 Tabela 1, com as respectivas temperaturas de hidridização (T<sub>m</sub>).

<b><u>Pululanase</u></b>												
	<b><u>S1-S2</u></b>		<b><u>S3</u></b>		<b><u>S4-S5</u></b>		<b><u>S6-R1-R2</u></b>		<b><u>R5-R6</u></b>		<b><u>R3-R4</u></b>	
<i>Zma</i>	218	YLWAPTAQDV	392	VDDIKSNWK	494	DKIVPGYY	519	TASEHFMV	609	GTGIGSFN	764	QGIPFFHAG
<i>Osa</i>	218	YLWAPTAQDV	418	VDDNKSNNK	520	DKIVPGYY	545	TASEHFMV	635	GTGIGSFN	780	QGIPFFHAG
<i>Hvu</i>	219	YLWAPTAQGV	396	VDDIKSNWK	500	DKIVPGYY	526	TASEHFMV	617	GTGIGSFN	764	QGIPFFHAG
<b><u>Isoamilase e Pululanase</u></b>												
	<b><u>S7-S8-S9-S10</u></b>			<b><u>S11-S12</u></b>			<b><u>R7-R8</u></b>					
<i>Zma</i>	291	KMNFWDY	339	VIMDVVYNH	415	DGFRFDLM						
<i>Osa</i>	266	KMNFWDY	314	VIMDVVYNH	395	DGFRFDLM						
<i>Hvu</i>	255	KMNFWDY	303	VILDVVFNH	384	DGFRFDLA						

**Figura 4:** Alinhamentos parciais de aminoácidos de pululanase e isoamilase de diferentes espécies vegetais (*Zma*-milho, Genbank ZMU18908; *Osa*-arroz, Genbank AB015615; *Hvu*-cevada, Genbank AF142589). Os números correspondem a posição do aminoácido na sequência completa de cada espécie e as siglas S1 a S12 (Sentido) e R1 a R8 (Reverso) indicam o primer planejado correspondente.

Os primers Sentido 1 a 6, e Reverso 1 a 6, referem-se a sequências decodificadoras somente para DBE tipo-pululanase. Os demais primers são comuns tanto a enzimas do tipo-pululanase quanto tipo-isoamilase.

**Tabela 1:** Relação de primers utilizados em PCR para amplificação de insertos de DBE

Primer	Sequência	T <sub>m</sub> (°C)
Sentido 1	5'-ACCTSTGGGCYCCMACCGCCCA-3'	68
Sentido 2	5'-TACCTSTGGGCYCCMACCGCTCA-3'	66
Sentido 3	5'-GTSGACGACRWCAAGTCCAASTGGAA-3'	66
Sentido 4	5'-GACAAGATYGTSCCMGGSTACTA-3'	56
Sentido 5	5'-GACAAGATYGTSCCMGGSTATTA-3'	54
Sentido 6	5'-ACYGCTCCGARCCTTYATGGT-3'	58
Sentido 7	5'-AAGATGAACTTCTGGGGCTA-3'	56
Sentido 8	5'-AAGATGAACTTCTGGGGGTA-3'	58
Sentido 9	5'-GAGGACCC(A/G)TACAACCTGGGGCTA-3'	70
Sentido 10	5'-GAGGACCC(A/G)TACAACCTGGGGGTA-3'	70
Sentido 11	5'-GTGATCATGGACGT(C/G)GT(C/G)TA(T/C)AATCA-3'	64
Sentido 12	5'-GTGATCATGGACGT(C/G)GT(C/G)TA(T/C)AACCA-3'	66
Reverso 1	5'-ACCATGAAGTGYTCGGARGCGGT-3'	66
Reverso 2	5'-ACCATGAAGTGYTCGGARGCAGT-3'	64
Reverso 3	5'-GCCGGCARTGGAARAANKGRATSCCTTG-3'	70
Reverso 4	5'-GCCGGCARTGGAARAANKGRATSCCCTG-3'	72
Reverso 5	5'-GTTRAAGGASCCGATSCCGGTGCC-3'	68
Reverso 6	5'-GTTRAAGGASCCGATSCCGGTGCC-3'	68
Reverso 7	5'-CATGAGGTC(A/G)AA(T/C)CT(A/G)AA(G/C)CCATC-3'	58
Reverso 8	5'-CATGAGGTC(A/G)AA(T/C)CT(A/G)AA(G/C)CCGTC-3'	60

Códigos Ambíguos IUPAC

N = qualquer base

S = C ou G

D = A ou G ou T

M = A ou C

Y = C ou T

H = A ou C ou T

R = A ou G

K = G ou T

V = A ou C ou G

W = A ou T

B = C ou G ou T

Em virtude dos resultados obtidos ao longo dos experimentos, confirmando a presença de uma DBE tipo-isoamilase, novos primers foram planejados com base nas leituras dos sequenciamentos e estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Relação de primers utilizados em PCR para amplificação de insertos de isoamilase, com base no sequenciamento de bases.

Primer	Sequência	Tm(°C)
Sentido específico 1	5'-CGTCTATAACCATACTAATGAAGCTAATGA-3'	80
Reverso específico 1	5'-GACATGGTACTCGTTAACCCAATG-3'	70
Sentido específico 2	5'-CCTGTCGTCATGGAAGTTATTCT-3'	66
Reverso específico 2	5'-TGATTGCAGTTTAATGTATTCCA-3'	62
Sentido específico 2 abr.	5'-CTTATTCTTGACAGTTTAAGACAT-3'	62
Reverso específico 2 abr.	5'-AATGTATTTCCACAGCCTGAAAAATTC-3'	72
Sentido específico 3	5'-CGCAAACCCTACCACAGTATCAATTT-3'	74
Sentido NT1	5'-TTGCACAATGCTGGCATTGAGGTG-3'	74
Sentido NT2	5'-GTCCTATAACCATACTAATGAAGCT-3'	67
Reverso CT1	5'-TTA AAATGACCGCCCCTTCTTTCTTCC-3'	75
Reverso CT2	5'-TTA AGATTCCAGATT TGTGTCAACCAC-3'	72

Foram utilizados também os primers T3, T7, M13, M13R e SP6 referentes aos sítios de clonagem dos vetores empregados, que estão relacionados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Sequência de bases de primers flanqueadores dos vetores pGEM e TOPO utilizados em sequenciamento.

Primer	Sequência	T <sub>m</sub> (°C)
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	56
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	55
M13	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	52
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	50
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'	55

### 3.2.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com uma mistura de reação composta de tampão Tris-HCl pH 8,3 10mM, contendo dNTP 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, primer Sentido 0,5 µM, primer reverso 0,5 µM, 2,5 U *Taq* polimerase, DNA molde (0,5 a 1,0 µL) e água, completando um volume final de reação de 20 ou 25 µL. As condições do termociclador foram: 94°C/30s; 50°C-72°C/30s; 72°C/1,5-2,0 min, num total de 35-40 ciclos. Foram otimizadas as temperaturas de hibridização conforme os primers utilizados e tempo de alongação de acordo com o tamanho de fragmento a ser amplificado (1 min/Kb).

Para visualização dos produtos de PCR, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1,0 a 1,5%), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, a 80 V por 10-15 min (Sambrook e col, 1989), em tampão TPE.

### 3.2.9. Clonagem e transformação de bactérias

Os fragmentos obtidos por PCR foram excisados de um gel preparativo e purificados através de eletroeluição em *Centrilutor* (Amicon) ou através do *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences).

Os produtos de PCR purificados foram ligados em vetor pGEM-T, através de *pGEM®-T Vector Systems* (Promega) ou em vetor pCR®4-TOPO, através de *TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen).

A ligação em vetor pGEM-T foi feita por meio da T4-DNA ligase, numa reação conduzida a 4°C, durante 16 h. Na sequência, o vetor contendo o inserto foi utilizado para transformação de células competentes de *Escherichia coli*, seguindo o método do CaCl<sub>2</sub> descrito por Cohen *et al.* (1972). À 100 µL de células foram adicionados 8 µL de reação de ligação e incubados a 42°C por 50 segundos. À essa suspensão foram adicionados 100 µL de meio LB, que foi mantida a 37°C por 1h. Em seguida, as células foram transferidas para placas de Petri contendo meio LB-ágar, ampicilina (100 µg/mL), 4 µL de IPTG (200 mg/mL) e 44 µL de X-gal (20 mg/mL) e incubadas durante a noite a 37°C. A identificação das células transformantes foi feita pelo crescimento de colônias de coloração branca.

Quando usado o vetor pCR®4-TOPO, o produto de PCR foi ligado diretamente ao vetor pela ação de uma topoisomerase associada ao vetor, numa reação à 22°C, durante 5 min. Dois microlitros de reação de ligação foram adicionados em tubos contendo 50 µL células competentes de *E. coli* TOP10 (provenientes do kit), incubados em gelo por 30 min,

adicionados de 250  $\mu$ L meio SOC e incubados a 37°C por mais 1 h. Nesse sistema, somente células transformadas crescem em meio LB-ágar contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL).

As colônias de células transformadas obtidas nas placas foram transferidas individualmente para tubos contendo cerca de 50  $\mu$ L de meio LB e ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e incubadas por 2 h a 37°C. A seguir, fez-se PCR dessas amostras para verificar a presença dos insertos, com primers específicos da isoamilase e primers flanqueadores dos vetores.

### **3.2.10. Mini-preparação de DNA plasmidial e sequenciamento**

Em tubos contendo 3 mL de meio LB com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, foram adicionados 5  $\mu$ L das colônias positivas (já testadas por PCR), previamente enriquecidas em meio LB com ampicilina, os quais foram incubados durante 16 h a 37°C. A extração e purificação do plasmídeo que continha o fragmento de interesse, foi feita através de mini-preparação utilizando *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences) ou *Concert Rapid Plasmid Purification Systems* (Gibco). A quantificação do DNA plasmidial foi feita a 260 nm, considerando que 50  $\mu$ g DNA/mL apresentam uma O.D. de 1,0.

O clone ISO-250 foi seqüenciado manualmente de acordo com o método de Sanger (1977), utilizando didesoxinucleotídeos e marcação por incorporação de  $\alpha^{32}$ P-dCTP, através do *Cycle Sequencing Kit* (Amersham Bioscience). A separação das amostras foi feita em gel de poliacrilamida 5% e 7M de uréia, a temperatura constante de 50°C e

potência de 120 W, em tampão TBE, conforme instruções do manual *Sequi-GenII* (Bio-Rad) e reveladas por autorradiografia. As demais amostras foram sequenciadas em sequenciador automático ALF Express, utilizando *Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing kit* e *ReproGel™ Long Read* (Amersham Biosciences). A eletroforese foi desenvolvida a 50°C, com potência constante de 25 W e tempo de corrida de 750 min. As sequências obtidas foram analisadas através dos aplicativos *Blast*, *Pileup*, *Translate* e *Fasta* do Wisconsin-Package (1997), disponíveis para acesso remoto através da Embrapa - Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia - Bioinformática (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br> e <telnet://asparagin.cenargen.embrapa.br>).

### 3.2.11. Northern Blot

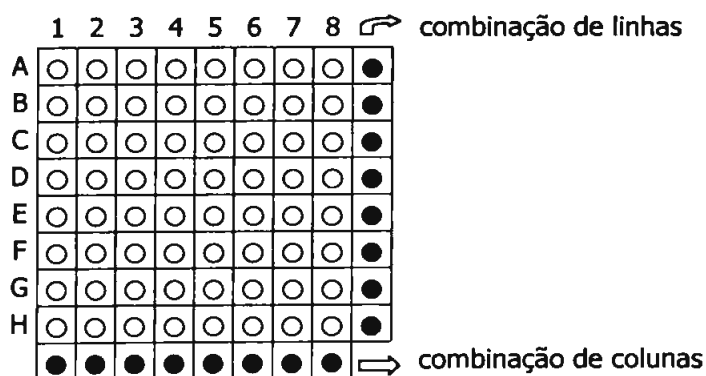
As amostras com 25 µg de RNA foram separadas em gel de agarose desnaturante, contendo 2,2 M de formaldeído (Sambrook, 1989) e transferidas à vácuo para membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham Biosciences). Foi utilizada uma sonda de DNA específica de banana, com cerca de 1 Kb, obtida por PCR, com os primers Sentido NT1 e Reverso CT1. A marcação da sonda foi feita com  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, conforme *Ready-To-Go DNA Labelling Beads Kit* (Amersham Biosciences) e a reação de hibridização foi conduzida durante 12 h, a 65°C. As lavagens da membrana obedeceram a seguinte ordem: SSC(2x)/0,1%SDS, por 15 min (2 vezes); SSC(1x)/0,1%SDS, por 15 min e SSC(0,1x)/0,1%SDS, por 15 min. A revelação foi feita por autorradiografia, após 3 dias de exposição da membrana.

### 3.2.12. Obtenção da sequência de cDNA de isoamilase

#### 3.2.12.1. Varredura em biblioteca de cDNA (*Screening*)

Uma biblioteca de cDNA, construída em vetor ZAP Express (fago  $\lambda$ ) através de *ZAP Express cDNA Synthesis Kit* (Stratagene), foi submetida a uma varredura em meio líquido com base no método de Israel (1993).

A biblioteca de cDNA, com um título de  $1,3 \times 10^4$  p.f.u./ $\mu$ L (plates forming unit - unidades formadoras de colônia) foi propagada pela infecção em bactérias de *E. coli* XL1 Blue MRF', em meio LB, contendo 0,2% de maltose e 10 mM de  $MgSO_4$ . Alíquotas de 100  $\mu$ L dessa mistura foram distribuídas em 64 poços de uma placa de microtitulação (8 linhas x 8 colunas) e incubadas a 37°C, durante a noite. Para restringir-se o número de amostras a serem testadas, de 64 para 16, foram feitas combinações de linhas e colunas, sendo extraídos 10  $\mu$ L de cada poço de linha para a formação da combinação das linhas e 10  $\mu$ L de cada poço de coluna para a combinação das colunas (Figura 5).



**Figura 5:** Formação das combinações de linhas e colunas em placa de microtitulação utilizada em varredura em biblioteca de cDNA, segundo Israel (1993).

Cada uma das 16 combinações foi testada através de PCR, com primers da sequência de isoamilase ( $S_{esp} 1 \times R_{esp}1$ ), visando verificar a presença do clone que continha o cDNA codificante para a enzima em estudo. Através do cruzamento de linha e coluna, foi possível chegar ao poço (do total de 64) que continha o clone. Desse poço positivo foi retirada uma alíquota, que novamente foi usada para infectar células de *E. coli* XL1 Blue MRF', de modo a gerar uma nova placa enriquecida do clone de isoamilase. Esse procedimento foi repetido até que todas as combinações de linha e coluna apresentassem amplificação positiva de um fragmento de tamanho compatível com o esperado pelo par de primers utilizado, indicando um enriquecimento satisfatório para a etapa de seleção em meio sólido. Foi testada a maior diluição ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) do poço escolhido que conservasse a banda característica.

Na etapa em meio sólido, uma alíquota de 0,5  $\mu$ L do clone (extraída do poço escolhido) foi incubada com 200  $\mu$ L células de *E. coli* XL1-Blue, por 15 min. Após a incubação, a suspensão de células foi misturada com 3 mL de meio NZY top-ágar e plaqueada em meio NZY ágar (37°C, durante a noite). Os fagos que formaram placas de lise foram ressuspensos em 20  $\mu$ L meio SM (NaCl 0,1 M; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 8 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e gelatina 0,01%) e a presença do inserto de interesse foi confirmada por PCR. Aquela placa de lise que amplificou o fragmento de tamanho esperado de acordo com os primers utilizados, foi enriquecida em meio SM e destinada a excisão *in vivo*.

A excisão *in vivo* consistiu na conversão do fago  $\lambda$ , contendo o inserto de interesse, em fagemídeo pBK-CMV (plasmídeo circularizado),

com o auxílio de um fago auxiliar (ExAssist Helper) e de outra cepa de bactérias de *E. coli*, denominadas XL0LR. As células de *E. coli* XL0LR transformadas, que passaram a conter o fagemídeo pBK-CMV foram plaqueadas em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e selecionadas pela sua viabilidade, uma vez que somente células transformadas possuem resistência ao antibiótico. Essa etapa também foi feita de acordo com o protocolo descrito no manual do *ZAP Express cDNA Synthesis Kit* (Stratagene).

### 3.2.12.2. RACE (Rapid Amplification cDNA Ends)

Para clonagem do gene da isoamilase a partir das extremidades 5' e 3' do cDNA de bananas, utilizou-se o *GeneRacer™ Kit – For full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RLM-RACE - Invitrogen)*. Esse método permite a amplificação de insertos do gene de interesse a partir das extremidades do cDNA, através de PCR, usando uma combinação de primers do kit e de sequências já conhecidas do gene. A técnica promove uma ligação seletiva de um ribonucleotídeo à extremidade 5' do mRNA, que é posteriormente submetido à transcrição reversa, para obtenção do cDNA.

O RNA de bananas climatéricas foi tratado com fosfatase intestinal bovina (CIP), para eliminação da extremidade fosfato 5', e com pirofosfatase ácida de tabaco (TAP), para remoção da estrutura *cap* 5' (Figura 6A e B). Esses tratamentos prepararam o RNA para ser ligado ao ribonucleotídeo específico de 44 bases (5'-CGACUGGACCACGAGGACACUGACAUGGAC UGAAGGAGUAGAAA-3')

na extremidade 5', através da T4 RNA ligase (Figura 6C). Em seguida foi feita a transcrição reversa do RNA utilizando-se *Transcriptase reversa* (AMV-RT) e o primer GeneRacer™ Oligo dT (Figura 6D), que é composto por 18 unidades de timina mais um oligonucleotídeo de 36 bases (5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)<sub>18</sub>-3'), o que possibilitou a amplificação de produtos de PCR, a partir das extremidades do cDNA, utilizando-se primers do kit (Tabela 4), complementares a esses oligonucleotídeos, e primers específicos da sequência de isoamilase (Tabela 2), obtidos a partir da leitura de bases de um inserto de isoamilase já clonado (Figura 6E e F).

**Tabela 4:** Sequência de bases dos primers utilizados na técnica RACE

Primer	Sequência	Tm(°C)
Sentido GeneRacer 5'	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'	74
Sentido GeneRacer 5' abr.	5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'	78
Reverso GeneRacer 3'	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'	76
Reverso GeneRacer 3' abr.	5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'	72

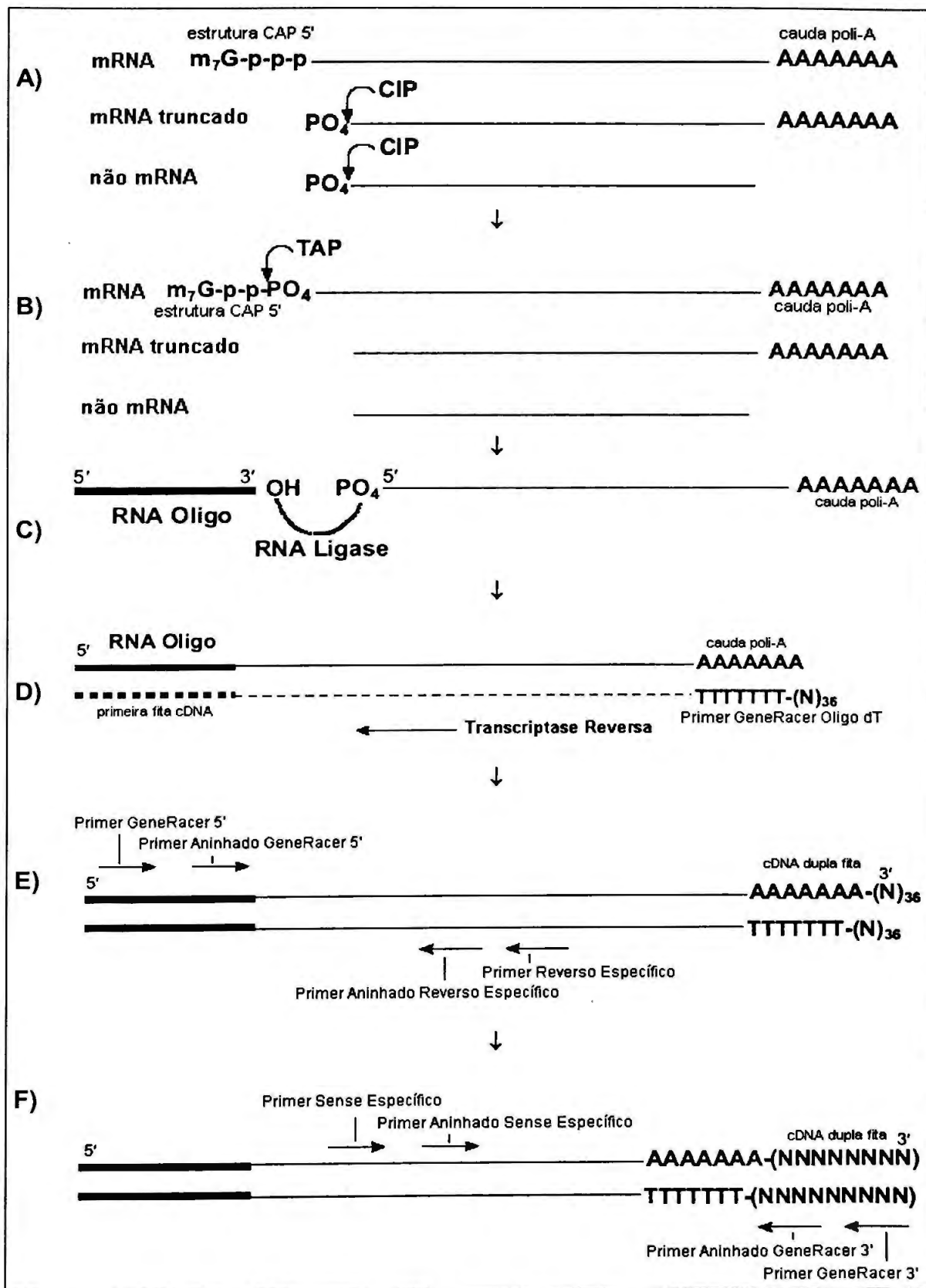


Figura 6: Fluxograma da técnica RACE. (Invitrogen, Manual do Fabricante). A) Remoção da ligação fosfato 5' do RNA com CIP (*calf intestinal phosphatase*); B) Remoção da estrutura cap do RNA com TAP (*tobacco acid pyrophosphatase*); C) Ligação de ribonucleotídeo à

extremidade 5'; D) Transcrição reversa do RNA com AMV-RT e GeneRacer Oligo-dT ; E) Amplificação da extremidade 5' por PCR; F) Amplificação da extremidade 3' por PCR.

### **3.2.13. Expressão de isoamilase em *Escherichia coli* e purificação da proteína recombinante**

Para expressão parcial da isoamilase de banana em *E.coli* foi utilizado o *pCR-T7/TOPO-TA Expression Kit* (Invitrogen). Foram gerados insertos que mantiveram a seqüência correta de aminoácidos da proteína, através da combinação dos primers Sentido 2 x Reverso CT1, Sentido 2 x Reverso CT2, Sentido 3 x Reverso CT1 e Sentido 3 x Reverso CT2, com tamanhos esperados de produto de PCR em torno de 730, 1000, 360 e 640 pb, respectivamente. Estes 4 insertos foram clonados em vetor de expressão *pCR-T7/NT-TOPO* e inseridos em uma cepa de bactérias *E.coli* denominada TOP10F'. Os plasmídeos obtidos foram purificados e usados para transformar a cepa BL21(DE3)*pLysS* de bactérias *E.coli*, em 10 mL de meio LB, contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de clorafenicol.

O nível de expressão da proteína recombinante foi verificado após 0, 2 e 4 horas de indução com IPTG (0,5-1,0 mM). Alíquotas de 500 µL da cultura induzida e não induzida foram coletadas nesses períodos e centrifugadas a 12000 rpm por 30 segundos. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 80 µL tampão de amostra (Tris-HCl pH6,8 62,5 mM; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 5%; glicerol 10% e azul de bromofenol, 0,05%), dos quais 10 µL foram submetidos a corridas eletroforéticas em SDS-PAGE (10-12%), segundo método de Laemmli (1970), com voltagem constante de 200 V, durante 35 min. Os padrões de peso molecular utilizados foram LMW

(Amersham Biosciences), contendo fosforilase b (94 KDa), albumina bovina (67 KDa), ovalbumina (43 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14 KDa) e SDS-6H (Sigma), contendo miosina (205 KDa),  $\beta$ -galactosidase (116 KDa), fosforilase b (97 KDa), albumina bovina (66 KDa), ovalbumina (45 KDa) e anidrase carbônica (29 KDa). Os géis foram revelados em Comassie-Blue 250 e descorados em solução de etanol 5% e ácido acético 7,5%.

A purificação da proteína recombinante foi realizada através de ligação em resina de afinidade com poli-histidina (*ProBond Purification System* - Invitrogen), conforme instruções do fabricante, a partir de alíquotas de 50 mL da cultura de bactérias. Após a purificação, a proteína foi dialisada com tampão PBS, contendo 0,15% de SDS e concentrada através de Centricon-100. A quantificação da proteína foi feita através do método de Lowry, com *Bio Rad DC Protein Assay* (Bio Rad), de acordo com o manual do fabricante, utilizando BSA como padrão.

#### **3.2.14. Produção de anticorpo policlonal anti-isoamilase**

Alíquotas de 100  $\mu$ g da proteína recombinante foram homogeneizadas ao reagente completo de Freund, numa proporção de 1:1 e volume final de 2 mL. Essa emulsão foi destinada à 1<sup>ª</sup> inoculação de coelhos machos, raça Nova Zelândia. A 2<sup>ª</sup> e 3<sup>ª</sup> inoculações foram feitas com reagente incompleto de Freund, no mesmo volume e proporção anteriores, em intervalos de 14 dias. Uma semana depois da última imunização foram coletadas alíquotas de soro, que foram centrifugadas a 5000xg por 2 min, para obtenção da fração enriquecida do anticorpo anti-isoamilase. Antes da

---

1ª. injeção, amostras de 3 mL de sangue foram extraídas dos animais, para análise do soro pré-imune contra extrato protéico total de banana.

### **3.2.15. Extração de proteína total e Western blot**

Cerca de 500 mg de polpa de banana triturada em nitrogênio líquido foram homogeneizadas a 1,5 mL de tampão de extração (Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM, SDS 2%, 2-β-mercaptoetanol 5%) com auxílio de ultraturrax e fervidas por 10 min para extração da proteína total. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Lowry (1951), modificado por Peterson (1977). Foram aplicados 50 µg de proteína, em gel de poli-acrilamida (10%). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad), sob voltagem constante de 30 V, durante 16 h, a 4°C.

A membrana foi bloqueada com solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM e 5% de leite desnatado, durante 1 h. O soro imune foi adicionado a uma nova alíquota de solução bloqueadora, numa proporção de 1:100, e incubado junto à membrana por 3 h. Em seguida foram feitas 3 lavagens sucessivas da membrana somente com o tampão salino, sem adição de leite desnatado. O anticorpo secundário anti-IgG de coelho, conjugado à fosfatase alcalina (Sigma) foi adicionado à solução bloqueadora, numa proporção de 1:30000, incubado por 1 h e lavado novamente por 3 vezes, com tampão salino, sem leite desnatado. A revelação das proteínas foi feita de acordo com o método da fosfatase alcalina, descrito por Sambrook e col. (1989).

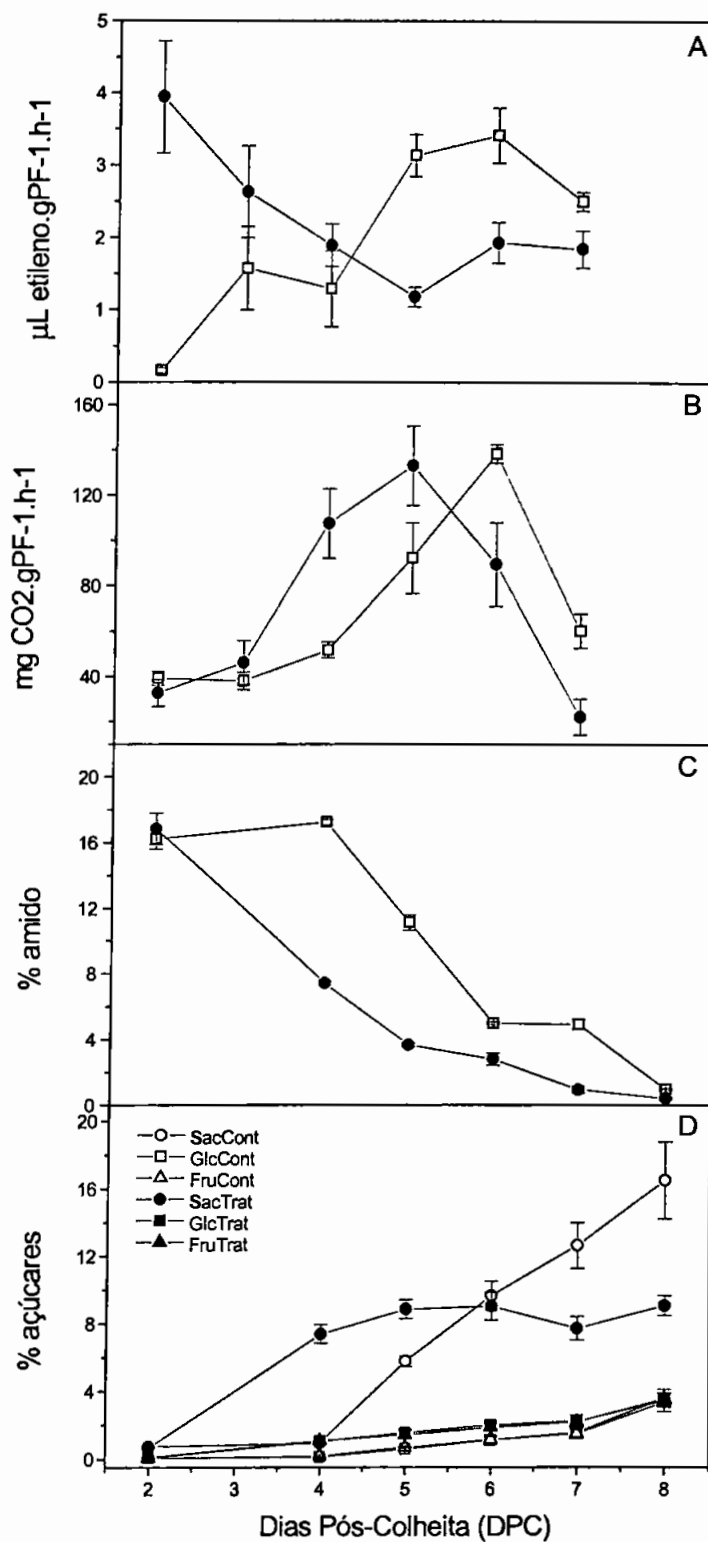
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***4.1. PERFIS DE RESPIRAÇÃO, ETILENO, AMIDO E AÇÚCARES SOLÚVEIS***

Na Figura 7 estão apresentados os perfis de produção de etileno, respiração, teores de amido e açúcares solúveis durante o amadurecimento de bananas. As amostras controle demonstraram um comportamento típico de frutos climatéricos, com aumento dos níveis de etileno, seguido de um incremento na produção de CO<sub>2</sub> após a colheita, conforme já descrito por Seymour (1992).

O objetivo da aplicação de etileno foi a uniformização da amostra, uma vez que dentro de uma mesma penca de bananas, pode-se observar uma diferença de vários dias entre a maturação, em virtude das diferentes épocas de floração e desenvolvimento dos frutos. Em experimentos anteriores foram detectados problemas de heterogeneidade dos lotes. O tratamento de bananas com 100 ppm de etileno gerou um padrão respiratório e de produção de etileno bastante inusitado e de difícil interpretação (dados não apresentados), por isso a aplicação de menores doses do hormônio (10 ppm), para as condições experimentais utilizadas, pareceram a melhor alternativa para a padronização do amadurecimento dos frutos.

É possível notar, através da análise da Figura 7, uma pequena diferença no comportamento das frutas tratadas com etileno das não tratadas. Bananas não tratadas começaram a apresentar aumento nos



**Figura 7:** Medidas de etileno (A), respiração (B), % de amido (C) e açúcares solúveis (D) de bananas controle e tratadas com 10 ppm de etileno durante o amadurecimento. Os valores representam a média e o erro padrão de 6 repetições (para análises de etileno e  $\text{CO}_2$ ) e 3 repetições (para análises de % amido e açúcares solúveis). Símbolos abertos representam amostras controle e símbolos fechados, amostras tratadas com 10 ppm de etileno.

níveis de etileno e CO<sub>2</sub> a partir do 3º DPC e 4º DPC, respectivamente, com grande aumento na produção de etileno aos 5 DPC e de CO<sub>2</sub> aos 6 DPC. Quando expostas à uma aplicação exógena de 10 ppm do hormônio ocorreu um adiantamento do pico de etileno para o 2º DPC e de CO<sub>2</sub> para o 5º DPC. Conforme descrito por Tucker e Grierson (1984), frutos climatéricos quando expostos a etileno exógeno, antecipam seu pico respiratório, mas mantêm a magnitude da produção de CO<sub>2</sub>, (130 mg CO<sub>2</sub>.Kg PF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> nos 2 tratamentos). O climatério respiratório pode acontecer devido a um maior requerimento de ATP para os processos anabólicos que acontecem durante o amadurecimento como adoçamento, síntese de pigmentos, ácidos nucléicos e proteínas. Entretanto, a demanda energética calculada durante o amadurecimento é muito menor do que a que é gerada no climatério (Solomos, 1983) e frutos não climatéricos amadurecem normalmente sem o incremento de respiração, podendo, inclusive, ter seus níveis de CO<sub>2</sub> diminuídos com o amadurecimento. É possível que o aumento da respiração das frutas seja somente mais uma das respostas fisiológicas da célula ao etileno, do que um agente elicitador do amadurecimento, tanto que frutos climatéricos quando expostos a etileno exógeno, apresentam um adiantamento na respiração.

Os teores de amido diminuíram de aproximadamente 17% para valores próximos a 1% no final do amadurecimento, tanto em frutas não tratadas quanto nas tratadas. A degradação do amido foi iniciada no 5º DPC nas frutas controle e no 3º DPC nas frutas tratadas, coincidindo com o aumento nos níveis de açúcares solúveis. Acredita-se que a degradação do

amido seja um dos eventos influenciados pelo etileno, no entanto, ainda não se sabe claramente como o aumento no teor do hormônio sinaliza a transcrição e/ou tradução das enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos.

A síntese de sacarose também foi acelerada nas frutas tratadas com etileno. Frutos tratados tiveram acúmulo máximo de sacarose (9%) no 5ºDPC, enquanto frutos controle apresentaram maior teor de sacarose (15%) no 8ºDPC. Os níveis de glicose e frutose mantiveram-se entre 5 e 6% nos 2 tratamentos. O menor acúmulo de sacarose em frutos tratados pode estar relacionado ao fato do etileno influenciar várias vias degradativas na fase de amadurecimento, desviando carbono para outras rotas, que não a síntese de sacarose. Tucker e Grierson (1987) afirmaram que a via das pentoses é mais importante no pré-climatério e conforme Seymour (1993) durante o climatério o aumento do fluxo de carbonos se deva à via glicolítica. Também é possível que as invertases estejam sendo estimuladas, conjuntamente a outras enzimas do metabolismo secundário.

É interessante observar que o amadurecimento deste lote de frutas ocorreu de forma mais rápida que o habitual para bananas do mesmo cultivar (cerca de 7 a 10 dias). Possivelmente, essa diferença na velocidade de amadurecimento entre diferentes amostras de banana deva-se ao ponto de maturação fisiológica em que as frutas foram colhidas e em função dos tratamentos culturais e condições climáticas a que foram submetidas. Acredita-se que bananas colhidas em estádios mais verdes respondem mais intensamente à aplicações exógenas de etileno, enquanto que frutos mais maduros apresentam menor sensibilidade ao hormônio (Seymour, 1992).

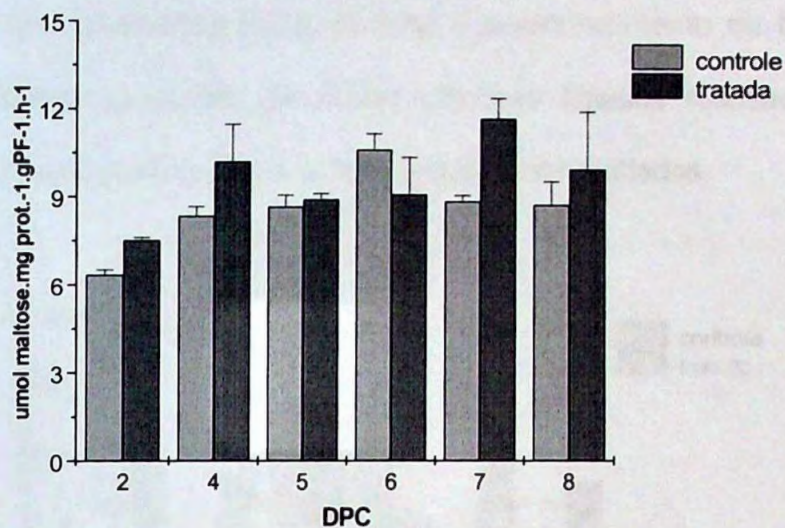
Essa diferença de sensibilidade entre frutos verdes e maduros pode explicar o pequeno efeito da aplicação de etileno no adiantamento do amadurecimento das bananas utilizadas nesse experimento. Com exceção da produção de etileno, os demais parâmetros observados foram antecipados em um ou dois dias, no máximo (Figura 7). Tal comportamento pode estar relacionado ao tempo de permanência do fruto ligado à planta-mãe. Enquanto permanecem na planta, os frutos podem receber algum tipo de sinalização relacionada a fatores de desenvolvimento e desse modo “desligam” o sistema de amadurecimento. Porém quando colhidos, os frutos rapidamente ativam as vias referentes à maturação, especialmente quanto aos receptores de etileno, e o climatério logo é estabelecido, dando origem a todas as reações de síntese e degradação pertinentes ao amadurecimento. O ponto de colheita, portanto, é decisivo no comportamento pós-colheita dos frutos e necessita estudos mais aprofundados.

#### **4.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOAMILASE**

Em ensaios preliminares de atividade enzimática foram testados 3 substratos distintos (pululano, amilopectina e glicogênio), para verificar se a enzima desramificadora presente no amadurecimento de bananas tratava-se de uma pululanase ou de uma isoamilase. Com base nos trabalhos descritos para pululanase, vários meios de extração e atividade foram testados, porém em nenhum deles foi possível a detecção de qualquer ação da enzima (dados não apresentados). No entanto, o uso de amilopectina e glicogênio, permitiu a determinação de atividade de uma

provável enzima desramificadora tipo-isoamilase. O glicogênio é o único substrato capaz de diferenciar a atividade da isoamilase da pululanase. Apesar desse substrato estar longe de ser o ideal para ensaios de atividade de isoamilase, devido ao fato de ser hidrolisado pelas amilases contidas no extrato protéico bruto, ele ainda é menos suscetível que a amilopectina, a qual pode ser atacada por toda gama de enzimas hidrolíticas e fosforolíticas presentes na banana.

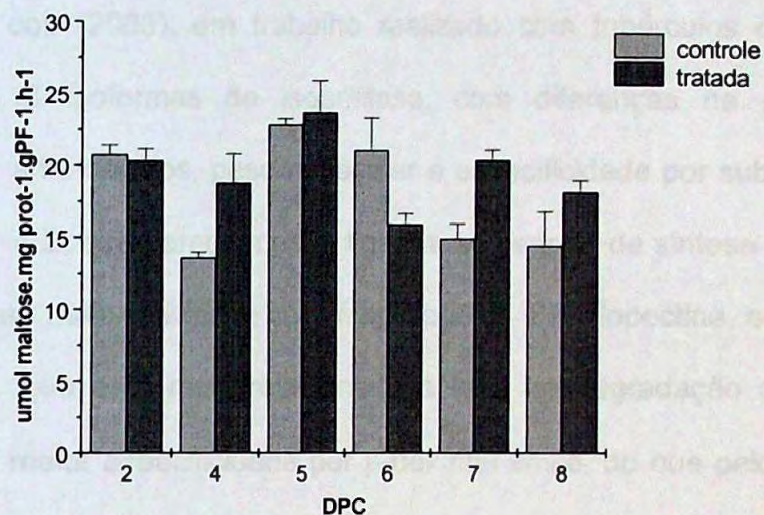
A Figura 8 ilustra os perfis de atividade de isoamilase utilizando o glicogênio como substrato. Por volta do 6º DPC, a isoamilase apresentou um pequeno pico de atividade (aumentado cerca de 1,5 vezes), nas frutas controle, conjuntamente ao pico de etileno. No caso das bananas tratadas com 10 ppm de etileno, houve duas leves elevações de atividade enzimática, aos 4 e 7 DPC. No entanto, de modo geral o perfil de atividade de isoamilase frente ao glicogênio não parece ser muito alterado durante o amadurecimento, porém frutos tratados apresentaram uma atividade um pouco maior desde os pontos iniciais (cerca de 20%). De acordo com os estudos de Maeda e col. (1978) e Yellowlees (1980. Apud: Kossmann e Lloyd, 2000), enzimas desramificadoras de amido isoladas de cevada e ervilha não foram capazes de hidrolisar grânulos nativos de amido, o que parece indicar que essa enzima tenha uma função mais efetiva nos estágios mais avançados de amadurecimento, atuando sobre os produtos de degradação de outras enzimas amilolíticas como amilases e fosforilases.



**Figura 8:** Atividade de isoamilase de bananas controle e tratadas com 10 ppm de etileno durante o amadurecimento, utilizando glicogênio como substrato. Os valores de atividade representam a média e o erro padrão de 3 repetições.

A isoamilase, além de apresentar especificidade por glicogênio e amilopectina, também é capaz de atuar sobre outros produtos ramificados. A  $\beta$ -dextrina limite parece ser um substrato preferencialmente degradado, em relação à  $\alpha$ -dextrina limite, amilopectina e glicogênio (Rahman e col., 1998). Por ser um composto de menor tamanho, obtido a partir da ação degradativa da  $\beta$ -amilase sobre a amilopectina, a  $\beta$ -dextrina limite apresenta estrutura e composição, aparentemente, mais favoráveis à atividade da isoamilase, com uma menor atuação remanescente das outras enzimas amilolíticas. Pelo fato de restarem apenas cerca de 3 resíduos de glicose antes do ponto de ramificação, a  $\beta$ -amilase não é capaz de clivar qualquer ligação glicosídica de sua estrutura. O fato de não haver fósforo inorgânico nos meios de extração e atividade, desfavorece a ação da amido-fosforilase, podendo-se descartar sua atuação nesse meio.

Na Figura 9, pode-se verificar o perfil de atividade da isoamilase com  $\beta$ -dextrina limite, durante o amadurecimento de bananas. Foram mantidas condições de ensaio idênticas àquelas realizadas com glicogênio, possibilitando assim, a comparação dos resultados.



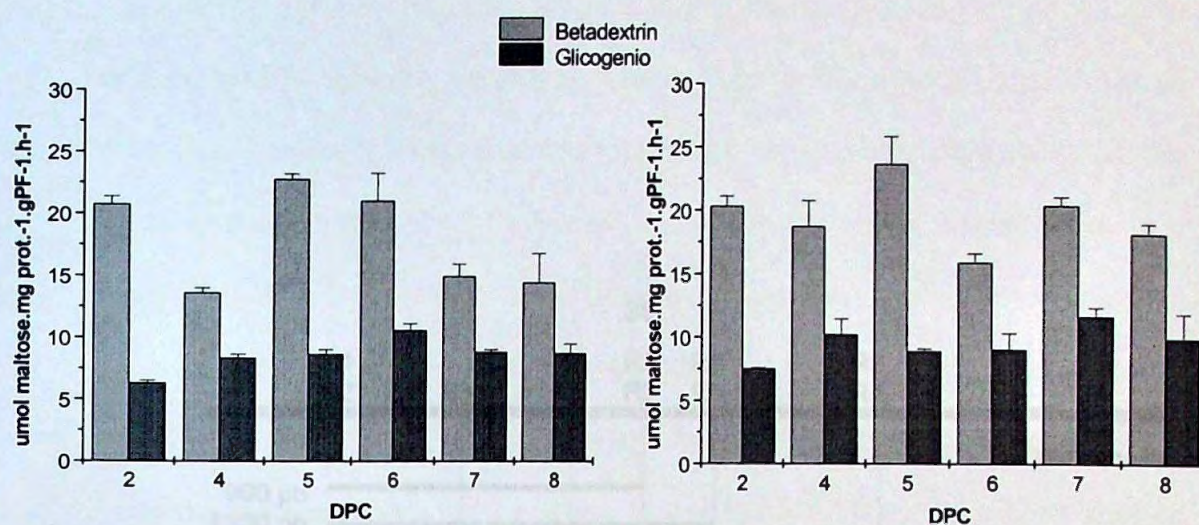
**Figura 9:** Atividade de isoamilase de bananas controle e tratadas com 10 ppm de etileno durante o amadurecimento, utilizando  $\beta$ -dextrina limite como substrato. Os valores de atividade representam a média e o erro padrão de 3 repetições.

Os frutos controle apresentaram um pequeno aumento de atividade enzimática aos 5 DPC, que foi decrescendo ao longo do amadurecimento (Figura 9). Amostras tratadas com 10 ppm de etileno apresentaram perfil bastante semelhante, com pequenos picos de atividade ocorrendo logo após o início da quebra do amido, para os 2 tratamentos.

A enzima isoamilase parece ter uma atividade relativamente constante durante o amadurecimento de bananas. Frutos tratados com etileno mantém esse padrão de constância, porém apresentam valores de

atividade mais elevados que frutos controle para quase todos os pontos (Figura 9).

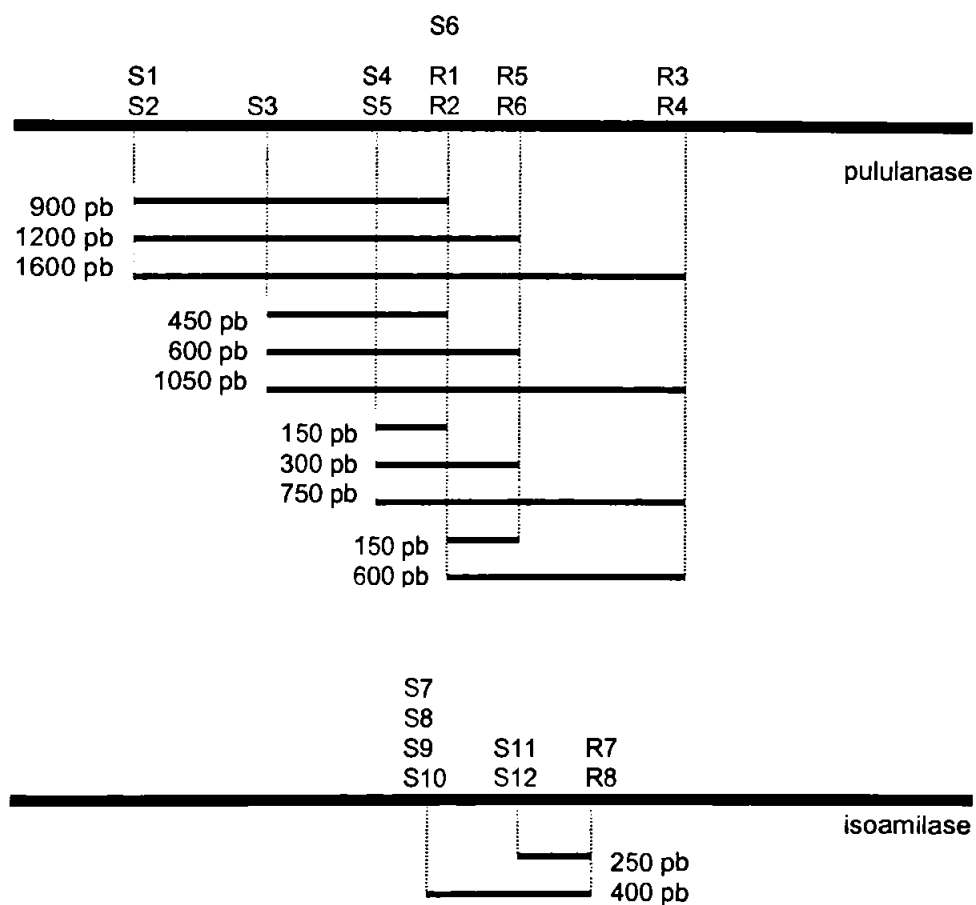
Em relação à especificidade por substrato é possível verificar, pela análise da Figura 10, que a  $\beta$ -dextrina limite apresentou valores de atividade cerca de 2 vezes maiores do que os encontrados com glicogênio. Hussein e col. (2003), em trabalho realizado com tubérculos de batata, detectaram 3 isoformas de isoamilase, com diferenças na seqüência primária de aminoácidos, peso molecular e especificidade por substrato. As isoformas 1 e 2, que parecem estar ligadas ao período de síntese do amido, apresentaram maior atividade com fitoglicogênio e amilopectina, enquanto a isoforma 3, que está mais relacionada à fase de degradação do amido, apresentou maior especificidade por  $\beta$ -dextrina limite, do que pelos demais substratos. Os resultados obtidos sugerem que a isoamilase de banana corresponde a isoforma 3 da isoamilase de batata, apresentando características de especificidade por substrato, tamanho e seqüência gênica muito semelhantes, como será demonstrado a seguir.



**Figura 10:** Comparação do perfil de atividade de isoamilase utilizando  $\beta$ -dextrina limite e glicogênio como substrato em bananas controle (esquerda) e tratadas com 10 ppm de etileno (direita), durante o amadurecimento. Os valores de atividade representam a média e o erro padrão de 3 repetições.

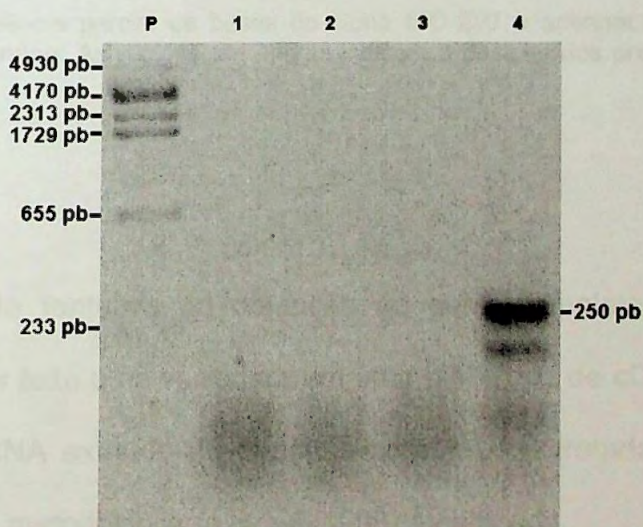
### 4.3. AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE ISOAMILASE

As primeiras tentativas de amplificação e clonagem de uma enzima desramificadora de amido foram feitas com cDNAs obtidos a partir de RNA total de bananas climatéricas, provenientes de experimentos anteriores. Como os ensaios de atividade e as PCR foram conduzidos paralelamente, e não havendo dados conclusivos sobre qual dos tipos de DBE estava presente em frutos de banana, foram testadas várias combinações de primers, planejados tanto com base em seqüências de isoamilase quanto pululanase. Os tamanhos esperados de fragmentos após amplificação por PCR estão descritos na Figura 11.



**Figura 11:** Tamanhos esperados de produtos de PCR (em pares de base) das combinações de primers Sentido e Reverso com base nas seqüência completa de pululanase (3000 pb) e isoamilase de arroz (2300 pb). S= primer sentido; R= primer reverso

As PCRs feitas com os primers somente para pululanase, não amplificaram nenhum fragmento (dados não apresentados), concordando com os ensaios negativos de atividade enzimática para pululanase, descritos anteriormente. Testando os primers restantes, feitos de acordo com seqüências comuns à pululanase e isoamilase, a combinação dos primers Sentido 12 e Reverso 7 possibilitou a amplificação de um fragmento de 250 pb (Figura 12), que apresentou tamanho de acordo com o esperado. Observou-se também que, quando a reação de PCR foi feita com apenas um dos primers (controles negativos) não ocorreu nenhuma amplificação, o que descartou a possibilidade de reações inespecíficas dos primers com o cDNA (dados não apresentados). O clone de DBE obtido em vetor pGEM-T, denominado ISO-250, foi digerido com as enzimas de restrição *Sac I* e *Apa I*, confirmando o tamanho do inserto (dados não apresentados).



**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de reações de PCR com cDNA de bananas climatéricas. P – padrão PTX, Linha 1 - reação com primers Sentido 12 e Reverso 7.

A seqüência de bases do clone ISO-250 (Figura 13) apresentou 63,5% de homologia com a isoamilase de arroz (Anexo 1). A seqüência do clone de banana correspondeu ao trecho compreendido entre as bases 820 e 1080 da seqüência completa do cDNA da isoamilase de arroz, a qual apresenta cerca de 2300 pb a partir do ATG inicial (Genbank AB015615; Fujita e col., 1999)

<b>GTG</b>	<b>ATC</b>	<b>ATG</b>	<b>GAC</b>	<b>GTT</b>	<b>GTC</b>	<b>TAT</b>	<b>AAC</b>	<b>CAT</b>	ACT	AAT	GAA	GCT	AAT	GAT	CGT	CAT	CCT	TAT	ACT	TCT
V	I	M	D	V	V	Y	N	H	T	N	E	A	N	D	R	H	P	Y	T	S
TCC	TTT	CGT	GGT	GTG	GAC	AAT	AAG	GTT	TAT	TAC	ATG	TTG	GAT	CCC	GAT	AAT	GGT	GCT	AAG	TAC
S	F	R	G	V	D	N	K	V	Y	Y	M	L	D	P	D	N	G	A	K	Y
CTG	AAT	TTT	TCA	GGC	TGT	GGA	AAT	ACA	TTA	AAC	TGC	AAT	CAC	CCT	GTC	GTC	ATG	GAA	CTT	ATT
L	N	F	S	G	C	G	N	T	L	N	C	N	H	P	V	V	M	E	L	I
CTT	GAC	AGT	TTA	AGA	CAT	TGG	GTT	AAC	GAG	TAC	<b>CAT</b>	<b>GTC</b>	<b>GAT</b>	<b>GGC</b>	<b>TTC</b>	<b>AGA</b>	<b>TTT</b>	<b>CAC</b>	<b>CTT</b>	<b>GCA</b>
L	D	S	L	R	H	W	V	N	E	Y	H	V	D	G	F	R	F	H	L	A

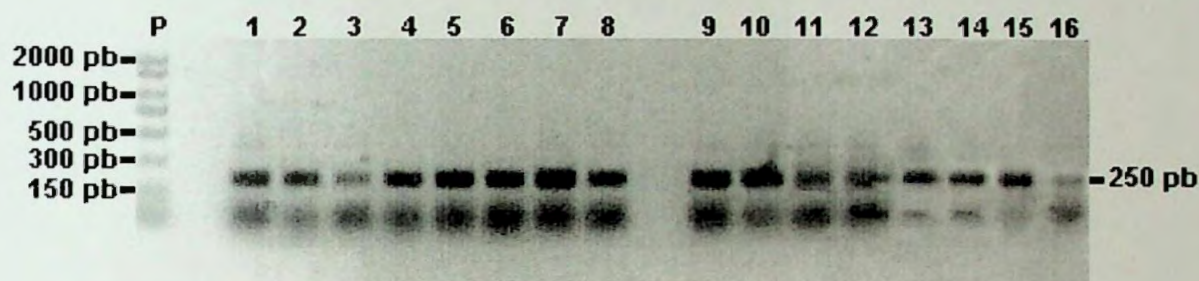
**Figura 13:** Seqüência parcial de bases do clone ISO-250 e aminoácidos deduzidos da isoamilase de banana. As regiões em negrito indicam a posição dos primers Sentido 12 e Reverso 7.

Na tentativa de obtenção do gene completo da DBE tipo-isoamilase, foi feita uma varredura em uma biblioteca de cDNA, construída a partir do RNA extraído de bananas com 3 DPC tratadas com etileno, utilizando-se a metodologia de Israel (1993) modificada.

Através de primers específicos da seqüência de isoamilase, planejados em função do sequenciamento do fragmento de 250 pb,

denominados  $S_{esp1}$  e  $R_{esp1}$ , o clone completo de DBE foi rastreado por PCR em placas de microtitulação conforme descrito em Material e Métodos.

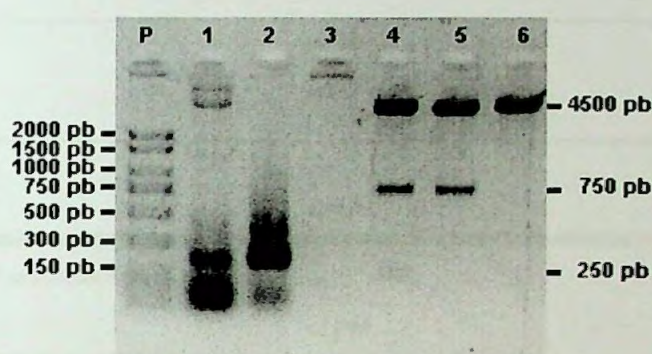
A Figura 14 ilustra o enriquecimento da biblioteca em relação ao fago contendo o clone de isoamilase. Nesta fase, todas as combinações de linha e coluna da placa de microtitulação apresentaram sinal positivo de amplificação do inserto de isoamilase.



**Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de reações de PCR com primers  $S_{esp1}$  e  $R_{esp1}$  a partir de biblioteca de cDNA. As reações de número 1 a 8 representam as combinações de linhas e as reações de 9 a 16 representam as combinações de colunas.

Após excisão *in vivo* do fago que continha o clone de isoamilase, a digestão do fagemídeo pBK-CMV obtido, liberou 2 fragmentos correspondentes ao gene que codifica a enzima: um de 750 pb e outro de 250 pb, totalizando 1000 pb que estão representados na Figura 15. Esse clone apresentou tamanho bastante inferior à seqüência completa de isoamilase de arroz, usada como referência. Quando seqüenciado, o clone não apresentou qualquer homologia com isoamilases de outras fontes vegetais, indicando que a seleção do fago na biblioteca de cDNA não havia sido correta. Em razão dos primers utilizados terem sido definidos com base em regiões conservadas de isoamilase, comuns à vegetais e microrganismos (incluindo *E.coli*), é provável que a hibridização cruzada

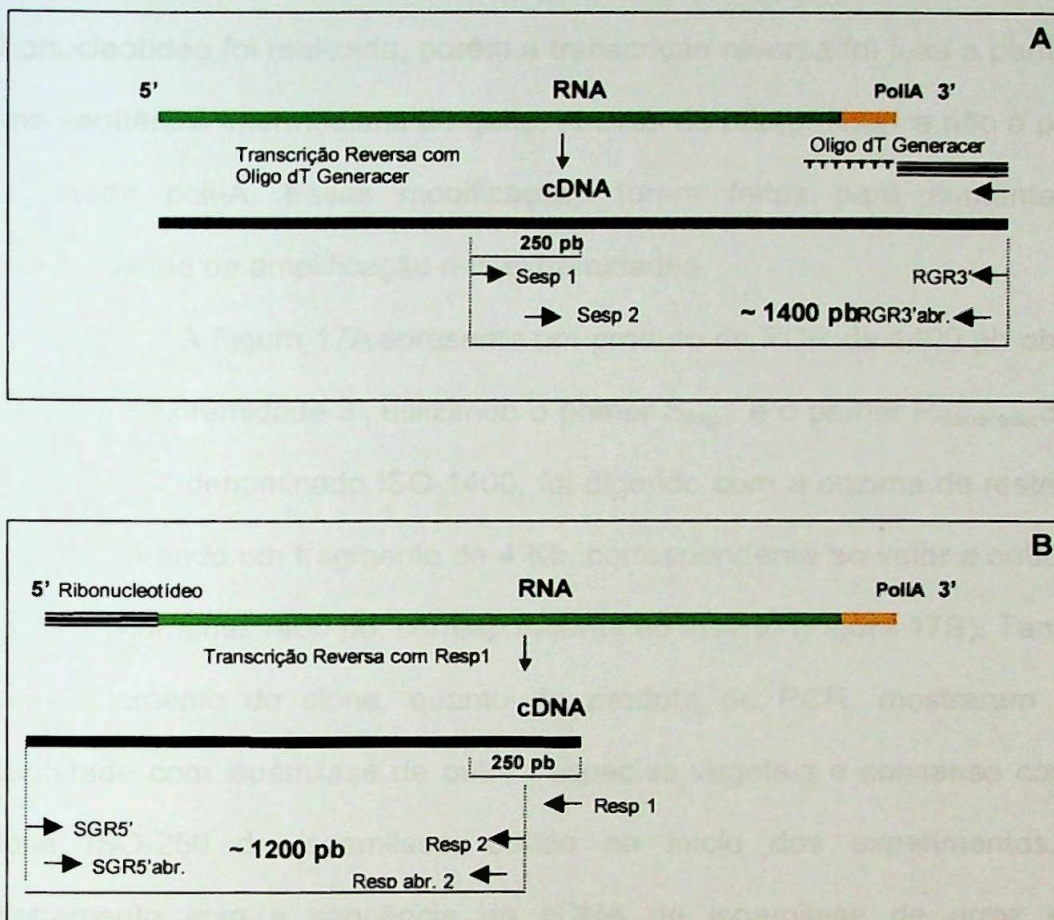
desses primers com a seqüência de isoamilase de *E. coli* presente nas amostras, em consequência da lise bacteriana pelo fago  $\lambda$ , tenha interferido nas análises, levando à obtenção de falsos positivos. Outro fator que pode ter interferido no rastreamento do gene da isoamilase na biblioteca de cDNA, refere-se provavelmente a sua baixa freqüência na biblioteca, tornando-o pouco representativo no conjunto de cDNAs presentes na biblioteca.



**Figura 15:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de reações de PCR com primers  $S_{esp}$  1 e  $R_{esp}$  1 (linhas 1 e 2) e digestão do clone de isoamilase contido em fagemídeo pBK-CMV, com enzimas de restrição *Sac* e *Kpn* I (linhas 4 a 6). Linha 1 – padrão, Linha 1 – amplificação do fagemídeo pBK-CMV com  $S_{esp}$  1 e  $R_{esp}$  1, Linha 2 – controle positivo, Linha 4 – fagemídeo digerido com *Sac* e *Kpn* I, Linha 5 – fagemídeo digerido somente com *Sac*, Linha 6 – fagemídeo digerido somente com *Kpn* I.

Como a varredura em biblioteca de cDNA não apresentou resultados satisfatórios, foi utilizada a técnica de RACE (*Rapid Amplification cDNAs Ends*), que permitiu a amplificação de insertos a partir das extremidades 5' e 3' do cDNA de bananas climatéricas, com cerca de 10% de amido.

Diferentemente das instruções do fabricante, foram feitos 2 cDNAs distintos para cada uma das extremidades, conforme esquematizado na Figura 16. Para a amplificação da extremidade 3' do cDNA, não foi feita a

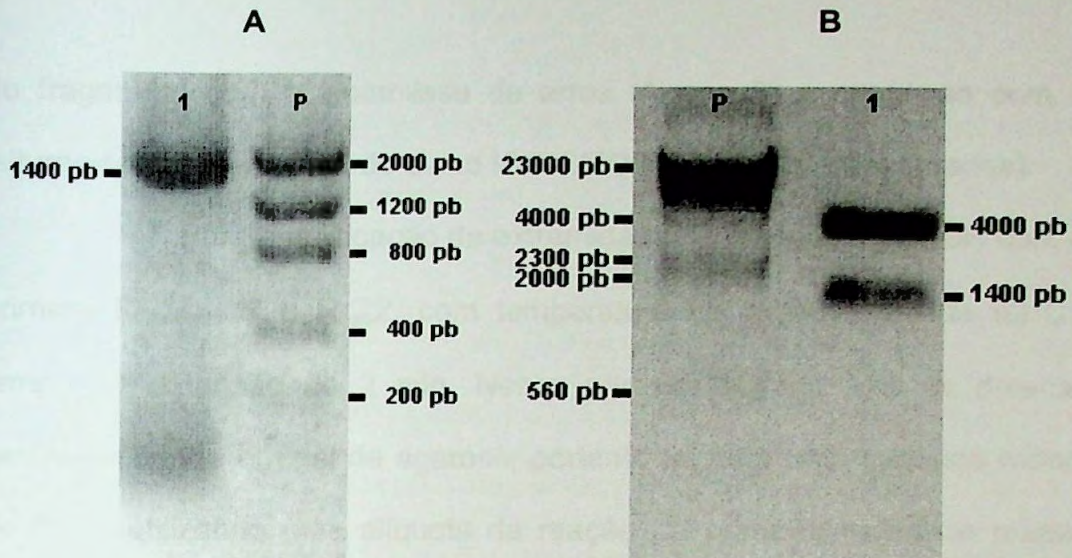


**Figura 16:** Representação esquemática da produção do cDNA de bananas na técnica de RACE. **A)** RNA, sem ligação do ribonucleotídeo à extremidade 5' e transcrição reversa com oligo dT Generacer ; **B)** RNA com ligação do ribonucleotídeo à extremidade 5' e transcrição reversa com primer  $R_{esp1}$ .

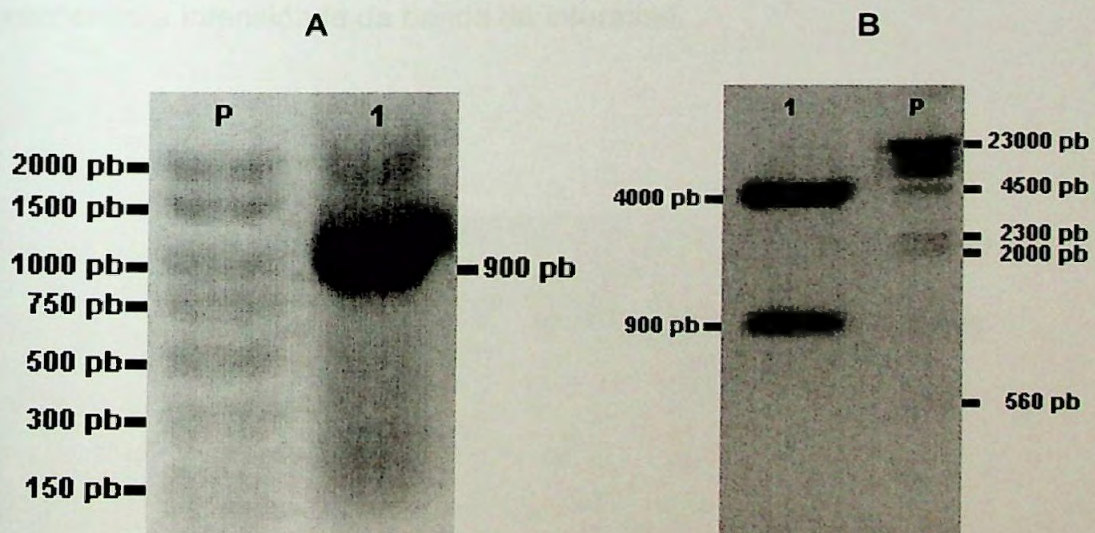
ligação do ribonucleotídeo à extremidade 5' e a transcrição reversa foi feita a partir da cauda poli-A. Para a amplificação da extremidade 5', a ligação do ribonucleotídeo foi realizada, porém a transcrição reversa foi feita a partir de uma seqüência intermediária do gene, através do primer  $R_{esp1}$  e não a partir da cauda poli-A. Essas modificações foram feitas para aumentar a especificidade de amplificação das extremidades.

A Figura 17A apresenta um produto de PCR de 1400 pb obtido a partir da extremidade 3', utilizando o primer  $S_{esp1}$  e o primer  $R_{Generacer3'}$ . O clone obtido, denominado ISO-1400, foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*, liberando um fragmento de 4 Kb, correspondente ao vetor e outro de aproximadamente 1400 pb, correspondente ao inserto (Figura 17B). Tanto o sequenciamento do clone, quanto do produto de PCR, mostraram alta identidade com isoamilase de outras espécies vegetais e consenso com o clone ISO-250 de isoamilase, obtido no início dos experimentos. O alinhamento com a seqüência de cDNA de isoamilase de arroz está apresentado no Anexo 2.

Com base na leitura Sentido do fragmento de 1400 pb, foi planejado um novo primer, denominado  $S_{esp3}$ , localizado aproximadamente entre as bases 480 e 500 do inserto lido, que amplificou um fragmento de aproximadamente 900 pb, quando usado em conjunto com o  $R_{Generacer3'}$  (Figura 18A). Esse primer foi feito para obtenção do restante da leitura da extremidade 3', visto que o fragmento de 1400 pb era muito longo. De igual forma, esse inserto foi clonado em vetor TOPO-TA e digerido com *EcoRI*, liberando um inserto com 4 Kb e outro com cerca de 900 pb (Figura 18B). O sequenciamento deste clone, denominado ISO-900, confirmou a identidade



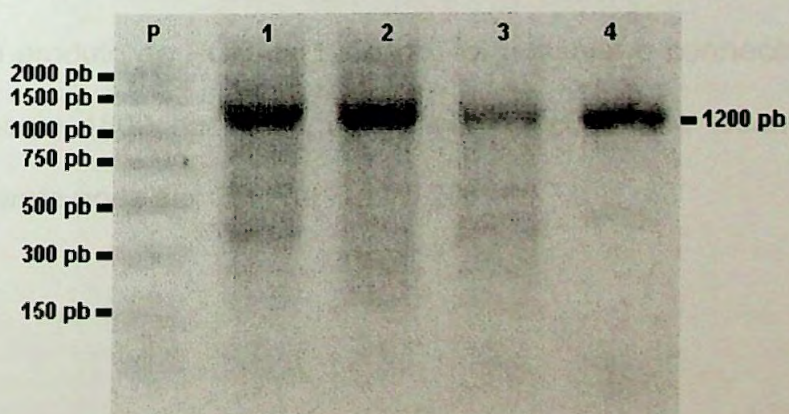
**Figura 17:** **A)** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR (1400 pb) da RACE realizada com cDNA de bananas. P – Padrão PCR Marker, Linha 1 –  $S_{esp1}$  x  $R_{Generacer3'}$ . **B)** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) da digestão do clone ISO-1400 com *EcoRI*. P – Padrão Hind III, Linha 1 – Produto de digestão (4000 pb – plasmídeo, 1400 pb – inserto de isoamilase)



**Figura 18:** **A)** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos de PCR (900 pb) da RACE realizada com cDNA de bananas. P – Padrão PCR Marker, Linha 1 –  $S_{esp3}$  x  $R_{Generacer3'}$ . **B)** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) da digestão do clone ISO-900 com *EcoRI*. P – Padrão Hind III, Linha 1 – Produto de digestão (4000 pb – plasmídeo, 900 pb – inserto de isoamilase)

do fragmento com a isoamilase de arroz (Anexo 3) e consenso com as leituras sentido e reversa do clone ISO-1400 (dados não apresentados).

Para amplificação da extremidade 5', foi feita uma PCR com os primers  $S_{\text{Generacer}5'}$  e  $R_{\text{esp}2}$ , com temperatura de hibridização de 62°C e tempo de extensão de 2 min. Nessa primeira rodada não se detectou nenhuma banda em gel de agarose, portanto foi feita uma segunda rodada de PCR, utilizando uma alíquota da reação da primeira rodada e primers abrigados aos anteriormente usados, denominados  $S_{\text{Generacer}5'abr.}$  e  $R_{\text{esp}2abr.}$ , numa temperatura de hibridização de 72°C, tempo de extensão de 2 min e 40 ciclos. O resultado da segunda PCR foi otimizado através da diluição do DNA molde da 1ª rodada. Foram testadas diluições de 0, 10, 100 e 1000 vezes e conforme Figura 19, percebe-se que a diluição de 1000 vezes foi a que apresentou melhor resultado, eliminando interferentes e mantendo a intensidade da banda de interesse.



**Figura 19:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto da 2ª rodada de PCR da RACE realizada com cDNA de bananas, utilizando DNA molde da 1ª. rodada em diferentes diluições. P – Padrão PCR Marker, Linha 1 – 0 x, Linha 2 – 10 x, Linha 3 – 100 x, Linha 4 – 1000 x.

O fragmento de 1200 pb foi inicialmente seqüenciado a partir do produto de PCR e mostrou-se similar com a seqüência de arroz, conforme pode ser observado no Anexo 4. O inserto apresentou consenso com o clone ISO-250 da isoamilase da banana já seqüenciado anteriormente. Foi possível seqüenciar o fragmento somente com o primer R<sub>esp2abr.</sub>, devido ao seqüenciamento com outros primers não ter apresentado bons resultados, apesar das inúmeras tentativas. Aparentemente, o primer S<sub>Generacer5'abr.</sub> complementar ao ribonucleotídeo ligado a extremidade 5' pareceu em alguma outra região do cDNA no momento das amplificações por PCR, uma vez que sua seqüência foi identificada no início das leituras sentido e reversa dos clones obtidos. O seqüenciamento do produto de PCR com o primer S<sub>Generacer5'abr.</sub> foi possível devido a essa ligação indesejada do ribonucleotídeo em outra região do gene, diminuindo a especificidade das amplificações dos fragmentos de Sanger, o que não permitiu determinar o ATG inicial do gene.

Através dos seqüenciamentos dos clones ISO-1400 e ISO-900 e de parte do produto de PCR de 1200 pb, foi possível o conhecimento de aproximadamente 1800 bases da seqüência de cDNA da isoamilase de banana, conforme pode ser visto na Figura 20.

```

1 TGG GTG tTA AKR AAA AAA yCC CCA CAT TTA TGG RAA CTG GGA ATC AAT GCT GTG GAG CTC
W V L ? K K ? P H L W ? L G I N A V E L
61 TSG CCA GTT TTK GAG TTT GAT GAA CTC GAW TTT CAG AGG TAC CCA AAT CCC AGA GAT CAC
? P V ? E F D E L ? F Q R Y P N P R D H
121 WTG WTT AAC ACC KGG GGC TAC TCC ACC TTA AAh TTT TTT TGC CCC CAG AGC CGA TAT GCT
? ? N T ? G Y S T L ? F F C P Q S R Y A
181 AGT GCT GGT GGT GGA CCG TTG GTT GCT TCT CAT GAG TTC AAA CAG ATG GTG AAA AST TTG
S A G G G P L V A S H E F K Q M V K ? L
241 CAC AAT GCT GGC ATT GAG GTG ATC ATG GAC GTT GTC TAT AAC CAT ACT AAT GAA GCT AAT
H N A G I E V I M D V V Y N H T N E A N
301 GAT CGT CAT CCT TAT ACT TCT TCC TTT CGT GGT GTG GAC AAT AAG GTT TAT TAC ATG TTG
D R H P Y T S S F R G V D N K V Y Y M L
361 GAT CCC GAT AAT GGT GCT AAG TAC CTG AAT TTT TCA GGC TGT GGA AAT ACA TTA AAC TGC
D P D N G A K Y L N F S G C G N T L N C
421 AAT CAC CCT GTC ATG GAA CTT ATT CTT GAC AGT TTA AGA CAT TGG GTT AAC GAG TAC
N H P V V M E L I L D S L R H W V N E Y
481 CAT GTC GAT GGC TTC AGA TTT CAC CTT GCA AGT ATT CTT TGC CGA GGG ACC GAT GGT TCT
H V D G F R F H L A S I L C R G T D G S
541 CCT CTT AAT TCA CCT CCA TTA GCC AAG GCA ATT GCT AAA GAT GCT GTA CTT TCA AGG TGT
P L N S P P L A K A I A K D A V L S R C
601 AAG ATA ATT GCT GAA CCA TGG GAC TGT GGA GGA CTT TAT CTT GTG GGA AAT TTT CCA AAT
K I I A E P W D C G G L Y L V G N F P N
661 TGG GAC CGG TGG GCC GAA TGG AAT GGA AAG TAC CGT GAT GAT ATT CGA AGA TTC ATG AAG
W D R W A E W N G K Y R D D I R R F M K
721 GGT GAT TGT GGT ATG AAA GGG ACC TTT GCA ACT CGT ATA TCT GGA TCT GCT GAC CTC TAC
G D C G M K G T F A T R I S G S A D L Y
781 CAG GTG AAC AAG CGC AAA CCC TAC CAC AGT ATC AAT TTT GTG ATA GCA CAT GAT GGG TTT
Q V N K R K P Y H S I N F V I A H D G F
841 ACA CTG TGT GAT CTT GTT TCT TAC AAT TTC AAG CAT AAT GAT GCT AAC GGG GAA GGT GGC
T L C D L V S Y N F K H N D A N G E G G
901 AAA GAT GGA AGC AAT GAC AAT TTT AGC TGG AAT TGT GGT GTT GAA GGA GAA ACG GAT GAT
K D G S N D N F S W N C G V E G E T D D
961 GTT GAT ATT ATA GGT CTT CGC TCA CGG CAA ATG AAG AAC TTC CAT TTG GCC TTA ATG ATC
V D I I G L R S R Q M K N F H L A L M I
1021 TCT CAG GGA ACA CCA ATG ATG CTA ATG GGG GAT GAA TAT GGC CAT ACA CGT TAT GGA AAC
S Q G T P M M L M G D E Y G H T R Y G N
1081 AAT AAT AGC TAT GGA CAT GAC ACT TCC ATA AAA ATT TTC AGT GGA AAC AGT TGG AAG AAA
N N S Y G H D T S I K I F S G N S W K K
1141 GAA GGG GCG GTC ATT TTA GAT TTT TCT GTG AGA ATG ATA AAA TTT CGC TGC AAG CAA TCC
E G A V I L E F S V R M I K F R C K Q S
1201 CAT GTT TGC GAC AAG ACA GAT TTC TTA CCA AAA AAT GAT GTT GCA TGG CAT GAA GAC AAC
H V C D K T D F L P K N D V A W H E D N
1261 TGG AGC AAC CAG GAG AGC AAA TTC TTA GCA TTT ACG CTT CAT GAA AAT CAG TTT GGA GGA
W S N Q E S K F L A F T L H E N Q F G G
1321 GAC ATC TAT TTG GCT TTT AAG GCY CAT GAT TAT TAT GTC AAA GCT GCA GTA CCT TCA CCA
D I Y L A F K A H D Y Y V K A A V P S P
1381 CCA CAT AAG AAG AGA TGG CCC CGA GTG GTT GAC ACA AAT CTG GAA TCT CCC AAA GAT TTT
P H K K R W P R V V D T N L E S P K D F
1441 GTT CCC GAA GGT GTA CCA TTC AGC AAC ACC AGT TAC AAT ATC GCT TCA TAT TCT GCA GTT
V P E G V P F S N T S Y N I A S Y S A V
1501 CTC CTT GAG GAA AGC CAT GAT CCT GTG ACA TTT GTT CTC CAG AAT CAT GAT CAA TAA agg
L L E E S H D P V T F V L Q N H D Q *
1561 act ccc act gtt tga caa att gct gcc taa ggg tta gtc agt cca tct gct gac att ata
1621 tag gag gtc gga gag gga gac gaa gga gaa tta aaa agg aga gag gca ggg ggt tgg att
1681 gaa ggg aat tat ttg cta taa cta tcc cat aaa taa att tta gaa aat tga cac ata ata
1741 aga aat aat gtt ctg (a)18

```

**Figura 20:** Sequência parcial de bases do cDNA de isoamilase de banana e seus respectivos aminoácidos deduzidos. Os pontos de interrogação (?) representam aminoácidos que não foram corretamente deduzidos, por problemas de leitura do códon de nucleotídeos correspondentes e o asterisco indica o possível códon de terminação da proteína.

A seqüência de bases do cDNA de banana e aminoácidos deduzidos apresentada na Figura 20 apresentou cerca de 60% de homologia a isoamilases de outros vegetais. Alguns trechos permaneceram com leituras confusas no sequenciamento, especialmente em relação ao fragmento de 1200 pb da extremidade 5', devido aos problemas ocorridos na clonagem, descritos anteriormente.

Uma fase aberta de leitura (Open Read Frame - ORF) obtida a partir da seqüência deduzida de aminoácidos mostrou uma boa homologia com isoamilase de arroz, milho, cevada e batata, as quais estão apresentadas na Figura 21.

A análise da seqüência de aminoácidos de isoamilase de banana indicou sua semelhança às amido hidrolases e demais enzimas relacionadas, descritas por Jespersen e col.(1993), que caracterizam-se por apresentar uma estrutura tridimensional na forma de barril. Este  $(\alpha/\beta)_8$ -barril é formado por 8 seqüências intercaladas de  $\beta$ -folhas pregueadas e  $\alpha$ -hélices, com regiões altamente conservadas. Pôde-se observar que a isoamilase de banana possui 4 regiões específicas ao domínio  $(\alpha/\beta)_8$ barril, denominados motivos I, II, III e IV (regiões sombreadas na Figura 21), os quais foram descritos em para todas as isoamilases estudadas até o momento. Essas regiões também estão presentes em pululanases, porém a isoamilase de banana é mais similar às isoamilases de microrganismos, do que às pululanases de fontes vegetais. Beatty e col. (1999) verificaram essa similaridade para isoamilase de milho, o que pode indicar que as enzimas desramificadoras divergiram antes do estabelecimento do Reino Vegetal e

241							
Osa	.....	.....	.....	..s..ve..	.....i...	.y.....	v.....
Hvu	.....e.....	.....	.....	..d..ve..	..f.....	.y.....	.....
Zma	.nk.....	..g.h.....	.....	..n..ktk..	.....	.....	.....
St3	slp...gk.	..ni.e.....	..nv.a.a	det..lqdqr	.s.l.lie.i	p.ll...i.a	v..l.vf.d
Mac	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CON	YSTFDWQGD	PLRYPQKDLV	IYEMHLRGT	KH-SSN--HP	GTYIGAVSKL	DHLKELGVNC	IELMPCHEFD
311							
Osa	.....	.c...m...	.....	i...g...	..rd.....	.....	I
Hvu	....at....	.....m....	.....	t..t.g..k.	..rdg....	.....s....	.....l....
Zma	.....	.....m.....	.....	a...s..d	s.cg.....	a.....	.....
St3	.....	---mi.t..	.....a.	s..ascg.g	gvpr.sv...	em.kal.ga.	....l...ye
Mac	<b>ELxfqrYpnp</b>	<b>r.dhxxNtxG</b>	<b>YSTlxFFcPq</b>	<b>sRYaSaG--g</b>	<b>gplvAshEFK</b>	<b>qmVxklHnaG</b>	<b>IEVIMDVVYN</b>
CON	ELEYFSY---	-SSSKKNFWG	YSTINFFSPM	-RYSS-GIRN	CG--AINEFK	TFVREAHKRG	IEVIMDVVFN
381							
Osa	.....k..	.....	.....	.....	.....	.....	II
Hvu	.....n..	.....v.	t.....	.....	.....	..q.....	.....m...i..
Zma	.....k..	.....	.....	.....	.....	.....	.....
St3	..n.a---	Ytt.....	.v...vdlnn	h---nfa..	.....t	.m.l.les..	h...y...
Mac	<b>HTnEaNdrhP</b>	<b>ytsSFRGvDN</b>	<b>kvYYMLdPdn</b>	<b>gakylnfSGC</b>	<b>GNTlNCNHPV</b>	<b>VmElIIdaLR</b>	<b>hWVnEyHVdG</b>
CON	HTAEGNE-GP	IL-SFRGIDN	STYYMLAPK-	-GEFYNSGC	GNTFNCNHPV	VREFIVDCLR	YVVTMhVdG
451							
Osa	.....m..	..c.....	.....v....	t.....at.	.....	..d.....	.....
Hvu	.....m..	..s....pi.	.....a....	.....	.....	.....	.....
Zma	.....	..c.....	.....m....	.....	.....	.....	.....
St3	.....v..	.....	.....	..d...ina.	..vka..k.s	v.src.i...	p..c...l.
Mac	<b>FRFhLASILc</b>	<b>RG-----</b>	<b>-----</b>	<b>-TdGsPLnsP</b>	<b>PLakaIakDa</b>	<b>vLsrcKiIAE</b>	<b>pWdcGGLYLv</b>
CON	FRFDLASILT	RG-SLWDPVN	VYGSPIEGDM	ITTGTPLV-P	PLIDMISNDP	ILGGVKLIAE	AWDAGGLYQV
521							
Osa	.....ki..	.....	.....	..g.....	..h.....	.....	.....
Hvu	.....v..	.....	.....	..g.....	.....	.....	.....
Zma	.....v..	.....	.....	..g.....	.....	.....	.....
St3	.k..n.dr.a	.....di	r...da.m	k.n..tria.	.ad..rvnk.	..y..v..i	.....y..
Mac	<b>GnFPnWdrWa</b>	<b>EWNGKYRddi</b>	<b>RrFmKGdcGm</b>	<b>kGtFAtRisG</b>	<b>SadLYQvnrR</b>	<b>KPyHSINfVi</b>	<b>ABDGFTLcDL</b>
CON	GQFPHWN-WS	EWNGKYRDIV	RQFIKGTDFG	AG-FAECLCG	SPQLYQAGGR	KPWHsINFVC	ABDGFTLADL
591							
Osa	....k...s	.....	.....	..g.....	.....	..s.....	.....
Hvu	...hn...p	.....	.....	..rs....	.....	.....	..i.....
Zma	...s....	..f.....	.....	..s...r.	.....	.....	.....
St3	.s..n.h.da	..g.-.c.	d.f.....i.	..tsdanina	.s...k..h	la.....t.	..ml.....
Mac	<b>VsYNfKhNda</b>	<b>NGEgkDGsN</b>	<b>dnfSWNCvE</b>	<b>GETddvdiig</b>	<b>LRsRQmKNFh</b>	<b>laIMiSQGTp</b>	<b>MAlMGDEYGH</b>
CON	VTYN-KYNLS	NGEDNRDGEN	HNLSWNCGEE	GEFA-LSVKR	LRRKQMRNFF	VCLMVSQGVp	MFYMGDEYGH
661							
Osa	.....	.....	d....-....	q...s....	.....a	...a..h.	.....
Hvu	.....	..s.....	e.....	.....	.....	.....	.....
Zma	.....	.....	d...q...	y...r...e.	..e.....e	...se.k.	.....
St3	.ry...s.g	..tai.n.q.	gql.arkn.h	fr.fsk.i..	.lshnv.rke	n.iekndit.	ledn-----w
Mac	<b>TryGNnNsYg</b>	<b>HDtsikiFsn</b>	<b>-KKEgavile</b>	<b>--FavrmiKF</b>	<b>Rckqshvcdt</b>	<b>DFlpkndvaW</b>	<b>Hednwnsqes</b>
CON	TKGGNNNTYC	HDHYVNYFRW	-KKEE-SSDL	-RFC-LMTKF	RKQCESLGL-	DFPT-QRL-W	HGHQPGKPDW
731							
Osa	..t.....s	t.....	....a....a	.....p.y	.....	p.....d	....v.pstc
Hvu	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Zma	..a.....t	m.....	....t...v	.....s.f	.....	.....	....avtyyq
St3	ncc...l..m	lh.gng.d..	l...hfsikt	aips.pr-nr	s.yr....nl	ks.d..v.e.	vs-----
Mac	<b>kflaftlhen</b>	<b>qfggdiylaf</b>	<b>kahdyvkaa</b>	<b>Vpfpftphkk</b>	<b>RWprVVDtnl</b>	<b>EsPkDFvpeG</b>	<b>vPfanTeyni</b>
CON	SE-SRFVAF-	-KDETKGEIY	VAFN-SHLP-	VVGLPER-G-	RWEPVVDTGK	EAPYDFLTDG	LPDR-T----
801							
Osa	sli.stpist	.csatppss.	.cslmier.k	ys.v*----	-----	-----	-----
Hvu	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Zma	f.hflnsnly	.mlsyssii.	vlrpdv*----	-----	-----	-----	-----
St3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Mac	<b>aSySavllce</b>	<b>shdpvtfvlq</b>	<b>Nhdq*----</b>	-----	-----	-----	-----
CON	-S-S-----	P-----L	N-----T-	-QI-----	-----	-----	-----

Figura 21: Alinhamento de aminoácidos da sequência deduzida da isoamilase de banana com outras espécies vegetais disponíveis no Genbank. Osa-arroz (AB015615); Hvu-cevada (AF142589); Zma-milho (AF030882); St3-batata (AY132998); Mac-banana. Os pontos e letras maiúsculas representam resíduos idênticos ao consenso e

letras minúsculas os resíduos diferentes do consenso. Algarismos romanos sobre área sombreada representam regiões conservadas do  $(\alpha/\beta)_8$ -barril. Os símbolos (+) e (#) representam os resíduos de ligação com cálcio e resíduos do sítio catalítico, respectivamente. A região destacada em amarelo ressalta o polimorfismo comum à isoforma 3 de batata.

que a função de cada tipo de DBE foi selecionada independentemente durante a evolução das plantas.

No domínio que compõe o  $(\alpha/\beta)_8$ -barril foram encontrados resíduos ácidos altamente conservados – D, E, D (aspartato, glutamato e aspartato) que parecem ter relação direta com catálise de ligações glicosídicas (Janeček e col., 1997; Kristensen e col., 1999). Na seqüência de aminoácidos de banana, esses resíduos também foram localizados e estão destacados na Figura 21 (símbolo #).

Outra observação importante em relação às amido hidrolases é que, em geral, elas apresentam um sítio de ligação com cálcio. Este sítio é formado pelos resíduos asparagina (N), aspartato (D) e glicina (G) e também foi encontrado na seqüência da isoamilase de banana (Figura 22), reforçando as evidências da identidade da proteína, como componente da superfamília de amilases.

Pode-se verificar que entre os aminoácidos 463 e 481, a seqüência de isoamilase de banana apresenta uma lacuna em relação a quase todas espécies comparadas (destacada em amarelo na Figura 21). Essa diferença de aproximadamente 20 resíduos, localizada entre os *loops* 4 e 5 da estrutura  $(\beta/\alpha)_8$ -barril, foi recentemente descrita em tubérculos de batata e está relacionada a seqüência do cDNA que codifica a isoforma 3 de isoamilase, já citada anteriormente por apresentar maior especificidade por

$\beta$ -dextrina limite (Hussein e col., 2003). MacGregor (2001) sugeriu que diferenças nos intervalos dos *loops* entre as estruturas  $\beta$ -folhas e  $\alpha$ -hélices promovem a especificidade distinta por substrato para as amido hidrolases com estrutura de  $(\beta/\alpha)_8$ -barril. Esse polimorfismo foi também encontrado em *E.coli* e *Chlamydia*, as quais hidrolisam preferencialmente  $\beta$ -dextrina limite (Hussein e col., 2003). No entanto, a maioria das isoamilases estudadas em vegetais mostraram-se mais similares as isoformas 1 e 2 encontradas também na batata, as quais apresentam afinidade por substratos maiores como a amilopectina, por exemplo. Isso pode indicar, que assim como nas demais espécies, exista mais de uma isoamilase em bananas e que cada uma dessas isoformas atue em um complexo multimérico, de acordo com o substrato disponível. No entanto, com a metodologia usada neste trabalho, somente uma isoforma de isoamilase foi detectada, a qual apresenta características muito parecidas à isoforma 3 de isoamilase de batata.

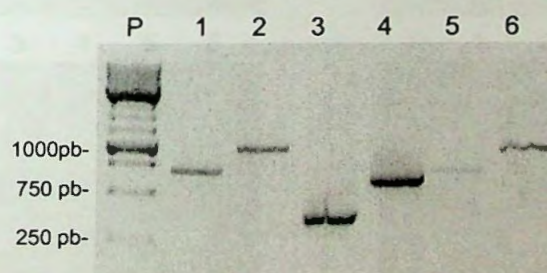
#### **4.4. EXPRESSÃO DE ISOAMILASE EM *E.coli* E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIIS**

Com a clonagem e sequenciamento de aproximadamente 2/3 do cDNA da isoamilase foi possível introduzir em *E.coli*, uma porção do gene que codifica para isoamilase, com o objetivo de expressar parcialmente a proteína recombinante. O sistema de expressão da proteína em microrganismo foi a alternativa mais promissora de obtenção da isoamilase pura para produção de anticorpos anti-isoamilase destinados à análise de

expressão da enzima durante o amadurecimento da banana. Purificações da isoamilase via cromatografia seriam bastante complicadas, uma vez que não existe um substrato suficientemente específico para monitorar a atividade da enzima durante as etapas de purificação.

A Figura 22 apresenta os insertos amplificados por PCR, através da combinação de primers sentido e reverso planejados para manter corretamente a seqüência da proteína durante a expressão em *E.coli*.

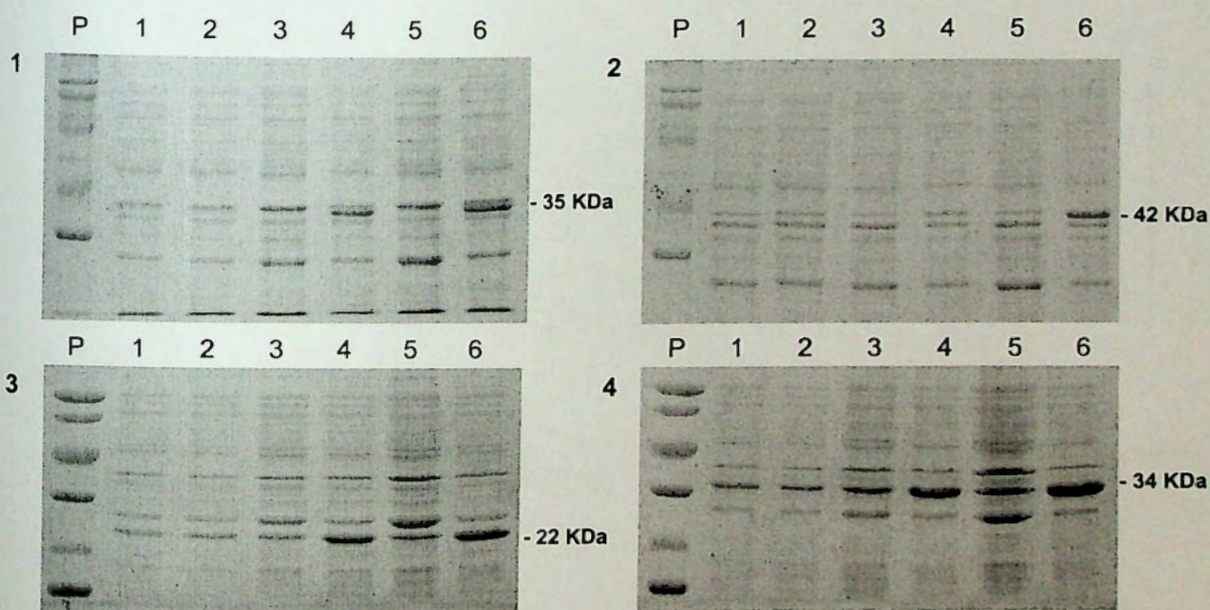
Depois de serem recortados de géis preparativos, os insertos 1, 2, 3 e 4 (Figura 22), por apresentarem maior intensidade das bandas, foram ligados em vetor pCR-T7/TOPO-TA e usados na transformação de *E.coli* TOP10F'. Os plasmídeos obtidos foram seqüenciados e apresentaram 100% de identidade com isoamilase de banana (dados não apresentados).



**Figura 22:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos de PCR, com cDNA de bananas climatéricas, obtidos pelas seguintes combinações de primers: 1) S2xRCT1 (730 pb); 2) S2xRCT2 (1000 pb); 3) S3xRCT1 (360 pb); 4) S3xRCT2 (640 pb); 5) S2abrxRCT1 (715 pb); 6) S2abrxRCT2 (990); P - Padrão 250 ladder (Gibco)

Conforme pode ser visualizado na Figura 23, os 4 insertos introduzidos na cepa BL21(DE3)pLysS de *E.coli* foram expressos. As

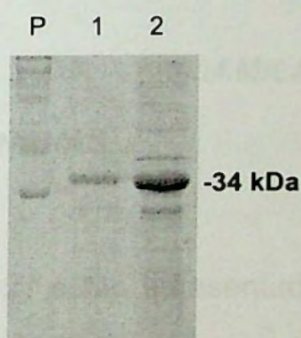
proteínas recombinantes foram denominadas ISO-1, ISO-2, ISO-3 e ISO-4, que correspondem aos insertos 1, 2, 3 e 4 e estão evidenciadas na Figura 25, com o tamanho aproximado de cada uma, em kDa. A primeira e segunda expressão piloto (ISO-1 e ISO-2) apresentaram um nível mais baixo de produção de proteína recombinante em comparação a terceira e quarta expressão (ISO-3 e ISO-4), após 4 h de indução com IPTG. Em virtude deste resultado, a proteína ISO-4, com cerca de 34 kDa foi escolhida como antígeno para produção de um anticorpo policlonal capaz de reconhecer a isoamilase de extratos de banana.



**Figura 23:** Eletroforese de proteínas das expressões piloto de isoamilase em *E.coli*, em géis de poliacrilamida. 1) ISO-1 (S2xRCT1); 2) ISO-2 (S2xRCT2); 3) ISO-3 (S3xRCT1); 4) ISO-4 (S3xRCT2). P - Padrão; Linhas 1 e 2 - 0 h; Linha 3 e 4 - 2 h; Linha 5 e 6 - 4 h. Linhas ímpares - sem indução; Linhas pares - com indução. Gel 1 e 2, 10% acrilamida e padrão SDS-6H; Gel 3 e 4, 12% acrilamida e padrão LMW.

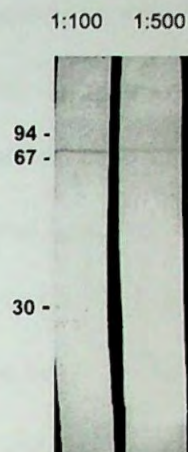
A Figura 24 ilustra o resultado de uma purificação da proteína recombinante ISO-4, após eluição da resina de afinidade *ProBond* e concentração em Centricon-100. O rendimento desta purificação foi de 300  $\mu\text{g}$  de proteína pura, a partir de 50 mL de cultura de células de *E.coli*.

Como foram percebidas algumas bandas inespecíficas no gel, depois da purificação em resina de afinidade, foi feito um gel preparativo, no qual 100  $\mu\text{g}$  de proteína eluída da resina foi aplicada, recortada e solubilizada em tampão PBS, num volume de 1 mL para posterior emulsificação com adjuvante de Freund.



**Figura 24:** Eletroforese da proteína recombinante em gel de poliacrilamida 12%, após purificação. P - Padrão SDS-6H; Linha 1 - Proteína purificada (isoamilase); Linha 2 - controle positivo (células induzidas 4 h)

Após as imunizações, foram coletadas amostras de sangue dos coelhos para confirmação da produção do anticorpo e teste de título. Na Figura 25 pode-se verificar que o anti-soro dos animais foi capaz de reconhecer claramente, uma subunidade de proteína em extratos de banana, com tamanho estimado ao redor de 80 kDa.



**Figura 25:** Western blot de proteínas totais de bananas tratadas com 10 ppm de etileno aos 5DPC, para teste de título do anti-soro anti-isoamilase obtido após 3 imunizações de coelhos raça Nova Zelândia. Os números à esquerda da figura representam os padrões de peso molecular em kDa e acima da figura encontram-se as diluições testadas.

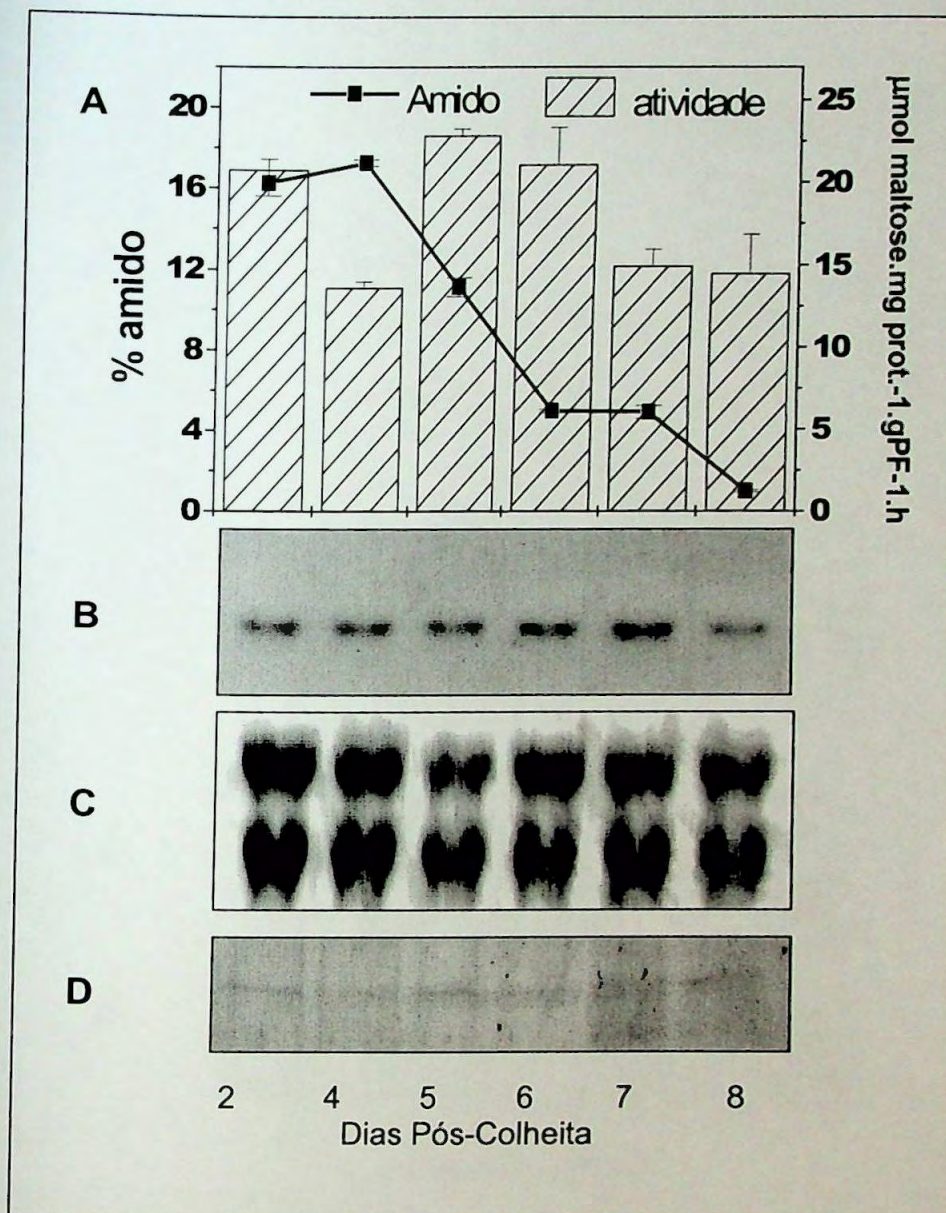
#### **4.5. EXPRESSÃO DA ISOAMILASE DURANTE O AMADURECIMENTO DE BANANAS**

Nas Figura 26 e 27 estão apresentados os perfis de atividade enzimática, teor de amido, nível de transcrito (*Northern blot*) e isoamilase expressa (*Western blot*) durante o amadurecimento de bananas controle (Figura 26) e tratadas com 10 ppm de etileno (Figura 27), respectivamente.

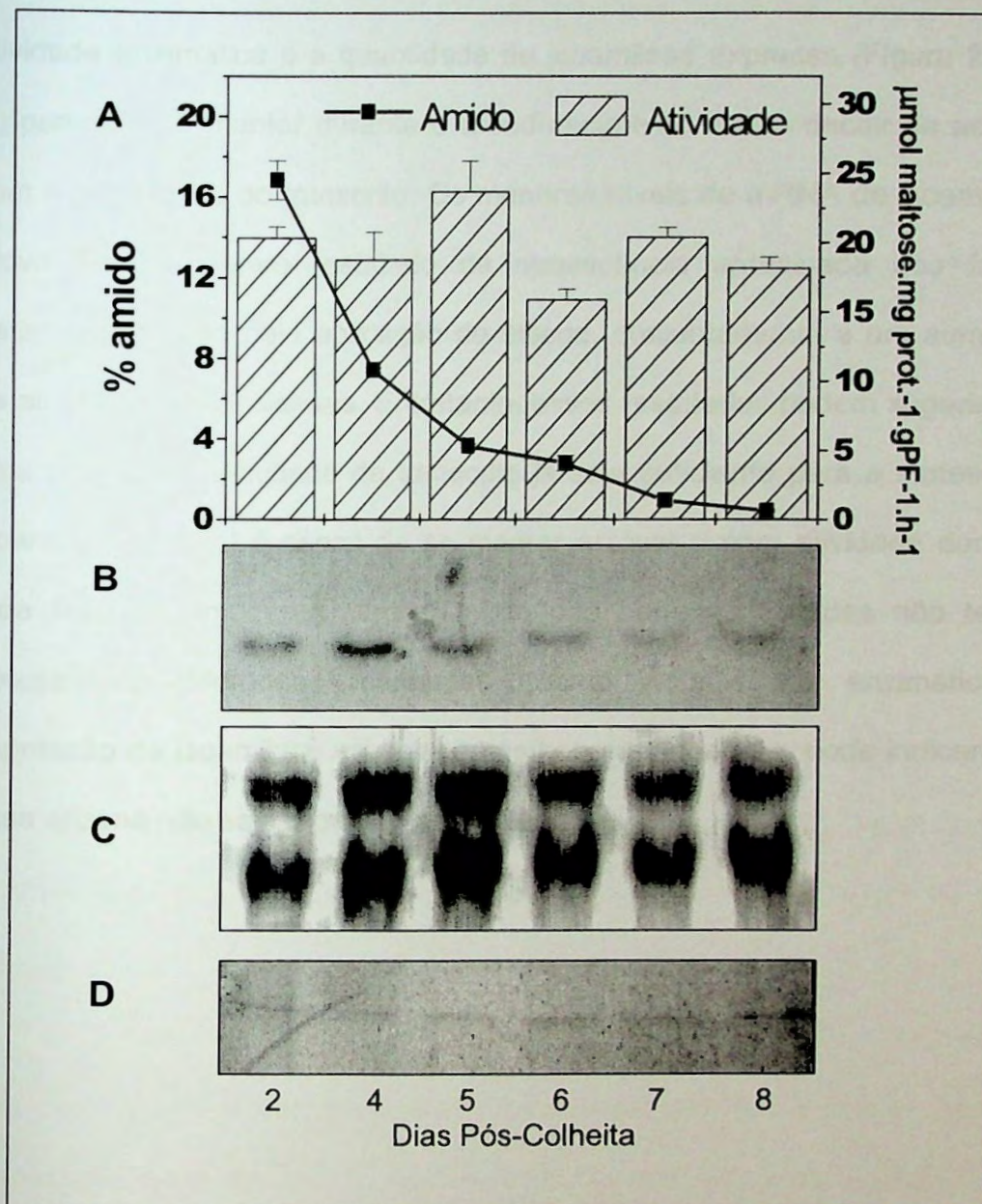
Como já discutido anteriormente, o amido é metabolizado por uma vasta gama de enzimas de modo altamente sincronizado. As enzimas desramificadoras possuem a função chave de hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha(1-6)$  da amilopectina e de seus produtos de degradação. É possível que as DBEs atuem desde o início da quebra do amido, a partir de substratos maiores e mais ramificados, até substratos simples, com baixo número de moléculas, como as dextrinas, ao fim do amadurecimento do

fruto. A especificidade por diferentes substratos pode indicar que existam várias formas de DBEs atuando conjuntamente na mobilização do amido. Isoformas que preferem substratos maiores diminuiriam sua expressão e/ou atividade com o amadurecimento, enquanto formas que preferam substratos menores seriam mais efetivas neste período. Tais compensações poderiam equilibrar a atividade enzimática desramificadora ao longo do amadurecimento, não acarretando alterações representativas no perfil geral de sua atividade. Conforme foi visto no item 4.2, a atividade de isoamilase, independente do substrato, não apresentou grandes incrementos durante o amadurecimento, porém é notória a preferência da enzima pela  $\beta$ -dextrina limite. A exemplo do trabalho realizado em tubérculos de batata (Hussein e col., 2003), frutos de banana parecem ter pelo menos uma forma de isoamilase, a qual guarda muitas semelhanças com a isoforma 3 de isoamilase encontrada em batatas, especialmente quanto à seqüência de bases, aminoácidos e especificidade por substrato.

O *Northern blot* desenvolvido com as amostras controle e tratadas de banana indicou que a sonda homóloga obtida com os primers SNT1 e RCT1, a partir do cDNA, reconheceu um transcrito de isoamilase com tamanho aproximado de 2,6 Kb. Em amostras controle, o nível de transcrito não pareceu se alterar durante o amadurecimento, assim como a expressão da proteína (Figura 26 B e D). Esses resultados parecem concordar com a hipótese de que a DBE tipo-isoamilase de banana, tenha produção e atividade constante no amadurecimento.



**Figura 26:** Perfil de expressão de isoamilase de bananas controle durante o amadurecimento. A) Atividade enzimática com  $\beta$ -dextrina limite B) Autorradiografia dos RNAs hibridizados com sonda de isoamilase; C) RNAs ribossomais corados com azul de metileno; D) Western blot (50  $\mu$ g de proteína) utilizando anti-soro anti-isoamilase (1:100).



**Figura 27:** Perfil de expressão de isoamilase de bananas tratadas com 10 ppm de etileno durante o amadurecimento. A) Atividade enzimática com  $\beta$ -dextrina limite; B) Autorradiografia dos RNAs hibridizados com sonda de isoamilase; C) RNAs ribossomais corados com azul de metileno; D) Western blot (50  $\mu$ g de proteína) utilizando anti-soro anti-isoamilase (1:100).

No caso dos frutos tratados, foi percebido um decréscimo nos níveis de transcrito de isoamilase a partir do 5° DPC (Figura 27B). Esse comportamento destoa dos demais parâmetros observados, ou seja, a atividade enzimática e a quantidade de isoamilase expressa (Figura 27A e D) parecem se manter durante o amadurecimento e não decair de acordo com a diminuição do transcrito. Os menores níveis de mRNA de isoamilase provavelmente sejam resultado da senescência antecipada dos frutos tratados, causada pela aplicação de etileno, conjuntamente a um aumento na atividade das nucleases. Entretanto, esses resultados podem sugerir que uma pequena quantidade de transcrito já seja suficiente para a síntese da isoamilase, a qual é capaz de se manter estável e com atividade durante toda fase de amadurecimento. O fato das bananas tratadas não terem apresentado diferenças marcantes quanto a atividade enzimática e expressão da isoamilase em relação as bananas controle, pode indicar que essa enzima não seja regulada pelo etileno.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos até o presente momento indicam que a enzima desramificadora de amido presente no amadurecimento da banana é uma isoamilase, tanto pela atividade enzimática desramificadora ter sido detectada com o uso de glicogênio e  $\beta$ -dextrina, e não com pululano, quanto pela similaridade da seqüência de cDNA e aminoácidos deduzidos de outras espécies vegetais.

A carência de um substrato específico para isoamilase, dificultou o acompanhamento de seu perfil de atividade no amadurecimento, uma vez que o extrato protéico utilizado nos ensaios de atividade não apresentou um nível de pureza desejável para isoamilase. Devido a isso, a atividade enzimática pode ter sido superestimada, em função da possibilidade das amilases poderem atuar sobre os substratos utilizados, gerando açúcares solúveis detectáveis pelo método do DNS. No entanto, o uso da  $\beta$ -dextrina parece ser uma boa alternativa de um substrato mais específico.

A clonagem e sequenciamento de bases também confirmaram que a isoamilase é a enzima desramificadora existente em bananas. Primers planejados com base em regiões comuns à pululanase e isoamilase, amplificaram inicialmente um fragmento de 250 pb, homólogo à isoamilase de outros vegetais. O sequenciamento desse inserto permitiu o planejamento de novos primers, que foram usados na subclonagem do gene de isoamilase. De todas as técnicas utilizadas para a clonagem e sequenciamento da isoamilase, a RACE (Rapid Amplification cDNAs Ends)

apresentou os melhores resultados, permitindo o conhecimento de cerca de 1800 pb do gene e a identificação da proteína traduzida como pertencente a superfamília das amido hidrolases.

A aplicação exógena de 10 ppm de etileno teve uma pequena influência sobre o metabolismo de carboidratos e sobre o comportamento da isoamilase durante o amadurecimento da banana. Com exceção da marcante antecipação na produção de etileno e do acúmulo reduzido de sacarose, frutos tratados apresentaram poucas diferenças em relação ao controle, no que se refere a respiração, metabolismo do amido e atividade enzimática. Apesar de frutos tratados com etileno terem o nível de transcrito de isoamilase reduzido ao longo do amadurecimento, a expressão e atividade da isoamilase durante o amadurecimento parecem ser constantes, independente da aplicação do hormônio. O estudo com outras dosagens ou com antagonistas do etileno são necessários para uma melhor compreensão a respeito da regulação desta enzima.

A identificação de outras isoformas da isoamilase e sua relação com possíveis regiões de polimorfismo gênico também contribuirão no entendimento da atuação da isoamilase no metabolismo de carboidratos da banana.

---

## **6. CONCLUSÃO**

A enzima desramificadora responsável pela hidrólise das ligações  $\alpha(1-6)$  do amido, durante o amadurecimento da banana é uma isoamilase, a qual guarda muitas semelhanças com isoamilases de outras espécies vegetais, sobretudo com a isoforma 3 de batatas, apresentando maior especificidade por  $\beta$ -dextrina limite e tamanho estimado de subunidade de 80 kDa.

A atividade e expressão da isoamilase parecem ser constantes durante o amadurecimento, independente do tratamento dos frutos com 10 ppm de etileno, sugerindo que essa enzima não é regulada por este hormônio.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E.Jr. **Ethylen in plant biology**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1992.
- Arêas, J.A.G. e Lajolo, F.M. Starch transformation during banana ripening: I – the phosphorilase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **J.Food Biochem.**, 5: 19-37, 1981.
- Bassinello, P.Z., Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M. Amylolytic activity in fruits: Comparison of different substrates and methods using banana as model. **J. Agric. Food Chem.** 50 (21), p-5781-5786, 2002.
- Beatty, M.K., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myers, A.M., James, M.G. Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. **Plant Physiol.**, v.119, p.255-266, 1999.
- Beck, E., Ziegler, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. **Annu. Ver. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.40, p.-95-117, 1989.
- Bernfeld, P. Amylases, alpha and beta. **Meth. Enzymology**, San Diego, v.1, n.149-158, 1955.

Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analyt. Biochem.**, San Diego, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **Intern. J. Biol. Macrom.** 23: 85-112, 1998.

Cohen, S.N., Chang A.C.Y., Hsu, L. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 69: 2110-2114. 1972. In: Clark, M.S. ed. Plant molecular biology – A laboratory manual. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 529p.

Cordenunsi, B.R. and Lajolo, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **J.Agric.Food Chem.** 43 (2): 347-351, 1995.

Cordenunsi, B.R., Nascimento, J.R.O., Mota, R.V., Lajolo, F.M. Phosphoglucose isomerase from bananas: partial characterization and relation to main changes in carbohydrate composition during ripening. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.65, n.10, p.2174-2180, 2001.

Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28:350, 1956.

- Fujita, N., Kubo, A., Francisco, P., Nakakita, M., Harada, K., Minaka, N., Nakamura, Y. Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. **Planta** 208: 283-293, 1999.
- Gallant, D.J., Bouchet, B., Baldwin, P.M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v.32, p.177-191, 1997.
- Garcia, E. and Lajolo, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. **J.Food Sci.**, Chicago, v.53, n.4, p.1181-1186, 1988.
- Genschel, U., Abel, G., Lörz, H., Lütticke, S. The sugary-type isoamylase in wheat: tissue distribution and subcelular localisation. **Planta**, v.214, p.813-820, 2002.
- Gerrits, N., Turk, S.C.H.J., van Dun, K.P.M., Hulleman, S.H.D., Visser, R.G.F., Weisbeek, P.J., Smeekens, S.C.M. Sucrose metabolism in plastids. **Plant Physiol.**, v.125, p.926-934, 2001.
- Hallett, I.C., Wegrzyn, T.F., Macrae, E.A. Starch degradation in kiwifruit – *in-vivo* and *in-vitro* ultrastructural studies. **Int. J. Plant Sci.**, Chicago, v.156, n.4, p.471-480, 1995.
- Hubbard, N.L., Pharr, D.M., Huber, S.C. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climateric. **Plant Physiol.**, Rockville, v.94, n.1, p.201-208, 1990.
-

Hussain, H. Mant, A., Seale, R., Zeeman, S., Hinchliffe, E., Edwards, A., Hylton, C., Bornemann, S., Smith, A., Martin, C., Bustos, R. Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. **Plant Cell**, v.15, p.133-149, 2003.

Ishizaki, Y., Taniguchi, H., Maruyama, Y. Debranching enzymes of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). I. Purification and some properties of potato isoamilase. **Agric. Biol. Chem.**, v.47, n.4, p.771-779, 1983.

Israel, D. A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries. **Nucleic Acids Res.** v.21, n.11, p. 2627-2631, 1993

James, M.G., Robertson, D.S., Myers, M. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels. **Plant Cell**, v.7, p.417-429, 1995.

Janeček, Š.  $\alpha$ -amylase family: molecular biology and evolution. **Prog. Biophys. Mol.Biol.**, v.67, p.67-97, 1997.

Jespersen, H., MacGregor, E.A., Sierks, M., Svenson, B. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. **Biochem.J.**, v.280, p.51-55, 1991.

Konish, Y., Kitasato, S., Asano, R., Nakatani, N. Polymorphism of acid and neutral alpha-glucosidase in banana pulp – Changes in apparent pI's and affinity to Con-A of the enzymes during ripening. **Agr. Biol. Chem. Tokyo**, Tokyo, v.55, n.4, p.1089-1094, 1991.

Kossmann, J., Lloyd, J. Understanding and influencing starch biochemistry. **Critical Reviews in Plant Science**, v.19, n.3, p.171-226, 2000.

Kristensen, M., Lok, F., Planchot, V., Svendsen, I., Leah, R., Svensson, B. Isolation and characterization of the gene encoding the starch debranching limit dextrinase from germinating barley. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1431, p.538-546, 1999.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

López-Gómez, R., Gómez-Lim, M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **Hortscience**, Alexandria, v.27, n.5, p.440-442, 1992.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.

MacGregor, E.A., Janeček, Š., Svensson, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Bioch. et Bioph. Acta*, v.1546, p.1-20, 2001.

Manners, D.J. Starch. In PM Dey, RA Dixon, eds, **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London: Academic Press, 1985, cap.4, p.149-204.

Manners, D.J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. **Carbohydr. Polym.** v.11, p.87-112, 1989.

Medina-Suárez, R. Manning, K., Fletcher, J. Aked, J., Bird, C.R., Seymour, G.B. Gene expression in the pulp of ripening bananas – Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. **Plant Physiol.**, Rockville, v.115, n.2, p.453-461, 1997.

Mota, R.V. **Identificação, purificação e caracterização parcial da enzima amido fosforilase em bananas Nanicão (Musa acuminata. grupo Cavendish)**. São Paulo, 2001. 86p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

---

Nascimento, J.R.O., Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in bananas. **J. Plant Physiol.**, Jena, v.156, n.5-6, p.605-611, 2000.

Nascimento, J.R.O., Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M., Alcocer, M.J.C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, New York, v.203, n.3, p.283-288, 1997.

Pan, D., Nelson, O.E. A debranching deficiency in endosperm of the *sugary-1* mutants of maize. **Plant Physiol.** v.74, p.324-328, 1984.

Peterson, G.L., A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* Which is more generally applicable. **Analyt. Biochem.**, v.83, p.346-356, 1977.

Purgatto, E., Lajolo, F.M., Nascimento, J.R.O., Cordenunsi, B.R. Inhibition of  $\beta$ -amilase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**, v.212, p.823-828, 2001.

Rahman, A., Wong, K., Jane, J., Myers, A., James, M. Characterization of SU1 isoamylase, a determinant of storage starch structure in mayze. **Plant Physiol.**, v.117, p.425-435, 1998.

Rossetto, M.R.M. Efeito do ácido giberélico no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana (*Musa acuminata* var. Nanicão).

São Paulo, 2001. 79p. (Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratorial manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory , 1989, v.1-3.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74**, 5463-5467. 1977.

Seymour, G.B. Banana. In: Seymour, G.B., Taylor, J.E, Tucker, G.A., eds. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.2, p.93-106.

Sivak, M.N., Preiss, J. Starch degradation. In: \_\_\_\_\_ **Advanceds in food and nutrition research. Starch: basic science to biotechnology**. San Diego: Academic Press, 1998, p.153-162.

Smith, A. Making starch. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.223-229, 1999.

Sun, C., Sathish, P., Ahlansberg, S., Jansson, C. **Plant Molecular Biology 40**: 431-443, 1999.

Tucker, G.A., Grierson, D. Fruit ripening. In Davies, D.D., ed. **The biochemistry of plants: A comprehensive treatise**. San Diego, Academic Press, 1984, v.12, p.265-318.

Witt, W., Buchholz, A., Sauter, J.J. Binding of endoamylase to native starch grains from poplar wood. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.292, p.1761-1769, 1995.

Wisconsin-Package Version 9.1. Madison, Wisc.: Genetics Computer Group (GCG), 1997.

Zeeman, S.C., Umemoto, T., Lue, W., Au-Yeng, P., Martin, C., Smith, A.M., Chen, J. A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyloglycogen. **The Plant Cell**. v.10, p.1699-1711, 1998.

## 8. ANEXOS

Anexo 1: Alinhamento do fragmento de 250 pb de isoamilase de banana com arroz (Genbank AB015615)

```

                                10      20      30
DBE-250                        CTCGGATCGTGACCATGGACGTCGTCTATAACCATACT
                                ||| | ||| | ||| | ||| | ||| |
seqarroz  GTTAGAGAGGCTCACAAACGGGGAATTGAGGTGATCATGGATGTTGTCTTCAATCATAACA
                                800      810      820      830      840      850

                                40      50      60      70      80      90
DBE-250  AATGAAGCTAATGATCGTCATCCTATACTCTCCTT---CGTGTGTGACAATAAGGTTTAT
                                || | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| |
seqarroz  GCCGAGGGTAATGAGAAAGGACCAATATTATCATTAGGGGGATAGATAATAGCACATAC
                                860      870      880      890      900      910

                                100     110     120     130     140     150
DBE-250  TACATGTTGGATCCCGATAATGGTGCTAAGTACTTGAATTTTTCAGGCTGTGGAATACA
                                || | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| |
seqarroz  TATATGCT---TGCCCCTAAGGGAG---AGTTTACAATTATTCTGGTTGTGGGAATACC
                                920     930     940     950     960

                                160     170     180     190     200     210
DBE-250  TTAAACTGCAATCA-CCTGTCGTCATGGAACCTTATTCTTGACAGTTTAAGACATTGGGTT
                                || | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| |
seqarroz  TTCAACTGTAATCATCCTGTGGTCCGTGAATTTATTGTAGATTGTTTAAGATACTGGGTG
                                970     980     990     1000    1010    1020

                                220     230     240     250     260     270
DBE-250  AACGAGTACCATGTCCATGGCTTCAGATTTCGACCTCATGAATCACTAGTGCGGCCGCTG
                                | || | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| |
seqarroz  ACAGAAATGCATGTTGATGGTTTTCGTTTTGA--TCTTGCATCCATAATGACCAGAGGAT
                                1030    1040    1050    1060    1070    1080

                                279
DBE-250  CAGGT

seqarroz  GCAGTCTTTGGGATCCAGTTAATGTGTATGGAAGTCCAGTAGAAGGTGACATGACTACGA
                                1090    1100    1110    1120    1130    1140

```

**Anexo 2:** Alinhamento do fragmento de 1400 pb de isoamilase de banana com arroz (Genbank AB015615)

```

                200      210      220      230      240      250
DBE-1400      CTTGCAAGTATTCTTTGCCGAGGGACCGATGGTCTCTCTTAATTCACCTCCATTAGCC
seqarroz      AGTCCAGTAGAAGGTGACATGACTACGACAGGGACACCTCTTGCTACTCCACCACTTATT
                1120      1130      1140      1150      1160      1170
                260      270      280      290      300      310
DBE-1400      AAGGCAATGCTAAAGATGCTGTACTTTCAAGGTGT-AAGATAATTGCTGAACCATGGGA
seqarroz      GACATGATCAGCAATGATCCAATTC-TTGGAGATGTCAAGCTCATTGCTGAAGCATGGGA
                1180      1190      1200      1210      1220      1230
                320      330      340      350      360      370
DBE-1400      CTGTGGAGGACTTTATCTTGTGGGAAATTTTCCAAATTGGGACCGGTGGGCCGAATGGAA
seqarroz      TGGGGGAGGCCTCTATCAAGTAGGTCAATTCCTCACTGGAAAATTTGGTCAGAATGGAA
                1240      1250      1260      1270      1280      1290
                380      390      400      410      420      430
DBE-1400      TGGAAAGTACCGTGATGATATTCGAAGATTCATGAAGGGTGATTGTGGTATGAAAGGGAC
seqarroz      TGGAAAGTACCGGGACATTGTTCTGCAATTCATTAAGGCACAGATGGATTGCTGGTGG
                1300      1310      1320      1330      1340      1350
                440      450      460      470      480      490
DBE-1400      CTTTGCAACTCGTATATCTGGATCTGCTGACCTCTACCAGGTGAACAAGCGCAAACCTTA
seqarroz      TTTCTGCTGAATGTTTGTGTGGAAGTCCACATCTATACCAGGCAGGGGGGAGGAAACCTTG
                1360      1370      1380      1390      1400      1410
                500      510      520      530      540      550
DBE-1400      CCACAGTATCAATTTTGTGATAGCACATGATGGGTTTACACTGTGTGATCTTGTTCCTTA
seqarroz      GCACAGTATCAACTTTGTGTGCGCATGATGGATTTACGCTGGCTGATTTGGTGACATA
                1420      1430      1440      1450      1460      1470
                560      570      580      590      600      610
DBE-1400      CAATTTCAAGCCTAATGATGCTAACGGGGAAGGTGGCAAARAATGGAAGCAATGACAATT
seqarroz      TAACAAGAAGTACAACCTTCAAATGGTGAGGATAATAGAG-ATGGAGAAAATCATAACC
                1480      1490      1500      1510      1520      1530
                620      630      640      650      660      670
DBE-1400      TTAGCTGGAAWTGTGGTGTGAAGGAGAAACGGATGATGTTGAAATTAWAGGTCTTCGCT
seqarroz      TCAGCTGGAACGTGGGGAGGAAGGAGAATTTGCAGGTTTGTCTGGTCAAAAGATTGAGGA
                1540      1550      1560      1570      1580      1590

```

**Anexo 3: Alinhamento do fragmento de 900 pb de isoamilase de banana com arroz (Genbank AB015615)**

```

                                10      20      30
DBE-900                        GTGATAGTCACATGATGGTGTTTAMACTGTGTGATCTT
                                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz  AACCTTGGCACAGTATCAACTTTGTGTGTGCGCATGATGG-ATTTACGCTGGCTGATTTG
                                1420    1430    1440    1450    1460    1470

                                40      50      60      70      80      90
DBE-900  GTTTCTTACAATTTCAAGCATAATGATGCTAACCGGGAAGGTGGCAAAGATGGAAGCAAT
                                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz  GTGACATATAACAAGAAGTACAACCTCTTCAAATGGTGAGGATAATAGAGATGGAGAAAAT
                                1480    1490    1500    1510    1520    1530

                                100     110     120     130     140     150
DBE-900  GACAATTTTAGCTGGAATTGTGGTGTGAAGGAGAAACGGATGATGTTGATATTATAGGT
                                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz  CATAACCTCAGCTGGAACTGTGGGGAGGAAGGAGAATTTGCAGGTTTGTCCGTCAAAGA
                                1540    1550    1560    1570    1580    1590

                                160     170     180     190     200     210
DBE-900  CTTGCTCACGGCAAATGAAGAACTTCCATTTGGCCTTAATGATCTCTCAGGGAACACCA
                                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz  TTGAGGAAGAGGCAAATGCGCAATTTCTTTGTTTCTCTCATGGTTTCTCAAGGTGTTCCG
                                1600    1610    1620    1630    1640    1650

                                220     230     240     250     260     270
DBE-900  ATGATGCTAATGGGGATGAATATGGCCATACACGTTATGGAAACAATAATAGCTATGGA
                                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz  ATGTTCTACATGGGCGATGAATATGGCCATAAAAAGGAGGCAACAACAACATACTGC
                                1660    1670    1680    1690    1700    1710

                                280     290     300     310     320     330
DBE-900  CATGACACTTCCATAAAMMMATTTTCAGTGGAAACAGTTGGAAGAAAGAAGGGGCGGTCA
                                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz  CATGACCATTATGTCAA-TTATTTCCGCTGGGACAAGAAAGAAGAATCCTCTGACTTGCA
                                1720    1730    1740    1750    1760

                                340     350     360     370     380     390
DBE-900  TTTTAGAATTTTCTGTGAGAATGATAAAATTTTCGCTGCAAGCAATCCCATGTTTGGCACA
                                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz  ACGGTTCTGCTCTCTTATGACCAAATTCGCAACAATGCGAGTCCCTTGGCCTCGCAGA
                                1770    1780    1790    1800    1810    1820

```

**Anexo 4: Alinhamento do fragmento de 1200 pb de isoamilase de banana com arroz (Genbank AB015615)**

```

                379      369      359      349      339
DBE-1200      AAAAYCCCCACATTTATGGAAGCTGGGAATCAATGCTGTGGAGC
                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz      ACATTGGGGCTATATCAAAGCTTGACTATCTGAAGGAGCTTGGAGTTAACTGTGTAGAGT
                580      590      600      610      620      630

                329      319      309      299      289      279
DBE-1200      TCTSGCCAGTTTTKGAGTTTGATGAACTCGAWTTTCAGAGGTACCCAAATCCCAGAGATC
                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz      TGATGCCCTGCCATGAATTCAATGAGCTGGAGTACTTCAGCTGCTC-----TT
                640      650      660      670

                269      259      249      239      229      219
DBE-1200      ACATGWTTAACACCKGGGGCTACTCCACCTTAAAYTTTTTTGCCCCCAGGAGCCGATATG
                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz      CCAAGATGAACTTCTGGGGATACTCCACGATAAACTTTTTTTCACCAATGATAAGATATT
                680      690      700      710      720      730

                209      199      189      179      169
DBE-1200      CTAGTGCTGG--TGGTGGACCGTTG----GTTGCTTCTCATGAGTTCAAACAGATGGTGA
                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz      CATCAGGTGGGATAAGAAACTGTGGCCGTGATGCCATAAATGAATCAAACCTTTTGTTA
                740      750      760      770      780      790

                159      149      139      129      119      109
DBE-1200      AASYTTTGCACAATGCTGGCATTGAGGTCAATTTTGGATGTTGTCTATAACCATACTAATG
                | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz      GAGAGGCTCACAAACGGGGAATTGAGGTGATCATGGATGTTGTCTTCAATCATACAGCCG
                800      810      820      830      840      850

                99      89      79      69      59      49
DBE-1200      AAGCTAATGATCGTCATCCTTATACTTCTTCCTTTCGTGGTGTGACAATAAGGTTTATT
                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
seqarroz      AGGGTAATGAGAAAGGACC-AATA--TTATCATTTAGGGGGATAGATAATAGCACATACT
                860      870      880      890      900      910

                39      29      19      9
DBE-1200      ACATGTTGGATCCCATAATGGTGCTAAGTACCTGAATTTTYA
                | | | | | | | | | |
seqarroz      ATATGCTTGGCCCTAAGGGAGAGTTTTACAATTATTCTGGTTGTGGGAATACCTTCAACT
                920      930      940      950      960      970

```

**MEIOS DE CULTURA****LB (Lúria-Bertani) pH 7,0**

Triptona 1%  
Extrato de levedura 0,5%  
NaCl 1%

**NZY-Broth pH 7,5**

NaCl 0,5%  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2%  
Extrato de levedura 0,5%  
NZ amina 1%

**NZY-top ágar**

NZY Broth  
Agarose 0,7%

**SM**

NaCl 100 mM  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 8 mM  
Tris-HCl 50 mM pH 7,5  
Gelatina 0,01%

**LB-ágar pH 7,0**

Triptona 1%  
Extrato de levedura 0,5%  
NaCl 1%  
Ágar 2%

**NZY-ágar pH 7,5**

NaCl 0,5%  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2%  
Extrato de levedura 0,5%  
NZ amina 1%  
Ágar 1,5%

**SOC**

Triptona 2%  
Extrato de levedura 0,5%  
NaCl 10 mM  
KCl 2,5 mM  
MgCl<sub>2</sub> 10 mM  
MgSO<sub>4</sub> 10 mM  
Glicose 20 mM

## 9. RESUMO

As enzimas desramificadoras (DBE) são indispensáveis para a hidrólise das ligações  $\alpha(1-6)$  do amido. Uma DBE tipo-isoamilase foi detectada durante o amadurecimento de banana, apresentando maior afinidade por  $\beta$ -dextrina limite, seguida por glicogênio, com tamanho de subunidade estimado em 80 kDa. O seqüenciamento de parte do gene da enzima de banana mostrou alta homologia com isoamilase de outros vegetais, confirmando sua identidade. A isoamilase de banana apresentou atividade, transcrição e expressão constantes durante o amadurecimento. Quando amostras de banana foram tratadas com 10 ppm de etileno, foi observada uma diminuição no nível de transcrito de isoamilase, porém sem alterações no perfil de atividade e quantidade de proteína expressa, sugerindo que a isoamilase de banana não é regulada por etileno.

## 10. ABSTRACT

Debranching enzyme (DBE) are indispensable to break  $\alpha(1-6)$  bounds of starch. One DBE type-isoamylase was detected during banana ripening, which showed higher affinity for  $\beta$ -dextrin limit, followed for glycogen, with subunit size of 80 kDa. The sequencing of the part gene of the enzyme showed high homology with isoamylase of others vegetables, confirming its identify. Isoamylase of banana showed constant activity, transcription and expression during ripening. When banana samples were treated with 10 ppm of ethylene was observed a decrease in transcript level, but without changes in activity and amount protein profile, sugering that isoamylase of banana is not regulated for ethylene.