



Proposta de Projeto de Iniciação Científica – Programa PIBIC

**“ATIVIDADE CATALÍTICA MÁXIMA DE ENZIMAS COMO FERRAMENTA PARA AUXILIAR O AUMENTO DE PRODUTIVIDADE EM CANA-DE-AÇÚCAR”**

Pesquisadora responsável: Dra Marina Câmara Mattos Martins Soldi (CTBE)

**Introdução**

As plantas são consideradas os sistemas químicos mais sofisticados do planeta (Stitt et al. 2010), capazes de utilizar a energia solar para converter CO<sub>2</sub> em carboidratos pela fotossíntese. Embora tradicionalmente o metabolismo vegetal seja dividido em vias distintas, na realidade ele opera como uma rede altamente integrada (Sweetlove et al. 2008). A coordenação e modulação dos processos metabólicos celulares em respostas às mudanças ambientais e de desenvolvimento ocorre através da regulação da atividade de enzimas.

A atividade de enzimas representa uma informação integrada dos fatores genéticos e ambientais que afetam a expressão gênica, metabolismo e crescimento vegetal. Ensaio enzimáticos propiciam informações funcionais e quando realizados em condições otimizadas permitem mensurar a atividade máxima (ap Rees & Hill 1994), essencial para compreender como as enzimas operam em redes metabólicas que produzem substratos para o crescimento e acúmulo de reservas (Stitt & Gibon 2014), como a sacarose em colmos de cana-de-açúcar. Determinar a atividade de enzimas difere de outras tecnologias “ômicas” porque envolve acessar a taxa de uma reação, que por sua vez requer condições apropriadas de pH, temperatura e concentração de substrato para cada enzima de interesse (ap Rees & Hill 1994).

A importância econômica da cana-de-açúcar para o setor sucroenergético brasileiro é inquestionável em virtude de sua utilização como matéria prima para a produção de sacarose e bioetanol, sendo o Brasil um dos maiores exportadores do mundo atualmente. A cana-de-açúcar é uma gramínea com metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>, considerada altamente eficiente na conversão de energia luminosa em biomassa. Além disso, sua produção é sustentável no que diz respeito à eficiência de carbono e rendimento bioenergético por hectare (Tamisola 2010).

O melhoramento clássico de cana-de-açúcar é geralmente empírico, conduzido com pouco ou nenhum entendimento sobre as bases fisiológicas ou genéticas de caracteres de interesse (Moore & Ming 2011, Verma et al. 2011). Os programas brasileiros de melhoramento obtiveram sucesso no desenvolvimento de novas variedades e melhores práticas agrônomicas para aumentar a produtividade tanto em termos de biomassa como em conteúdo de açúcar nos últimos 25 anos (Dal-Bianco et al. 2012). Entretanto, os cultivares gerados são pouco caracterizados fisiologicamente e bioquimicamente.

O presente projeto tem por objetivo determinar a atividade de diferentes enzimas do metabolismo primário como ferramenta para auxiliar na elucidação de processos chaves que influenciam fortemente a produtividade de cana-de-açúcar, como capacidade de acúmulo de sacarose nos colmos, uso eficiente de fontes nitrogenadas e eficiência fotossintética.

## **Metodologia**

### *Material vegetal*

Três experimentos distintos foram conduzidos visando avaliar a variabilidade de diferentes cultivares de cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum spp*) em relação ao (i) metabolismo de acúmulo de sacarose nos colmos, (ii) preferência de uso de nitrogênio e (iii) atividade fotossintética ao longo da folha. Amostras foram coletadas e estão congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise.

### *Determinação da atividade catalítica máxima de enzimas importantes do metabolismo primário*

Amostras contendo cerca de 50 mg de material vegetal fresco e pulverizado serão extraídas com tampão contendo 50 mM Hepes/KOH pH 7.5, 10% (v/v) glicerol, 0.25% (p/v) BSA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM benzamidina, 1 mM ácido aminocapróico, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoride, 10  $\mu\text{M}$  leupeptina, 1 mM DTT e 2% (p/v) polivinilpolipirrolidona insolúvel (Gibon et al. 2004). As atividades das enzimas invertase ácida vacuolar (Ma et al. 2000), sacarose fosfato sintase (Gibon et al. 2004), nitrato redutase (Wray & Fido 1990), glutamina sintetase (O'Neal & Joy 1973) e fosfoenolpiruvato descarboxilase (Ashton et al. 1990) serão otimizadas para diferentes tecidos de cana-de-açúcar (folhas, colmos, gemas e raízes).

O bolsista de iniciação científica estará envolvido em diversas etapas da execução deste projeto, incluindo preparação de amostras, extração de enzimas, otimização dos ensaios enzimáticos, análise dos resultados e confecção de relatórios.

## **Referências**

- Ap Rees T, Hill SA** (1994) Metabolic control analysis of plant metabolism. *Plant, Cell and Environment* 17: 587-599.
- Ashton AR, Burnell JN, Furbank RT, Jenkins CLD, Hatch MD** (1990) Enzymes of  $\text{C}_4$  photosynthesis. In: In PM Dey, JB Harborne (eds), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 3. Academic Press, San Diego, pp 39-72.
- Dal-Bianco M, Carneiro MS, Hotta CT, Chapola RG, Hoffmann HP, Garcia AAF, Souza GM** (2012) Sugarcane improvement: how far can we go? *Current Opinion in Biotechnology* 23: 265-270.
- Gibon Y, Bläsing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JH, Fisahn J, Höhne M, Gunther M, Stitt M** (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days, depletion of sugar during the night

leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant Journal* 39: 847-862.

- Ma H, Albert HH, Paul R, Moore PH** (2000) Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cells. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 1021-1030.
- Moore PH, Ming R** (2011) Sugarcane breeding and biotechnology to feed the emergent sugarcane biorefinery industry. *Tropical Plant Biology* 4:1-2.
- O'Neal D, Joy KW** (1973) Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization and pH optima. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 159: 113-122.
- Stitt M, Sulpice R, Keurentjes J** (2010) Metabolic networks: how to identify key components in the regulation of metabolism and growth. *Plant Physiology* 152: 428-444.
- Stitt M, Gibon Y** (2014) Why measure enzyme activities in the era of systems biology? *Trends in Plant Science* 19: 256-265.
- Sweetlove LJ, Fell D, Fernie AR** (2008) Getting to grips with the plant metabolic network. *The Biochemical Journal* 409: 27-41.
- Tammisola J** (2010) Towards much more efficient biofuel crops - can sugarcane pave the way? *GM Crops* 1: 181-198.
- Verma AK, Upadhyay SK, Verma PC, Solomon S, Singh SB** (2011) Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars. *Plant Biology* 13: 325-332.
- Wray JL, Fido RJ** (1990) Nitrate reductase and nitrite reductase. In PM Dey, JB Harborne (eds), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 3. Academic Press, San Diego, pp 241-256.