



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
 Departamento de Engenharia de Alimentos


ZEA – 0561 – BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS



Aula 07 – HIDROLASES

AMILASES


Profa. Marta Mitsui Kushida



Dica

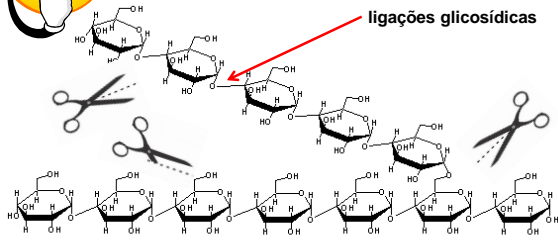
CARBOIDRASES:

Capítulo 6 Livro “Enzymes in food processing” de NAGODAWITHANA e G. REED e
Capítulo 2 do livro “BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS” de M. G. Koblitz das referências!!!!



CARBOIDRASES,
O QUE SÃO??

ligações glicosídicas



carboidratos

oligo e/ou polissacarídeos

Onde encontro carboidratos?

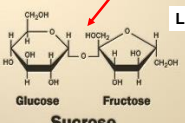





ALGUNS DOS ALIMENTOS QUE CONTÊM CARBOIDRATOS:		
arroz	massa	pães
cereais	frutas	sucos
vegetais	leite e laticínios	nozes
batata	bolos	torradas
frutas e frutas	feijões	pipoca
biscoitos salgados	refrigerante	panquecas e waffles
torradas	biscoitos doces	geléias
ALIMENTOS QUE NÃO CONTÊM CARBOIDRATOS:		
carnes e gorduras		

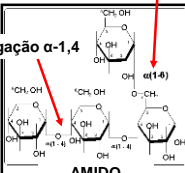
Recordando...

Ligação α -1,2



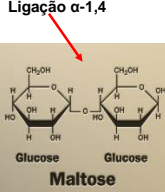
Sucrose

Ligação α -1,4



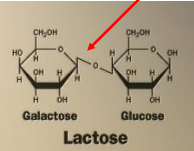
AMIDO

Ligação α -1,6



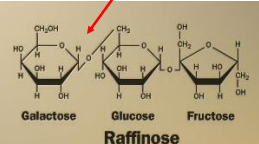
Maltose

Ligação β -1,4



Lactose

Ligação α -1,6



Raffinose

➤ São específicas em relação:

- Ao tipo de monossacarídeo;
- A posição da ligação (α -1,4 ou α -1,6);
- A configuração do substrato (α ou β);
- Ao tamanho da molécula do substrato (massa molecular ↓, atividade ↓).
- Padrão endo- ou exo- de atividade

HIDROLASES Carboidrases

REPRESENTANTES IMPORTANTES...

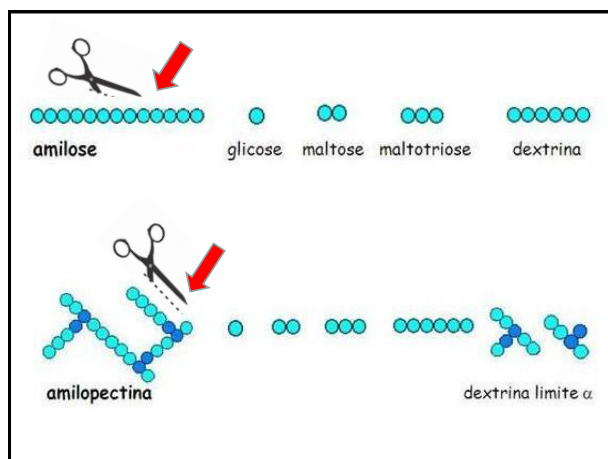
**AMILASES;
PECTINASES;
CELULASES;
LACTASES;
INVERTASES;
etc.**



HIDROLASES

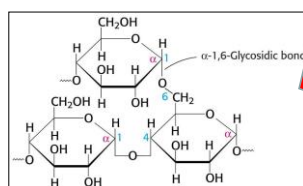
1. Lipases
2. Proteases
3. Carboidrases
 1. Amilases
 2. Pectinases
 3. Celulases
 4. Lactases
 5. Invertases, etc.

Amilases



AMILASES

- Enzimas mais importantes do grupo das glicosídeo-hidrolases
- Atuam na degradação do amido (AMILO)



AMIDO

**IMPORTANTE
!!!!**

HISTÓRICO

HISTÓRICO

- **Século XVI =**
 - em cervejarias alemãs, a cevada era pisada em água por vários dias e em seguida deixada germinar em uma sala úmida e quente.
 - As enzimas **β -amilases e maltases**, produzidas pelos germes digeriam o amido à glicose que era posteriormente fermentada.
- **Início do século XX =**
 - produção de enzimas amilolíticas em escala industrial em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos.
 - Takamine = desenvolvimento do primeiro método para a produção microbológica de enzima em grande escala – a α -amilase fúngica **Takadiastase**

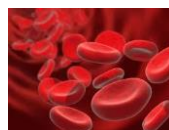
HISTORICO

- As **α -amilases** estão entre as primeiras enzimas conhecidas.
- As amilases promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos.
- Foram descritas:



1811 – nos Extratos de trigo

1831 – na Saliva



1846 – no Sangue



1833 – no Malte

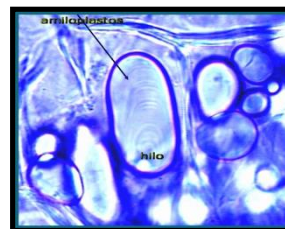


1881 – produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae*

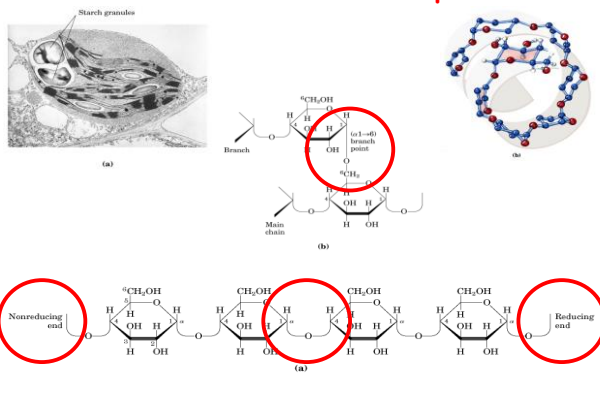
O SUBSTRATO

AMIDO

- Contém dois tipos de polissacarídeos:
 - Amilose (15-20%)
 - Amilopectina (80-85%).

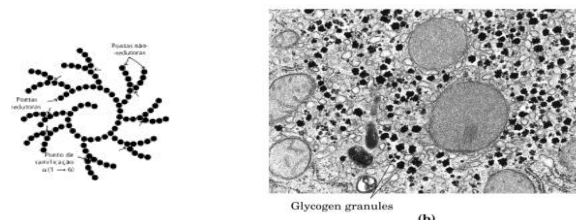


Amido: amilose e amilopectina



GLICOGÊNIO

Polímero de α -D-glicose ramificado
Fígado e músculos esqueléticos



Similar à amilopectina, porém mais densamente ramificado: cada ramo 8-12 resíduos
Fígado: 7% do peso úmido
0,01 μ M (glicose livre = 0,4M)

FRAÇÕES DO AMIDO

Amylose

Chaine linéaire

ligações α -1,4

Amylopectine

Chaines ramifiées

ligações α -1,4 e α -1,6

β -D-glicopirranose

AMILOSE

D-glucose

- É um dos componentes do amido e fécula, é uma molécula linear composta por 250 a 300 unidades de D-glicopirranose ligadas uniformemente por ligações glicosídicas α -1,4 que conferem forma helicoidal à molécula.

- Possui uma extremidade redutora e uma não-redutora.

Ação das amilases sobre a amilose

- A **α -amilase** hidrolisa a cadeia linear da amilose, atacando **ao acaso** as ligações α -1,4 por toda a cadeia, produzindo uma mistura de maltose e glucose - (Endoenzima)
- A **β -amilase**, ataca a **extremidade não redutora** da amilose, produzindo sucessivas unidades de maltose - (Exoenzima).

AMILOPECTINA

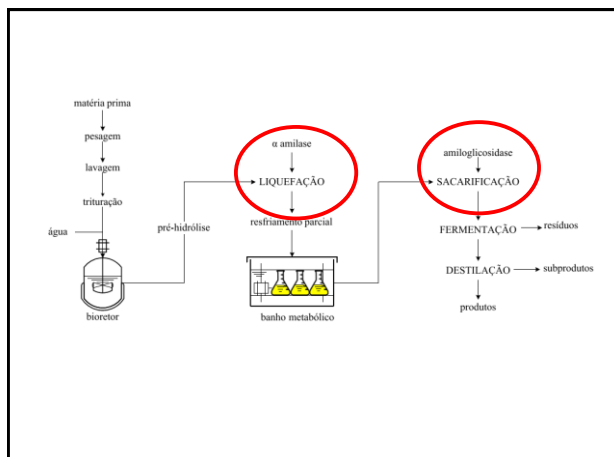
- É um polissacarídeo ramificado;
- na sua molécula, cadeias mais curtas de glucose unidas por ligações α -1,4 são também unidas entre si por ligações α -1,6 (das quais se podem obter a isomaltose).

Ação das amilases sobre a amilopectina

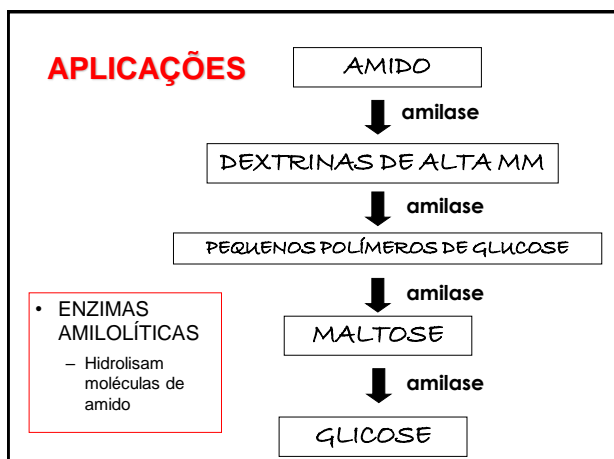
- A amilopectina também pode ser atacada por
 - α -amilase e
 - β -amilase,
- Ligações α -1,4 próximas das ramificações da amilopectina e as ligações α -1,6 **não são hidrolisadas por essas enzimas.**
- dextrina limite
- Isoamilase e isomaltase, α -1,6 glicosidase, pode hidrolisar a amilopectina até uma mistura de glucose e maltose.

hidrólise enzimática do amido na produção industrial de xaropes

- Ocorre em altas temperaturas.
- Dois passos importantes**
 - liquefação
 - sacarificação
- α -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* ou de *Bacillus stearothermophilus* hidrolise parcial das ligações α -1,4, liberando maltodextrinas (redução da viscosidade)



APLICAÇÕES



Produtos: mistura de oligossacarídeos de diferentes massas moleculares - dextrina ou maltodextrina.



Maltodextrina é uma mistura de carboidratos provenientes da conversão enzimática do amido do milho, sendo de fácil dissolução em água, tornando-se assim, uma excelente fonte de carboidratos.



APLICAÇÕES



Indústria de papel e celulose

APLICAÇÕES



panificação

APLICAÇÕES

liquefação e sacarificação do amido



Xarope de glucose

APLICAÇÕES



Indústria de cervejas

Europa e países andinos: uso de malte (amilases vegetais) para produção de **cerveja, uísque etc.**



bebidas destiladas

APLICAÇÕES

- Oriente e América do Sul: uso de amilases fúngicas para produção de **saquê e tiquira**.
- Índios da Amazônia: uso de amilases animais (da saliva humana) para produção do **caxiri** (bebida à base de mandioca).



E MUITO MAIS...

- detergentes,
- cereais para alimentação infantil,
- ração animal,
- de fermentação (vitaminas, aminoácidos, antibióticos),
- química e farmacêutica

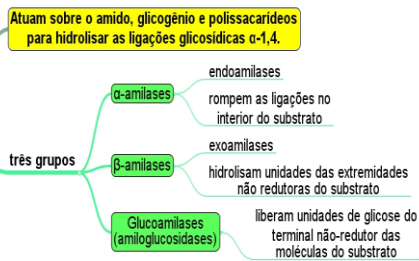
AS ENZIMAS

Exemplos: ENZIMAS QUE AGEM SOBRE O AMIDO E GLICOGÊNIO

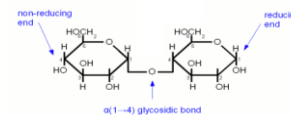
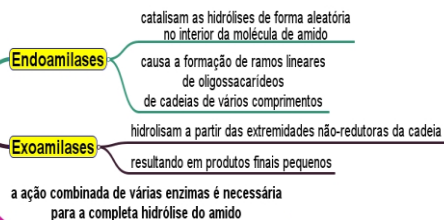
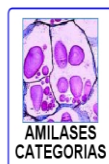
Enzima		Ligação preferencial para hidrólise	Substrato preferencial	Resultado da hidrólise
Endoenzimas				
α -amilase	EC 3.2.1.1	α -1,4	Amido	Dextrinas, maltose
Isoamilase	EC 3.2.1.68	α -1,6	Amilopectina	Amilose (dextrinas lineares)
Isomaltase	EC 3.2.1.10	α -1,6	Dextrinas-limite	Maltose, maltotriose
Pululanase	EC 3.2.1.41	α -1,6	Pululana e amilopectina	Maltotrioses e dextrinas lineares
Isopululanase	EC 3.2.1.57	α -1,4	Pululana	Isopanose
Exoenzimas				
β -amilase	EC 3.2.1.2	α -1,4	Amido	β -maltoses, dextrinas
Glicoamilase	EC 3.2.1.3	α -1,4 e α -1,6	Amido	β -glicoses
α -glicosidase	EC 3.2.1.20	α -1,4	Diversos	α -glicoses

(Koblitz, 2008)

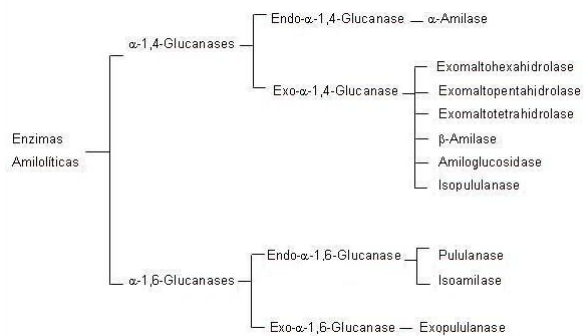
AMILASES



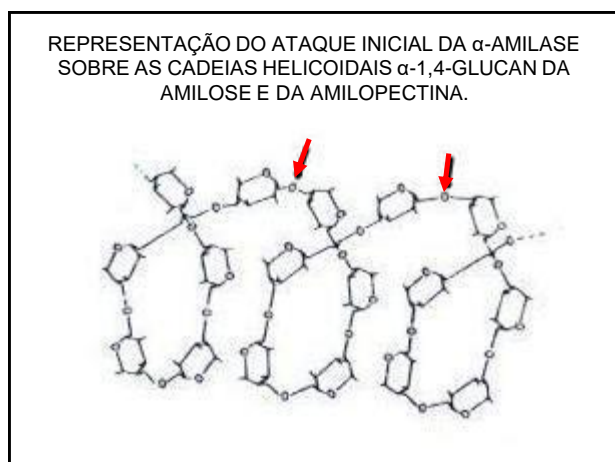
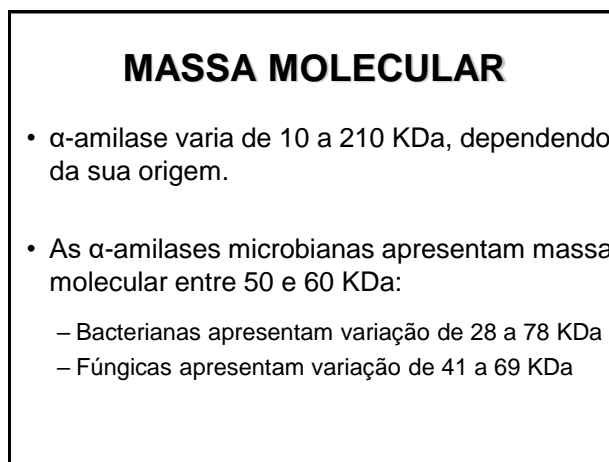
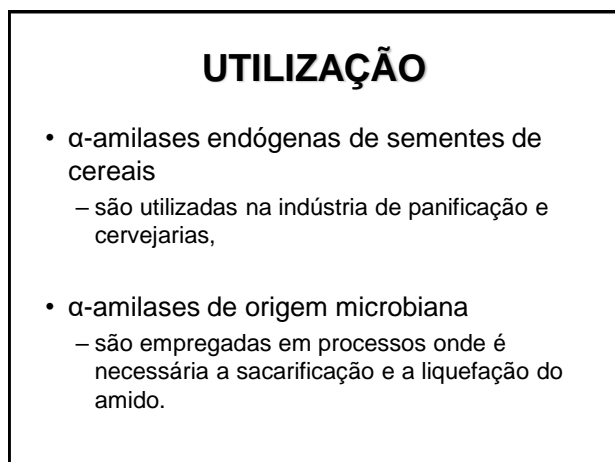
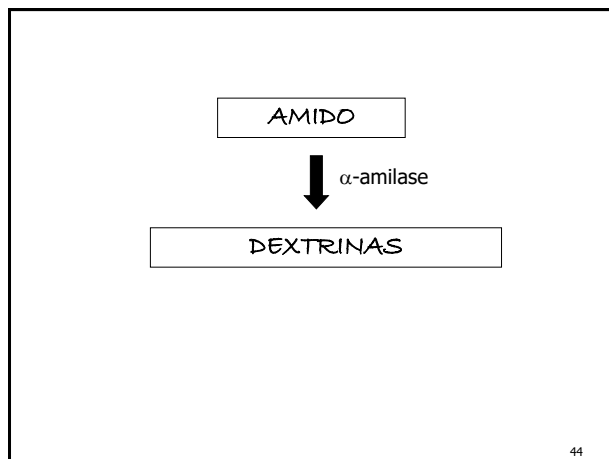
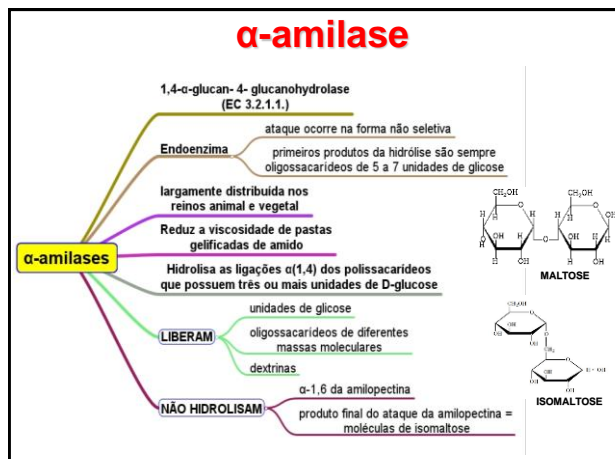
AMILASES



CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS AMILOLÍTICAS



α -amilase



FATORES QUE AFETAM A ATIVIDADE

- Necessária a presença de Ca^{+2} como cofator;
 - As amilases de origem diferentes se diferenciam pela força de ligação com o cálcio.
- O cálcio não influi somente na atividade da enzima como também aumenta sua estabilidade frente a trocas de temperatura e de pH.

Não participa diretamente na formação do complexo enzima-substrato

Mantém a enzima na CONFORMAÇÃO ÓTIMA

Importante para a enzima permanecer completamente ativa

Traços de cálcio presentes no amido são geralmente suficientes

Recomendada para máxima proteção das enzimas contra desnaturação pelo calor

Ca⁺⁺ como cofator

Adição de sais de cálcio

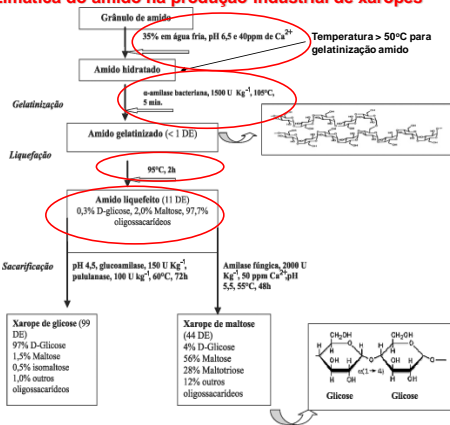
pH

- O pH ótimo para a α -amilase fúngica está entre 5,0 e 6,0.
- O pH ótimo para a α -amilase de mamíferos está entre 6,0 e 7,0.
- O pH ótimo para a α -amilase microbiana é bastante variável
- Possui caráter ácido e é solúvel em água.
- Íons de metais pesados, como o mercúrio, a prata e o chumbo inibem a α -amilase.

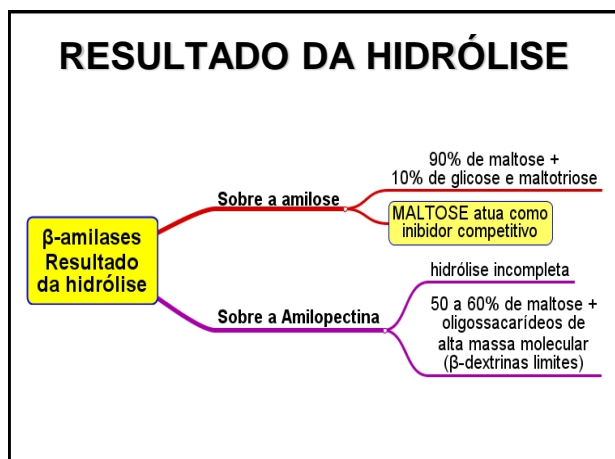
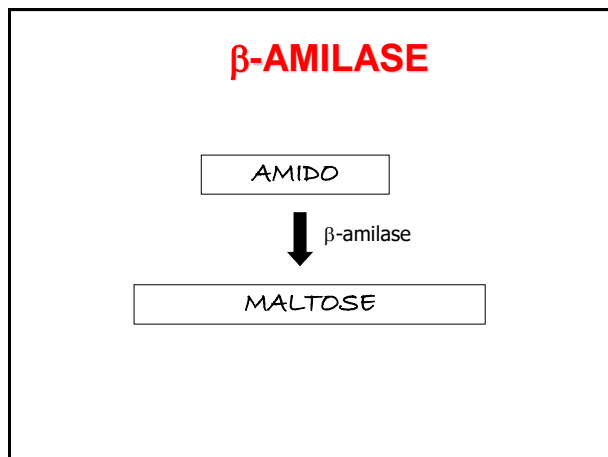
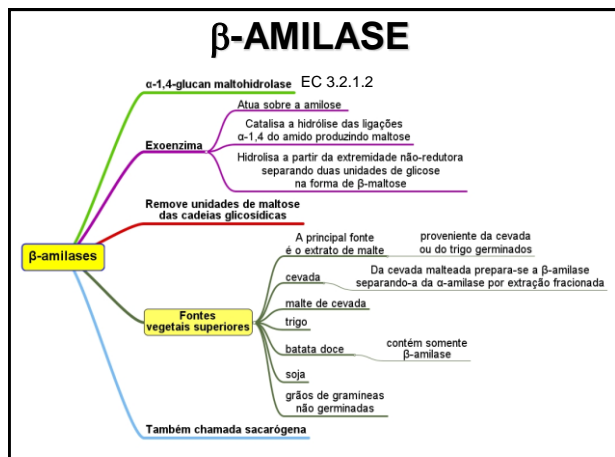
TEMPERATURA

- Atividade **diminui** rapidamente **acima de 50°C**
 - Na presença de um excesso de ions cálcio a desativação pode ser diminuída.
- A **faixa ótima de temperatura = 55 a 70°C** (varia dependendo da fonte).
- A atividade aumenta de 0° a 40°C.
 - amilases bacterianas apresentam maior estabilidade frente às temperaturas superiores a 40°C, com atividade ótima ao redor de 70°C.

hidrólise enzimática do amido na produção industrial de xaropes



β -Amilase



- ## FATORES QUE AFETAM A ATIVIDADE
- A β-amilase de vegetais
 - pH ótimo entre 5,0 e 6,0.
 - Estáveis entre 4,0 a 8,0.
 - SOJA = maior estabilidade em meio ácido do que trigo e cevada.
 - Temperatura ótima em torno de **30°C**.
 - Perdem grande parte da atividade após 30min a 70°C.
 - São enzimas **sulfidrílicas**
 - podem ser inativadas por oxidação.
 - Uso de agentes redutores pode recuperar sua atividade.

Curiosidade 1

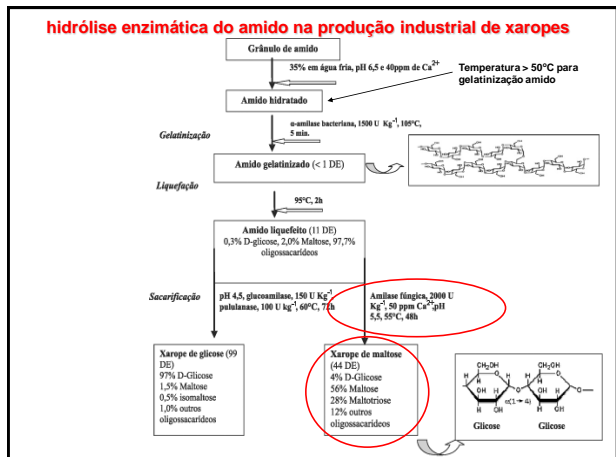
A AÇÃO COMBINADA DA α E β-AMILASE NO GRÃO GERMINADO AUMENTA A PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTÁVEIS

Curiosidade 2

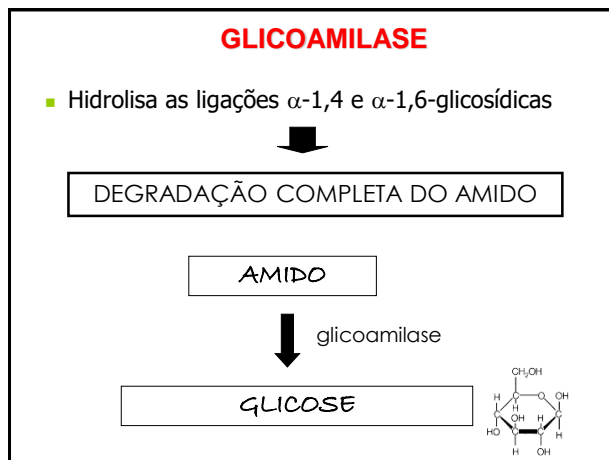
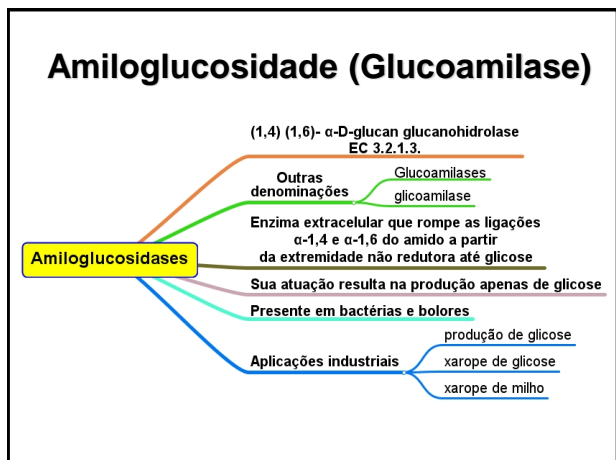
O AMIDO CRU (NÃO DANIFICADO E NÃO GELATINIZADO) NÃO É SUSCETÍVEL À ATIVIDADE DA β-AMILASE

Por outro lado...

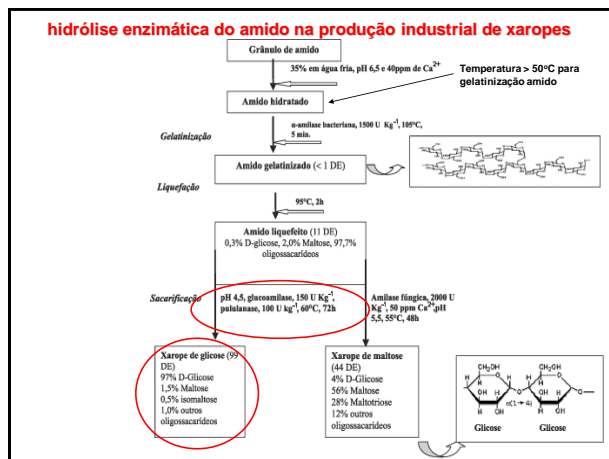
A α-AMILASE PODE ATUAR EM GRÂNULOS DE AMIDO INTACTOS



Amiloglucosidade (Glucoamilase)

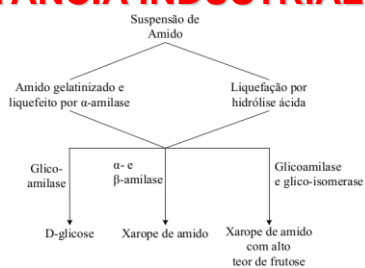


- ## AÇÃO
- Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisados pela enzima, que atua **também sobre as ligações α -1,3**.
 - A amiloglucosidase é uma **enzima de indução**, sendo importante a presença de **maltose** ou **amido** no meio para sua alta produção.



IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL

- Habilidade de formar menos produtos de reversão que a hidrólise ácida.



- Alta taxa de conversão do polissacarídeo em glicose.
- Usada em amidos liquefeitos com α -amilase
 - Resultados:
 - produtos que serão usados como substratos para fermentações
 - obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas.

Outras:

Enzimas Desramificantes

ENZIMAS DESRAMIFICANTES



REFERÊNCIAS

- CONN, E.E. ; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447 p.
- KUSHIDA, MARTA MITSUI. **Princípios de Bioquímica e Biotecnologia de Alimentos. Livronline - Curso livre EAD**. São Paulo: Livronline.com. 2001.
- NAGODAWHITANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3 ed. London: Academic Press, 1993. 480p.
- LEHNINGER, ALBERT L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Elsevier. 1989.
- SPIER, MICHELE RIGON. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2005.