

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA INVERTASE ÁCIDA SOLÚVEL DE TUBÉRCULOS DE BATATA ARMAZENADOS EM BAIXA TEMPERATURA¹

Cristina Rodrigues Mendes²
Marcos Antonio Bacarin³
Clauber Mateus Priebe Bervald⁴
Fabio Cristiano Trevizol⁴
Nei Fernandes Lopes⁵

RESUMO

A atividade da invertase ácida solúvel de tubérculos de batata em desenvolvimento é baixa. Um substancial aumento nos níveis de hexose, devido à maior atividade da enzima, ocorre com a remoção dos tubérculos da planta. A invertase ácida de tubérculos maduros armazenados a frio é a enzima predominante na degradação da sacarose. No entanto, os mecanismos de controle da atividade da invertase na planta ainda não estão bem entendidos. Na tentativa de elucidá-los, foi realizada a purificação parcial da invertase ácida de tubérculos maduros de batata armazenados a frio, 2°C, por 30 dias. A purificação foi realizada utilizando-se centrifugação, precipitação com sulfato de amônia e filtração em gel (Sephadex G 75), com fluxo linear de 11,8 cm h⁻¹. A atividade da invertase foi determinada pela produção de glicose medida enzimaticamente pelo sistema glicose oxidase. A atividade específica da invertase ácida solúvel foi maior no extrato parcialmente purificado com precipitação por sulfato de amônia e filtração em gel, comparada com o extrato cru. A invertase ácida solúvel foi eluída em coluna entre 10 e 13 mL. A cinética enzimática mostrou K_M de 110 mmol L⁻¹ no extrato cru e de 27 mmol L⁻¹ no extrato eluído da filtração em gel. A invertase ácida solúvel apresenta a máxima

¹ Aceito para publicação em 19.09.2004.

² Eng.-Agr. e Mestre em Fisiologia Vegetal

³ Prof. Adjunto, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Cx.P. 354, 96010-900 Pelotas, RS. Brasil (Bolsista CNPq) (bacarin@ufpel.edu.br – autor para correspondência)

⁴ Estudante de Agronomia (Bolsista PIBIC/CNPq)

⁵ Prof. Titular, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Cx.P. 354, 96010-900 Pelotas, RS. Brasil

atividade num pH ótimo entre 3 e 4. Não houve evidência de atividade de invertase alcalina em ambos os extratos cru e purificado. A atividade específica da invertase ácida solúvel foi inibida pelos metais pesados Cu^{+2} , Hg^{+2} e Ag^{+2} .

Palavras-chaves: *Solanum tuberosum* L., invertase ácida, purificação, caracterização.

ABSTRACT

PARTIAL PURIFICATION OF A SOLUBLE ACID INVERTASE FROM POTATO TUBER STORED UNDER COLD TEMPERATURE

Potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers kept under cold storage show a substantial increase of hexose levels, with one mechanism being an increase in invertase activity. However, the mechanisms controlling invertase activity are still not well understood. This paper reports the partial purification of acid invertases from potato tubers, and discusses some of their properties. Soluble acid invertase was extracted from mature tubers of potato stored at 2°C for 30 days and purified by centrifugation, ammonium sulphate precipitation and gel filtration (Sephadex G 75), with linear flow of 11.8 cm h⁻¹. Invertase activity was assayed by the release of glucose measured enzymatically with glucose oxidase. The specific activity of soluble acid invertase increased in extracts purified by ammonium sulphate precipitation and gel filtration, as compared with crude extract. Soluble acid invertase was eluted from the column between 10 and 13 mL. Enzymatic kinetics showed a K_M of 110 mmol L⁻¹ in the crude extract and K_M of 27 mmol L⁻¹ in the extract eluted with gel filtration. The soluble acid invertase showed an optimum pH between pH 3 - 4. There was no evidence of alkaline invertase activity in the crude extract and purified material. The specific activity of the soluble acid invertase was inhibited by the heavy metals Cu^{+2} , Hg^{+2} e Ag^{+2} .

Key words: *Solanum tuberosum* L., acid invertase, purification, characterization.

INTRODUÇÃO

Tubérculos de batata são importante fonte de carboidratos para nutrição, sendo usados como base para vários produtos processados. Em razão da necessidade de suprimento da demanda industrial ou para o consumo *in natura* durante o ano todo, torna-se freqüente, a necessidade de armazenamento dos tubérculos, o que em geral resulta na diminuição da qualidade do produto (6).

Os tubérculos armazenados a temperaturas inferiores a 10°C passam por um processo chamado de adoçamento de baixa temperatura, acumulando açúcares solúveis totais (15). Estes tubérculos, ao serem processados na forma de *chips*, resultam em produtos de coloração escura, devido ao fato de os açúcares reagirem inicialmente com compostos aminos, seguidos por reações consecutivas e paralelas que formam uma grande faixa de compostos de alto e baixo peso molecular, chamadas de

reações de Maillard (11, 15). Isso deprecia ou, em alguns casos, até impede a comercialização do produto.

Altos teores de açúcares redutores nos tubérculos armazenados estão geralmente associados à senescência após um período longo ou em alta temperatura de armazenamento; rápida germinação (brotação dos tubérculos); imaturidade dos tubérculos quando colocados em armazenamento; e exposição a temperaturas inferiores a 10°C durante o armazenamento (7).

O aumento no conteúdo de hexoses em tubérculos de batata armazenados em baixas temperaturas tem sido documentado (4, 16). Entretanto, os passos metabólicos envolvidos na iniciação e na subsequente regulação deste processo ainda não foram completamente elucidados (15). Muitos argumentos têm sido utilizados para explicar este acúmulo de açúcares, incluindo o aumento na atividade da invertase (5, 13, 15).

O controle do fluxo das hexoses monofosfatadas na via glicolítica em baixas temperaturas, contribui para o acúmulo de sacarose e, subsequentemente, dos açúcares redutores nos tubérculos de batata (5). Portanto, o controle da hidrólise de sacarose deve ser considerado importante na regulação da formação das hexoses (3). Duas enzimas podem contribuir diretamente para a formação de hexose nos tubérculos, a sacarose sintase (EC 2.4.1.13) e a invertase (EC 3.2.1.26) (3). A primeira é uma glicosil transferase que produz a sacarose a partir de UDP-glicose e frutose (17). A invertase (β -D-frutofuranosida frutoidrolase) hidrolisa irreversivelmente a sacarose nos seus constituintes monossacarídeos glicose e frutose.

A maioria das espécies vegetais contém no mínimo duas isoenzimas de invertase vacuolar acumulando-se como proteínas solúveis no interior deste compartimento ácido (invertase ácida solúvel). Da mesma forma, são encontradas muitas isoenzimas de invertase extracelular ligadas ionicamente à parede celular (17). Em tubérculos maduros, Isla et al. (9) isolaram três tipos de invertases: invertase ácida solúvel, invertase I e invertase II. Somente a primeira é de origem vacuolar (localização simplástica), enquanto as demais são apoplásticas e apresentam interações com a parede celular em diferentes graus.

As invertases ácidas têm sido purificadas em várias espécies vegetais, apresentando baixo K_M para sacarose (18). A atividade é inibida por íons de metal pesado como Hg^{2+} e Ag^{+2} , sugerindo a presença de um grupo sulfidril no centro catalítico (17). As invertases ácidas também são inibidas por seus produtos de reação, como a glicose agindo como um inibidor não competitivo e a frutose como um inibidor competitivo (9).

Este trabalho teve como objetivo adequar metodologia para a purificação parcial da invertase ácida solúvel de tubérculos de batata

armazenados em baixa temperatura, bem como caracterizá-la bioquimicamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Tubérculos de batata, cultivar Pérola, produzidos no campo experimental da Embrapa-Clima Temperado, Pelotas, RS, foram colhidos em julho de 2000 e imediatamente transferidos para o Laboratório de Metabolismo Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas. A seguir foram selecionados e padronizados quanto ao tamanho e armazenados em geladeira por 30 dias, a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Decorrido este período, eles foram descascados e picados em pequenos pedaços de modo, a formar amostras de aproximadamente 50 g. Estas foram acondicionadas em recipientes plásticos com aproximadamente 10 mL de tampão de armazenamento que continha HEPES (2 g L^{-1}), EDTA ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), Glutathione (100 mg L^{-1}), DTT (50 mg L^{-1}), PVP ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), Triton X 100 ($0,5 \text{ mL L}^{-1}$) e Mercaptoetanol ($0,25 \text{ mL L}^{-1}$) e mantidas congeladas até o momento do processamento (adaptado de 15).

Para a purificação da invertase ácida solúvel, as amostras previamente armazenadas foram homogeneizadas em triturador de tecido (Potter S), seguido de filtração em gaze, obtendo-se o extrato I, do qual 5 mL foram armazenados para posterior processamento. O restante do extrato I foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos, a 4°C . Parte do sobrenadante (5 mL) foi armazenada (extrato II), e ao restante foi adicionado sulfato de amônia (65% de saturação). O extrato foi novamente centrifugado (20.000 g por 15 minutos, a 4°C) e o precipitado foi ressuscitado em água destilada, formando o extrato III. A seguir, uma alíquota do extrato III foi aplicada em coluna contendo Sephadex® G75, equilibrada com tampão fosfato 100 mmol L^{-1} , pH 7, sendo eluída com o mesmo tampão com um fluxo linear de 118 mm h^{-1} e coletando-se frações de 1 mL.

Em todos os extratos (I, II e III) e todas as frações eluídas da cromatografia gélida foram determinados: a) teores de proteínas solúveis totais, pelo método de Biureto, usando BSA como padrão (8); e b) atividade da invertase ácida pela formação de glicose, determinada enzimaticamente pelo método de glicose-oxidase. Das frações eluídas da cromatografia gélida, aquela que apresentou maior atividade específica foi denominada extrato IV.

A determinação da atividade da invertase ácida foi baseada na produção de glicose, sendo estimada espectrofotometricamente pelo método enzimático baseado na reação catalisada pelo sistema glicose oxidase. A atividade da invertase ácida foi determinada em meio de reação contendo sacarose 250 mmol L^{-1} , como substrato, tampão acetato pH 5,

água destilada e quantia suficiente de extrato protéico, sempre com volume final de 1 mL. O volume dos componentes do meio de reação e do extrato protéico foi variável, em razão do ensaio realizado. Após a adição do volume de extrato protéico, o meio de reação foi mantido em temperatura constante de 37°C, por uma hora. A seguir, a reação foi paralisada em banho fervente por três minutos e, após o resfriamento adicionaram-se 2 mL de reativo de cor. Ao adicionar o reativo, os tubos retornaram ao banho de 37°C, por 15 minutos. Decorrido este período, os tubos foram colocados à temperatura ambiente e, após o resfriamento realizou-se a leitura da absorbância a 505 nm, determinando, assim, os teores de glicose nas amostras após a ação da enzima (Q_1). O teor de glicose presente inicialmente nas amostras (Q_0) foi determinado após a fervura prévia do extrato. Após a inativação, procedeu-se como descrito anteriormente. Desta forma, a atividade da invertase ácida solúvel (Δ) foi determinada pela diferença entre as quantidades de glicose determinadas antes (Q_0) e após a ação da enzima (Q_1), ou seja, $\Delta = Q_1 - Q_0$.

Os ensaios de caracterização da invertase ácida solúvel foram realizados com os extratos II e, ou, IV, dependendo do parâmetro analisado:

a) efeito da quantidade de enzima

Os ensaios do efeito da quantidade de enzima, estimada a partir do teor de proteína solúvel, foram realizados com a variação dos volumes de extratos protéicos nos meios de reação: de 10 a 50 μL e de 1 a 75 μL , respectivamente, nos extratos II e IV.

b) efeito da quantidade de substrato

O efeito da concentração de sacarose nas velocidades das reações enzimáticas foi avaliado, alterando-se a concentração de sacarose no meio de reação, a qual variou de 0 a 350 mmoles L^{-1} e 0 a 200 mmoles L^{-1} nos extratos II e IV, respectivamente. Obtidas as velocidades da reação, foram determinados os parâmetros de cinética enzimática (K_M e V_{max}) em cada extrato, com o emprego da equação hiperbólica de Michaelis-Menten entre a concentração de substrato e a velocidade de reação.

c) efeito da temperatura de incubação

O ensaio de efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi realizado com o extrato II, alterando-se a temperatura de incubação do meio de reação de 3 a 45°C.

d) efeito do pH do meio de reação

O ensaio de efeito do pH sobre a atividade enzimática foi realizado com o extrato II, alterando-se o pH do meio de reação, utilizando os tampões apropriados com pH variando de 1 a 14.

e) efeito da presença de metais no meio de reação

O efeito da presença de metais no meio de reação sobre a atividade enzimática foi determinado no extrato II, adicionando-se, em tubos distintos, 20 μL das soluções de 1 mmol L^{-1} de FeSO_4 , KCl , MgSO_4 , CuSO_4 , MnCl_2 , CaCl_2 , KI , SrCl_2 , BaCl_2 , HgCl_2 e AgNO_3 ao meio de reação constituído de 200 μL de solução de sacarose 250 mmoles L^{-1} , 100 μL de tampão acetato pH 5, 100 μL extrato protéico e água destilada em quantidade suficiente para 1 mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de proteínas solúveis totais obtidos a partir de tubérculos de batata, cultivar Pérola, conforme as etapas de purificação, estão no Quadro 1. A utilização em conjunto da precipitação com sulfato de amônia e posterior centrifugação (extrato III) foi altamente eficiente, permitindo extrair uma concentração de 3,22 mg de proteína mL^{-1} de extrato. O efeito da concentração de proteínas pela ação do sulfato de amônia é decorrente da diminuição da solubilidade da maioria das proteínas, que ocorre em altas concentrações de sais (precipitação por salificação). A fração eluída por filtração gélida (extrato IV), com máxima atividade específica da invertase ácida solúvel (Quadro 1), teve a menor quantidade de proteína solúvel (1,02 mg).

A atividade específica da invertase ácida solúvel foi muito baixa e quase inalterada entre os extratos I e II (Quadro 1), indicando que a centrifugação, apesar de causar redução de aproximadamente 50% de proteína, não resulta em diminuição na atividade específica (Quadro 1).

QUADRO 1 - Concentração de proteína solúvel total, eficiência de purificação e atividade específica da invertase de tubérculos de batata

Extrato	Volume (mL)	Proteína solúvel			Atividade específica	
		mg mL^{-1}	Quant. de proteína (mg)	Purificação (%)	mg de glucose liberada $\text{mg proteína}^{-1} \text{h}^{-1}$	Purificação (%)
I ^A	40	1,00 ($\pm 0,07$) ^B	40,00	100	0,27 ($\pm 0,150$) ^B	100
II	30	0,66 ($\pm 0,07$)	19,80	49,5	0,30 ($\pm 0,119$)	112
III	4	3,22 ($\pm 0,07$)	12,88	32,2	0,44 ($\pm 0,009$)	163
IV	1	1,02 ($\pm 0,06$)	1,02	2,6	2,04 ($\pm 0,180$)	756

A) I = homogeneizado e filtrado em gase; II = extrato I depois da centrifugação; III = sobrenadante depois da adição de sulfato de amônia (65%) e centrifugado; IV = fração eluída de filtração gélida com máxima atividade. Atividade enzimática medida em três repetições.
B) Desvio-padrão da media.

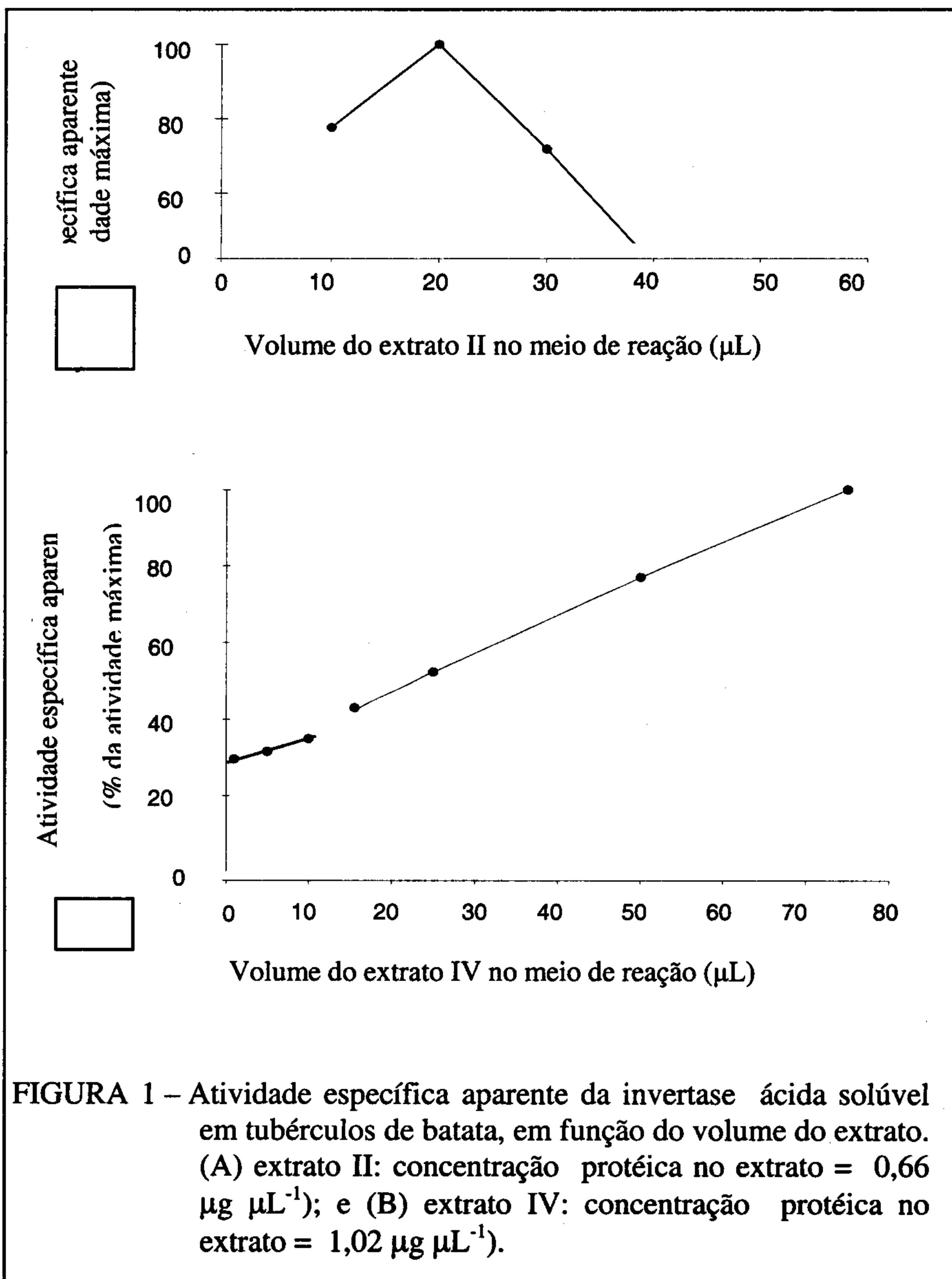
A atividade específica no extrato III, obtido após precipitação com sulfato de amônia e centrifugação, foi praticamente o dobro da alcançada

no extrato I, em virtude da maior quantidade e da pureza protéica atingida com a precipitação salina. O extrato IV apresentou atividade específica de 2,04 mg de glicose formada $\text{mg proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$, aproximadamente quatro vezes mais atividade do que no extrato III, devido à purificação protéica e à eliminação da glicose, evitando a inibição da invertase pela glicose.

A atividade específica da invertase de batata, purificada por Pressey (12), foi 0,3 e 11,2 unidades por mg de proteína nos extratos bruto e eluído em Sefadex G-100, respectivamente. Bracho e Whitaker (2) encontraram atividades específicas de 0,042 e 8,1 unidades por mg de proteína, concernentes aos extratos bruto e eluído em DEAE-Sefadex A-50-120, respectivamente. Isla et al. (9) obtiveram atividades específicas de invertase de batata de 0,8 (extrato bruto), 0,7 (extrato precipitado com sulfato de amônia, 100% de saturação) e 55 unidades por mg de proteína (extrato eluído em Sefadex G-100). Por definição, em todos estes ensaios uma unidade é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de sacarose min^{-1} a 37°C, em pH 4,7.

A atividade específica aparente da invertase ácida solúvel (expressa em relação à atividade específica máxima) em relação ao volume do extrato II utilizado no meio de reação (Figura 1A) mostrou um pico de atividade específica em 20 μL , diferindo dos volumes de 10 e 30 μL . Entretanto, quando utilizados 50 μL de extrato, a atividade foi reduzida drasticamente para aproximadamente 20% da atividade máxima. O extrato II apresentava grande quantidade de carboidratos solúveis dissolvidos, principalmente glicose e frutose. A queda na atividade enzimática observada nos volumes de extrato acima de 20 μL pode ser explicada pelo incremento no teor de glicose no meio da reação, o qual pode inibir a atividade da invertase, em concordância com Isla et al. (9), quando afirmaram que a glicose produz inibição não-competitiva clássica da invertase.

A atividade específica da invertase ácida solúvel em relação ao volume do extrato IV está representada na Figura 1B, ocorrendo linearidade entre o volume de extrato e a atividade quantificada. Duas retas podem ser identificadas, uma para baixos volumes (< 10 μL) com pequena declividade, indicando que pequenas alíquotas provocam incrementos menores na taxa de atividade específica, e outra com declividade maior (volumes de extrato entre 15 e 75 μL), na qual grandes incrementos na taxa de atividade específica da invertase ácida foram observados. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de as frações obtidas pela cromatografia praticamente não apresentarem açúcares redutores, mas sim proteína, não havendo, então, glicose capaz de inibir a invertase ácida; assim, as velocidades da reação enzimática acompanharam o aumento do volume de extrato (quantidade de proteína) até ocorrer a saturação da enzima com o substrato.



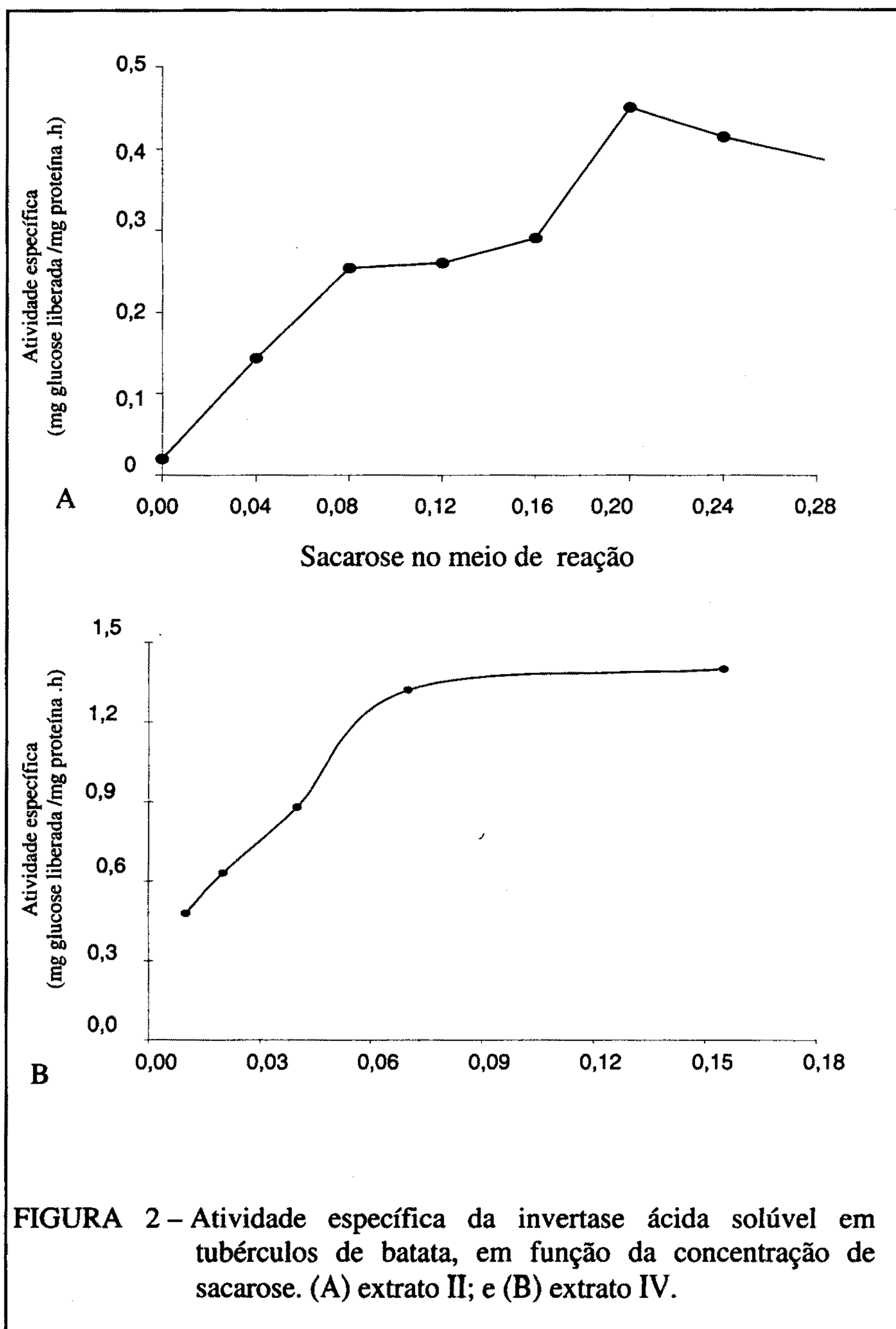
As atividades específicas da invertase ácida solúvel nos extratos II e IV, em função da concentração de sacarose no meio de reação, estão representadas na Figura 2A e B, respectivamente. A atividade específica da invertase de batata foi mais baixa no extrato II (extrato bruto) do que no IV (eluído por cromatografia).

A atividade específica da invertase ácida solúvel foi crescente entre as concentrações de 0 a 80 mmol L⁻¹ de sacarose, com patamar entre 80 e 160 mmol L⁻¹, atingindo o máximo na concentração de 200 mmol L⁻¹ de sacarose (Figura 2A). Estes resultados podem indicar a existência de dois sítios ativos para sacarose na enzima invertase, provavelmente um atuando em baixa concentração e outro em alto teor de sacarose, porém agindo de forma cooperativa.

Em tubérculos de batata, Bracho e Whitaker (2) identificaram uma invertase nativa com massa molecular de 60.000, sendo um dímero com massa molecular de 30.000 por subunidade. Por outro lado, Burch et al. (3) isolaram uma invertase, por filtração gélida, com massa molecular de 60.000, mas usando SDS-PAGE, a massa molecular foi de 58.000 sem subunidades, concluindo que a invertase é um monômero, justificando que a presença de subunidades descritas por Bracho e Whitaker (2) pode ser devida a uma quebra protéica ou, possivelmente, seja um reflexo de diferença varietal.

A utilização do extrato IV, isto é, após a desalinização pela passagem em cromatografia gélida, para ensaio do efeito da variação da concentração do substrato (Figura 2B), resultou em atividades específicas maiores e em menor necessidade de substrato para efetivar a reação. Isso é explicado pela maior quantidade de proteínas, maior pureza da enzima e menor quantidade de interferentes da reação. A atividade enzimática cresceu com o aumento da concentração de sacarose entre 10 e 80 mM, porém em concentrações maiores do que 80 mM a atividade enzimática não acompanhou o aumento da concentração de substrato, permanecendo constante, caracterizando, assim, uma saturação da enzima com o substrato.

Os parâmetros da cinética enzimática encontrados neste experimento foram do extrato II: $K_M = 110$ mmol L⁻¹ e $V_{max} = 559$ µg de glicose mg⁻¹ proteína solúvel total h⁻¹, enquanto do extrato IV: $K_M = 27$ mmol L⁻¹ e $V_{max} = 1615$ µg de glicose mg⁻¹ proteína solúvel total h⁻¹. Diferentes K_M para sacarose são encontrados em trabalhos com tubérculos de batata: 6 mM (12), 16 mM (2), 7 mM (3) e 28 mM (9), sendo este semelhante ao encontrado no extrato IV. A invertase ácida também utiliza outros substratos, como rafinose ($K_M = 37$ mM) e estaquiase ($K_M = 41$ mM), porém com menor afinidade (9).



A enzima apresentou dois picos de maior atividade, o primeiro a 4°C, seguido de queda abrupta da atividade a 10 e 30°C, quando a atividade chegou a apenas 20% da atividade máxima, e o segundo a 38°C, temperatura em que a máxima atividade enzimática foi detectada, seguido de nova queda de atividade a 45°C. Anderson et al. (1) obtiveram atividade catalítica máxima da invertase da batata a 50°C, concluindo também que a melhor temperatura para a ligação do inibidor endógeno com a invertase é de 5 a 10°C mais baixa. Esta faixa de 40 a 45°C para a ligação do inibidor coincide com a queda da atividade a 45°C obtida neste experimento, podendo indicar a possível ligação do inibidor endógeno da invertase neste extrato. Entretanto, também deve ser considerada a possível desnaturação protéica com temperaturas acima de 40°C.

A atividade específica máxima da invertase foi atingida em pH 3,15, sendo acentuadamente decrescente até pH 5, porém deve ser salientado que, em pH 4,15, a atividade foi aproximadamente 65% da máxima. Estes resultados diferem um pouco da faixa de maior atividade obtida por Bracho e Whitaker (2) e Pressey (12), que citam um pH ótimo entre 4,5 e 5,0 para a atividade máxima da invertase ácida. Entretanto, devem ser consideradas as especificidades dos métodos de isolamento e purificação da enzima, ou mesmo a utilização de outra invertase.

Os metais pesados Cu^{2+} , Ag^{2+} e Hg^{2+} inibiram fortemente a enzima (58, 50 e 33% de inibição, respectivamente), de conformidade com Sturm (17), incrementando a inibição com o aumento da massa molecular do íon. A atividade da invertase ácida é inibida por íons de metal pesado como Hg^{2+} e Ag^{2+} , sugerindo a presença de um grupo sulfidril no ponto catalítico (17). Algumas enzimas que possuem um grupamento essencial sulfidrílico (-SH) são inibidas não-competitivamente pelos íons de metais pesados, sugerindo que esses grupos (-SH) devem estar intactos para que a enzima mantenha sua conformação nativa normal (10). O efeito destes metais sobre a invertase neutra da cana-de-açúcar (19) foi similar ao detectado neste ensaio. Cu^{2+} , Ag^{2+} e Hg^{2+} pertencem ao grupo dos metais de transição. Mn^{2+} e Fe^{2+} , que aumentaram a atividade da enzima, também pertencem a este grupo. Estes metais geralmente possuem tendência a ser mais duros e fundir a temperaturas mais altas do que os metais alcalinos e alcalinos terrosos. As densidades deste grupo são resultantes de elevadas massas atômicas, volumes atômicos pequenos e empacotamento compacto. Uma característica importante nos metais de transição é a variabilidade de seus números de oxidação nos compostos formados (14).

A presença de K^{1+} , independentemente do ânion, não causou efeito sobre a atividade da enzima, apresentando atividade semelhante à obtida no controle. O potássio pertence ao grupo dos metais alcalinos (IA), que são leves e com ponto de fusão baixo, pelo fato de a ligação nesses elementos ser puramente metálica e, portanto, não direcional. As

densidades dos metais alcalinos são baixas, como consequência primária de seus raios atômicos elevados.

A atividade da invertase ácida foi incrementada quando os metais Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} foram adicionados ao meio de reação. Estes pertencem ao grupo dos metais alcalinos terrosos (IIA), que são típicos, bons condutores de calor e eletricidade, porém mais duros, mais densos e se fundem a temperaturas mais altas do que os metais alcalinos (14).

CONCLUSÕES

1) Elevada atividade específica da invertase ácida solúvel é alcançada com o emprego de precipitação com sulfato de amônia e filtração gélida.

2) A atividade máxima da invertase *in vitro* é atingida a 38°C, tendo o pH ótimo de 3,15, porém a 4°C é verificada alta atividade.

3) A invertase ácida solúvel estudada apresenta diferença nos parâmetros de cinética enzimática, em razão da metodologia de extração. No extrato IV, o K_M é de 27 mmoles L^{-1} e a $V_{max} = 1,615$ mg de glicose formada mg^{-1} proteína h^{-1} .

4) Os metais pesados Cu^{2+} , Ag^{2+} e Hg^{2+} inibem a atividade da enzima e Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} e Fe^{2+} promovem a atividade da invertase ácida solúvel purificada de tubérculos de batata, armazenados em baixa temperatura.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro na execução do projeto e pela concessão das bolsas.

REFERÊNCIAS

1. ANDERSON, R.S.; EWING, E.E. & SENESAC, A.H. Inhibition of potato tuber invertase by an endogenous inhibitor. *Plant Physiology*, 66:451-6, 1980.
2. BRACHO, G.E. & WHITAKER, J.R. Purification and partial characterization of potato (*Solanum tuberosum*) invertase and its endogenous proteinaceous inhibitor. *Plant Physiology*, 92:386-94, 1990.
3. BURCH, L.R.; DAVIES, H.V.; CUTHBERT, E.M.; MACHRAY, G.C.; HEDLEY, P. & WAUCH, R. Purification of soluble invertase from potato. *Phytochemistry*, 31:1901-4, 1992.
4. BURTON, W.G. The sugar balance in some British potato varieties during storage. II. The effects of tuber age, previous storage temperature and intermittent refrigeration upon low temperature sweetening. *European Potato Journal*, 12:81-95, 1969.
5. CHAPPER, M.; BACARIN, M.A.; & PEREIRA, A.S. et al. Carboidratos não estruturais em tubérculos de dois genótipos de batata armazenados em duas temperaturas. *Horticultura Brasileira*, 20:583-8, 2002.

6. COELHO, A.H.R.; VILELA, E.R.; & CHAGAS, S.J.R. de. Qualidade de batata (*Solanum tuberosum*) para fritura, em função dos níveis de açúcares redutores e de amido, durante o armazenamento refrigerado e à temperatura ambiente com atmosfera modificada. *Ciência e Agrotecnologia*, 23: 899–910, 1999.
7. DAVIES, H.V. & VIOLA, R. Regulation of sugar accumulation in stored potato tubers. *Postharvest News and Information*, 3:97-100, 1992.
8. GORNALL, A.G.; BARDAWILL C.J. & MAXIMA, D. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Biological Chemistry*, 177:51-66, 1949.
9. ISLA, M.I.; VATTUONE, M.A. & SAMPIETRO, A.R. Invertase activity associated with the walls of *Solanum tuberosum* tubers. *Phytochemistry*, 50:525-34, 1999.
10. LEHNINGER, A.L. *Bioquímica*. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1976. 262p., v.1.
11. LOW, N.; JIANG, B.; & DOKHA, S. et al. Reduction of glucose content in potatoes with glucose oxidase. *Journal of Food Science*, 54:118-21, 1989.
12. PRESSEY, R. Invertase inhibitor from potatoes: Purification. Characterization, and reactivity with plant invertase. *Plant Physiology*, 42:1780-6, 1967.
13. PRESSEY, R. & SHAW, R. Effect of temperature on invertase inhibitor, and sugars in potato tubers. *Plant Physiology*, 77:1657-1, 1966.
14. RUSSEL, J.B. *Química geral*. 2ª ed. São Paulo: Makron Books do Brasil editora, 1994. 1268p., v.2.
15. RICHARDSON, D.L.; DAVIES, H.V.; & ROSS, H.A. Invertase activity and its relations to hexose accumulation in potato tubers. *Journal of Experimental of Botany*, 41: 95-9, 1990.
16. SAMOTUS, B.; NIEDZWIEDZ, M.; & KOLODZIEJ, Z. Storage and reconditioning of tubers of Polish potato varieties and strains. I. Influence of storage temperature on sugar level in potato tubers of different varieties and strains. *Potato Research*, 17:64-81, 1974.
17. STURM, A. Invertase primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology*, 121:1-7, 1999.
18. UNGER, C.; HOFSTEENGE, J. & STURM, A. Purification and characterization of a soluble β -fructofuranosidase from *Daucus carota*. *European Journal of Biochemistry*, 204:915-21, 1992.
19. VORSTER, D.J. & BOTHA, F.C. Partial purification and characterization of sugarcane neutral invertase. *Phytochemistry*, 49:651-5, 1998.