

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA INVERTASE ÁCIDA SOLÚVEL EM TUBÉRCULOS DE BATATA: ENERGIA DE ATIVAÇÃO E EFEITO DE INIBIDORES

PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE SOLUBLE ACID INVERTASE FROM POTATO TUBERS: ENERGY OF ACTIVATION AND INHIBITOR EFFECTS

DEUNER, Sidnei¹; FERREIRA, Ladislau S.¹; BACARIN, Marcos A.²; BERVALD, Clauber M. P.³; ZANATTA Eduardo R.³

RESUMO

Tubérculos de batata quando armazenados a temperaturas baixas sofrem um processo de acúmulo de açúcares solúveis e ao serem processados na forma de "chips", resultam em produtos de coloração escura. Um dos mecanismos propostos para explicar este fato é o aumento na atividade da invertase ácida. Na tentativa de elucidá-los foi realizada a caracterização parcial da invertase ácida solúvel de tubérculos maduros de batata com base no efeito de inibidores e energia de ativação. Após a colheita os tubérculos de batata cv. Pérola, foram acondicionados a 4°C no escuro por 30 dias. A seguir as amostras foram congeladas até o momento do processamento, e posterior purificação parcial da invertase. A partir do extrato protéico realizaram-se ensaios de cinética enzimática para determinação da Velocidade Máxima da reação ($V_{máx}$) e da constante de Michaelis-Menten (K_M), medidos pela liberação de açúcares redutores. Realizada a cinética enzimática, adicionou-se glicose e frutose nas concentrações de 1 e 10 mM ao meio de reação. A cinética enzimática na presença do inibidor glicose nas concentrações de 1 e 10 mM aumentou o valor de K_M e reduziu o $V_{máx}$, caracterizando a glicose como inibidor não competitivo, e para frutose, verificou-se grande incremento no K_M e no $V_{máx}$, caracterizando-a como inibidor competitivo. Para a energia de ativação, entre as temperaturas de 15 a 45°C e de 45 a 60°C obtiveram valores de 38,60 e 48,87 KJ mol⁻¹ em pH 4,5, respectivamente.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum* L., adoçamento, açúcares

INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é um dos alimentos mais consumidos no mundo devido à sua composição, versatilidade gastronômica, tecnológica e baixo preço, sendo suplantada apenas pelo trigo, arroz e milho. Os produtos à base de batata têm alcançado um desenvolvimento importante e uma rápida diversificação, tanto na forma de flocos e granulados destinados a reconstituir os purês, como na forma de "fritas à francesa", pré-cozidas e congeladas, "chips", batatas cozidas e enlatadas (COELHO et al., 1999).

PEREIRA & COSTA (1997), constataram que a maioria das cultivares plantadas no sul do Brasil, região responsável por cerca da metade da produção brasileira de batata, não é própria à fritura, devido ao alto teor de açúcares redutores, situação que se agrava no cultivo de outono. Observaram, também, que esse índice, ainda que seja altamente correlacionável com a qualidade pós-fritura para determinados

genótipos, no geral, não garante o sucesso do processo de fritura, obtendo produtos escurecidos e amargos.

Tubérculos armazenados em baixa temperatura acumulam altos teores de açúcares e ao serem processados, por fritura, formam produtos de coloração escura, resultado da reação entre o grupamento carbonila do açúcar redutor e o grupo amino de aminoácidos, peptídeos ou proteínas (reação de Maillard – escurecimento não enzimático), depreciando ou até, em alguns casos, impedindo a comercialização do produto (RICHARDSON et al., 1990).

O aumento no conteúdo de hexoses em tubérculos de batata armazenados sob baixas temperaturas tem sido bem documentado (BURTON, 1969; SAMOTUS et al., 1974). Entretanto, os passos metabólicos envolvidos na iniciação e na subsequente regulação deste processo ainda não foram completamente elucidados (Richardson et al., 1990). Muitos argumentos têm sido utilizados para explicar este acúmulo de açúcares, incluindo entre outros o aumento na atividade da invertase (RICHARDSON et al., 1990; CHAPPER et al., 2002).

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, muitas isoenzimas de invertase extracelular ligadas ionicamente à parede celular são encontradas (STURM, 1999). Em tubérculos maduros, ISLA et al. (1999) isolaram três tipos de invertase: invertase ácida solúvel, invertase I e invertase II, sendo que somente a primeira é de origem vacuolar (localização simplástica), enquanto que as demais são apoplásticas, porém apresentando interações com a parede celular em diferentes graus.

As reações catalisadas por enzimas apresentam parâmetros bioquímicos que caracterizam tanto as enzimas quanto às reações por elas mediadas, sendo um desses parâmetros importantes para o estudo da enzimologia, a energia de ativação.

A energia de ativação mede a variação da energia potencial de um par de moléculas necessária para iniciar o processo de conversão de um par de moléculas reagentes em um par de moléculas de produtos (LEHNINGER et al., 1995).

As enzimas catalisam todos os processos que ocorrem nas células e não deve ser surpreendente que sofram processos de regulação ou mesmo inibição da sua atividade. O estudo dos inibidores das enzimas também fornece valiosa informação a respeito dos mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir algumas vias metabólicas. Segundo

¹ Eng. Agr., Estudante do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Botânica, CEP: 96010-900, Pelotas-RS (Bolsista CAPES)

² Prof. Adjunto, Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Botânica, CEP: 96010-900, Pelotas-RS, e-mail: bacarin@ufpel.edu.br (autor para correspondência) (Bolsista CNPq)

³ Acadêmico de Agronomia, Bolsistas de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq

(Recebido para Publicação em 19/04/2004, Aprovado em 30/03/2005)

LEHNINGER et al. (1995), existem duas grandes classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar características da reação catalisada pela enzima invertase ácida solúvel de tubérculos de batata, considerando o efeito da temperatura durante a reação e a presença de inibidores sobre a cinética enzimática além de verificar a possível relação entre a atividade da invertase ácida solúvel e o processo de adoçamento em tubérculos de batata quando armazenados a baixas temperaturas.

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 (Departamento de Botânica) da Universidade Federal de Pelotas. A seguir foram selecionados e padronizados quanto ao tamanho e armazenados em geladeira por trinta dias a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Decorrido este período os tubérculos foram descascados, picados em pequenos pedaços de modo a formar amostras de aproximadamente 50 g. Estas amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos com aproximadamente 10 mL de tampão de armazenamento em pH 4,5 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 ($0,5 \text{ mL L}^{-1}$), Mercaptoetanol ($0,25 \text{ mL L}^{-1}$), e mantidas congeladas até o momento do processamento.

Obtenção do Extrato Protéico.

Para a obtenção da invertase ácida solúvel, amostras foram descongeladas, homogeneizadas em triturador de tecido com o próprio tampão de armazenamento, seguido de filtragem em gaze. O extrato obtido foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos a 4°C . No sobrenadante coletado foi medido o volume e adicionado sulfato de amônia ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) até 65 % de saturação. Após 20 minutos da adição, o extrato foi novamente centrifugado (20.000 g por 15 minutos a 4°C), o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso com quatro mL de água deionizada. A seguir, este extrato foi dialisado por 24 horas contra tampão fosfato potássio 100 mM com pH 7,0 obtendo-se o extrato enzimático bruto (MENDES et al., 2005).

Determinação da Atividade da Invertase Ácida Solúvel.

A determinação da atividade da invertase ácida foi baseada na produção de açúcares redutores, sendo estimada espectrofotometricamente segundo método de Nelson (NELSON, 1944). A atividade da invertase ácida foi determinada em meio de reação contendo sacarose como substrato, tampão acetato 100 mM pH 4,5, água deionizada e quantia suficiente de extrato protéico o qual foi variável em função do ensaio realizado. O teor de açúcares redutores presente inicialmente nas amostras (Q_0) foi determinado após a fervura prévia do extrato por 3 minutos (inativação protéica) e incubado com meio de reação. A seguir adicionou-se o reativo de Nelson e procedeu-se a leitura da absorbância a 540 nm. Após a adição do extrato protéico, o meio de reação foi mantido sob temperatura constante de 37°C por 1 hora. A seguir, a reação foi paralisada em banho fervente por 3 minutos, e os tubos foram resfriados até temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se o reativo de cor sendo realizada a leitura da absorbância a 540 nm, determinando-se assim, os teores de açúcares redutores nas amostras após a

ação da enzima (Q_1). Desta forma, a atividade da invertase ácida solúvel (Δ) foi determinada pela diferença entre as quantidades de açúcares redutores determinadas antes (Q_0) e após a ação da enzima (Q_1), ou seja, $\Delta = Q_1 - Q_0$. A atividade enzimática foi expressa em μg de açúcares redutores mg^{-1} proteína solúvel total h^{-1} (MENDES et al., 2005)

Ensaio de Velocidade e Cinética Enzimática no Extrato Protéico.

Os ensaios da velocidade e cinética enzimática foram realizados com o extrato protéico obtido como descrito acima.

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 da seguinte forma: 15 μL de solução de sacarose variando de 0 a 1 M com intervalos de 0,1M; 40 μL de tampão acetato 100 mM, pH 4,5; 20 μL extrato protéico e 25 μL de água deionizada. Obtidas as velocidades da reação conforme descrito no item 2, foram determinados os parâmetros de cinética enzimática (K_M e $V_{\text{máx}}$ aparentes). As características da cinética enzimática foram calculadas com emprego da equação hiperbólica de Michaelis-Menten entre a concentração do substrato e a velocidade da reação, conforme citado por BRUNE (1978).

Efeito da presença de inibidores.

Realizado o ensaio para cálculo da cinética enzimática, o mesmo foi repetido com a adição de glicose ou frutose, nas concentrações de 1 e 10 mM ao meio de reação, obtendo-se valores de velocidade da reação na presença dos inibidores. Os mesmos foram submetidos à análise dos duplos recíprocos do inverso da velocidade e inverso da concentração de substrato (sacarose) conforme descrito por Lineweaver-Burk (BRUNE, 1978), permitindo a determinação de novos valores de K_M aparente e $V_{\text{máx}}$ para cada condição experimental.

Efeito da Temperatura de Incubação.

O ensaio do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi realizado com o extrato protéico alterando-se a temperatura de incubação do meio de reação de 15 a 65°C em intervalos de 5°C , contendo: 15 μL de solução de sacarose 0,6 M, 40 μL de tampão acetato 100 mM, pH 4,5, 20 μL de extrato protéico e 25 μL de água deionizada. Obtidos os valores de atividade enzimática foi calculada a energia de ativação, conforme descrito por BERGAMASCO et al. (2000), utilizando-se a relação entre o logaritmo neperiano da velocidade e o inverso da temperatura em que a reação ocorreu, expressa em graus Kelvin. A energia de ativação foi expressa em KJ mol^{-1} . Obtidas as energias de ativação em cada faixa de temperatura calculou-se o Q_{10} que corresponde a taxa de incremento na reação em função do aumento da temperatura em 10°C , segundo a fórmula: $E_a = (2,3 \times R \times T_2 \times T_1 \times \log Q_{10})/10$, onde; E_a = energia de ativação; T_2 e T_1 = temperatura em graus Kelvin; R = constante dos gases ideal em $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 – Ensaio de Cinética Enzimática.

Pela análise da cinética enzimática utilizando o modelo de Michaelis-Menten (Figura 1) determinou-se um $V_{\text{máx}}$ de 74,12 μg de açúcares redutores mg^{-1} proteína solúvel total h^{-1} e um K_M aparente de 0,025 M. A atividade enzimática cresceu com o aumento da concentração de sacarose até certo ponto onde em concentrações maiores a atividade enzimática não acompanhou o aumento da concentração de

substrato permanecendo constante, caracterizando, assim, uma saturação da enzima com o substrato.

Quando adicionou-se glicose ao meio de reação na concentração de 1 mM, obteve-se um $K_M = 0,037$ M e $V_{m\acute{a}x} = 69,36$ μg de açúcares redutores mg^{-1} proteína solúvel total h^{-1} e quando esta concentração foi aumentada para 10 mM, o valor de K_M aumentou para 0,047 M porém, o $V_{m\acute{a}x}$ sofreu uma redução caindo para 63,40 μg de açúcares redutores mg^{-1} proteína solúvel total h^{-1} (Tabela 1). Esta queda na atividade

enzimática promovida pelo incremento no teor de glicose ao meio de reação provocou a diminuição da atividade da invertase, semelhante ao obtido por ISLA et al. (1999), que afirmaram que a glicose produz inibição não competitiva clássica da invertase. Isto indica que o K_M para o substrato não é alterado por um inibidor não competitivo, mas $V_{m\acute{a}x}$ diminui, porém, segundo CLARK & SWITZER (1976) aumentos no K_M e diminuição de $V_{m\acute{a}x}$ também indicam uma inibição não competitiva.

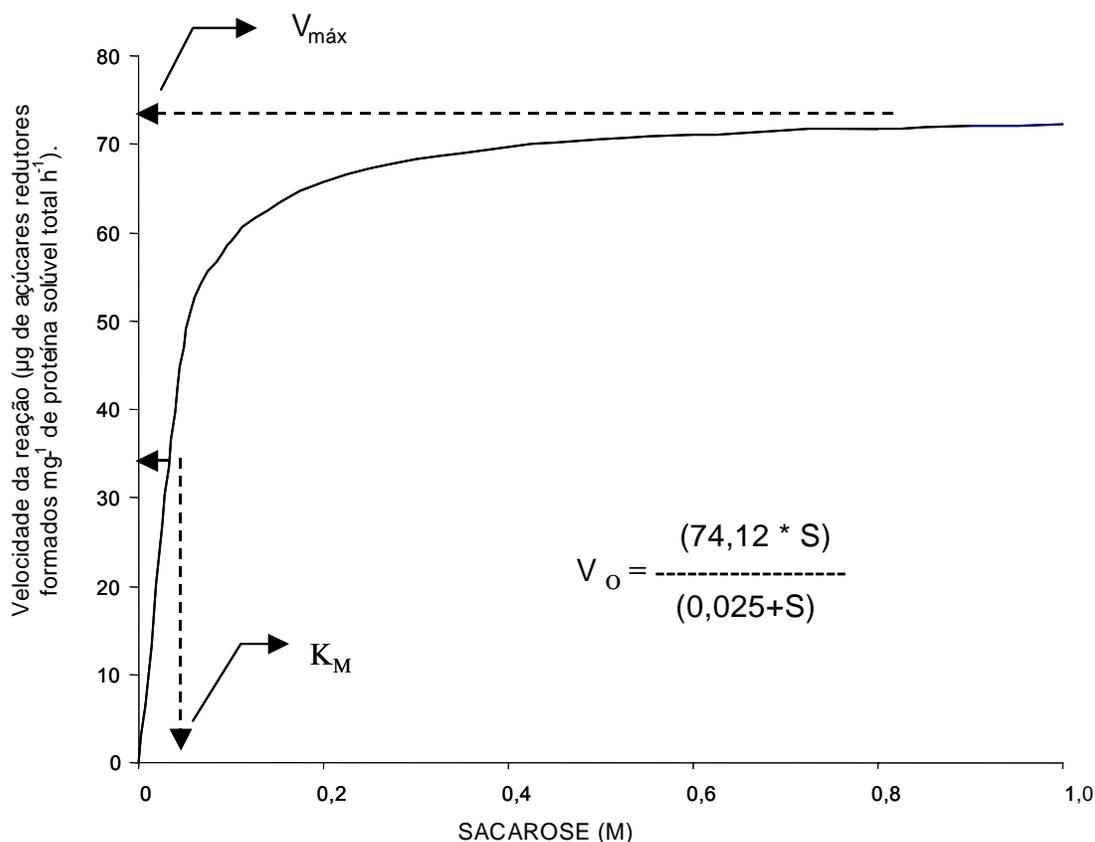


Figura 1 - Relação entre a concentração de sacarose (M) e a velocidade da reação (μg de açúcares redutores formados mg^{-1} de proteína solúvel total h^{-1}) catalisada pela invertase ácida solúvel de tubérculos de batata.

Adicionando frutose ao meio de reação obteve-se um $K_M = 0,035$ M e $V_{m\acute{a}x} = 71,08$ μg de açúcares redutores mg^{-1} proteína solúvel total h^{-1} para a concentração 1 mM e $K_M = 0,314$ M e $V_{m\acute{a}x} = 74,46$ μg de açúcares redutores mg^{-1} proteína solúvel total h^{-1} para a concentração 10 mM (Tabela 1). A partir dos valores de K_M observa-se a existência de uma relação linear com as concentrações iniciais de frutose. Assim, esses resultados concordam com a inibição competitiva da atividade de invertase pela frutose, conforme a equação clássica de inibição competitiva.

Com o aumento na concentração de frutose de 1 para 10 mM, houve um pequeno incremento no $V_{m\acute{a}x}$, porém, o K_M aumentou aproximadamente de 9 vezes de 0,035 para 0,314 M. O inibidor competitivo apresenta estrutura semelhante ao substrato da enzima que se liga para realizar a catálise, a enzima poderá aceitar esta molécula no seu local de ligação,

mas não pode conduzir ao processo catalítico ocupando o sítio ativo do substrato correto. Portanto o inibidor compete pelo mesmo local do substrato. O efeito da reação modifica o K_M , mas não altera a velocidade (HOLME & PECK, 1989).

SAMPIETRO et al. (1980), analisando os produtos de ação da invertase como inibidores da mesma em folhas de cana de açúcar, constataram que a glicose é um inibidor não competitivo simples. Porém, a frutose atua como um inibidor competitivo. Pela representação da declividade do gráfico duplo-recíproco versus concentração de frutose constataram que a frutose constitui-se em mecanismo mais complexo que a glicose.

A atividade da invertase ácida solúvel em sementes de arroz também é inibida pela ação dos inibidores glicose e frutose, confirmando que a frutose atua como um inibidor

competitivo e a glicose como um inibidor não competitivo (ISLA et al., 1995).

A invertase de tubérculos de batata pode ser afetada *in vivo* por dois tipos de inibidores, frutose e os inibidores protéicos, agindo ao nível da atividade da enzima. O inibidor protéico tem sido tradicionalmente interpretado como um regulador fisiológico da atividade da invertase, porém nenhuma prova objetiva foi verificada da interação entre a enzima e o inibidor protéico (ISLA et al., 1991).

Tabela 1 - Valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ em função da presença de inibidores em diferentes concentrações.

Concentração	K_M	$V_{m\acute{a}x}$
	(M)	(μg de açúcares redutores mg^{-1} proteína solúvel total h^{-1})
0	0,025	74,12
Glicose	1 mM	0,037
	10 mM	0,047
Frutose	1 mM	0,035
	10 mM	0,314

2 – Efeito da Temperatura.

Na Tabela 2 são apresentados os valores da atividade específica da invertase ácida solúvel (velocidade da reação) em função das temperaturas a que foram submetidas às reações. Verifica-se certa linearidade na velocidade da reação na faixa de temperatura de 15 a 45°C e um incremento mais acentuado entre 45 e 55°C, sendo aproximadamente constante entre 55 a 60°C onde após este ponto há uma acentuada redução na velocidade da reação. Comparando-se os valores de 15 a 60°C, observa-se um aumento de quase 10 vezes na velocidade da reação. Estes resultados demonstram que a invertase ácida solúvel é uma enzima altamente resistente a altas temperaturas, fato este confirmado por BERTI (1996), que observaram melhor desempenho da atividade da invertase para uma faixa de temperatura de 50 a 55°C, enquanto que na temperatura de 60°C verificaram uma sensível desativação térmica, chegando a redução da conversão máxima obtida.

ANDERSON et al. (1980) obtiveram atividade catalítica máxima da invertase de batata numa temperatura de 50°C, concluindo que a melhor temperatura para a ligação do inibidor endógeno com a invertase é de 5 a 10°C mais baixa. Entretanto, também consideraram a possível desnaturação protéica com temperaturas acima de 40°C.

A temperatura ótima para a atividade enzimática também é uma função da fonte de enzima e condições experimentais, sendo relatados valores na faixa de 45 a 73°C (WOODWARD & WISEMAN, 1975). As enzimas apresentam uma temperatura ótima de atividade, porém a mais adequada para uma reação particular depende do ajuste entre a atividade máxima por um curto período de tempo e uma queda de atividade devido à desnaturação por um longo período de tempo (HOLME & PECK, 1989).

Da mesma forma o aumento na concentração do substrato tem claro efeito de proteção contra a desnaturação térmica da invertase, conforme mostrado por WOODWARD & WISEMAN (1975), que obtiveram temperaturas ótimas para atividade da invertase de *S. cerevisiae* entre 55 e 65°C utilizando concentrações de 2 e 60 % de sacarose, respectivamente.

A velocidade de uma reação depende da temperatura em que ela ocorre, sendo que quando a temperatura aumenta,

as moléculas movem-se mais rápido e, portanto, colidem mais freqüentemente. As moléculas também transportam mais energia cinética, e a proporção de colisões que podem superar a energia de ativação da reação aumenta com a temperatura. Com o aumento da temperatura aumenta a taxa de todas as reações químicas, incluindo as catalisadas por enzimas, mas também aumenta a taxa de desnaturação de proteína (BODNER et al., 2003).

Tabela 2 - Atividade específica da invertase ácida solúvel de tubérculos de batata em função da temperatura que a reação foi realizada.

Temperatura		Velocidade da reação (μg de açúcares redutores formados mg^{-1} proteína solúvel total h^{-1}).
(°C)	(K)	
15	288	14,61*
20	293	26,97
25	298	37,97
30	303	48,69
35	308	58,42
40	313	66,21
45	318	72,54
50	323	93,18
55	328	127,46
60	333	134,18
65	338	29,89

* média de 4 repetições.

A energia de ativação normalmente observada para enzimas está na faixa de 4 a 20 Kcal mol^{-1} , por essa razão um aumento de 10°C na temperatura de 25°C aumenta a atividade enzimática numa faixa de 1,2 a 3,0, respectivamente (CHEETHAM, 1985; HARTMEIER, 1988).

Utilizando-se o logaritmo neperiano da velocidade da reação e o inverso da temperatura e considerando as diferenças nas declividades das relações obtidas, optou-se por calcular a energia de ativação nas faixas de temperatura de 15 a 45°C e 45 a 55°C. Obtidas as regressões lineares entre estes valores, foi calculada a energia de ativação segundo descrita por ARRHENIUS (1889) citado por LEHNINGER et al. (1995), o qual estabeleceu que a declividade da reta entre $1/T$ versus $\ln V$ é proporcional a energia de ativação ($-K = -E_a/R$) onde; K é a declividade da reta e R a constante dos gases. Utilizando-se das equações da reta entre $1/T$ e $\ln V$ para as faixas de temperatura de 15 a 45°C e 45 a 55°C foi possível calcular a energia de ativação. Procedendo-se desta forma, foram obtidos os valores de 38,60 e 48,87 KJ mol^{-1} em pH 4,5, respectivamente para faixas de temperatura de 15 a 45°C e 45 a 55°C. BERGAMASCO et al. (2000) caracterizando a atividade de invertase livre e imobilizada para uma faixa de temperatura de 35 a 65°C, obtiveram uma energia de ativação de 29,33 e 28,74 KJ mol^{-1} em pH 5,0 e 5,5 respectivamente para a enzima livre e para enzima imobilizada os valores da energia de ativação foram 27,44 e 24,85 KJ mol^{-1} em pH 4,5 e 5,0, respectivamente. Outros trabalhos constataram valores para energia de ativação da invertase numa faixa de 7,32 a 7,85 kcal mol^{-1} (DICKENSHEETS et al., 1977).

A partir da energia de ativação foram calculados os valores de Q_{10} , obtendo-se valores de 1,63 na faixa de temperatura de 15 a 45°C e 1,76 na faixa de 45 a 55°C. Esses valores indicam uma variação no comportamento da velocidade da reação conforme a faixa de temperatura estudada.

A taxa de uma reação química pode ser acelerada pelo aumento na temperatura por aumentar o movimento térmico e a energia, aumentando o número de moléculas capazes de entrar no estado de transição e assim apressar a taxa de reações químicas. Como regra geral, a taxa de uma reação duplica a cada 10°C de aumento na temperatura do sistema (HOLME & PECK, 1989).

CONCLUSÕES

Nas condições experimentais utilizadas foi possível concluir:

1) Pela análise da cinética enzimática na presença de inibidores, pode-se confirmar que a glicose é um inibidor não competitivo e a frutose um inibidor competitivo para invertase em tubérculos de batata.

2) A invertase ácida apresenta uma alta estabilidade térmica, aumentando sua atividade com a elevação da temperatura até 60°C, caracterizando-a como uma enzima altamente resistente a altas temperaturas.

3) Os valores de energia de ativação determinados foram de 38,60 e 48,87 KJ mol⁻¹ para as faixas de 15 a 45 °C e 45 a 55 °C, em pH 4,5, correspondendo respectivamente a valores de Q₁₀ de 1,63 e 1,76.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo financiamento do projeto pelo Edital Universal e concessão de Bolsa de Produtividade e a Embrapa – Clima Temperado através do Dr.Arione da Silva Pereira.

ABSTRACT

When potato tubers are stored under low temperatures, a process of accumulation of total soluble sugars occur and, when processed as "chips", a dark coloration of the product is observed. One of the mechanisms proposed to explain this fact is the increase in the activity of the invertase. To elucidate this fact, a partial characterization of the soluble acid invertase of mature potato tubers was accomplished, based on the inhibitor parameter effects and activation energy. After harvest, the potato tubers cv. Pérola, were conditioned at 4°C in the dark during 30 days, and then frozen until processing and partial purification of invertase. The protein extract was used for determination of the Maximum Velocity of reaction (V_{max}) and the Michaelis-Menten constant (K_M) obtained through the liberation of reducing sugars. Accomplished the enzymatic kinetics, the inhibitors glucose and fructose were added in the concentrations of 1 and 10 mM, to determine the kinetics of these inhibitors. The enzymatic kinetics in the presence of glucose in both concentrations presented an increase in the values of K_M and a reduction in V_{max} , characterizing the glucose as a non competitive inhibitor. The fructose addition resulted in a great increase in the K_M and also in V_{max} , characterizing as competitive inhibitor. For the activation energy, from 15 to 45°C and 45 to 60°C we observed the values 38,60 and 48,87 KJ mol⁻¹ with pH 4,5, respectively.

Key words: Solanum tuberosum L., sweetening, sugar.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, R.S.; EWING, E.E.; SENESAC, A. H Inhibition of potato tuber invertase by an endogenous inhibitor. **Plant Physiology**, Rockeville, v.66, p. 451-456, 1980.
- BERGAMASCO, R.; BASSETTI, F.J.; MORAES, F.F. de; et al. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Campinas, v.17, p.15-25, 2000.
- BERTI, C. **Simulação de alternativas de processos para a hidrólise da sacarose**. Maringá, 1996. 145f. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual de Maringa.
- BODNER, G.M.; NAKHLEH, M.B.; ROBINSON, W.R. Energia de ativação. Santa Maria, (S/D). Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/juca/activate.htm>> Acesso em 24 set. 2003.
- BRUNE, W. **Cálculo cinético em reações enzimáticas**. Viçosa :Empresa Universitária – UFV, 1978. 83p. .
- 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**, Wageningen, v.12, p. 81-95, 1969.
- 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**, Brasília, v.20, p.583-588, 2002.
- CHEETHAM, P.S.J. Principles of Industrial Enzymology Basis of Utilization of Soluble and Immobilized Enzymes in Industrial Processes. In: WISEMAN, A. (ed.) **Handbook of Enzyme Biotechnology**, New York, 2. ed., John Wiley: Chichester, 1985.
- CLARK, J.M.; SWITZER, R.L. **Experimental Biochemistry**. 2. ed. San Francisco :W.H. Freeman and Company, 1976. p.337
- 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**, Lavras, v.23, p. 899–910, 1999.
- DICKENSHEETS, P.A.; CHEN, L.F.; TSAO, G.T. Characteristics of Yeast Invertase Immobilized on Porous Cellulose. **Biotechnology and Bioenergetic**, New York, v.19, p. 365-375, 1977.
- HARTMEIER, W. **Immobilized Biocatalysts - An Introduction**. Berlin : Springer - Verlag, 1988.
- HOLME, D.J.; PECK, H. **Analytical biochemistry**. 3. ed. Singapore :British Library, 1989. 488p.
- ISLA, M.I.; SALERNO, G.; PONTIS, H.; et al. Purification and properties of the soluble acid invertase from *Oryza sativa*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.38, p. 321-325, 1995.
- ISLA, M.I.; VATTUONE, M.A.; SAMPIETRO, A.R. Modulation of potato invertase activity by fructose. **Phytochemistry**, Elmsford, v.30, p. 423-426, 1991.
- ISLA, M.I.; VATTUONE, M.A.; SAMPIETRO, A.R. Invertase activity associated with the walls of *Solanum tuberosum* tubers. **Phytochemistry**, Elmsford, v.50, p. 525-534, 1999.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- MENDES, C.R.; BACARIN, M.A.; BERVALD, C.M.P.; et al. Purificação parcial de uma invertase ácida solúvel de tubérculos de batata armazenados em baixa temperatura. **Revista Ceres**, Viçosa, 2005. No prelo.

- NELSON, N.A. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.153, p. 375-380, 1944.
- PEREIRA, A. da S.; COSTA, D.M. da. Qualidade e estabilidade de "chips" de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15, p.62-65, 1997.
- RICHARDSON, D.L.; DAVIES, H.V.; ROSS, H.A. et al. Invertase activity and its relations to hexose accumulation in potato tubers. **Journal of Experimental Botany**, London, v.41, p. 95-99, 1990.
- SAMOTUS, B.; NIEDZWIEDZ, M.; KOŁODZIEJ, Z.; et al. 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**, Wageningen, v.17, p. 64-81, 1974.
- SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A.; PRADO, F.E. A regulatory invertase from sugar cane leaf-sheaths. **Phytochemistry**, v.19, p.1637-1642, 1980.
- STURM, A. Invertases primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, Rockville, v.121, p.1-7, 1999.
- WOODWARD, J.; WISEMAN, A., Invertase. In: LEE, C. K. AND LINDLEY, M. G. (eds) **Developments in Food Carbohydrate**. London : Applied Science Publishers ,1975. p. 1-21.