

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

EQB738 – ENGENHARIA ENZIMÁTICA



Conceitos Introdutórios

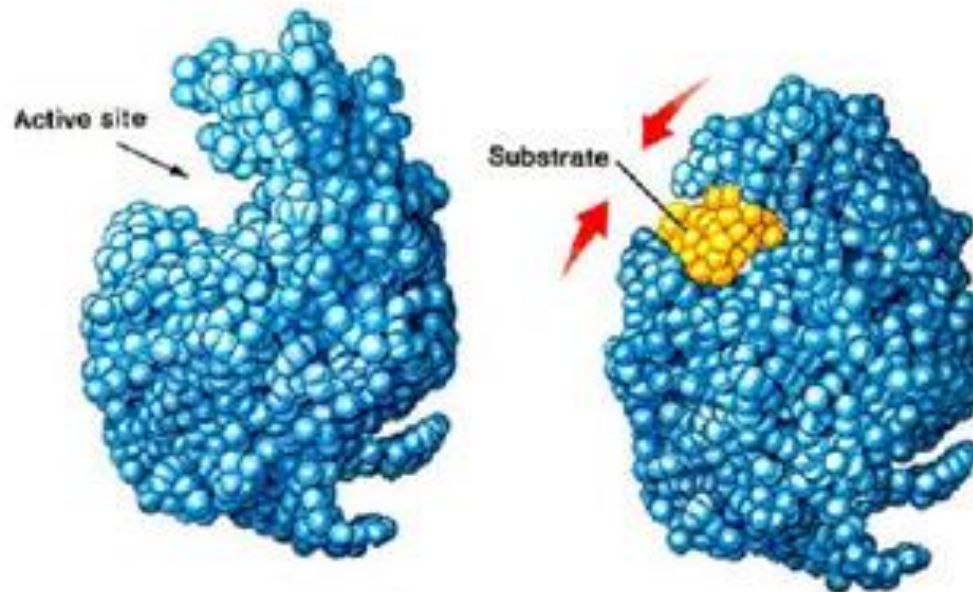
Prof Bernardo Dias

bernardo@eq.ufrj.br

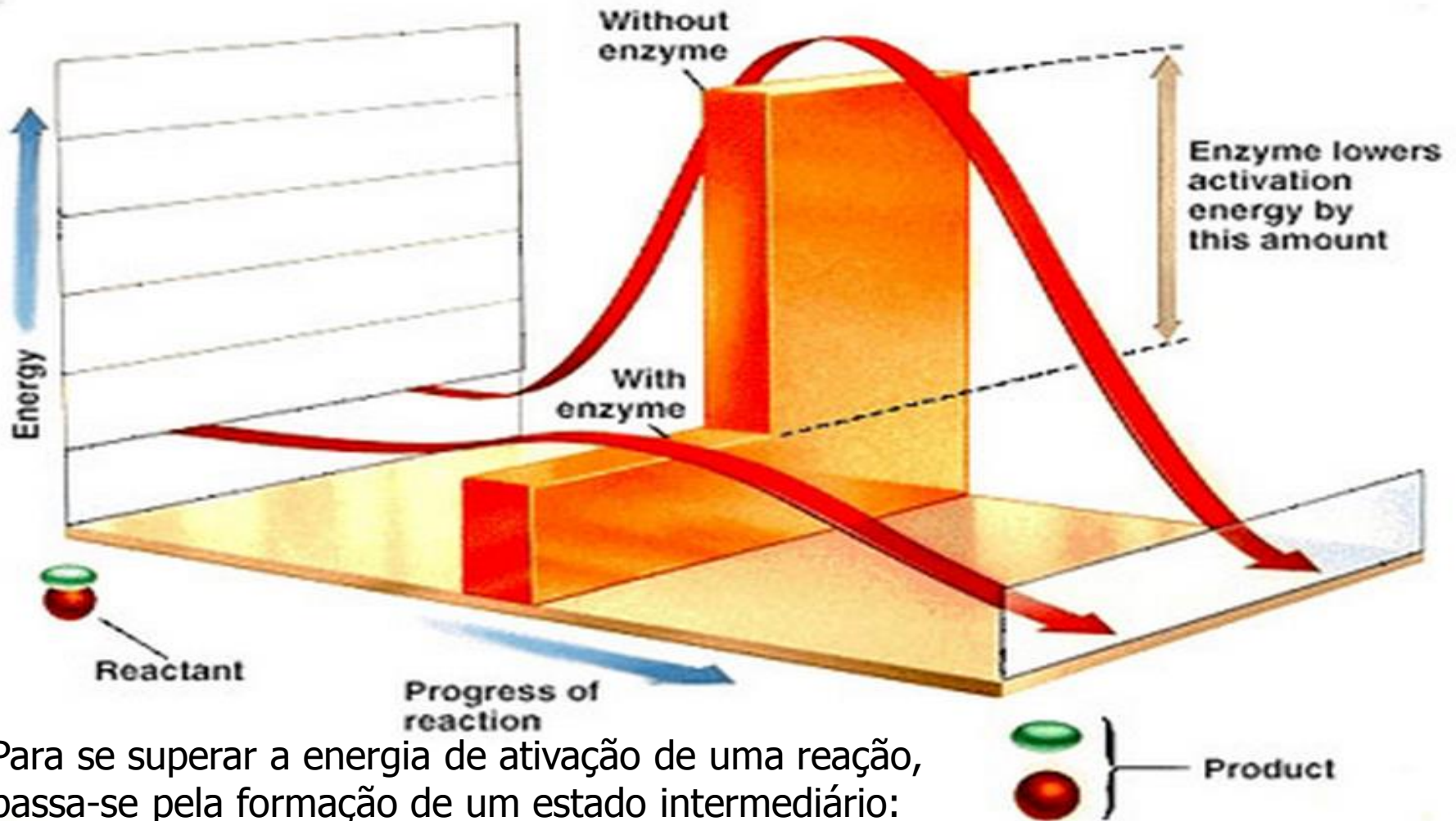
E-102/E-103, <http://www.eq.ufrj.br/biose/>

Enzimas

- Biocatalisadores
- Proteínas altamente específicas
- Atuam eficientemente sob condições brandas, que são as requeridas para preservar a funcionalidade e integridade de sistemas biológicos



Enzimas



Para se superar a energia de ativação de uma reação, passa-se pela formação de um estado intermediário:

"Estado de Transição", sempre um composto instável e de alta energia, representado por "ES*", onde o substrato está ligado ao sítio catalítico da enzima com altíssima afinidade.

Enzimas

Ex: Decomposição do H_2O_2



Condições da Reação	Energia livre de Ativação KJ/mol Kcal/mol		Velocidade Relativa
Sem catalisador	75,2	18,0	1
Platina	48,9	11,7	$2,77 \times 10^4$
Enzima Catalase	23,0	5,5	$6,51 \times 10^8$

Características

<i>Característica</i>	<i>Enzimas</i>	<i>Catalisadores Químicos</i>
Especificidade ao substrato	alta	baixa
Natureza da estrutura	complexa	simples
Sensibilidade à T e pH	alta	baixa
Condições de reação (T, P e pH)	suaves	drástica (geralmente)
Custo de obtenção (isolamento e purificação)	alto	moderado
Natureza do processo	batelada	contínuo
Consumo de energia	baixo	alto
Formação de subprodutos	baixa	alta
Separação catalisador/ produtos	difícil/cara	simples
Atividade Catalítica (temperatura ambiente)	alta	baixa
Presença de cofatores	sim	não
Estabilidade do preparado	baixa	alta
Energia de Ativação	baixa	alta
Velocidade de reação	alta	baixa

Histórico

<i>Year(s)</i>	<i>Who?</i>	<i>Where?</i>	<i>What?</i>
BC	Unknown	Old World	Chymosin from calf and sheep stomach utilized for production of cheese
1783– 1836	Spallanzani		verifies in vitro “digestion” of meat in stomach juice: factor called “pepsin”
1876	Kühne		term “enzyme” for catalysts not bound to living cells (“unorganized ferments”)
1877	Eduard Buchner (Nobel prize 1907)	Berlin Agricultural College, Germany	1st alcoholic respiration with cell-free extract: vital force, <i>vis vitalis</i> , does not exist
1893	Wilhelm Ostwald	Leipzig Univ., Germany	definition of term “catalyst” (Nobel prize 1909)
1894	Emil Fischer	Berlin Univ., Germany	“lock-and-key” concept (Nobel prize 1902)
1903	Henry D. Dakin	London, UK	1st enantioselective synthesis, with oxynitrilase
1908	Otto Röhm	Darmstadt, Germany	Patent for enzymatic treatment of leather (with trypsin)
1913– 1915	Röhm Company	Darmstadt, Germany	1st laundry detergent with enzyme (pancreatin): “Burnus”

Histórico

1926	James B. Sumner	Cornell Univ., Ithaca, NY, USA	1st enzyme crystallized: urease from jack beans (Nobel prize 1946)
1936	Ernst Sym		lipase reaction in organic solvent
1950	Pehr Edman	Univ. of Lund, Sweden	protein degradation developed
1960		Novo (Bagsvaerd, Denmark)	large-scale protease production from <i>Bacillus licheniformis</i> in submerged culture
1963	Stanford Moore and William Stein	Rockefeller Univ., New York, USA	amino acid sequence of lysozyme and ribonuclease elucidated (Nobel prize 1972)
1978	Stanley Cohen and Herbert Boyer	Stanford, CA, USA	method of recombination of DNA developed
1985	Michael Smith	Univ. of British Columbia, Canada	site-directed gene mutagenesis to change enzyme sequence (Nobel prize 1993)
1988	Kary B. Mullis	Cetus Corp., CA, USA	invention of PCR (Nobel prize 1993)
2000	Celera Genomics	Gaithersburg, MD, USA	sequencing of human genome announced (3 billion basepairs)

Nomenclatura

- ✚ **Nome Recomendado:** Mais curto e utilizado no dia a dia de quem trabalha com enzimas; Utiliza o sufixo "ase" para caracterizar a enzima. Exs: Urease, Hexoquinase, Peptidase, etc.
- ✚ **Nome Sistemático (IUB):** Mais complexo, nos dá informações precisas sobre a função metabólica da enzima. Ex: ATP-Glicose-Fosfo-Transferase.
- ✚ **Nome Usual** : Consagrados pelo uso; Exs: Tripsina, Pepsina, etc.

Nomenclatura

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>



INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc.

If the table below is unusable
check this button
for an alternative presentation

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>

World Wide Web material prepared by G. P. Moss

School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary, University of London,
Mile End Road, London, E1 4NS, UK

g.p.moss@qmul.ac.uk

To search the database [click here](#).

[What's Here and What's New](#)

[Changes to Published Documents for World Wide Web Presentation](#)

[Home page for IUBMB](#)

Full text of IUBMB Nomenclature Committee Recommendations

[Enzyme Nomenclature](#)

[EC 1 Oxidoreductases](#)

[EC 2 Transferases](#)

[EC 3 Hydrolases](#)

[EC 4 Lyases](#)

[EC 5 Isomerases](#)

[EC 6 Ligases](#)

[Supplements](#)

[Proposed New Enzymes](#)
New June 2014

[Enzyme Reaction Diagrams](#)

[Multiple Forms of Enzymes \(Isoenzymes\)](#)

[Multienzymes](#)

[Nomenclature Nucleic Acid Sequences
\(incompletely specified bases\)](#)

[Junctions and Branchpoints in Nucleic Acids](#)

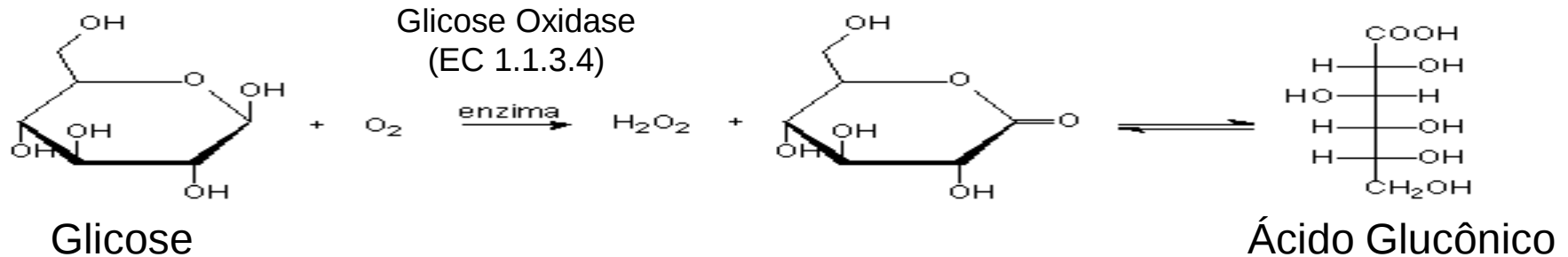
[Enzymes Kinetics](#)

Classificação

1. Oxidorredutases

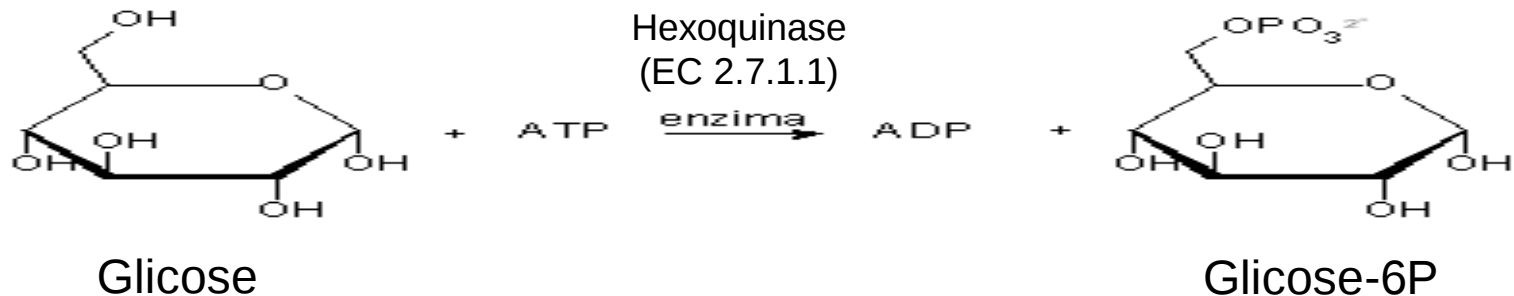
catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja: reações de oxi-redução. São as Desidrogenases e as Oxidases.

atuam em CH-OH, C=O, C=O⁻, CH-NH₂, CH-NH- e NADH, NADPH.



2. Transferases

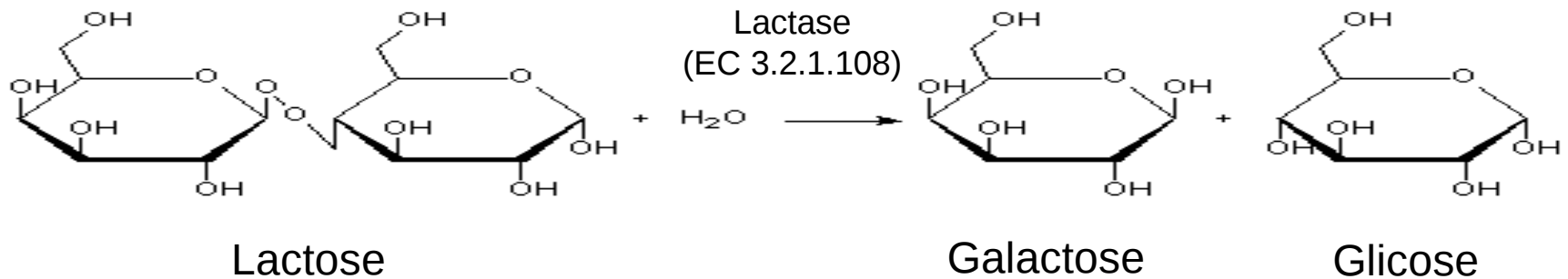
catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc. Como exemplo temos as Quinases e as Transaminases. Atuam em grupos com um carbono, aldeído ou cetona, acil, glicosil, fosfatos ou grupos contendo enxofre



Classificação

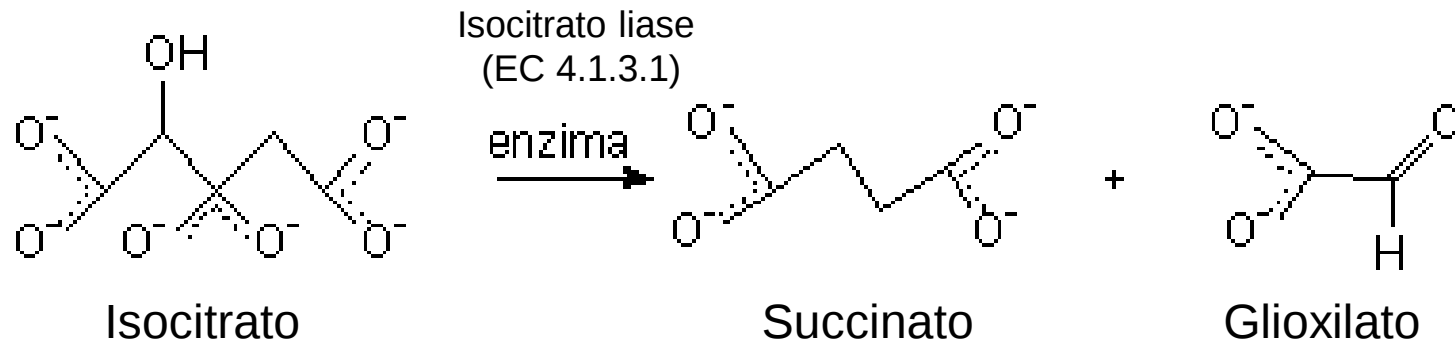
3. Hidrolases

Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente. Ex: as peptidases; hidrólises de ésteres, ligações glicosídicas, ligações peptídicas, outras ligações C-N ou anidridos ácidos.



4. Liases

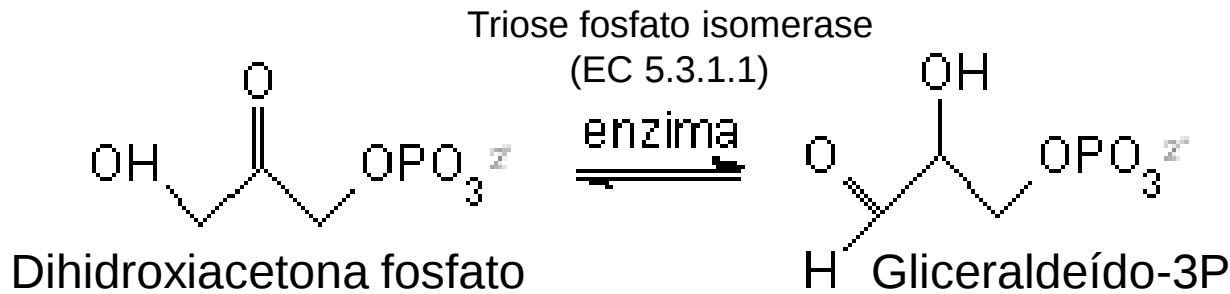
Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico. As Dehidratases e as Descarboxilases são bons exemplos; =C=C= , =C=O e =C=N



Classificação

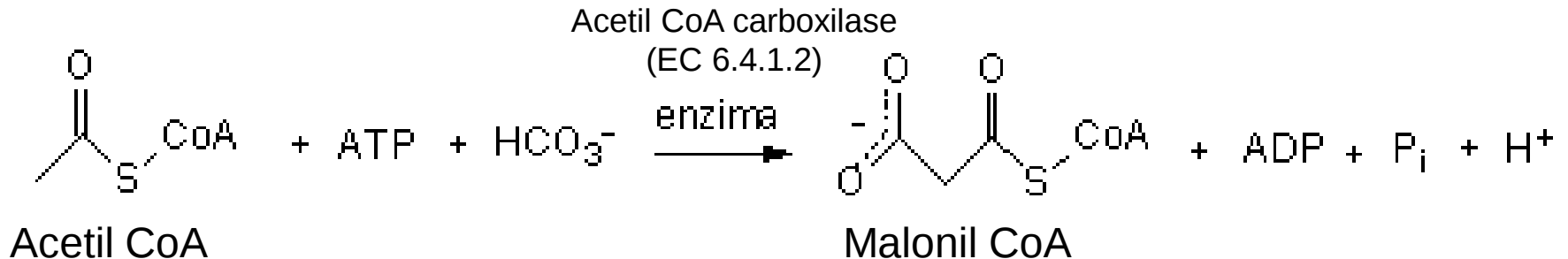
5. Isomerases

Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos. *As Epimerases são exemplos;*

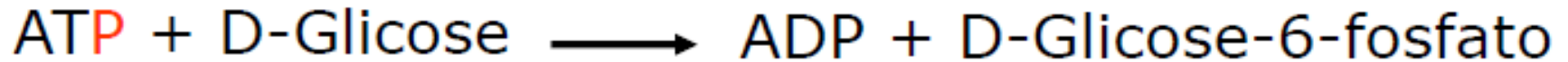


6. Ligases

Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre às custas de energia (ATP). *São as Sintetases*



Classificação



IUB - ATP:glicose fosfotransferase

E.C. 2.7.1.1

2 - classe - Transferase

7 - subclasse - Fosfotransferases

1 - sub-subclasse - Fosfotransferase que utiliza grupo hidroxila como receptor

1 - indica ser a D-glicose o receptor do grupo fosfato

Nome trivial: Hexoquinase

Classificação

<http://www.brenda-enzymes.org/>



BRENDA 

The Comprehensive Enzyme Information System

EC-Number	Enzyme Name	Organism	Protein	Full text	Ligand	Advanced Search
Search		Display 10 entries				

New BRENDA release online since July 2014

Nomenclature	Reaction & Specificity	Functional Parameters
Enzyme Names EC Number Common/ Recommended Name Systematic Name Synonyms CAS Registry Number	Pathway Catalysed Reaction Reaction Type Natural Substrates and Products Substrates and Products Substrates Natural Substrate Products Natural Product Inhibitors Cofactors Metals/Ions Activating Compounds Ligands Biochemicals Reactions Aligned	Km Value kcat/Km Value Ki Value IC50 Value pI Value Turnover Number Specific Activity pH Optimum pH Range Temperature Optimum Temperature Range Kinetic ENzyme DATA
Isolation & Preparation		Organism-related information
Purification Cloned Expression Renatured		Organism Source Tissue Localization

Classificação

- Quanto à sua origem: Endocelulares
 Exocelulares.
- Quanto ao seu modo de ação: Endoenzimas
 Exoenzimas
- Quanto ao seu uso

Enzima como produto (lactase, collagenase, proteases):

Matéria prima $\longrightarrow$ *Enzima*

Enzima catalisando a reação principal (amilase, glicose-isomerase, invertase):

Matéria prima $\xrightarrow{\text{Enzima}}$ Produto

Enzima catalisando reações secundárias do processo produtivo (proteases):

Matéria prima $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Produto
 $\uparrow$
Enzima *Enzima* *Enzima*

Estrutura

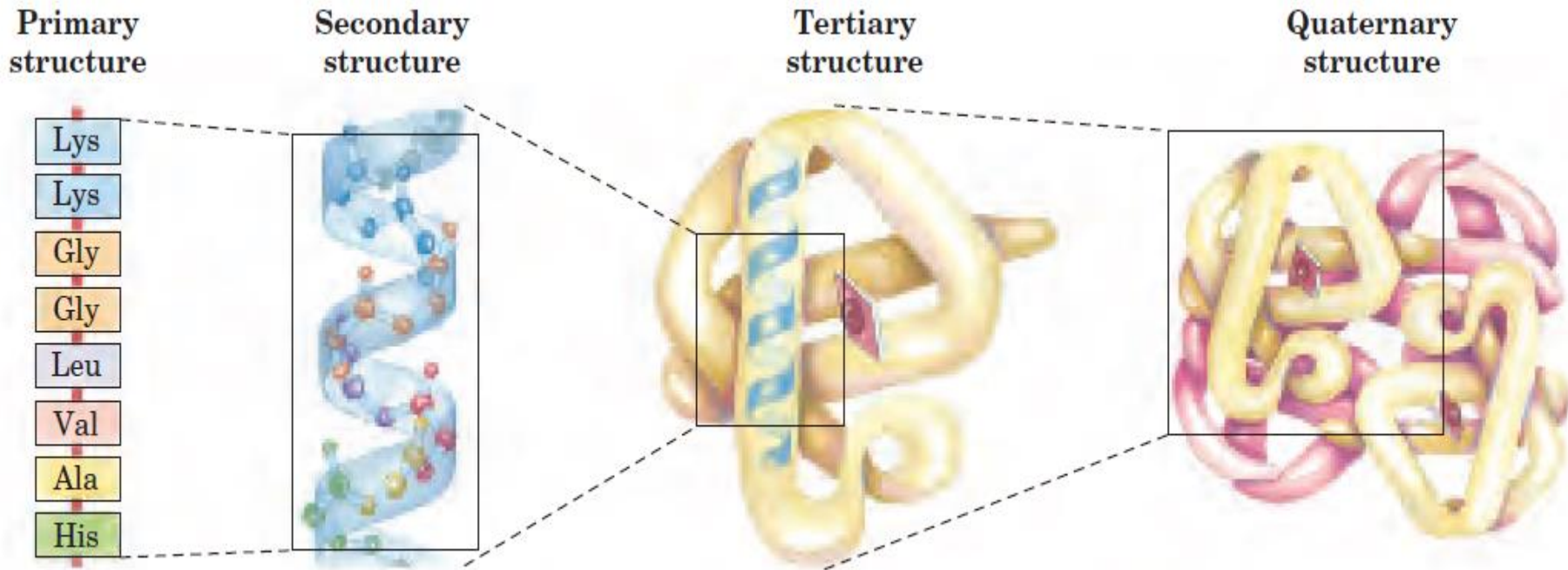


TABLE 4-1 Secondary Structures and Properties of Fibrous Proteins

Structure	Characteristics	Examples of occurrence
α Helix, cross-linked by disulfide bonds	Tough, insoluble protective structures of varying hardness and flexibility	α -Keratin of hair, feathers, and nails
β Conformation	Soft, flexible filaments	Silk fibroin
Collagen triple helix	High tensile strength, without stretch	Collagen of tendons, bone matrix

Estrutura

Ligação Dissulfeto => Amarelo

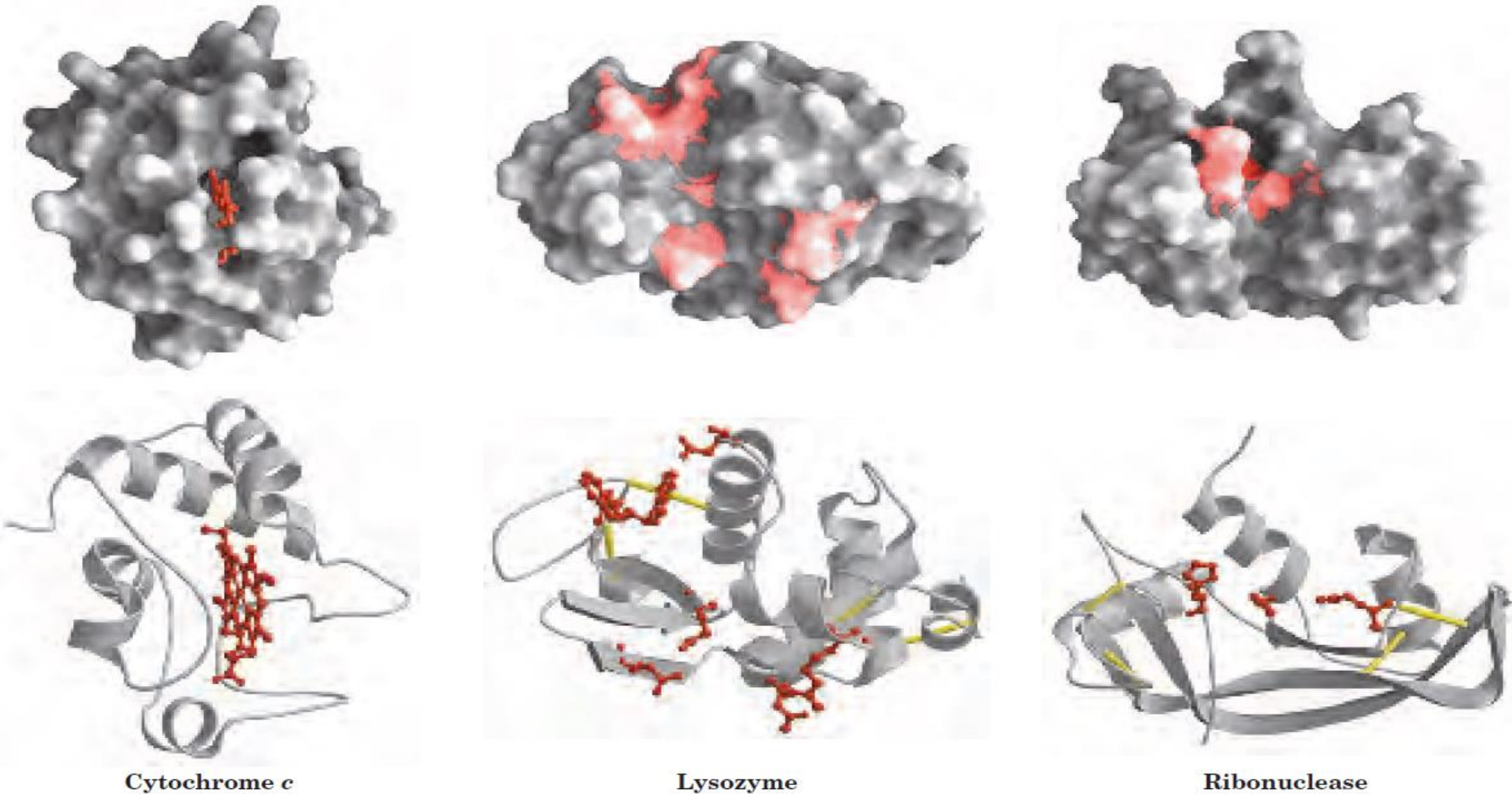
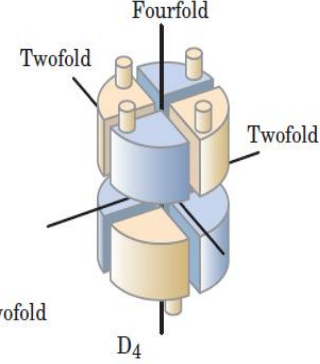
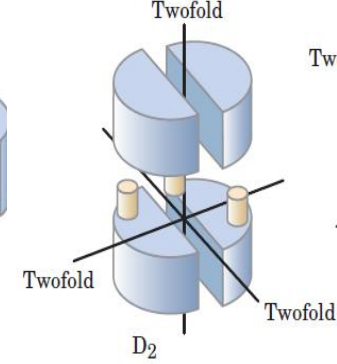
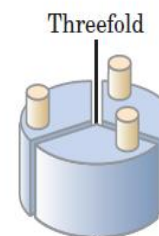
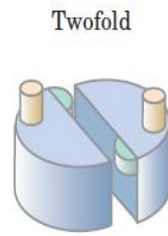
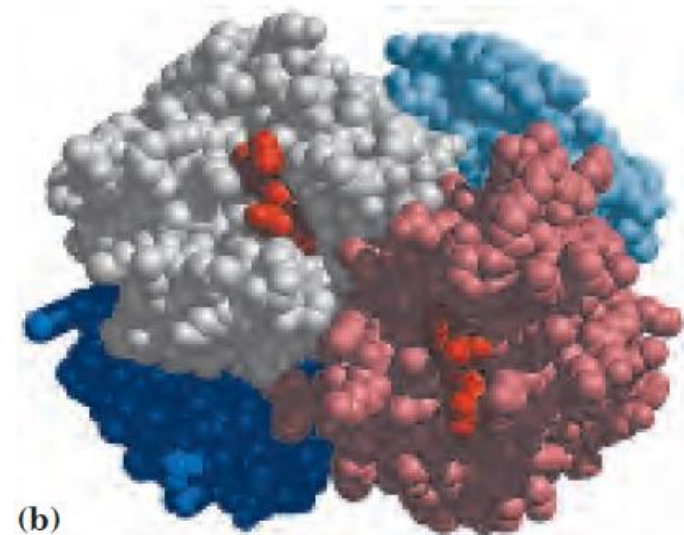
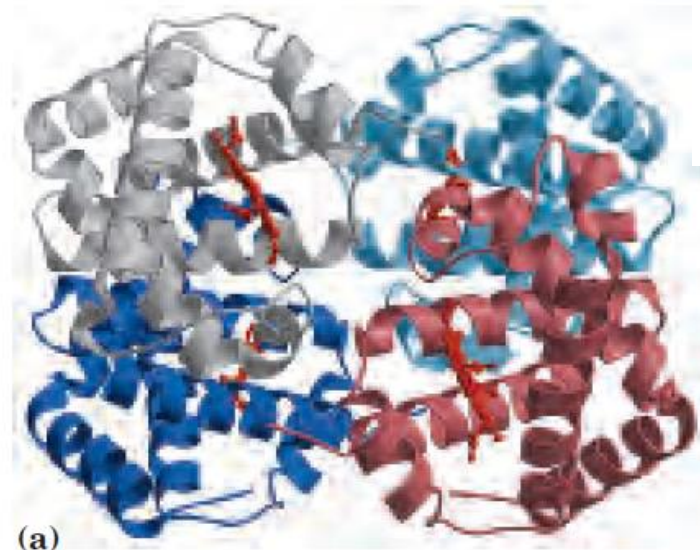


FIGURE 4-18 Three-dimensional structures of some small proteins. Shown here are cytochrome c (PDB ID 1CCR), lysozyme (PDB ID 3LYM), and ribonuclease (PDB ID 3RN3). Each protein is shown in surface contour and in a ribbon representation, in the same orientation. In the ribbon depictions, regions in the β conformation are

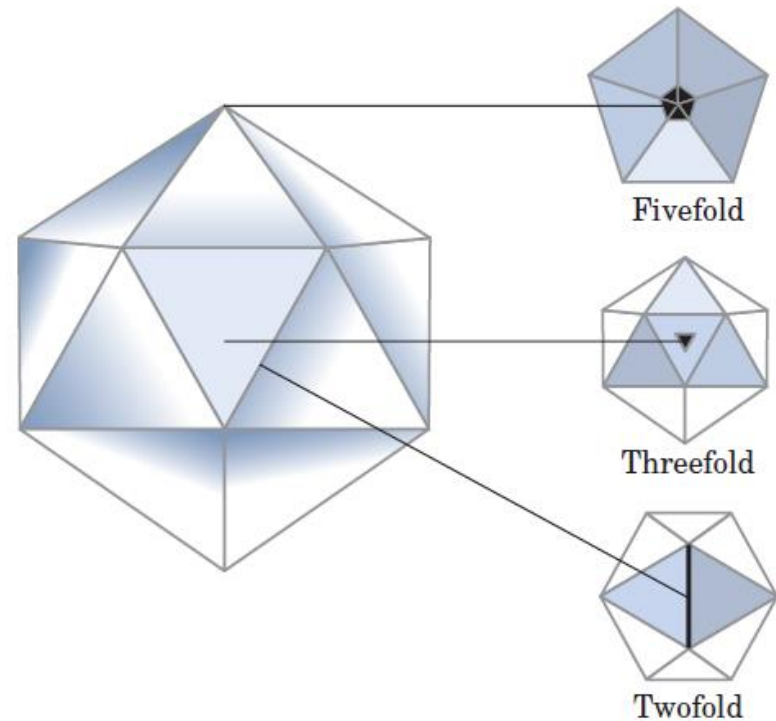
represented by flat arrows and the α helices are represented by spiral ribbons. Key functional groups (the heme in cytochrome c; amino acid side chains in the active site of lysozyme and ribonuclease) are shown in red. Disulfide bonds are shown (in the ribbon representations) in yellow.

Estrutura



Two types of cyclic symmetry
(a)

Two types of dihedral symmetry

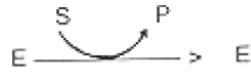


Icosahedral symmetry
(c)

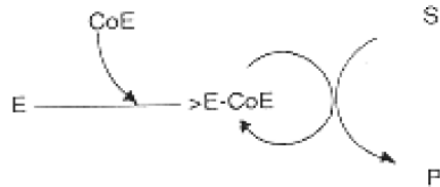
FIGURE 4-23 Quaternary structure of deoxyhemoglobin. (PDB ID

Cofatores e Coenzimas

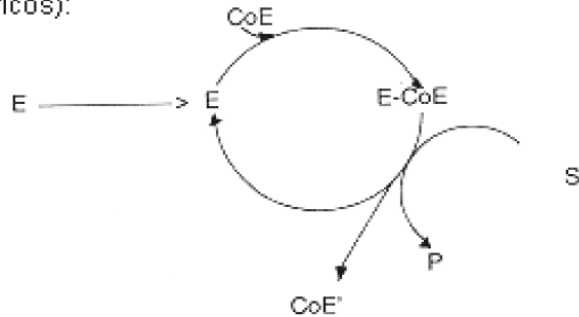
Enzima sem exigência de co-fatores:



Enzima com requerimento de co-fatores ligados (catalíticos):



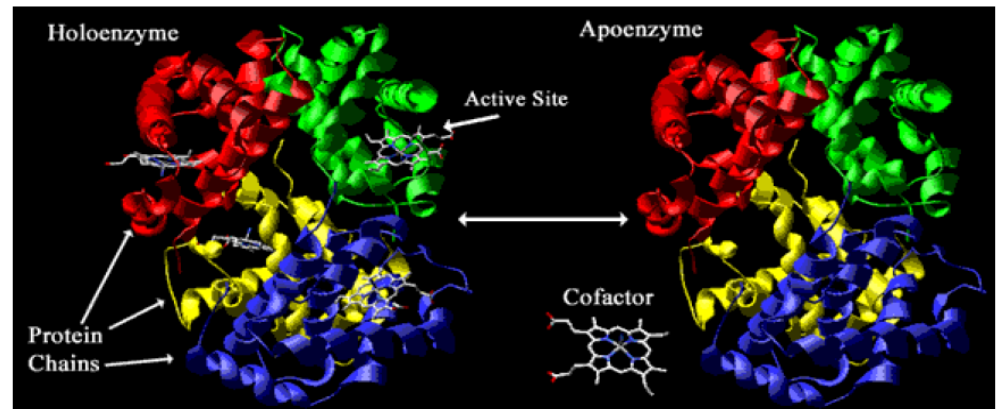
Enzima com requerimento de co-fatores dissolváveis (estequiométricos):



Região da molécula enzimática que participa da reação com o substrato.

Pode possuir componentes não protéicos: cofatores

Possui aminoácidos auxiliares e de contato.



APOENZIMA (porção proteica) + GRUPO PROTÉTICO → HOLOENZIMA

Cofatores e Coenzimas

TABLE 6–1 Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu^{2+}	Cytochrome oxidase
Fe^{2+} or Fe^{3+}	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Pyruvate kinase
Mg^{2+}	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

Cofatores e Coenzimas

TABLE 6-2 Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups

<i>Coenzyme</i>	<i>Examples of chemical groups transferred</i>	<i>Dietary precursor in mammals</i>
Biocytin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (:H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

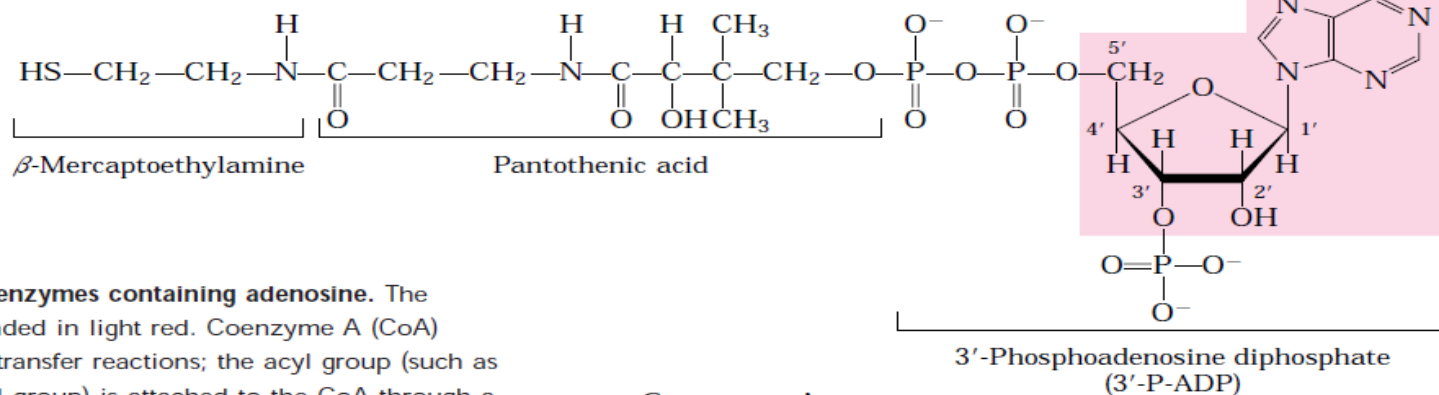
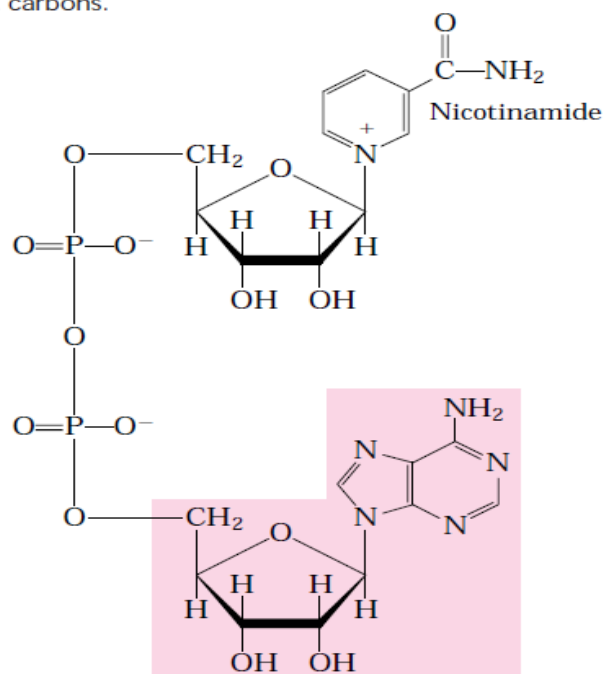
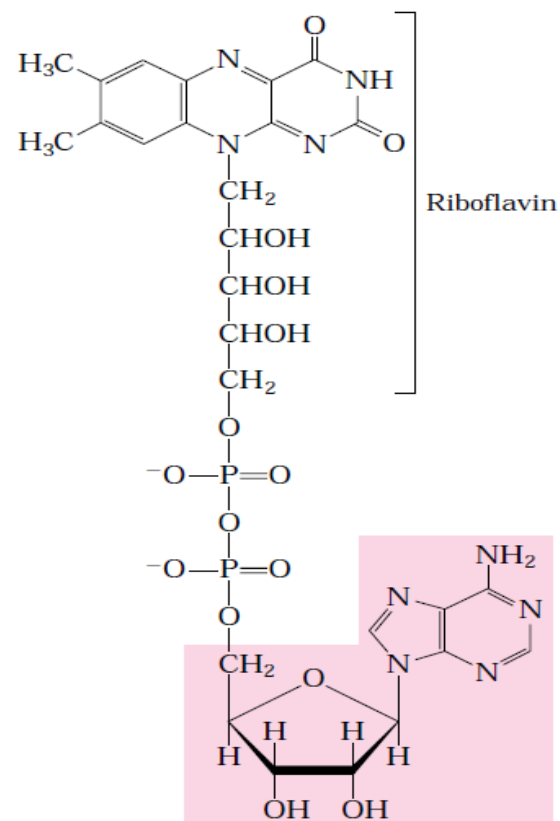


FIGURE 8-41 Some coenzymes containing adenosine. The adenosine portion is shaded in light red. Coenzyme A (CoA) functions in acyl group transfer reactions; the acyl group (such as the acetyl or acetoacetyl group) is attached to the CoA through a thioester linkage to the β -mercaptoethylamine moiety. NAD^+ functions in hydride transfers, and FAD, the active form of vitamin B_2 (riboflavin), in electron transfers. Another coenzyme incorporating adenosine is 5'-deoxyadenosylcobalamin, the active form of vitamin B_{12} (see Box 17-2), which participates in intramolecular group transfers between adjacent carbons.

Coenzyme A



Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)



Flavin adenine dinucleotide (FAD)

Atividade Enzimática

International Unit (IU) → quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μmol substrato (ou a formação de 1 μmol produto) em 1 min, em condições estabelecidas.

Temperatura → 30°C ou 37°C (temperatura corporal)

pH → valor ótimo ou fisiológico, especificando o tampão utilizado

Atividade Específica (IU/mg) → relação entre IU da enzima e mg de proteína → indica maior pureza da enzima

Atividade molecular (ou número de turnover) (IU/mol) → relação entre IU da enzima e μmol de enzima.

Obs: Se o número de sítios ativos por molécula de enzima for conhecido →

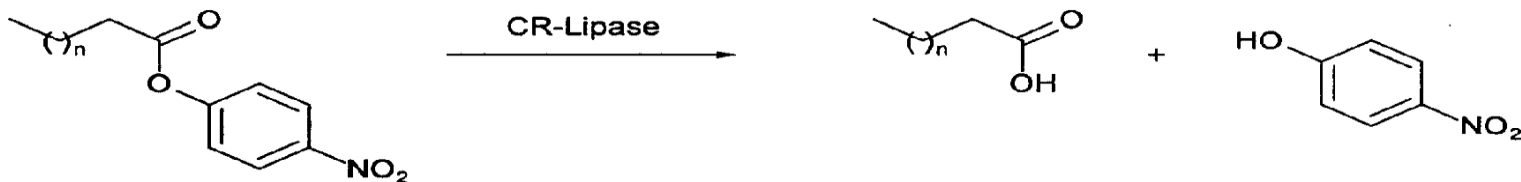
Atividade do centro catalítico = $\text{IU}/n^{\circ}\text{sítios ativos}$

Katal (kat) → recomendado pela Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (raramente utilizado) → substitui o minuto por segundo na definição de atividade enzimática

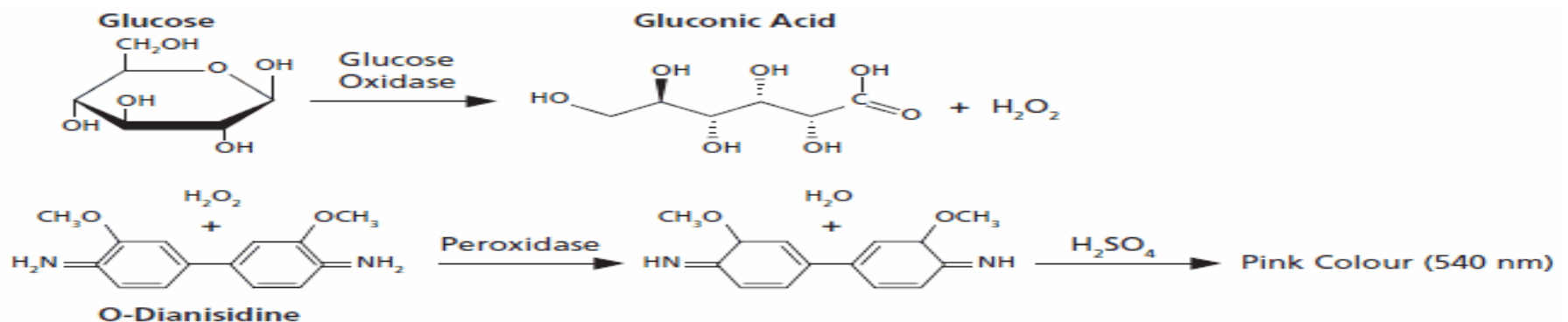
Análise Quantitativa

Ensaio direto: medida direta da diferença entre propriedades de substratos e/ou produtos em função do tempo.

Ensaio indireto: prévio tratamento da mistura reacional gerando um produto mensurável ou para aumentar a conveniência ou a sensibilidade do ensaio.

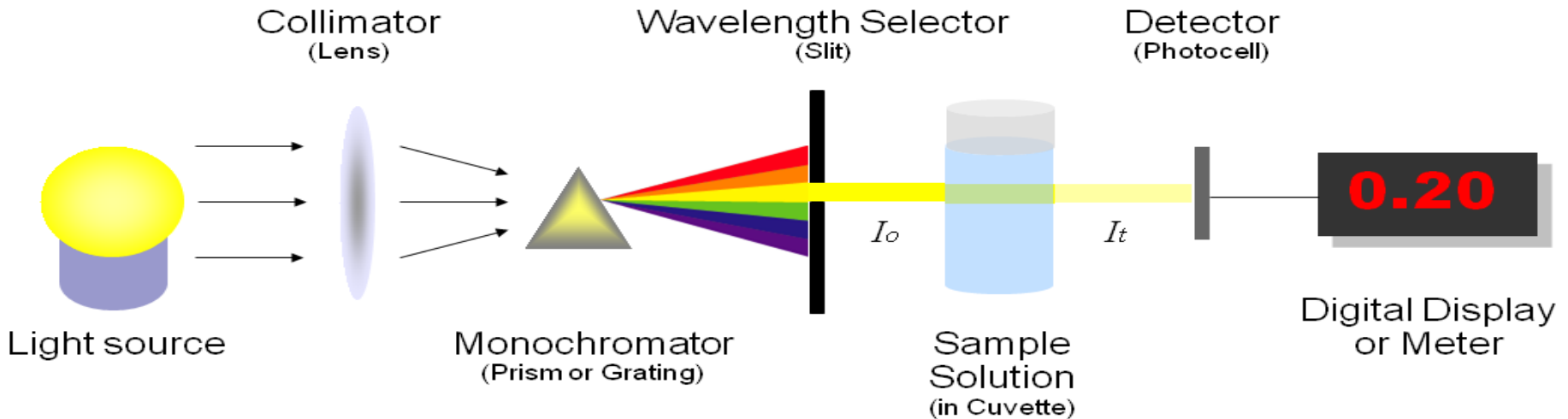


Ensaio acoplado: utilização de uma ou mais enzimas para catalisar a reação de um dos produtos gerando um composto que pode detectado diretamente.

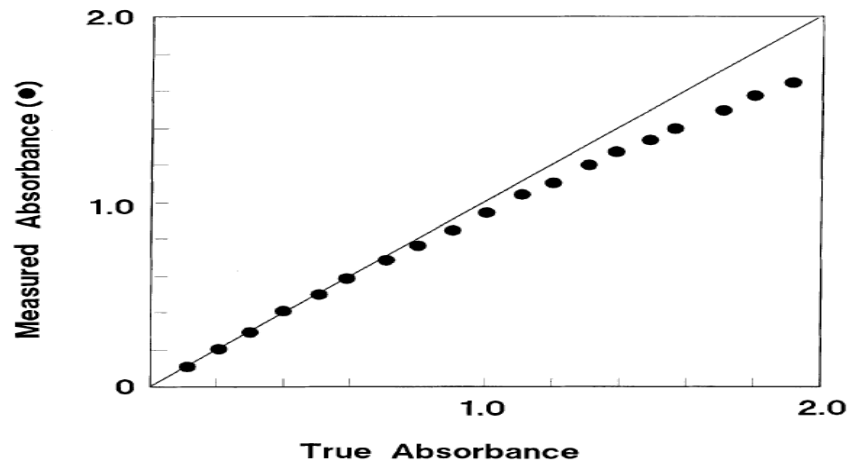


Métodos de Análise

Espectrofotometria



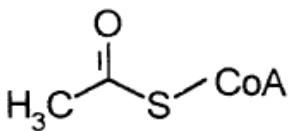
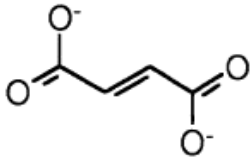
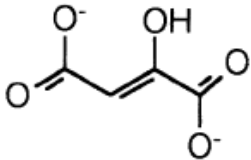
Medida da absorção de luz (UV-Vis)
→ Lei de Lambert-Beer



Métodos de Análise

Espectrofotometria

Table 1 Absorbance characteristics of some naturally occurring, UV-absorbing substrates. The wavelengths given are those which maximize the difference between substrate and product absorbances

Compound	Absorbance characteristics	Enzymes
Acetyl coenzyme A 	232 nm $\epsilon = 4500 \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Choline acetyl transferase and other acetyltransferases
Fumarate 	240 nm $\epsilon = 2440 \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Fumarase Argininosuccinase
Oxaloacetate 	265 nm $\epsilon = 950 \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Oxaloacetate decarboxylase

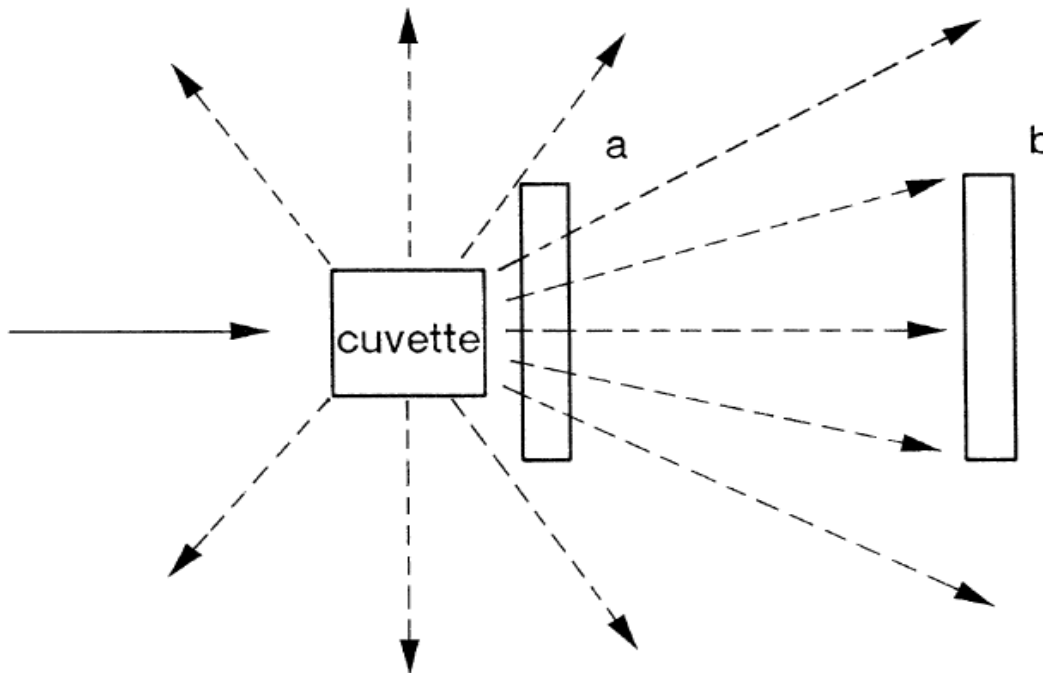
Métodos de Análise

Turbidimetria

Ação sobre polímeros insolúveis → Alteração da turbidez (espalhamento de luz)

Análise mais difícil em relação a reprodutibilidade → Suspensões

Medidas de turbidez variam com a distância entre o luz espalhada e o detector



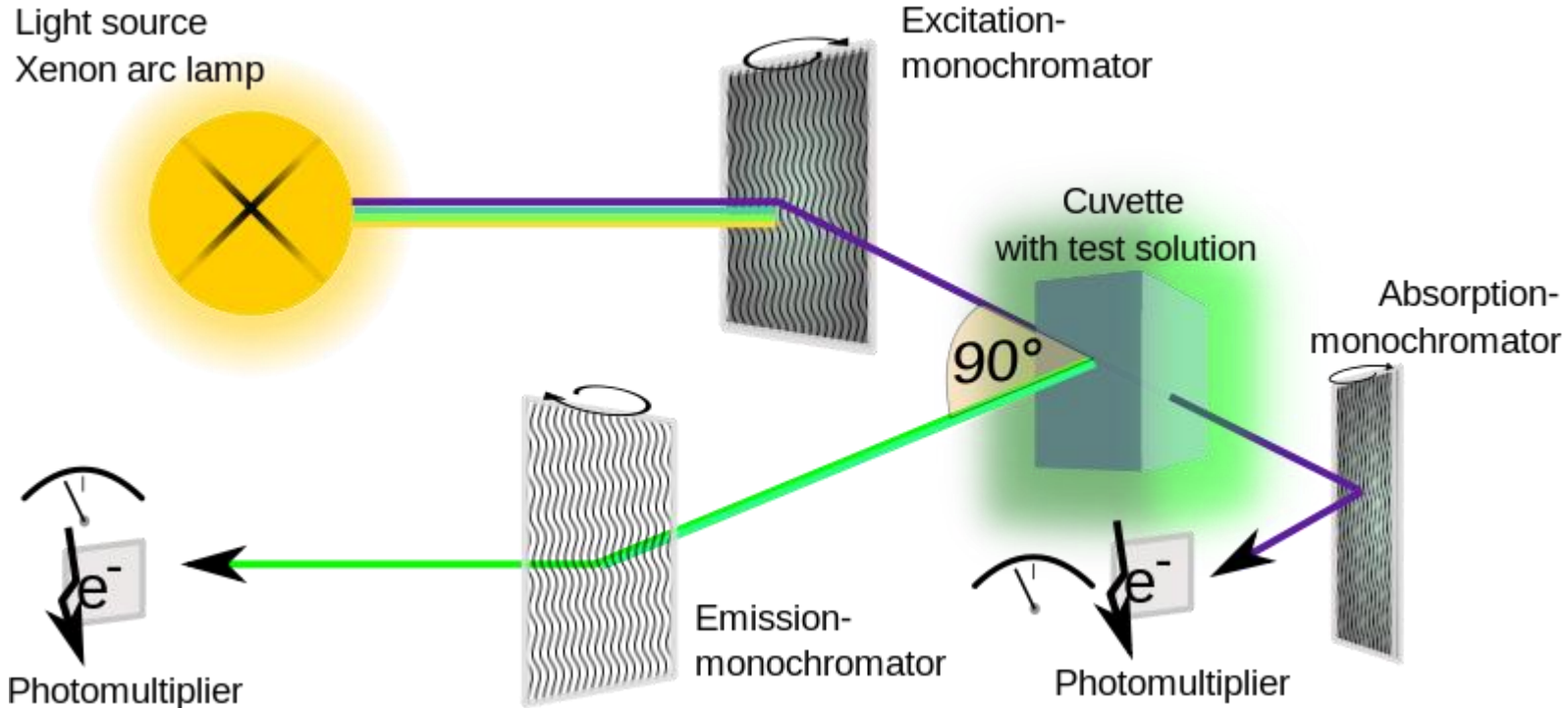
Exemplo: Lisozima atuando sobre paredes celulares bacterianas

$\lambda = 450 \text{ nm}$

one unit of activity → produces an initial rate of change in 'absorbance' of 0.001 per min when the volume in the cuvette is 2.6 ml (other conditions being pH 6.24 and 25°C).

Métodos de Análise

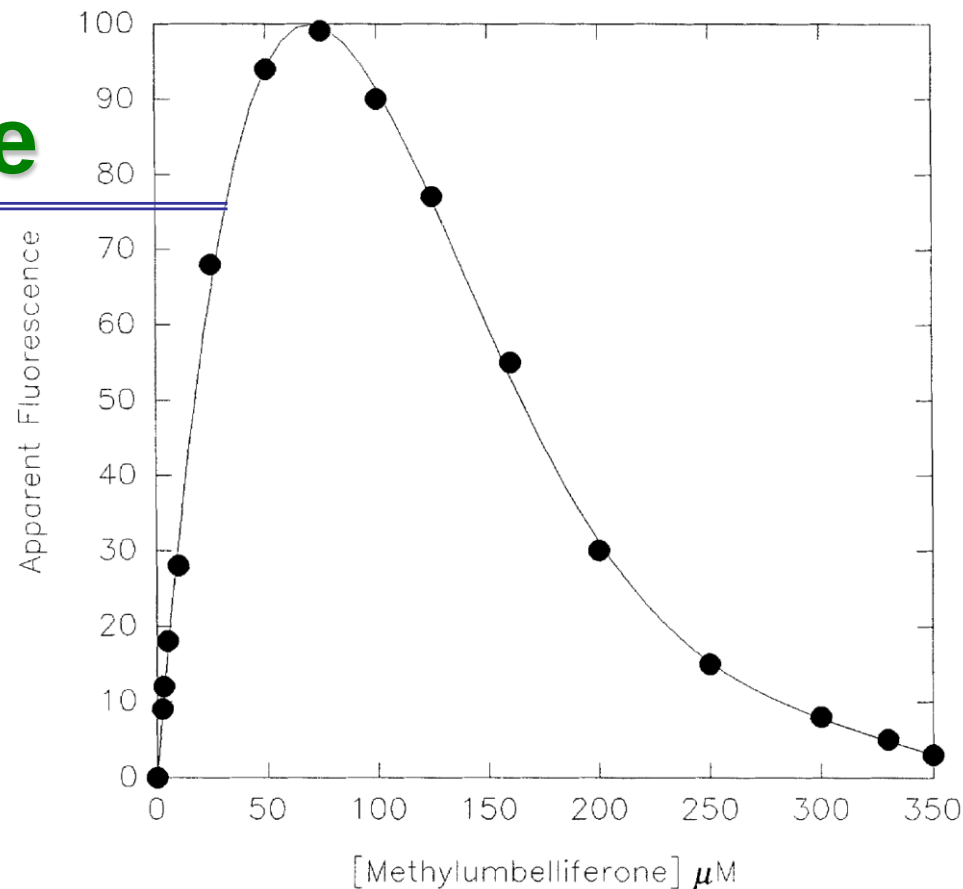
Fluorimetria



Métodos de Análise

Fluorimetria

Figure 15 Relationship between measured fluorescence and concentration. The concentration dependence of the apparent fluorescence (ex 355 nm, em 460 nm) of methylumbelliferone was determined. The compound was dissolved in 0.1 M glycine, pH 10. At concentrations of fluor below about 10 M the relationship is linear but becomes progressively more non-linear as light absorption becomes more significant. Eventually, at high concentrations, this inner-filter effect leads to a fall in measured fluorescence with increasing concentration.



Exemplo: Elastase

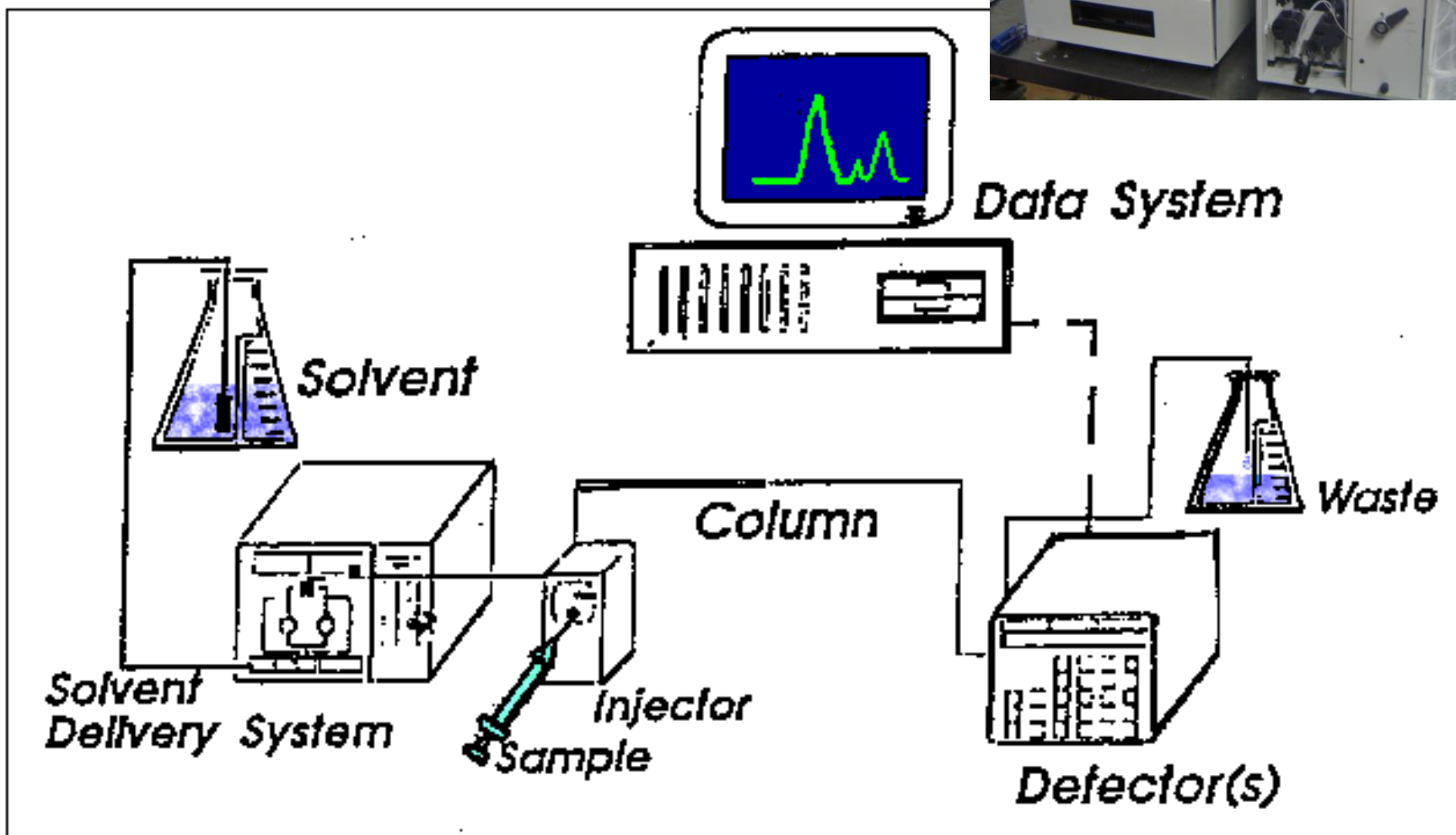
Substrato: Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-aminomethylcoumarin

By appropriate choice of excitation and emission wavelengths (370 nm and 460 nm) more than 70% of the maximum fluorescence of aminomethylcoumarin can be used while the contribution of the unhydrolysed substrate contributes only 0.5% of its maximum fluorescence.

The system is sensitive enough to detect 10 nM product and is linear to about 5 M. Elastase may be assayed at pH 7.6 and 25°C in 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.1 M CaCl_2 .

Métodos de Análise

Cromatografia - HPLC



Métodos de Análise

Titulação Automática

É utilizada quando a reação produz ou consome ácido ou base. Titula-se na solução ácido ou base para que o pH continue constante. A quantidade de ácido ou base consumido é o valor da reação catalítica enzimática.



Amilases

1. Oxidoredutases

2. Transferases

3. Hidrolases

4. Liases

5. Isomerases

6. Ligases

2.4.1.18 – 1,4- α -glucana (enzima ramificadora)

2.4.1.19 – ciclomaltodextrina glucanotransferase

2.4.1.25 – 4- α -glucanotransferase (amilomaltase)

2.4.1.161 – oligossacarídeo 4- α -D-glicosiltransferase

3.2.1.1 – α -amilase

3.2.1.2 – β -amilase

3.2.1.3 – glucano 1,4- α -glicosidase
(glucoamilase ou amiloglicosidase)

3.2.1.20 – α -glicosidase (maltase)

3.2.1.41 – pullulanase

3.2.1.60 – glucano 1,4- α -maltotetraohidrolase

3.2.1.68 – isoamilase

3.2.1.98 – glucano 1,4- α -maltohexaosidase

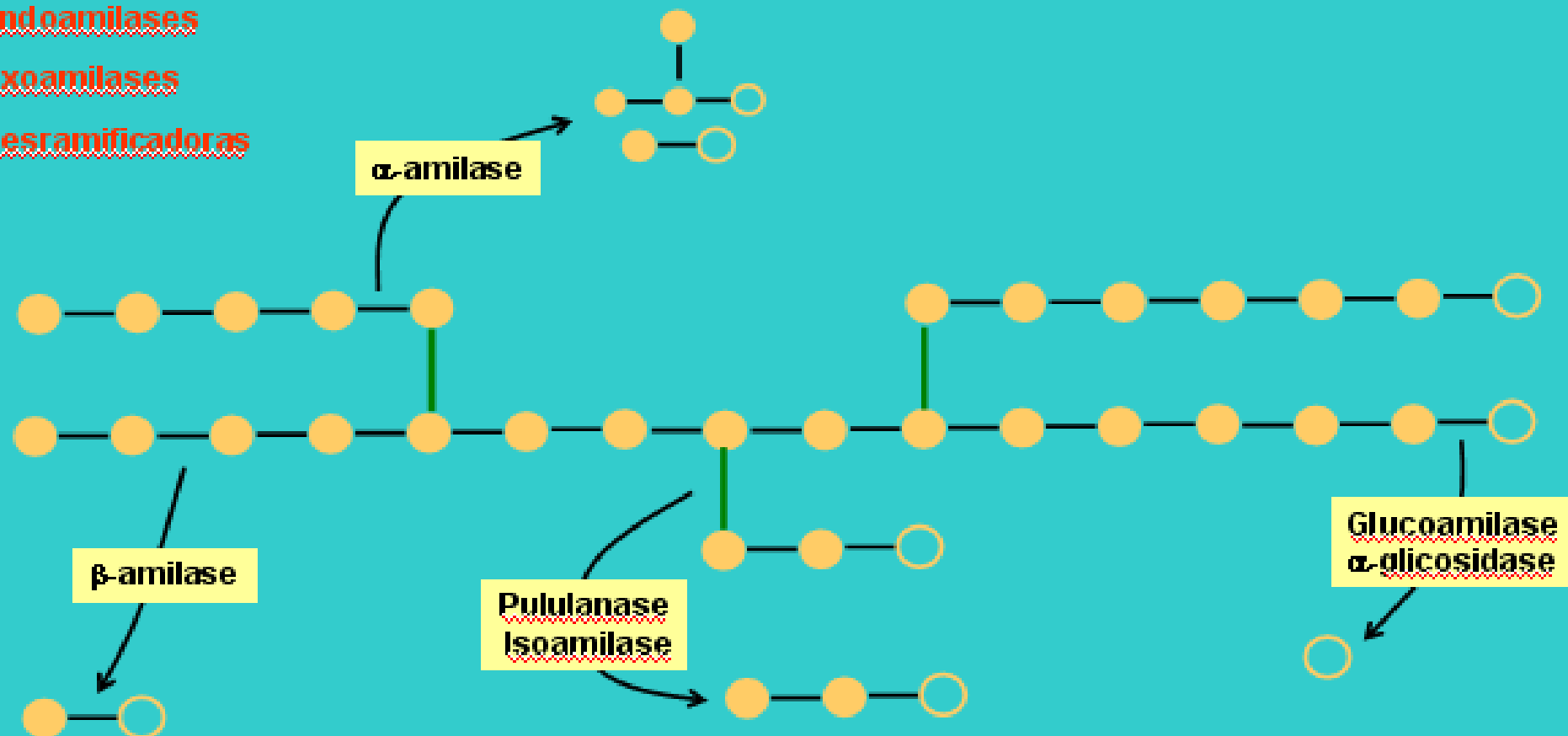
3.2.1.133 – glucano 1,4- α -maltohidrolase

Classificação

Endoamilases

Exoamilases

Desramificadoras



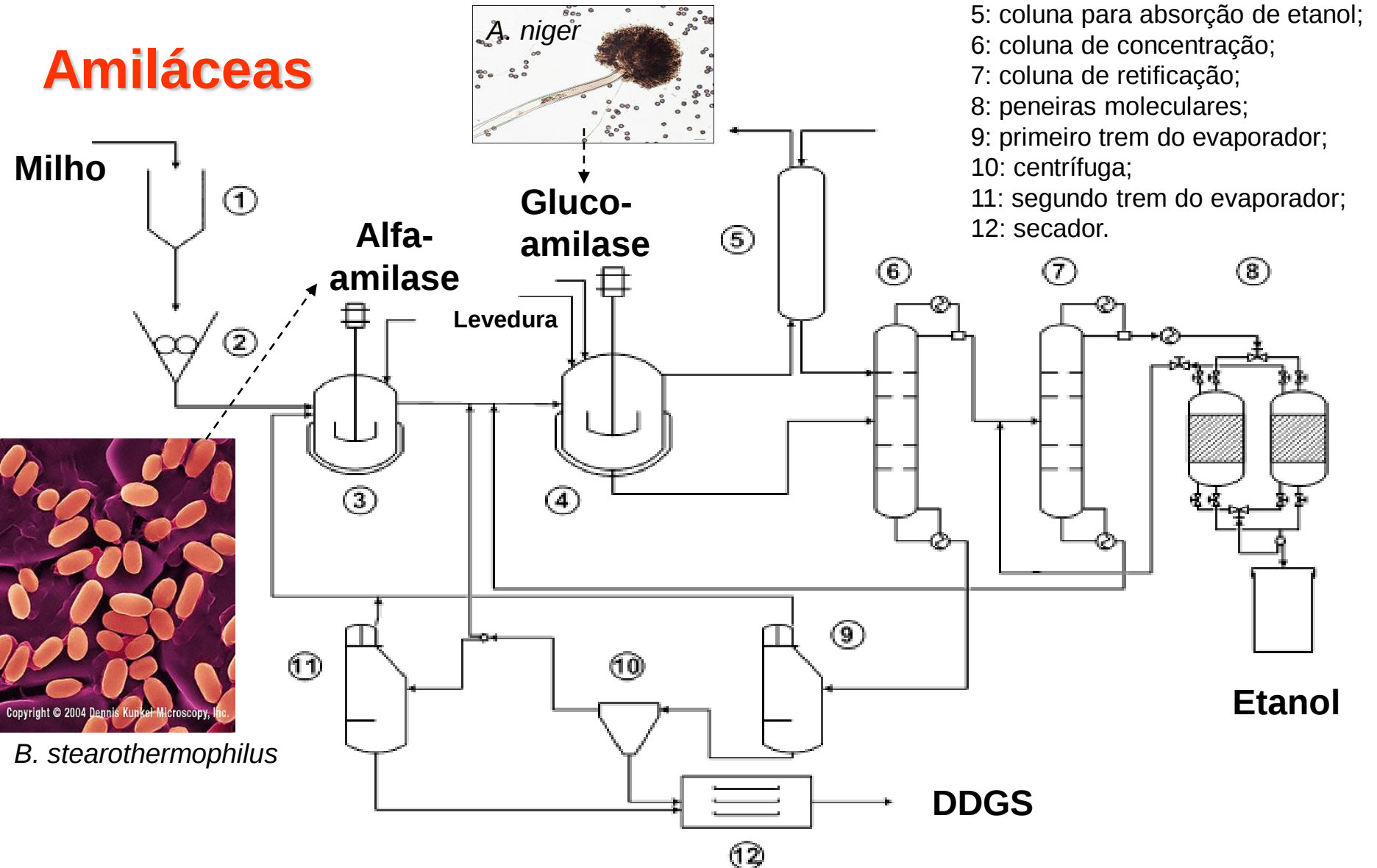
Aplicações

Table 9. Uses of amylases in various sectors of industry

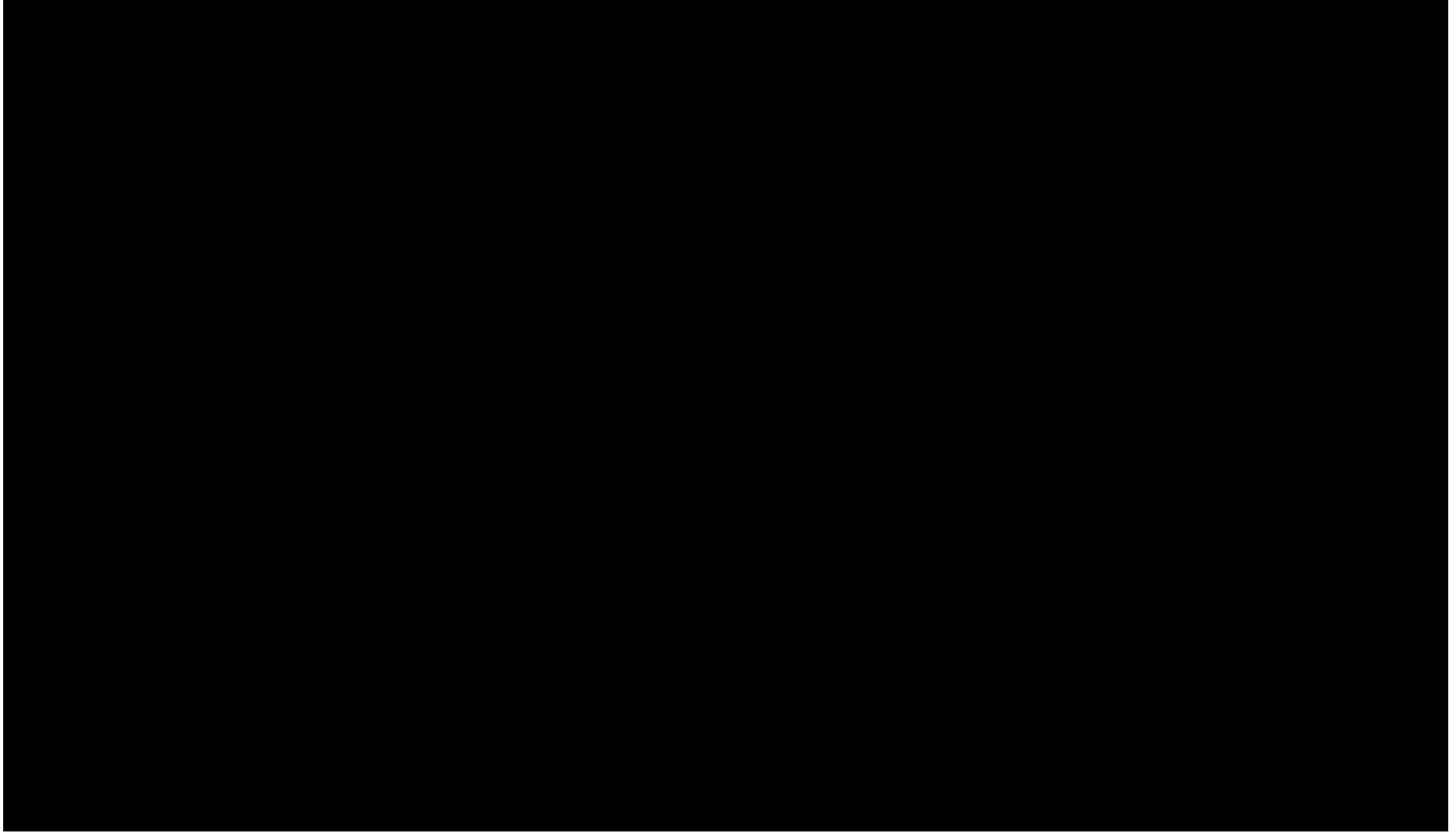
Sector	Uses
Food industry	Production of glucose syrups, crystalline glucose
	Production of high fructose corn syrups
	Production of maltose syrups
	Reduction of viscosity of sugar syrups
	Reduction of haze formation in juices
	Solubilization and saccharification of starch for alcohol fermentation in brewing industries
Detergent industry	Retardation of staling in baking industry
	Used as an additive to remove starch based dirt
Paper industry	Reduction of viscosity of starch for appropriate coating of paper
Textile industry	Warp sizing of textile fibers
Pharmaceutical industry	Used as a digestive aid

Etanol

Amiláceas



Amilases



Celulases

1. Oxidoredutases

2. Transferases

3. Hidrolases

4. Liases

5. Isomerases

6. Ligases

3.1 Ligações éster

3.2 Glicosilases

⋮

3.13 Ligações C-S

3.2.1. S- e O- glicosidases

3.2.1. N-glicosidases

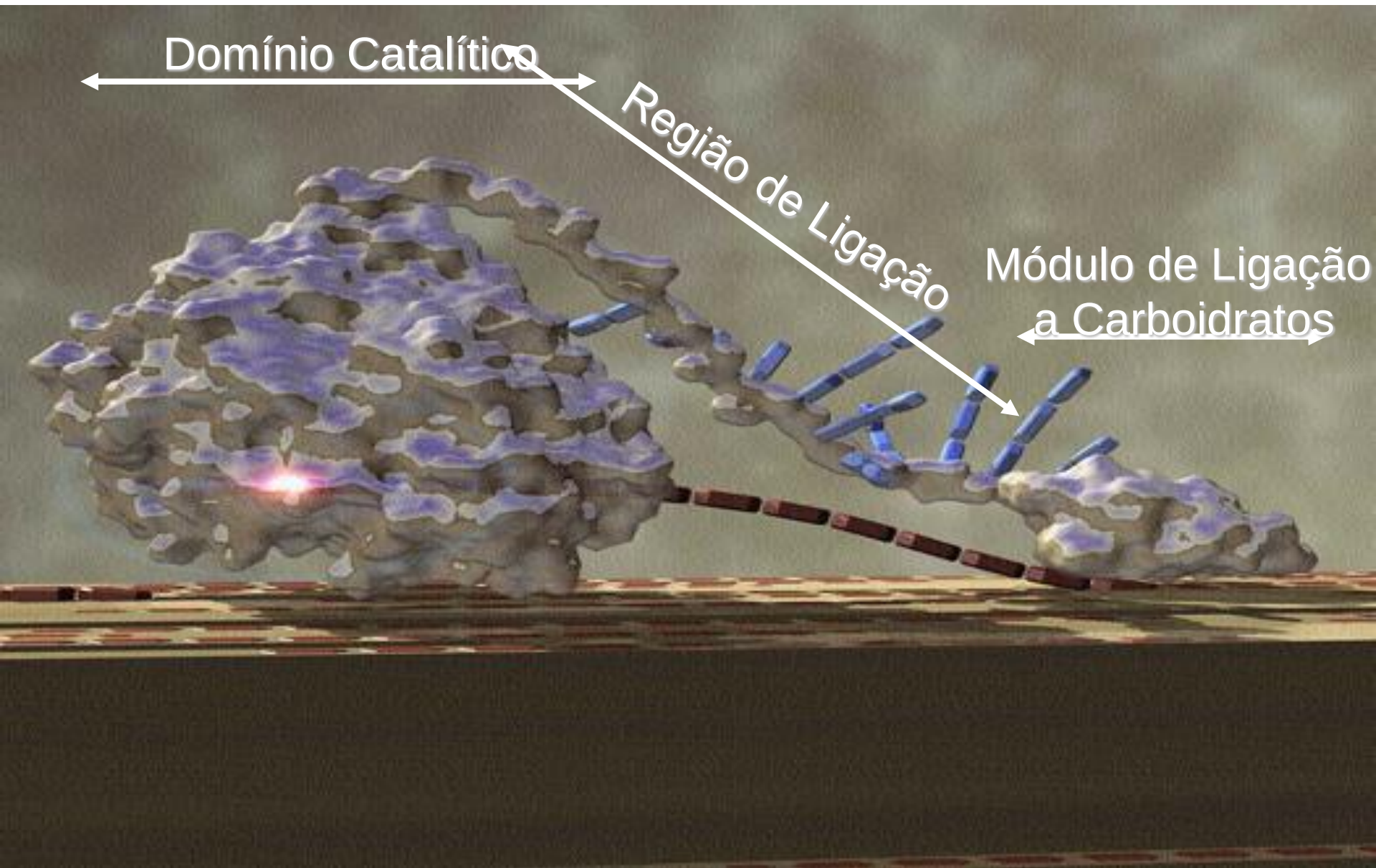
3.2.1.4 endo 1,4- β -glucanase

3.2.1.21 1,4- β -glicosidase

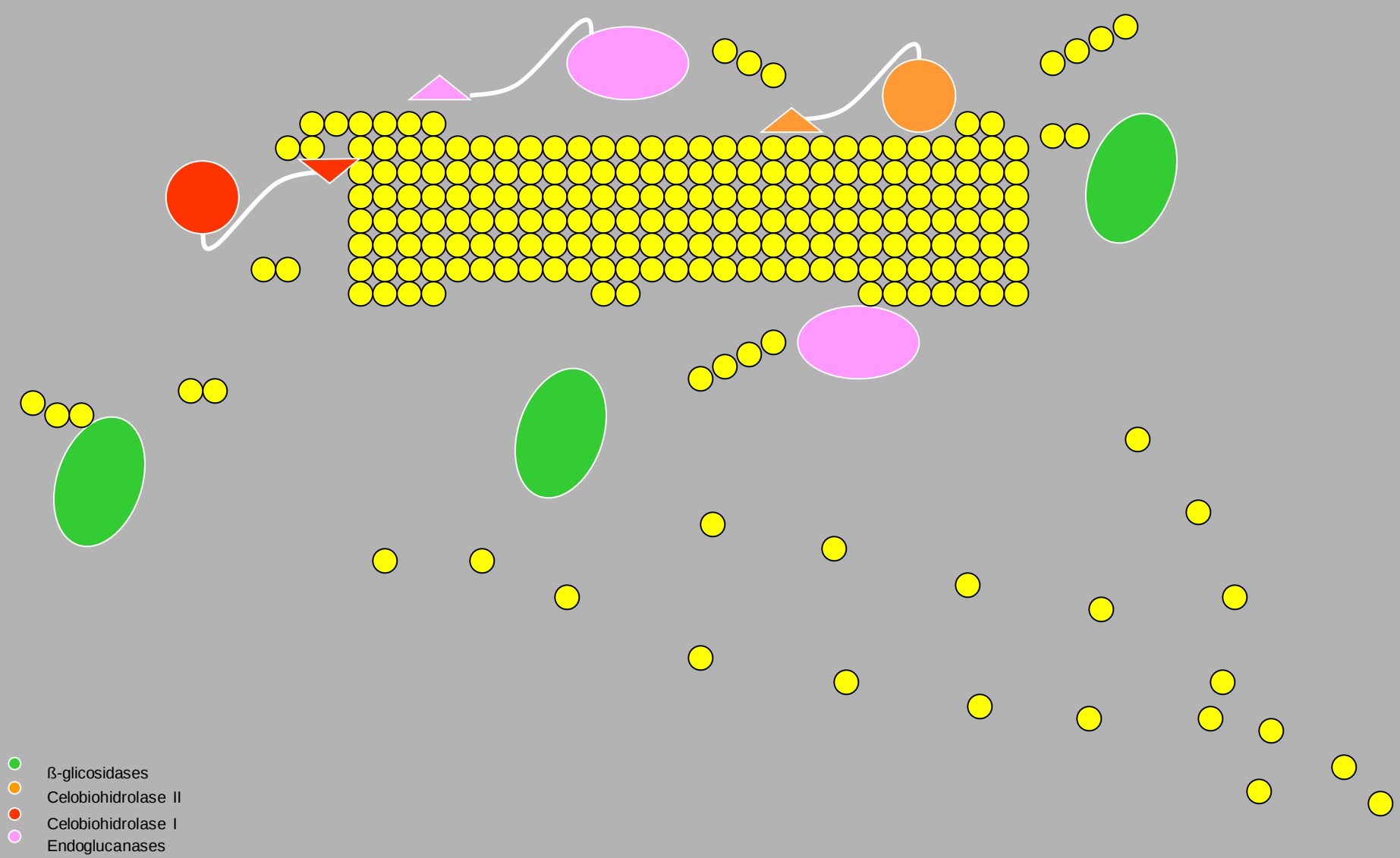
3.2.1.74 glucana 1,4- β -glicosidase

3.2.1.91 1,4- β -celobiosidase

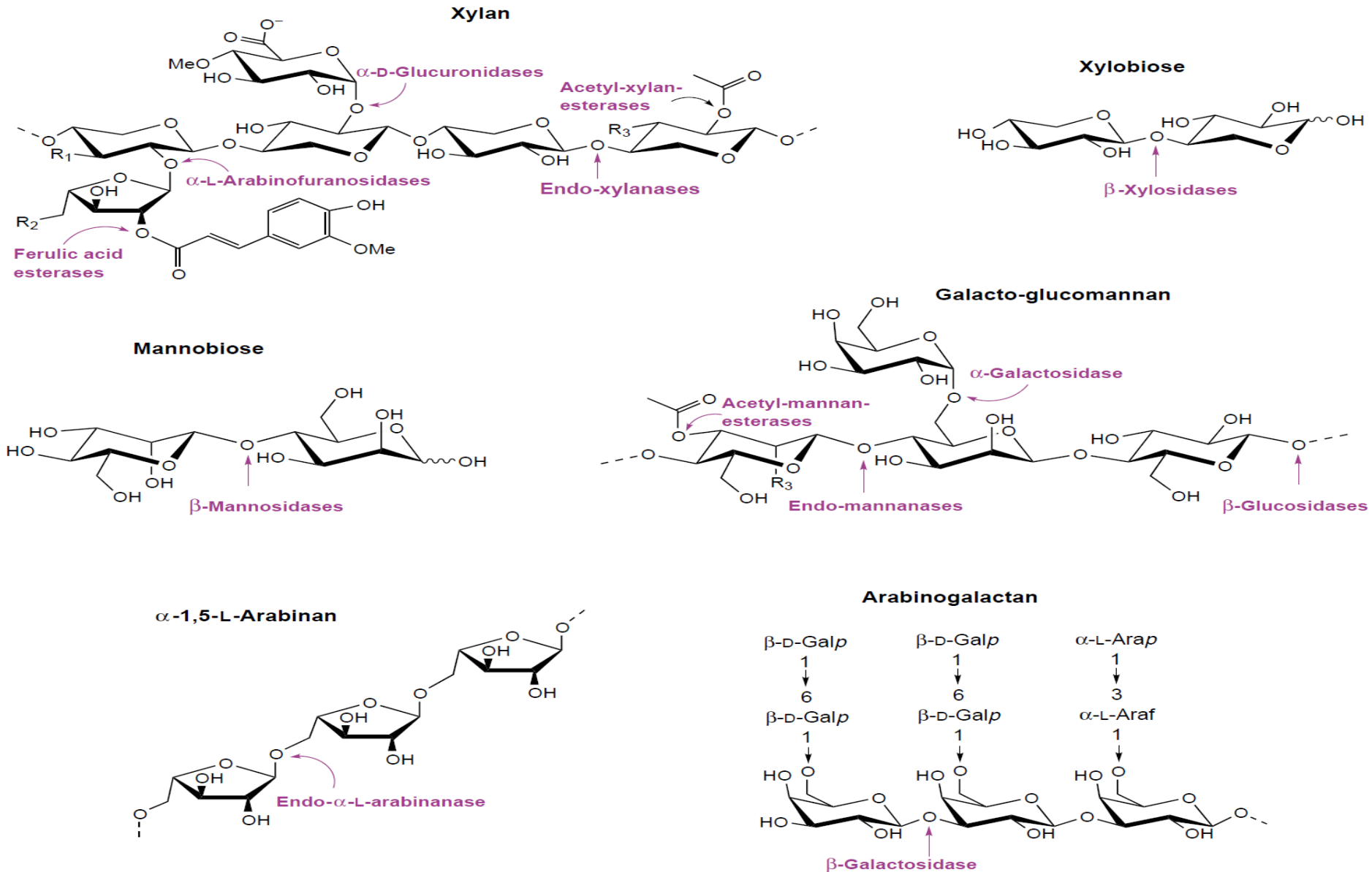
Celulases



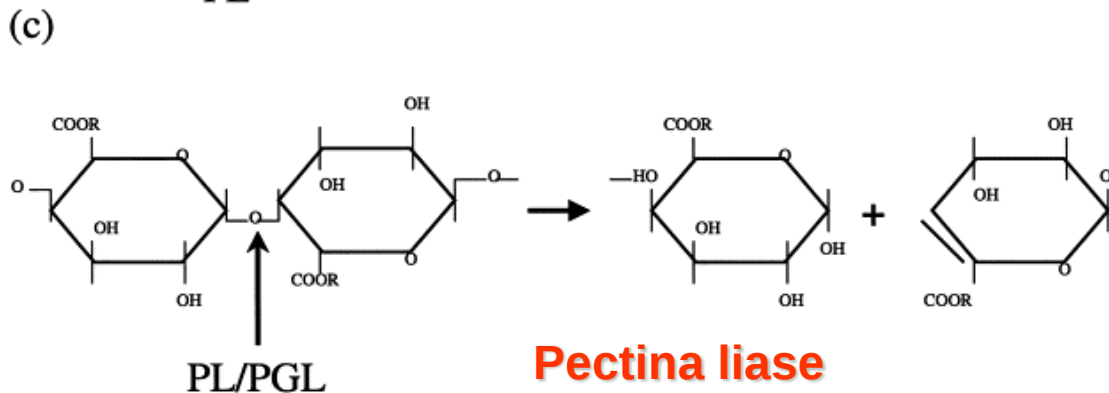
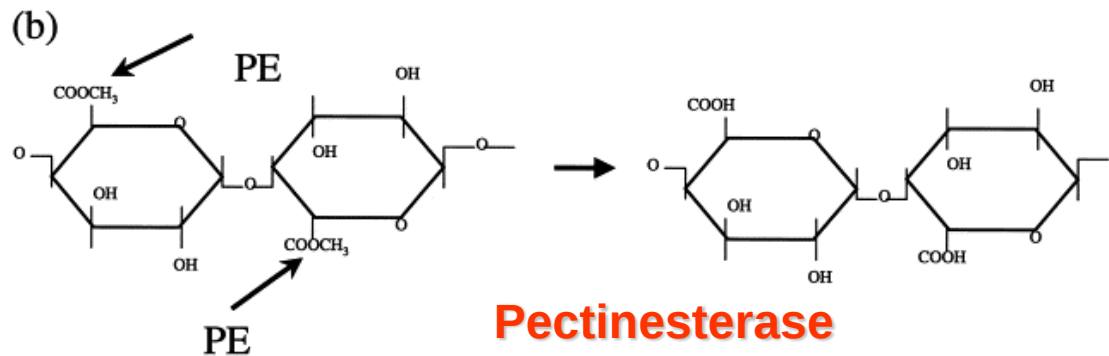
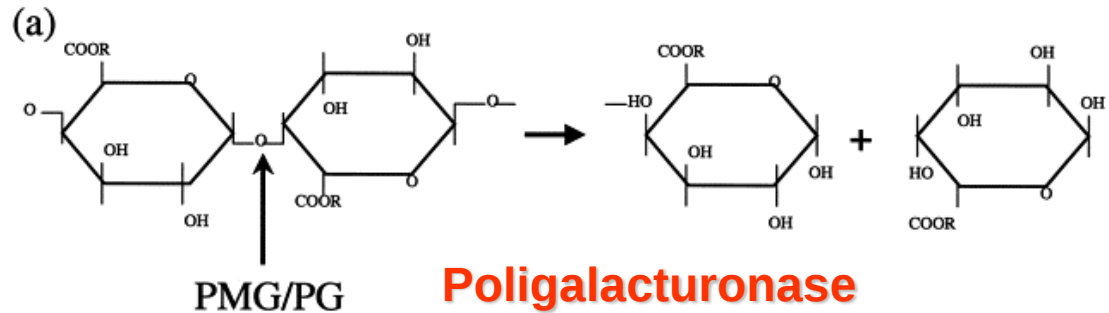
AÇÃO SINÉRGICA



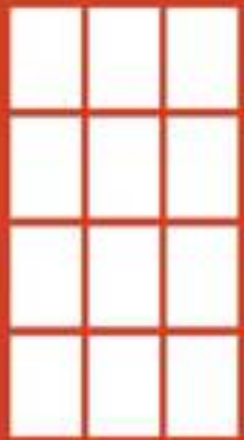
Hemicellulases



Pectinases



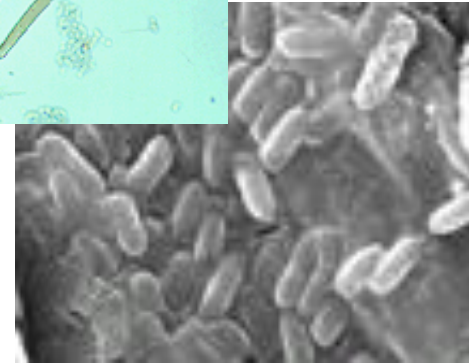
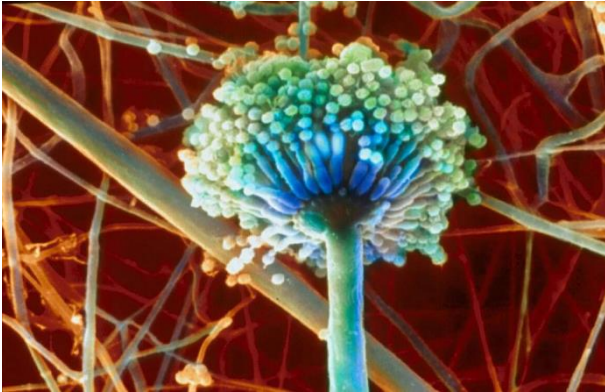
Pectinases



ChefSteps

Pectin-Free Juice

Proteases



Enzimas	Hemoglobina	Gelatina	Caseína	Proteína soja
Papaína (referência)	1	1	1	1
Ficina	0,5	1,1	0,2	0,3
Pepsina	0,65	0,7	0,95	0,1
Subtilisina	1,6	1,3	1,65	1,7
Neutra (<i>Bacillus sp.</i>)	1,35	1,4	1,3	1,4

Proteases

Table 1. Characteristic features of the four types of proteases

Properties	EC No.	Molar mass range/kDa	pH optimum	Temperature optimum/°C	Metal ion requirement(s)	Active site amino acid(s)	Major inhibitor(s)	Major source(s)
Aspartic or carboxyl proteases	3.4.23	30–45	3–5	40–55	Ca ²⁺	Aspartate or cysteine	Pepstatin	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , animal tissue (stomach)
Cysteine or thiol proteases	3.4.22	34–35	2–3	40–55	–	Aspartate or cysteine	Indoacetamide, <i>p</i> -CMB	<i>Aspergillus</i> , stem of pineapple (<i>Ananas comorus</i>), latex of fig tree (<i>Ficus</i> sp.), papaya (<i>Carica papaya</i>), <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>
Metallo proteases	3.4.24	19–37	5–7	65–85	Zn ²⁺ , Ca ²⁺	Phenyl-alanine or leucine	Chelating agents such as EDTA, EGTA	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>
Serine proteases	3.4.21	18–35	6–11	50–70	Ca ²⁺	Serine, histidine and aspartate	PMSF, DIFP, EDTA, soybean trypsin inhibitor, phosphate buffers, indole, phenol, triamino acetic acid	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , animal tissue (gut), <i>Tritirachium album</i> (thermostable)

Proteases



Modificação de Proteínas

- Solubilização de proteínas insolúveis
- Melhoramento das propriedades funcionais das proteínas: hidratação, emulsificação, gelificação, textura e formação de espuma

- Proteínas Vegetais

- Concentrados protéicos
- Isolados protéicos
- Hidrolisados protéicos



Proteases
Celulases

- Proteínas de Peixe

Água de farinha de peixe → Prensagem, ↑viscosidade → **Proteases**

Modificação de Proteínas

- Solubilização de proteínas insolúveis
- Melhoramento das propriedades funcionais das proteínas: hidratação, emulsificação, geleificação, textura e formação de espuma

- **Proteínas da Carne**

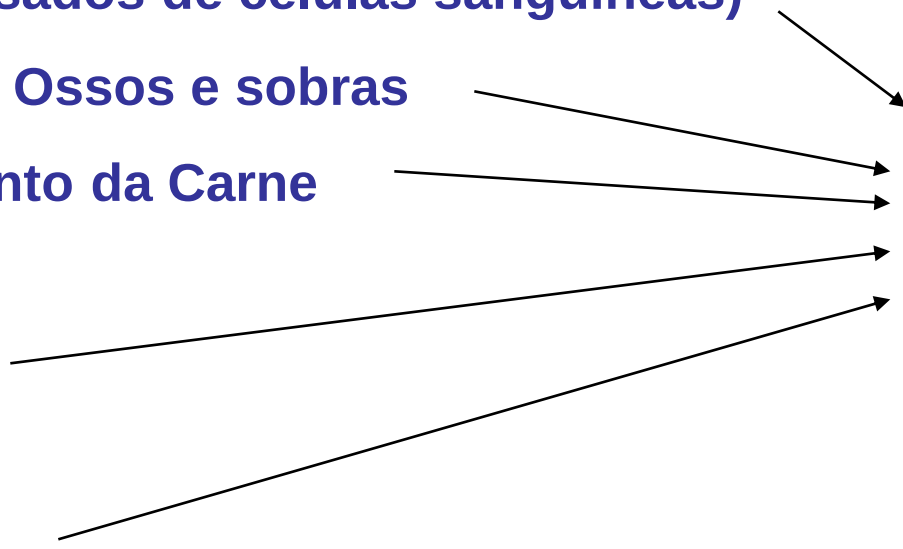
- **HCS (Hidrolisados de células sanguíneas)**

- **Limpezas de Ossos e sobras**

- **Processamento da Carne**

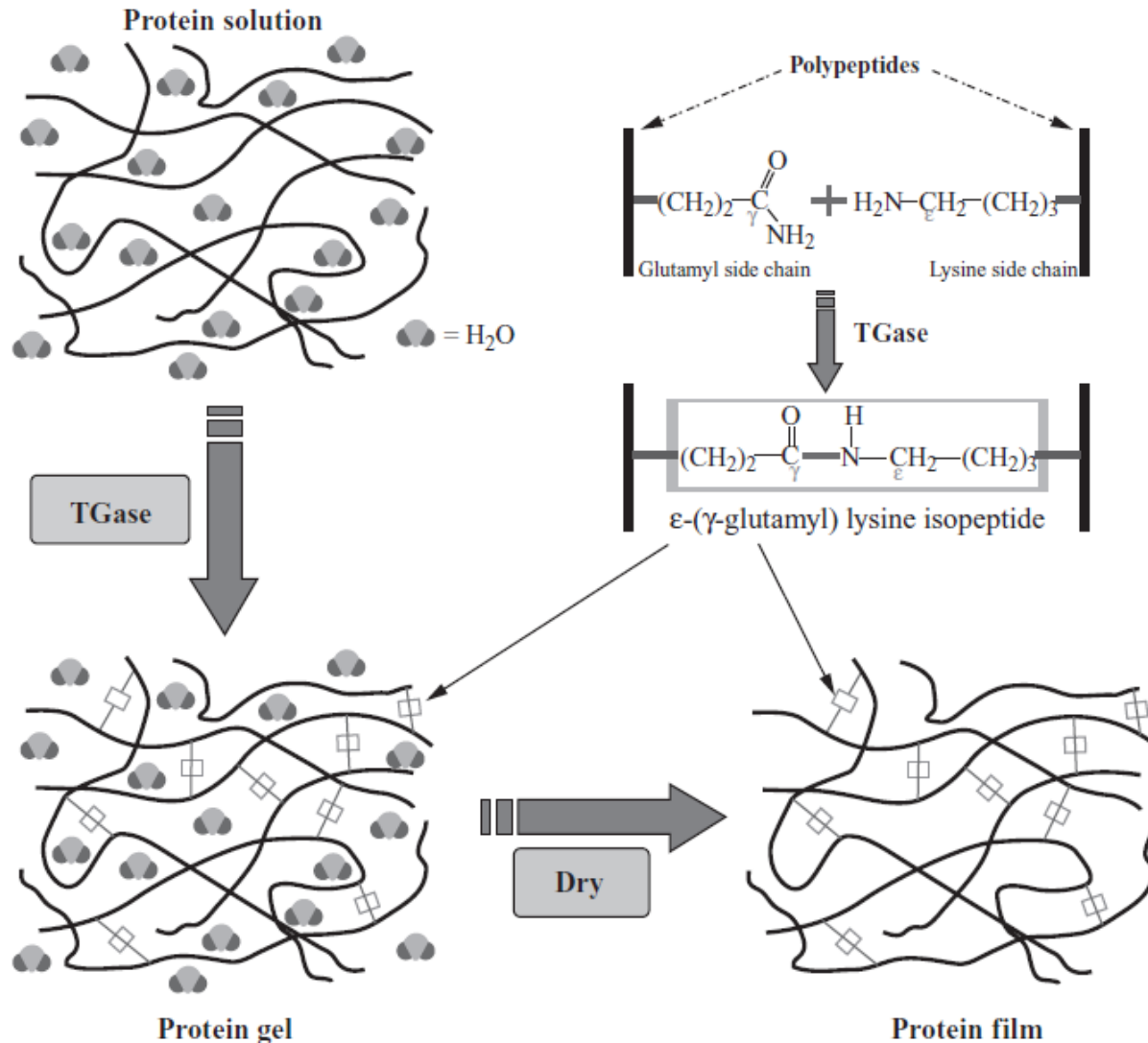
- **Gelatina**

- **Queratina**



Proteases

Transglutaminase



Modificação de propriedades funcionais em proteínas de peixe:

→ Surimi

→ Gelatina derivada de peixe, substituindo a bovina

Fig. 10.6 Cross-linking of proteins in gel and film induced by transglutaminase.

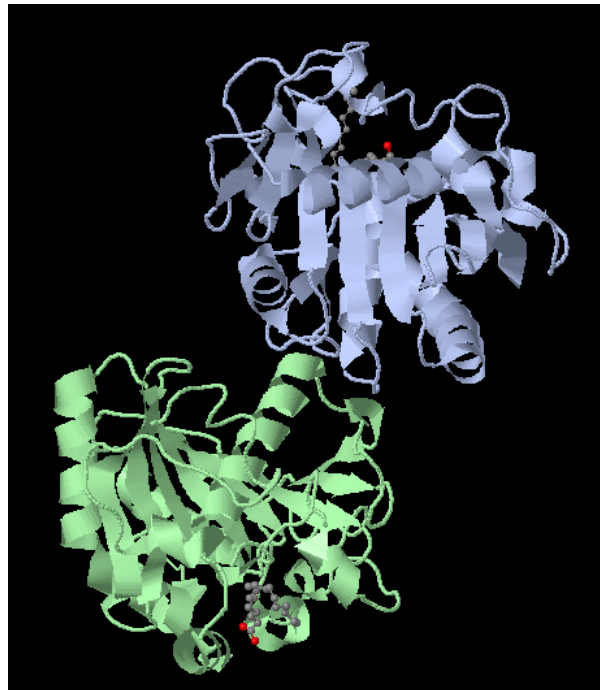
Transglutaminase



Lipases

Glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3)

Atuam em substratos insolúveis em água, agindo na interface óleo-água de soluções emulsionadas. Além disso, características como estabilidade na presença de solventes orgânicos, ausência da necessidade de cofatores e alta enantiosseletividade.

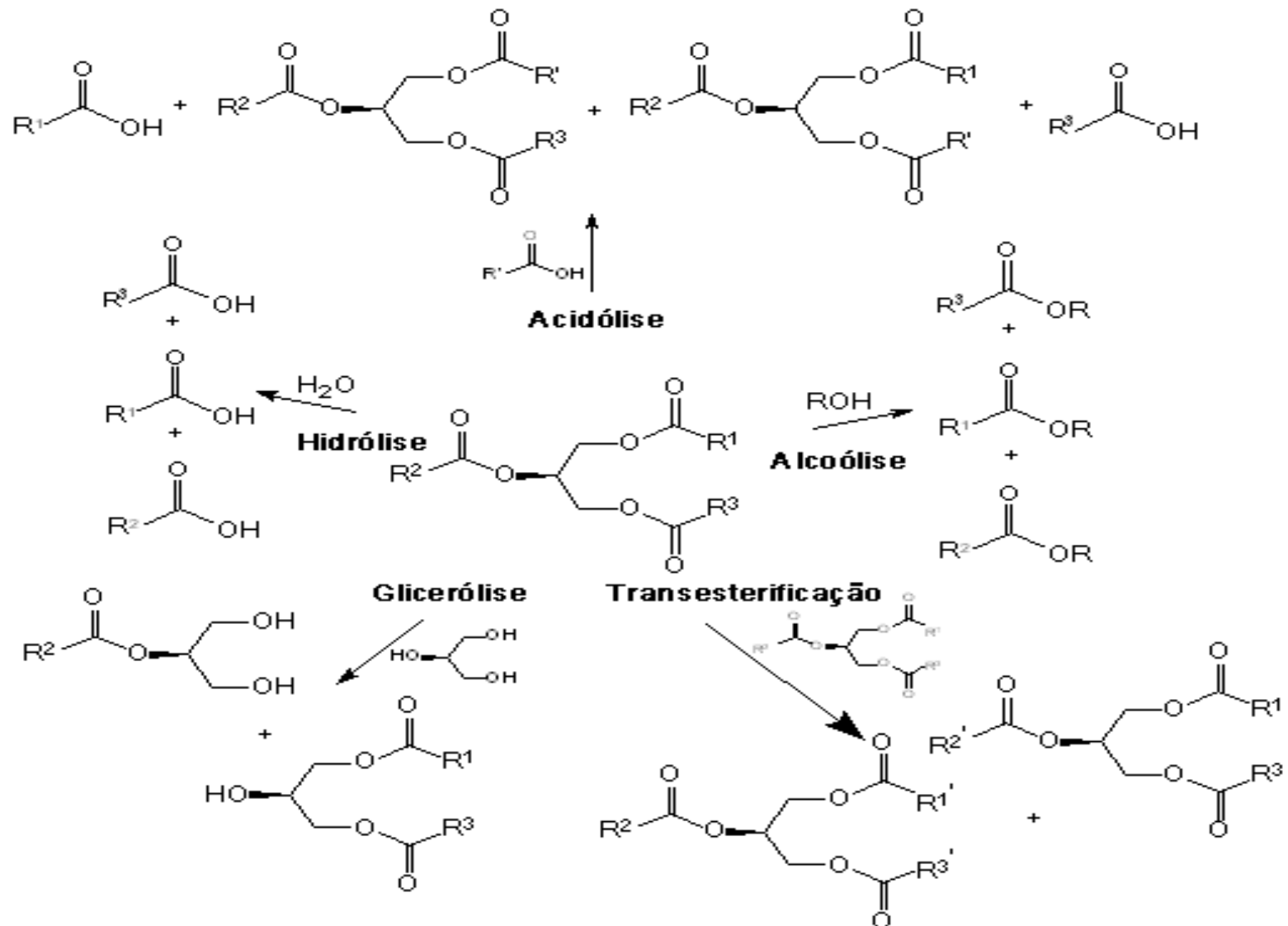


Thermomyces lanuginosus



Candida antarctica

Reações catalisadas por lipases



Lipases Comerciais

Manufacturer	Commercial microbial lipase
Novozymes A/S Co.	<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase; <i>Candida antarctica</i> lipase B; <i>Rhizomucor miehei</i> lipase; <i>Candida antarctica</i> lipase A; <i>Humicola lanuginosa</i> lipase
Genencor Co.	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> lipase; <i>Pseudomonas mendocina</i> lipase
Amano Co.	<i>Aspergillus niger</i> lipase; <i>Candida rugosa</i> lipase; <i>Penicillium roqueforti</i> lipase; <i>Penicillium camemberti</i> lipase; <i>Rhizopus niveus</i> lipase; <i>Burkholderia cepacia</i> lipase; <i>Pseudomonas fluorescens</i> lipase; <i>Rhizopus oryzae</i> lipase; <i>Mucor javanicus</i> lipase; <i>Rhizopus delemar</i> lipase; <i>Rhizomucor miehei</i> lipase
Others	<i>Chromobacterium viscosum</i> lipase; <i>Geotrichum candidum</i> lipase; <i>Aspergillus oryzae</i> lipase; <i>Rhizopus arrhizus</i> lipase; <i>Bacillus thermocatenuatus</i> lipase; <i>Fusarium solani</i> lipase; <i>Penicillium expansum</i> lipase

Source	Trade name	Supplier	Applications	Industry
Bacteria				
<i>Alcaligenes</i> sp.	Lipase PL	Meito Sangyo, Co.	Modification of oils and fats/feed additives	Food processing
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Lipase CV	Genzyme	Diagnostics/analytical	Health care and diagnostics
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase SL	Amano	Chiral synthesis	Food processing
<i>Pseudomonas menodocina</i>	Lumafast	Genencor International	Hydrolysis of oils and fats	Detergent
Fungi				
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase DS	Amano	Dietary supplement	Biopharmaceuticals
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipase	Sigma	Organic synthesis/analytical	Food processing
	Lipopan® F ^a	Novozyme	Dough strengthening	Baking and food processing
	Lipomod™ 627P-L627P	Biocatalysts	Dough texture and shelf life	Baking and food processing
	Lipomod™ 36P-L036P		Dietetics	Biopharmaceuticals
<i>Rhizomucor miehei</i>	Palatase® ^a	Novozyme	Cheese flavour enhancement	Dairy
Yeast				
<i>Candida cylindracea</i>	Lipase MY	Meito Sangyo, Co.	Dietetics	Biopharmaceuticals
<i>Candida antarctica</i>	Resinase® ^a	Novozyme	Pitch control	Forest product
	Novozym® 435 ^a	Novozyme	Oil based specialties	Food processing
	Noopazyme® ^a		Pasta/noodles	Cereal Food
<i>Candida cylindracea</i> /porcine pancreas	Lipomod™ 29P-L029P	Biocatalysts Ltd.	Cheddary type flavour	Flavour/Dairy

^a Trade names that are recombinant.

Especificidade

Lipases não específicas → *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum*, *Thermomyces lanuginosus* e *Pseudomonas* sp. → agem sobre as moléculas de acilglicerol randomicamente, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários.

Lipases 1,3 específicas → *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii* → agem nos ácidos graxos das posições 1 e 3

Lipases ácido graxo específicas → *Geotrichum candidum* → ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos apresentam cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9.

Lipases estereoespecíficas → *Burkholderia cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa* e *Rhizopus delemar* → um dos isômeros de um racemato pode ser hidrolisado preferencialmente em detrimento de outro, ou ainda, a formação de um isômero pode ser catalisada seletivamente a partir de precursores pró-quirais, como os compostos *meso*-diésteres ou *meso*-dióis.

Aplicações

Industry	Action	Product application
Dairy food	Hydrolysis of milk, fat, cheese ripening, modification of butter fat	Development of flavouring agent in milk cheese and butter
Bakery food	Flavour improvement	Shelf life propagation
Beverages	Improved aroma	Alcoholic beverages, e.g. sake wine
Food dressings	Quality improvement	Maysoine dressing and whippings
Health food	Trans esterification	Health food
Meat and fish	Flavour development	Meat and fish product fat removal
Fats and oils	Trans esterification and hydrolysis	Cocoa butter, margarine fatty acids, glycerol mono- and diglycerides
Laundry	Reducing biodegradable stains	Cleaning cloths
Cosmetics	Esterification	Skin and sun-tan creams, bath oil etc.
Surfactants	Replaces phospholipases in the production of lysophospholipids	Polyglycerol and carbohydrates fatty acid esters used as industrial detergents and as emulsifiers in food formulation such as sauces and ice creams
Agrochemicals	Esterification	Herbicides such as phenoxypropionate
Pharmaceuticals	Hydrolysis of epoxyester alcohols	Produce various intermediates used in the manufacture of medicine
Fuel industries	Trans esterification	Biodiesel production
Pollution control	Hydrolysis and trans esterification of oils and grease	To remove hard stains, and hydrolyse oils and greases

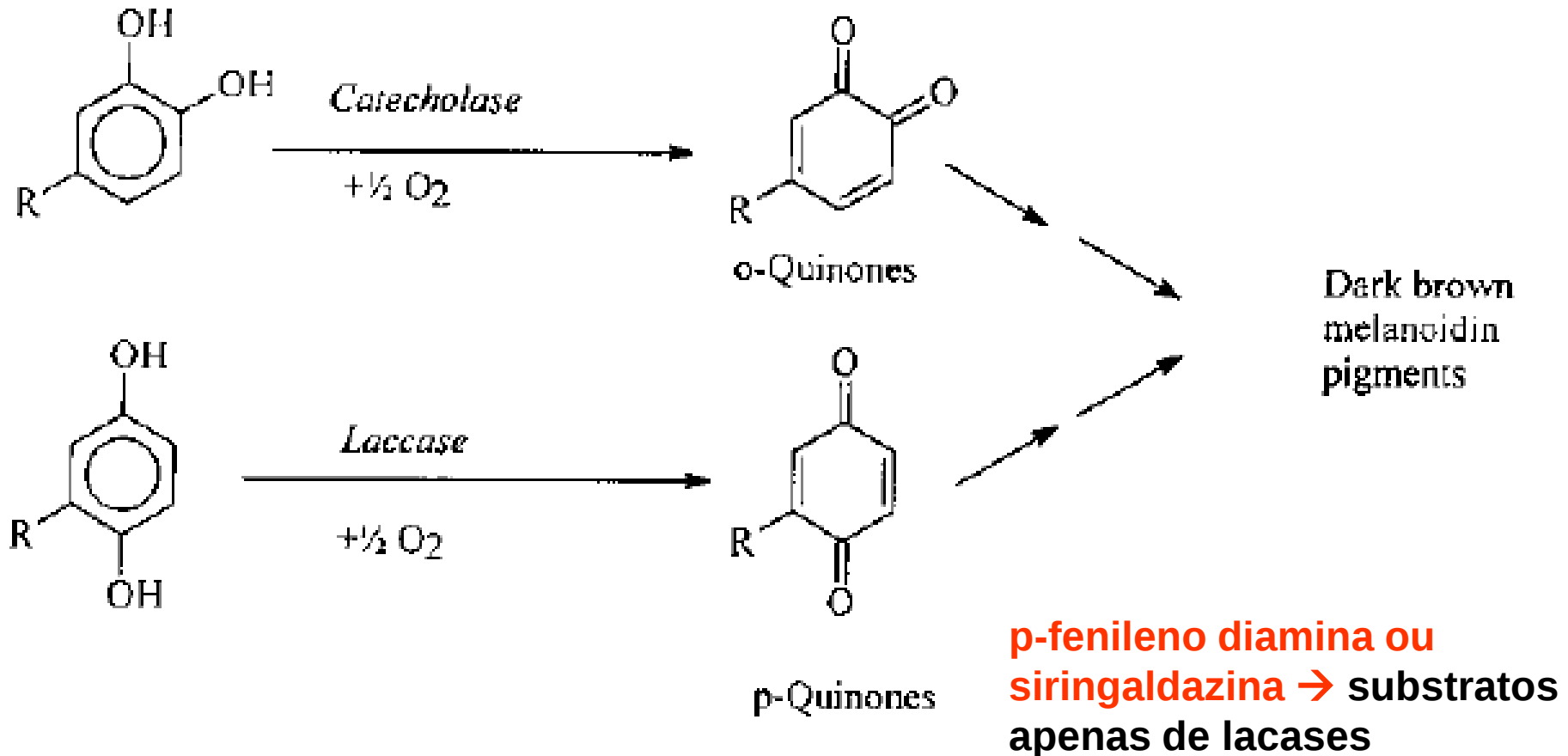
Biodiesel Enzimático



Aplicações



Oxidases



Ácido salicilhidroxâmico e ácido cinâmico → inibidores de tirosinase

Compostos quaternários (brometo de cetil tetraamônio) → inibidores de lacase

Lacase

New enzyme technology
for cold denim bleaching

Peroxidase (Raiz Forte)



Armoracia rusticana

Usos: Análises clínicas e biocatálise em meios não aquosos

Funções:

Degradação e síntese de lignina → Reparo de danos físicos em plantas

Degradação dos fitohormônios → Regulação do crescimento vegetal

Produção de espécies reativas → Ação contra patógenos

Catalase



Índice de escaldamento (*Blanching*) de vegetais e frutas → Destrução de micro-org e enzimas, preservando cor, textura, sabor e aroma num prazo de 2 anos congelado

Remoção de H_2O_2 residual de leites, de O_2 de ovos em pó, sucos e vinhos, e em biossensores.

Indicador de contaminação de leite por neutrófilos

Indicador de problemas hematológicos e de infecções do trato urinário

Aplicações de Enzimas

- Detergentes
- Têxteis
- Papel e Celulose
- Biocombustíveis
- Cosméticos
- Síntese Orgânica
- Laticínios
- Panificação
- Suco
- Amido
- Cerveja



Mercado Mundial (2013): US\$ 4,8 bilhões

Principais Empresas:

Novozymes, Dupont (Genencor, Danisco), DSM → 75% mercado

Produção

**Preparados
Enzimáticos
Comerciais**



**Enzimas + Outras
Proteínas + Material Não-
proteico + Preservantes**

**Obtenção
de Enzimas**



**-Extração: Tecidos
animais e vegetais**

**- Fermentação:
Micro-organismos**

Classificação

Enzimas Constitutivas

Ligadas aos aspectos centrais do metabolismo

Produzidas continuamente independente da presença de substrato

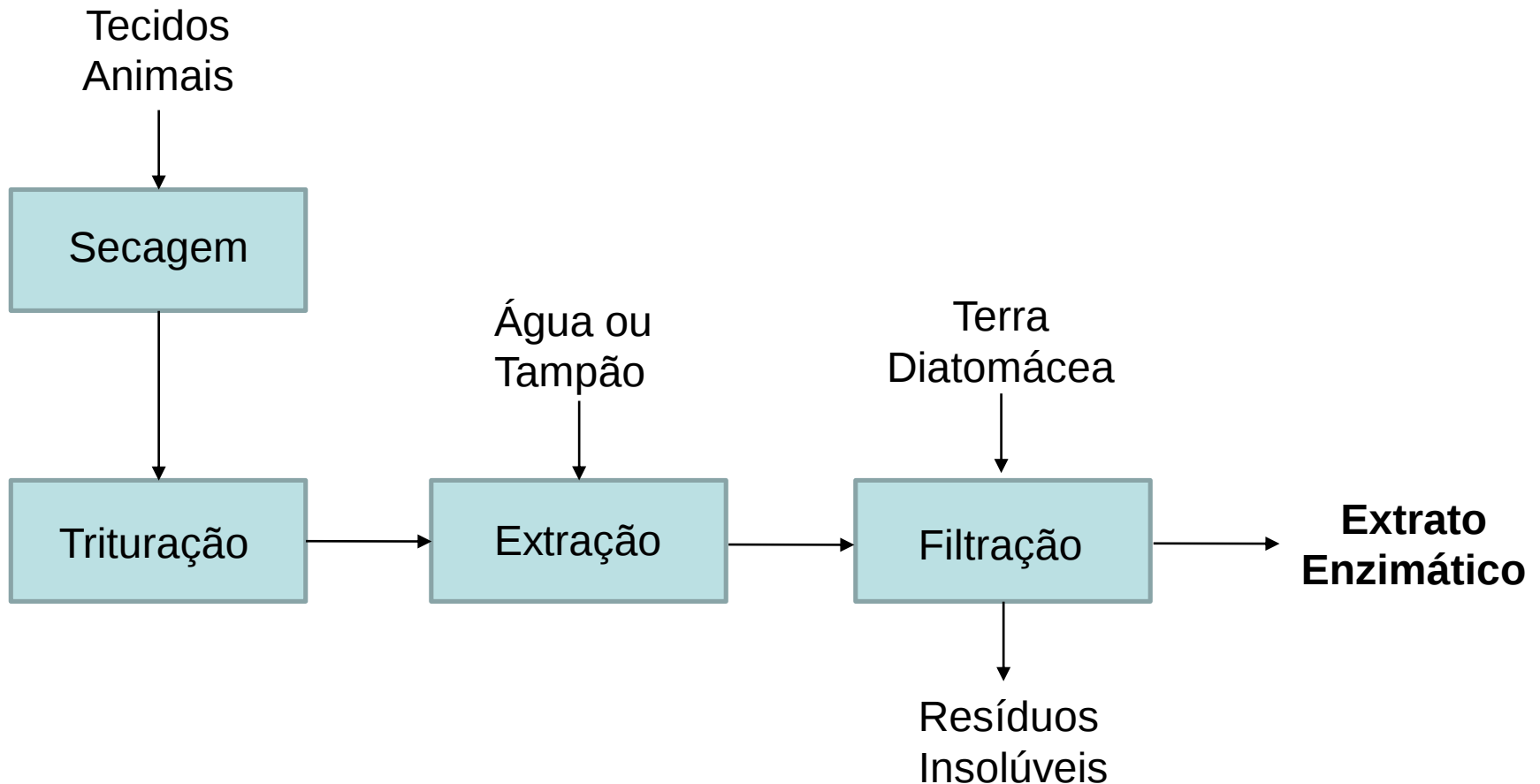
Enzimas Induzidas

São sintetizadas em maior proporção na presença de um substrato ou de um produto derivado de sua degradação → Indução da Produção

Industrialmente, estas são mais comuns

Enzimas de Origem Animal

Método Geral de Produção



Enzimas de Origem Animal



Pancreatina → Amilase + Protease + Lipase

Origem: Pancreas de porco

Uso: Auxiliar digestivo

Obs: Precisa ser desengordurado c/Éter de Petróleo

Renina → Protease + Lipase

Origem: Suco gástrico do 4º estômago do bezerro alimentado só com leite

Uso: Queijos italianos, pudins

Obs: Extração em pH ácido, conversão de pró-renina em renina



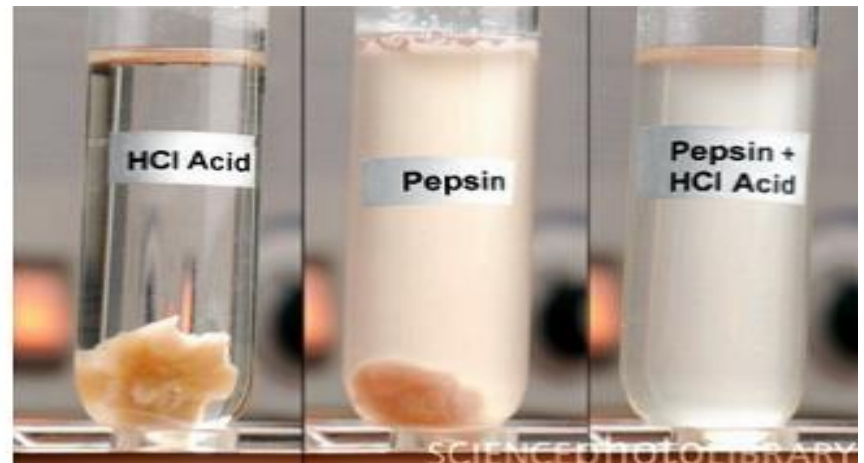
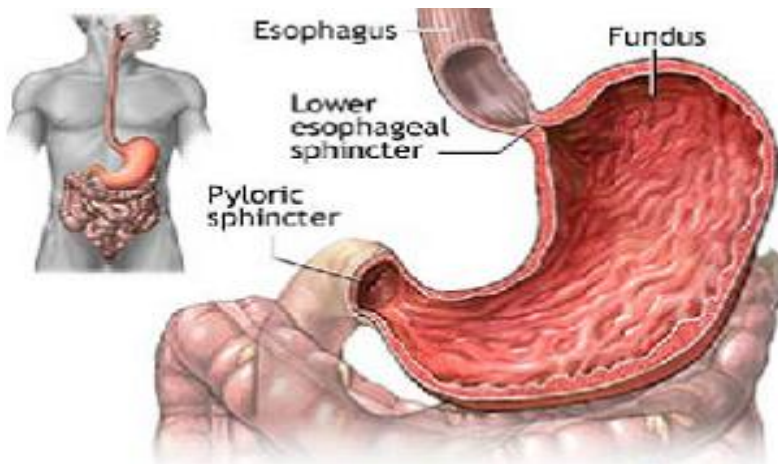
Enzimas de Origem Animal

Pepsina → Protease

Origem: Mucosa de estômago de porco

Uso: Auxiliar digestivo e produção de hidrolisados

Obs: Precisa ser misturado com HCl (pH 2) por 16h a 25°C, e depois 1 h a 45°C para converter o pepsinogênio em pepsina



Enzimas de Origem Animal

Catalase → Oxidorredutase

Origem: Fígado e sangue de animais (boi e porco)

Uso: Degradação de H_2O_2

Obs: Macerado com 35% de acetona → remoção dos insolúveis;

Depois, 50% de acetona → ppt da catalase



Enzimas de Origem Vegetal



Papaína → Protease

Origem: Látex do fruto verde de mamão

Uso: Auxiliar digestivo; amaciamento de carne e clarificação de cerveja

Obs: Sensível a oxidação do ar



Bromelina → Protease

Origem: Talo e fruto do abacaxi, menos maduros

Uso: Auxiliar digestivo; amaciamento de carne e clarificação de cerveja

Obs: A enzima é precipitada com sulfato de amônio, etanol ou acetona fria

Enzimas de Origem Vegetal

Malte de Cereais

- Proteases, lipases, hemicelulases, oxidoredutases
→ sintetizadas durante a germinação do grão
- Alfa-Amilase → presente no grão durante a germinação
- Beta-Amilase → presente no grão antes de sua germinação

Uso: Produção de cerveja

EXTRAÇÃO

- 1) Primeira secagem (paralisa a atividade enzimática e reduz o teor de umidade);
- 2) Aumento gradativo da temperatura (reduz ainda mais o teor de umidade);
- 3) Secagem final à 92°C.

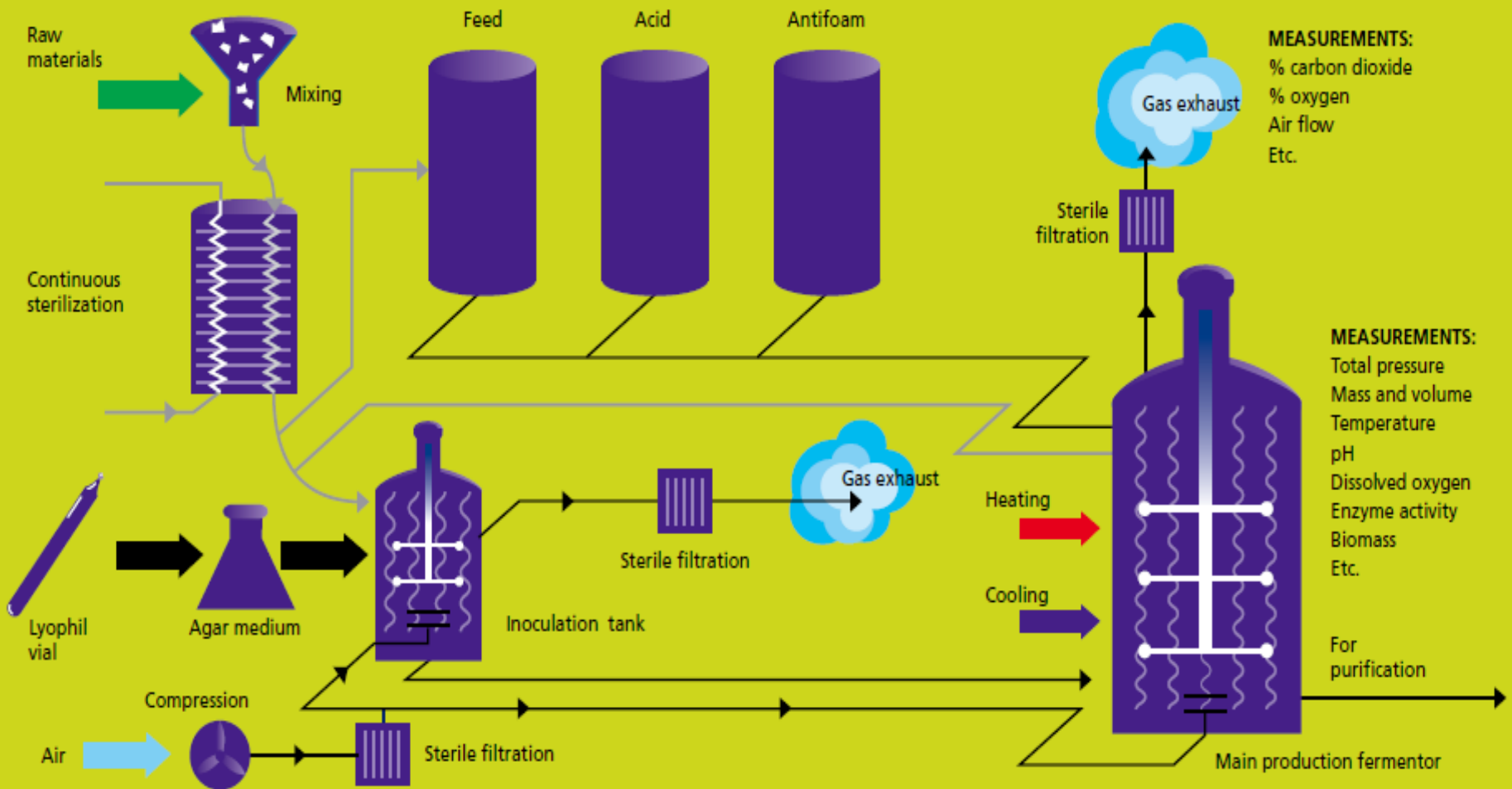
Enzimas Microbianas

- Micro-organismos produtores: bacterias, fungos filamentosos e leveduras
- **Gêneros mais utilizados:** *Bacillus* e *Aspergillus* → 80-85% mercado
- Maioria das enzimas comerciais são enzimas produzidas de forma não associada ao crescimento

Características do Processo de Produção:

- Produção de vários tipos de enzimas
- Processo rápido
- Facilidade do controle de condições e de recuperação do produto
- Maior produtividade
- Uso de engenharia genética

Produção



Produção

Novozymes, Franklinton, USA



Produção

