

APLICAÇÕES

Uso industrial de proteases

TABLE 1.5

Industrial Sectors in Which Protease Enzymes are Applied

Industry/Process	Application
Laundry detergent additive	Promotes catalytic degradation of protein-based clothing stains
Leather manufacture	To dehair animal hides and to soften (bate) leather
Cheese manufacture	To coagulate casein
Meat processing	To tenderize meat
Beverage industry	Stabilization of some beers
Baking	To alter dough characteristics

Fonte: Shanley and Walsh – Applied enzymology: an overview – in Directory of therapeutic enzymes, 2006

Uso de proteases na Industria de Alimentos

Table 3 Use of Proteolytic Enzymes in Food Processing

Food	Purpose of action
Baked goods	Softening action in doughs. Cut mixing time, increase extensibility of doughs. Improve texture, elasticity and loaf volume. Liberate β -amylase.
Brewing	Body, flavor, and nutrient development during fermentation. Aid in filtration and clarification. Chill-proofing.
Cereals	Modify proteins to increase drying rate, improve product handling characteristics. Production of miso and tofu.
Cheese	Casein coagulation. Characteristic flavor development during aging.
Chocolate, cocoa	Action on beans during fermentation.
Egg, egg products	Japanese dipping properties
Feeds	Waste product conversion to feeds. Digestive aids, particularly for pigs.
Fish	Solubilization of fish protein concentrate. Recovery of oil and proteins from inedible parts.
Legumes	Hydrolyzed protein products. Removal of flavor. Plastein formation.
Meats	Tenderization. Recovery of protein from bones.
Milk	Coagulation in rennet puddings. Preparation of soybean milk.
Protein hydrolysates	Condiments such as soy sauce and tamar sauce. Bouillon. Dehydrated soups. Gravy powders. Processed meats. Special diets.
Antinutrient factor removal	Specific protein inhibitors of proteolytic enzymes and amylases. Phytate. Gossypol. Nucleic acid.
Wines	Clarification ^a
In vivo processing ^b	Conversion of zymogens to enzymes. Fibrinogen to fibrin. Collagen biosynthesis. Proinsulin to insulin. Macromolecular assembly.

^aIn large part caused by other than proteolytic enzymes

^bRepresentative examples given.

(Whitaker, 2003)

DETERGENTES

- **1960** = protease alcalina produzida por *Bacillus licheniformis* (subtilisina Carlsberg) foi incorporada a detergentes em pó.

Temperatura ótima = 45 a 65°C; pH 9 a 12



Hoje a indústria de detergentes é a maior consumidora de proteases!!

Na sequência vem a indústria de alimentos!

Proteases: curiosidades

- Possuem aplicação comercial,
 - entre os três maiores grupos de enzimas industriais
 - responsáveis por **60% da venda internacional de enzimas**.
- Estão envolvidas em processos biológicos essenciais:
 - coagulação sanguínea,
 - morte celular
 - diferenciação de tecidos.
- Também participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas.

Proteases: curiosidades

- Recentes acordos mundiais para uso de **tecnologias não poluentes**:
 - Proteases usadas em larga escala no tratamento do **couro**, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados.
- Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos.
 - VER: artigo – OLIVEIRA, L.F. *Alim. Nutr.*, v.12, p. 215-226, 2001 – Avanços do uso da bromelina na área de alimentação e saúde
- Proteases hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células; devido a seu papel despolimerizante, as enzimas extracelulares têm um papel importante na nutrição.

Proteases: curiosidades

- O **Aspartame** é um dipeptídeo (ácido aspártico e fenilalanina, unidos por ligação peptídica)
 - Em torno de 200 vezes mais doce do que sacarose.
- Pode ser sintetizado quimicamente ou enzimaticamente.
 - Síntese química é muito cara e é necessário preservar a estereoespecificidade.
 - Síntese enzimática – mais indicada = naturalmente preserva a estereoespecificidade.
- Uma metaloprotease neutra = Thermolisina (*Bacillus thermoproteolyticus*) é usado para sua produção.
 - Sob condições controlada a protease realiza a síntese do peptídeo a uma taxa maior do que a hidrólise.

Fonte: Shanley and Walsh – Applied enzymology: an overview – in **Directory of therapeutic enzymes**, 2006

Watch a Novozymes protease attack stains containing protein



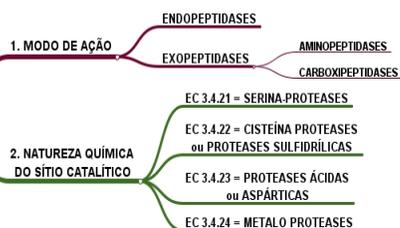
novozymes 

CARACTERÍSTICAS GERAIS

pH DE ATUAÇÃO DE PROTEASES

Enzima	pH ótimo
pepsina	1,5 – 2,5
tripsina	7,0 – 8,0
renina	5,5
plasmina	6,5 – 8,0

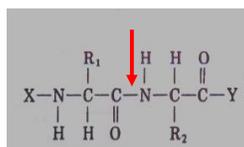
CLASSIFICAÇÃO



CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM O MODO DE AÇÃO

Endopeptidases

- Preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal.

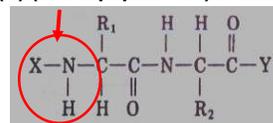


EXOPEPTIDASES

- Somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal:

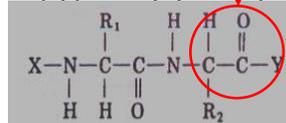
- **Região amino terminal livre (N) (aminopeptidases)** liberam:

- um aminoácido livre,
- um dipeptídeo ou
- um tripeptídeo.



- **Região carboxi terminal livre (C) (carboxipeptidases)** liberam:

- um aminoácido livre ou
- um dipeptídeo.

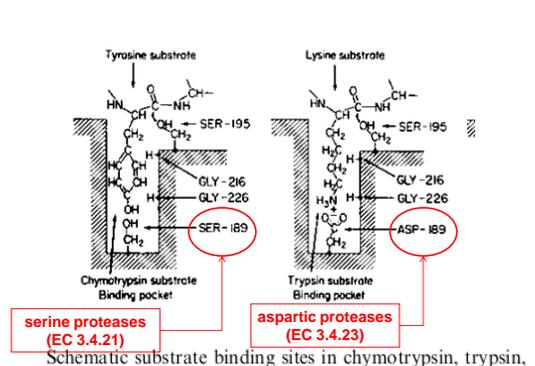


CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A NATUREZA QUÍMICA DO SÍTIO CATALÍTICO

CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM NATUREZA QUÍMICA DO SÍTIO CATALÍTICO

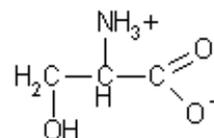
1. **SERINA PROTEASE**
 - Possuem um resíduo de serina em seu centro ativo.
2. **CISTEÍNA PROTEASE (proteases sulfidrílicas)**
 - Apresentam um aminoácido cisteína conjugada com histidina no sítio catalítico.
3. **PROTEASE ASPÁRTICA (protease ácida)**
 - Têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico
4. **METALO-PROTEASES**
 - Dependem de íons metálicos divalentes no seu mecanismo catalítico

- As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99



1. PROTEASES SÉRICAS ou SERINA PROTEASES

- Aminoácido serina presente no sítio ativo



- Ex.: quimotripsina e subtilisina
- pH 7,0 a 11,0
- Apresentam baixa especificidade de substrato.

Condições de atividade

- **BACTERIANA:**
 - Proteases neutras = pH 5,0 a 8,0 e baixa estabilidade térmica
 - Proteases alcalinas = pH 8,0 a 11,0 e temperaturas entre 50 a 60°C e baixa especificidade ao substrato
- **FÚNGICA:**
 - Um único fungo pode produzir diferentes proteases (ex.: *Aspergillus oryzae*).
 - Atividade em pH de 4,0 a 11,0 e temperatura ótima em torno de 40°C, inativadas a 50°C.

ORIGEM VEGETAL

Enzimas proteolíticas de plantas usadas no amaciamento da carne:

- bromelina
- ficina
- papaína

BROMELINA

1. BROMELINA - (EC 3.4.22.4)

- encontrada no abacaxi, bem como em outras espécies da família Bromeliaceae.
- **Ocorrência:** talo e fruto do abacaxi (*Ananas comosus*)
- **Composição:** mistura de 4 proteases com ações distintas, dependentes do pH
- **Aplicação:** amaciamento de carnes e clarificação da cerveja



BROMELINA - FONTE

- No Brasil, são cultivadas cinco espécies de *Ananas* e uma de *Pseudoananas*.
- Dos cultivares de interesse frutícola (*Ananas comosus*), os mais conhecidos são o **Pérola**, **Hawai** e o **Smooth caienne**;
 - segundo BALDINI et al. (1993), a espécie **Ananás vermelho-do-mato** (*Ananas bracteatus*, var. *typicus*) mostrou ser uma fonte promissora de bromelina.



BROMELINA - FONTE

- A presença da enzima bromelina depende da **fase de crescimento da planta**, sendo que ela não é encontrada quando a planta é muito jovem ou muito velha.
 - Acredita-se que esta enzima, nestas fases, seja transformada em uma outra proteína com função metabólica diferente, como enzima produtora de sabor e aroma (BALDINI et al., 1993).
- O abacaxi é o único fruto que possui concentrações, relativamente, altas de proteases, no estado maduro

COMPOSIÇÃO

- Rowan et. al. (1990) descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*):
 - bromelina do fruto,
 - bromelina do talo,
 - ananaina e
 - comosaina.
- A **bromelina do fruto** tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos e sua atividade é máxima em pH 8,0 e a temperatura de 70°C.
- A **bromelina do talo** apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0.
- A forma da bromelina comercialmente encontrada é a bromelina do talo.

UTILIZAÇÃO

- A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica:
 - indústrias alimentícias
 - indústria farmacêuticas
 - indústria cervejeira
 - indústria têxtil
- Pode-se mencionar sua utilização em:
 - amaciamento de carnes,
 - clarificação de cervejas,
 - fabricação de queijos,
 - preparo de alimentos infantis e dietéticos,
 - Pré-tratamento de soja,
 - no tratamento do couro,
 - tratamento da lã e da seda,
 - tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações,
 - Preparo de colágeno hidrolisado, etc.

PAPAÍNA

2. Papaína

- A papaína é obtida do fruto verde do mamoeiro (*Carica papaya*).
- Há muito tempo, os nativos de países tropicais deixavam as carnes duras de molho no suco da fruta ("leite" de mamão), ou as esfregavam com pedaços da fruta verde, ou as embrulhavam nas folhas do mamoeiro, por uma noite, antes da cocção.

Os amaciantes industrializados são mais conhecidos, facilmente encontrados e de custo relativamente baixo e utilização prática, evitando-se assim o uso de frutas ricas em papaína.

Papaína

- **Ocorrência:** látex do fruto verde do mamão (*Carica papaya*), além de suas folhas e talos
- Possui alta atividade proteolítica.
- É facilmente **inativada por oxidação** (necessidade de agentes redutores como sulfeto de hidrogênio, cianeto de hidrogênio, etc).
- Extraída principalmente como fruto prensado das folhas e talos
- **Aplicações:** clarificação da cerveja, amaciamento de carnes, auxiliar da digestão



CONCENTRAÇÃO NO FRUTO

- No **mamão** e no **figo**, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o **fruto está verde**;
- Com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece.

PAPAÍNA - AÇÃO

- Causa hidrólise geral de todos os componentes estruturais do músculo da carne bovina.
- Sua penetração é baixa (de 0,5 a 2,0 mm), necessitando-se, assim, a perfuração da carne durante sua preparação, para que esta enzima penetre mais facilmente na carne.
- A maior ação da papaína ocorre durante a cocção da carne (à temperatura de 60-80°C).

CURIOSIDADES

- A produção de papaína é uma excelente opção para o produtor de mamão, mas tem sido praticamente ignorada, seja por desconhecimento do seu valor comercial, seja por desconhecimento da tecnologia de produção.
- O mercado internacional da papaína vem crescendo nos últimos anos, tanto em quantidade como em valor, uma vez que ela é a enzima proteolítica mais potente existente para usos industriais, não possuindo substituto.
- Na indústria farmacêutica vem sendo utilizada associada com um curativo para acelerar o processo de cicatrização.

FICINA

3. FICINA

Ocorrência: látex de certas espécies de *Ficus*

Agente anti-helmíntico (digere os ascarídeos)

Economicamente inviável (requer extração de grande quantidade de matéria vegetal)

Aplicação: amaciamento de carnes e clarificação da cerveja

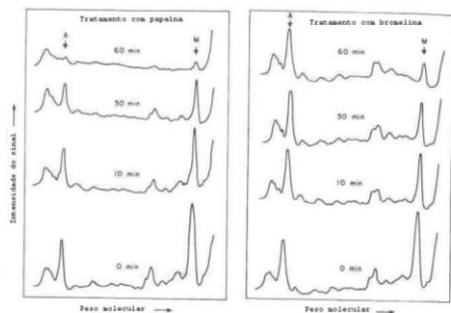


Ficina

- A ficina é uma enzima proteolítica obtida do látex de figos imaturos (*Ficus carica*).
- Atua sobre as proteínas estruturais da carne.
- Vários estudos foram realizados nas décadas de 50 e 60, mostrando as qualidades da ficina como amaciante de carnes.
- O seu método de aplicação mais usado é através de injeções *antemortem* da solução de enzima na veia jugular 15-20 minutos antes do abate, sendo o método mais eficiente para se obter carnes macias devido à circulação fazer a melhor distribuição da enzima pelo corpo do animal.

Ação das enzimas papaina e bromelina sobre carne

Fonte: KIM e TAUB. *Food Chemistrv.* v. 40. p. 337-343. 1991.



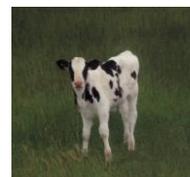
Densitogramas correspondentes ao perfil do SDS-PAGE das proteínas extraídas de carne com papaina e bromelina. (A→ actina; M→ miosina)

ORIGEM ANIMAL

RENINA

RENINA OU QUIMOSINA (Coelho)

- É uma protease gástrica ácida
- Ocorrência: suco gástrico do abomaso de bezerros
- Extraída principalmente de fetos bovinos nos últimos meses de gestação
- Comercializada na forma líquida, em pó ou em pastas
- Aplicação: fabricação de queijos e preparação de pudins

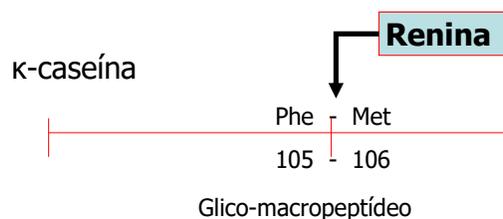


RENINA

- Enzima é extremamente específica e quebra apenas a ligação entre os aa. 105 e 106;
- Quando o animal cresce, a quimosina é substituída pela pepsina (não é específica);



COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA



PEPSINA

PEPSINA

- Ocorrência: mucosa do estômago na forma de pepsinogênio.
- Tratamento com ácido para ativação do pepsinogênio a pepsina (pH abaixo de 5,0)
- Precipitação com etanol
- Secagem em baixa temperatura

PEPSINA

- Consiste de uma única cadeia polipeptídica que contém 321 aminoácidos
- pH ótimo: 1,8
- Acima de 6,0 é rapidamente desnaturada perdendo sua atividade

OUTRAS PROTEASES ANIMAIS IMPORTANTES

- **TRIPSINA**
 - Serina-protease secretada pelo pâncreas
 - São endopeptidases altamente específicas (ligação entre LIS e ARG)
 - pH ótimo entre 7,0 a 9,0.
- **QUIMOTRIPSINA**
 - Serina protease semelhante à tripsina, também secretada pelo pâncreas;
 - Especificidade por ligações que envolvem aa aromáticos (TIR, PHE e TRP).
 - pH ótimo entre 7,0 a 9,0.

Ação da Quimotripsina

- VÍDEO

REFERÊNCIAS

- NAGODAWHITANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3 ed. London: Academic Press, 1993. 480p.
- Beynom, R.J., Bond, J.S. (eds). **Proteolytic enzymes: A practical approach**. Oxford: Academic press, 1989.
- Proprieta' E Biochimica Del Latte. *Composizione Macroscopica: Sostanza Azotata Le Caseine*. Disponível em: digilander.libero.it/~le_caseine.htm. Acesso em 16 jan 2008.
- LOPES, F. L. G.; SEVERO JÚNIOR, J. B.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. DE; TAMBOURGI, E. B. Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.7, n.1, p.33-38, 2005
- BORRACINI, Heloisa Maria Pitaro. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo**. 2006. 84p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Faculdade Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CURIOSIDADES:

- Proteases microbianas representam aproximadamente 40% da venda total mundial de enzimas.
- Proteases de origem microbiana são preferidas às enzimas de plantas e animais, uma vez que elas possuem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia.

CURIOSIDADES:

- Proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos.
- A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas têm levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana.
- Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética.

CURIOSIDADES:

- A degradação é iniciada por proteinases (endopeptidases) secretadas pelos microrganismos, seguida de hidrólise posterior por peptidases (exopeptidases) em um sítio extra- ou intracelular.
- Numerosas proteinases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie.
- Proteinases diferentes também podem ser produzidas pela mesma cepa, variando as condições de cultura.

CURIOSIDADES:

- A maioria das serina proteinases comerciais, principalmente as alcalinas e neutras, são produzidas por organismos que pertencem ao gênero *Bacillus*.
- As subtilisinas são enzimas representantes deste grupo.