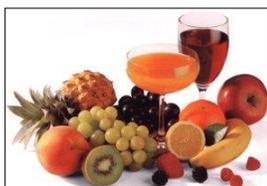




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

ZEA – 0561 – BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS



Aula 08 – HIDROLASES: PECTINASES

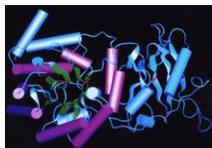
2S2019

Profa. Marta Mitsui Kushida

HIDROLASES

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

Pectinases

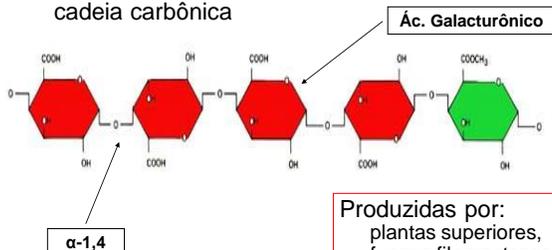


HISTÓRICO

- **Pectinases**
 - 1930 = umas das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas.
 - 1960 = os estudos sobre a natureza química de tecidos vegetais se tornaram mais aparentes. Os cientistas começaram a utilizar as enzimas mais eficientemente.
- Diversas companhias produzem pectinases e preparações comerciais de pectinases:
 - Na **Europa** (Novo Nordisk, Miles Kali-Chemie, Swiss Ferment Co., Novartis, Roche),
 - Nos **Estados Unidos** (Miles Laboratories, Rohm and Raas Co.)
 - No **Japão** (Kikkoman Shoyu Co.).

PECTINASES

- Degradam substâncias pécnicas em vegetais, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica



Produzidas por:
plantas superiores,
fungos filamentosos,
bactérias e
leveduras.

ATUAÇÃO DAS ENZIMAS PÉCTICAS

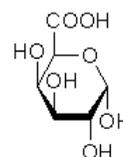
MOLÉCULAS DE PECTINA



UNIDADES MENORES



ÁCIDO D-
GALACTURÔNICO



Ácido D-
galacturônico

ATUAÇÃO DAS ENZIMAS PÉCTICAS



Watch a Novozymes pectinase attack stains containing pectin



novozymes 

O SUBSTRATO

A PAREDE CELULAR DE VEGETAIS

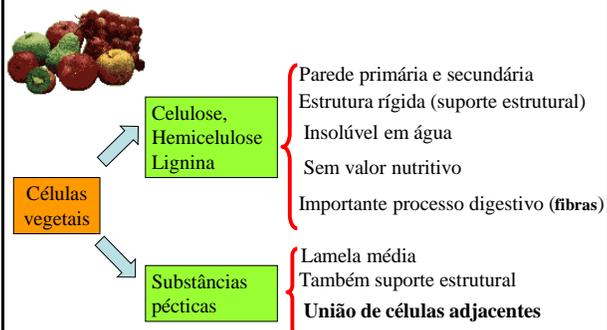


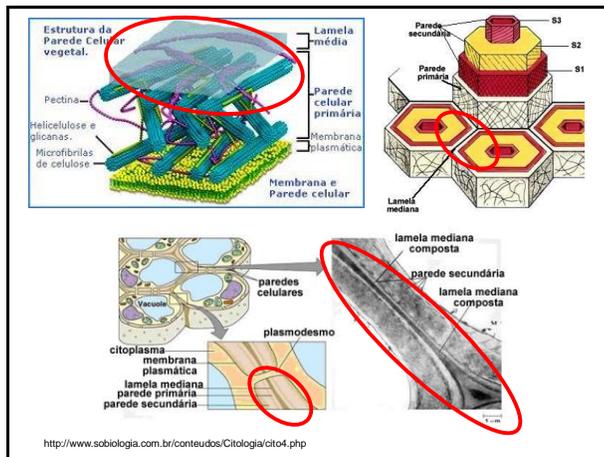
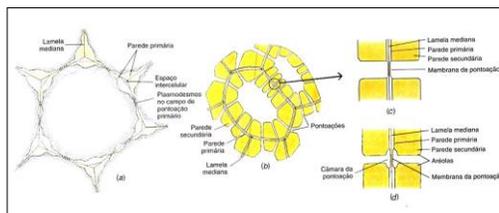
Figura 4. Corte com as principais partes da laranja.
Fonte: ABECITRUS, 2008.

SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS



SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

- Maior componente da **lamela média**
 - fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células de vegetais superiores.



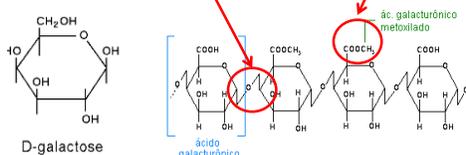
SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

- Causa um aumento considerável na **viscosidade** do suco, dificultando a **filtração** e a **concentração**.
- A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais
 - degradação da pectina e outros componentes de alta massa molecular,
 - diminui a viscosidade
 - aumenta o rendimento dos sucos
 - aparência cristalina no produto final
 - reduz em até 50% o tempo de filtração.

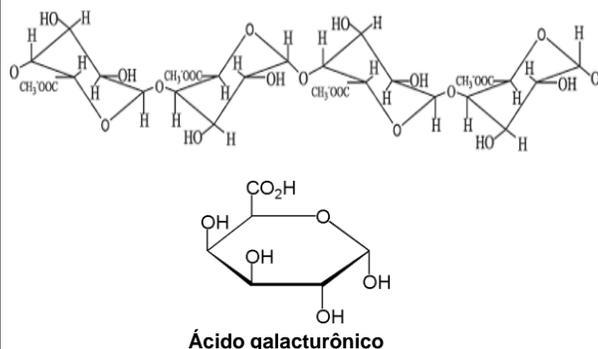


SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

- Complexo coloidal de polissacarídeos ácidos:
 - composto de resíduos de **ácido D-galacturônico** unidos por **ligações α-1,4**.
 - Podem estar parcialmente esterificados por **grupos metil éster** e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (ions sódio, potássio ou amônio).
- As substâncias pécticas não possuem massa molecular definida, variando de 25 a 360 kDa.



ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PECTINA

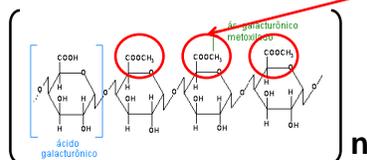


SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS – CLASSIFICAÇÃO (American Chemical Society)



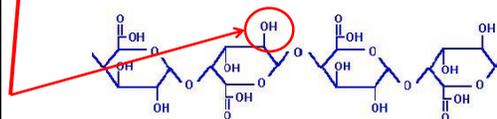
PROTOPECTINA

- Cadeias de ác. Galacturônicos metoxilados (esterificados com metanol) ligadas entre si:
 - por íons metálicos (Ca^{++} ; Mg^{++}),
 - por cadeias de outros carboidratos (arabinose, galactose, ramnose e xilose),
 - por ácido fosfórico e
 - pontes de hidrogênio.
- Em condições de hidrólise restrita, produzem ácidos pectínicos ou pectina.



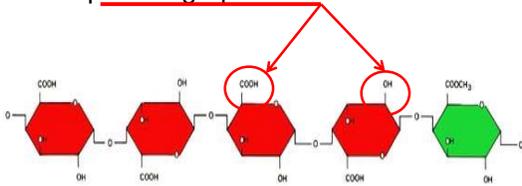
ÁCIDO PÉCTICO (ou Pectato)

- Compostos de resíduos de ácido poligalacturônico coloidal completamente desmetoxilada.
- Seus sais são pectatos neutros ou ácidos.



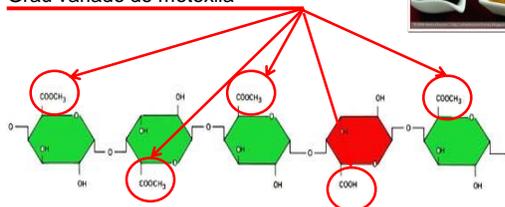
ÁCIDO PECTÍNICO

- Ácido pectínico é um grupo de compostos contendo ácido poligalacturônico coloidal com poucos grupos metil éster.



PECTINA

- Capacidade de formar géis, quando em presença de ácidos e açúcar (base para formação de geleias e outros tipos de frutas em conserva).
- Grau variado de metoxila



PECTINA



Pectinas com alto teor de metoxilação (ATM)

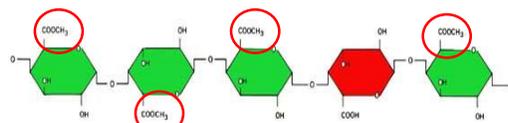
- > 50% de metoxilação
- Freqüentemente denominadas apenas "pectinas"
- Formam géis com açúcar e ácidos;
- Gelificam a temperaturas mais altas;
- Alta massa molecular maior firmeza do gel;

Pectinas com baixo teor de metoxilação (BTM)

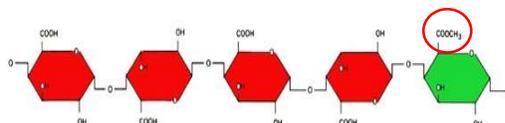
- < 50% de metoxilação
- Gelificação é possível na ausência de açúcares e na presença de alguns íons metálicos
- Gelificação devido à adição de cátions di ou trivalentes (Ex: Cu^{++} ; e Ca^{++} utilizado em concentração de 0,1 a 0,5%).
- Útil para alimentos dietéticos.

DM = Grau de Metoxilação
DM = 0,6 – 60% de metoxilação

Pectina - estrutura



Pectina de alto teor de metoxila (ATM)



Pectina de baixo teor de metoxila (BTM)

ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

CLARIFICAÇÃO E REDUÇÃO DE VISCOSIDADE EM SUCOS DE FRUTAS

• Indústria de sucos de frutas

– Vantagens das pectinases

- Utilização em diversos tipos de produtos (sucos clarificados ou não, concentrados, polpas,...)
- Redução do tempo de extração
- Sucos e concentrados estáveis
- Redução dos resíduos de polpa
- Custos de produção reduzidos

EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

- Localização: células do albedo de frutas cítricas
- Composição: hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos); compostos oxigenados (aldeídos não voláteis (ceras, flavonoides e dos, ésteres, álcoois, cetonas e fenóis) e ácidos graxos)

Extração do suco → partículas de albedo e emulsão óleo-água são separadas



Centrifugação da emulsão → para sua concentração



Pectinase hidrolisa complexos de pectina-proteína liberando o óleo e aumentando o rendimento

Produção de sucos e vinhos e na maceração de vegetais

- Pectinases + β -galacturonases + hemicelulases
- Vantagens:
 - Melhor maceração da casca
 - Aumento na extração do pigmento
 - Facilita a clarificação e filtração do mosto
 - Aumenta a qualidade e estabilidade do vinho
- Durante o esmagamento
 - Melhora a extração do suco
 - Reduz o tempo de clarificação
 - Aumenta conteúdo de terpenos no vinho



Extração de óleos vegetais

- Óleos de canola, coco, girassol, palma e oliva
- Degradação da parede celular por enzimas pectinolíticas = extração de óleo em processo aquoso (liquefação dos componentes estruturais das paredes celulares das sementes que contém óleo)
- Enzimas de maceração:
 - Aumenta a quantidade de agentes anti-oxidantes e vitamina E em óleo de oliva extravirgem
 - Reduz indução ao ranço
 - Aumenta a extração
 - Melhora fracionamento na centrifugação
 - Produz óleo de baixo teor de umidade.



fermentação de chá e café

1. Pectinases aceleram fermentação melhorando a qualidade final
2. Removem a camada de mucilagem do grão (3/4 de substâncias pécicas)



• Na indústria têxtil

- atuam na maceração do material hemicelulósico que resulta em separação das fibras de celulose da parede vegetal.
- Degradar camada de pectina que recobre as fibras de celulose
- Tratamento do resíduo líquido
- Degomagem das fibras naturais
- Maceração de fibras vegetais (linho, cânhamo e juta)
- Biopreparação do algodão
- Polímero enzimático de tecidos mistos de juta e algodão

Outras aplicações industriais

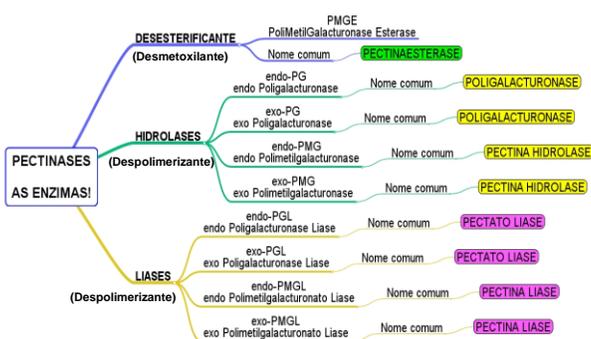
- amadurecimento de frutas,
- extração de polpa de tomate,
- tratamento de resíduos vegetais,
- enriquecimento proteico de alimentos infantis,

CLASSIFICAÇÃO DAS PECTINASES

CLASSIFICAÇÃO

1. Ataque ao esqueleto galacturônico,
2. Preferência pelo substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina),
3. Ação por transeliminação ou hidrólise,
4. Por clivagem randômica (enzima endo - ou despolimerizante) ou Por clivagem terminal (enzima exo – final da molécula).

AS ENZIMAS



"Enzyme Commission" (EC)

Tabela 3. Classificação das enzimas pecticas

Tipo de pectinase	Nome sugerido pela EC	Sígl	Nome comum	Número EC
Desesterificante	polimetilgalacturonase esterase	PMGE	pectina esterase	3.1.1.11
Hidrolase	endo poligalacturonase	endo-PG	poligalacturonase	3.2.1.15
	exo poligalacturonase 1	exo-PG 1	poligalacturonase	3.2.1.67
	exo poligalacturonase 2	exo-PG 2	poligalacturonase	3.2.1.82
	endo polimetilgalacturonase	endo-PMG	pectina hidrolase	
Liase	exo polimetilgalacturonase	exo-PMG	pectina hidrolase	
	endo poligalacturonase liase	endo-PGL	pectato liase	4.2.2.2
	exo poligalacturonase liase	exo-PGL	pectato liase	4.2.2.9
	endo polimetilgalacturonato liase	endo-PMGL	pectina liase	4.2.2.10
	exo polimetilgalacturonato liase	exo-PMGL	pectina liase	

Pectinases que atuam sobre oligogalacturonatos não estão incluídas na tabela porque não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação de pectina. Adaptada das refs. 5 e 6

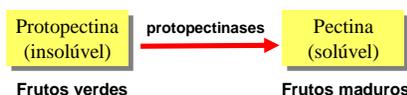
Tipos de pectinases

1. **Protopectinases**
 - solubilizam protopectina para formar pectina
2. **Despolimerizantes** (hidrolases e liases)
 - catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécicas
3. **Desesterificantes** ou **desmetoxilante** (pectinaesterase),
 - remove os grupos metil éster

1. PROTOPECTINASES

SOLUBILIZAÇÃO DE PROTOPECTINAS

- Mudanças durante o amadurecimento de vegetais = redução da firmeza devido ao amadurecimento causado pela solubilização das protopectinas



- **Despolimerizações e desmetoxilações** enzimáticas das PROTOPECTINAS = polímeros de baixa massa molecular, com menos grupos metoxilicos = alterações na estrutura.

Protopectinases

- Com base nas suas aplicações, são principalmente de dois tipos:
 - **protopectinase tipo A** (PPase-A), que reage com o sítio interno, isto é, a região do ácido poligalacturônico da protopectina
 - **protopectinase tipo B** (PPase-B) que reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes das paredes celulares.
- Não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina.

2. DESPOLIMERIZANTE

Enzimas despolimerizantes

- são classificadas de acordo com:
 - a clivagem hidrolítica (**hidrolases**) ou transeliminativa (**liases**) das ligações glicosídicas;
 - mecanismos endo- (randômica) ou exo- (a partir do final da molécula) de ação e preferência por ácido pécico ou pectina como substrato.
- Envolvem as hidrolases (catalisam a hidrólise de ligações α -1,4) e as liases (catalisam a β -eliminação).

POLIGALACTURONASE (HIDROLASES)

HIDROLASES

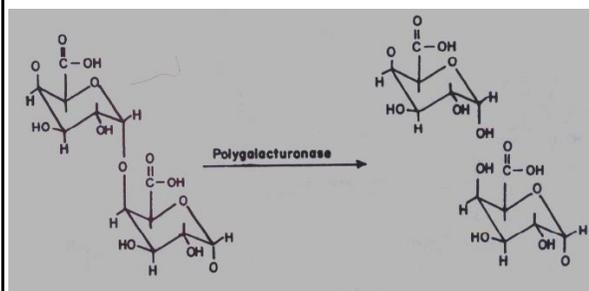
- A **polimetilgalacturonase** (PMG) presumivelmente hidrolisa polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos por clivagem de ligações α -1,4, podendo ser endo- ou exo-PMG.
- As **poligalacturonases** (PG) hidrolisam α -1,4 ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico.
 - É a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido pectico.
 - As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e possuírem pH ótimo de atividade na região levemente ácida e temperatura ótima entre 30 e 50°C.

POLIGALACTURONASE - PG

- Encontrada em vegetais, fungos filamentosos e bactérias

- **Endopoligalacturonase**
Frutas
Fungos filamentosos
- **Exopoligalacturonase**
Vegetais (cenoura, pêssego)
Fungos
Bactéria

REAÇÃO CATALISADA PELA POLIGALACTURONASE



46

PECTINA LIASE (LIASES)

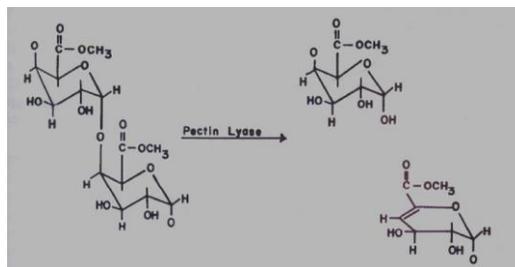
PECTINA LIASE

- Obtida exclusivamente a partir de fungos filamentosos
Aspergillus niger
- As ligações glicosídicas na pectina são altamente suscetíveis à sua atuação

LIASES

- Também chamadas **transeliminases**, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado.
- Incluem as pectina liases e as pectato liases.
- **Pectina liase** (polimetilgalacturonato liase, PMGL)
 - catalisa a β -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados.
 - Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) de modo endo- ou exo-.
 - O pH ótimo é em torno de 5,5 e temperatura ótima entre 40 e 50°C.
- **Pectato liase** (poligalacturonato liase, PGL)
 - catalisa a clivagem de ligações α -1,4 de ácido pectico de modo endo- ou exo- por trans-eliminação
 - requer Ca^{2+} para atividade
 - tem pH ótimo na região alcalina, entre 7,5 e 10
 - temperatura ótima entre 40 e 50°C.

REAÇÃO CATALISADA PELA PECTINA LIASE



Resumindo: Enzimas Pecticas Despolimerizantes:

• Endoenzimas :

- 1- Enzimas que atuam sobre pectina:
 - a- endo PMG (endo polimetilgalacturonase)
 - b- endo PL (endo pectina liase)
- 2- Enzimas que atuam sobre o ác. pectico :
 - a- endo PG (endo poligalacturonase)
 - b- endo PAL (endo pectato liase)

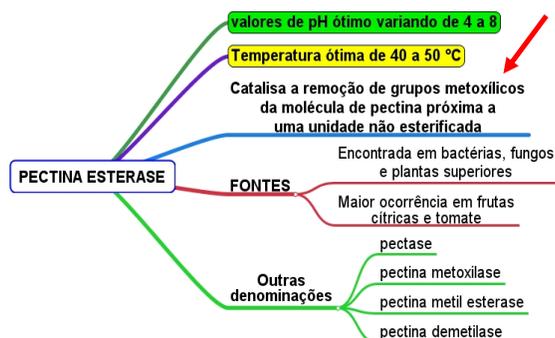
Resumindo: Enzimas Pecticas Despolimerizantes:

• Exoenzimas :

- 1- Enzimas que atuam sobre a pectina:
 - a- exo PMG (exo polimetilgalacturonase)
 - b- exo PL (exo pectina liase)
- 2- Enzimas que atuam sobre ac. pectico
 - a- exo PG (exo poligalacturonase)
 - b- exo PAL (exopectato liase)

3. DESMETOXILANTE PECTINESTERASE

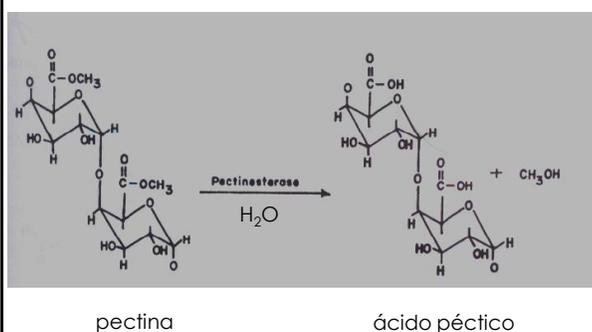
Pectina esterase



Pectina esterase

- Está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção e melhoramento da textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sucos de frutas.
- Pode estar envolvida em mudanças das substâncias pécicas durante amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais.

REAÇÃO CATALISADA PELA PECTINESTERASE



Interesse industrial

- Problema na indústria de sucos cítricos (sucos concentrados):
 - Perda de turbidez e separação de fases.
 - Pectina desesterificada precipita com o Ca⁺⁺ natural dos sucos.
- Solução = inativação de PE
 - Ver detalhes cap 2 – livro Bioquímica de Alimentos G. Koblitz.

PECTINESTERASE

controle



PECTINESTERASE

controle

ROMPIMENTO/CORTE DA FRUTA A ALTA TEMPERATURA

MÉTODO *HOT-BREAK*

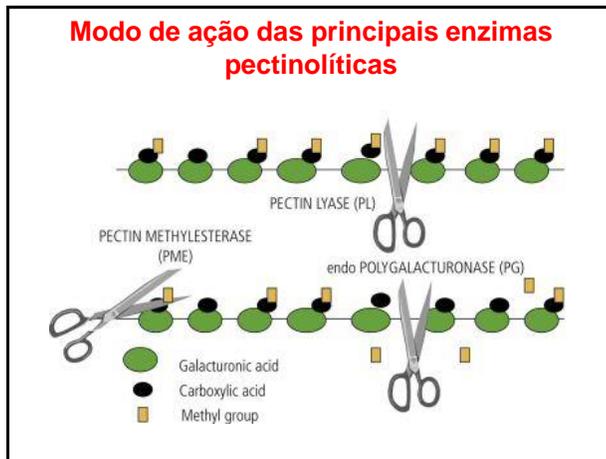
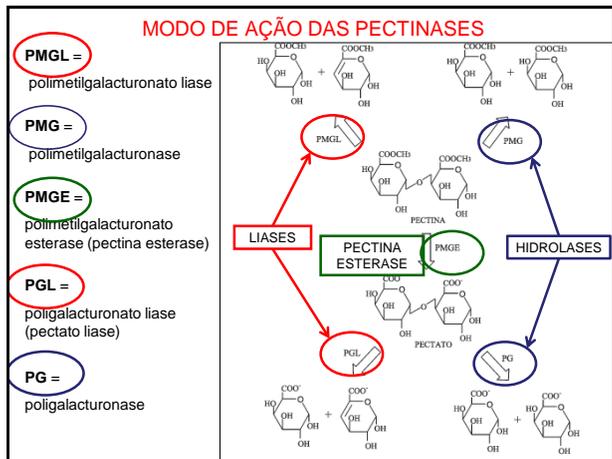


INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA INSTANTÂNEA



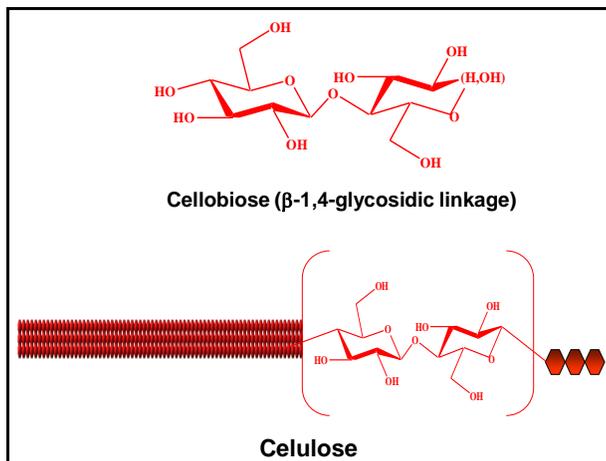
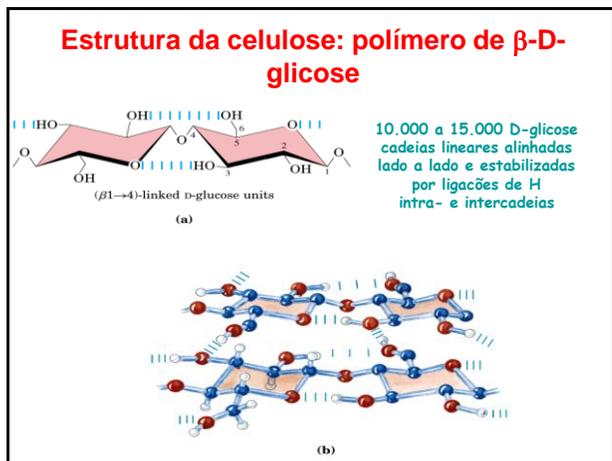
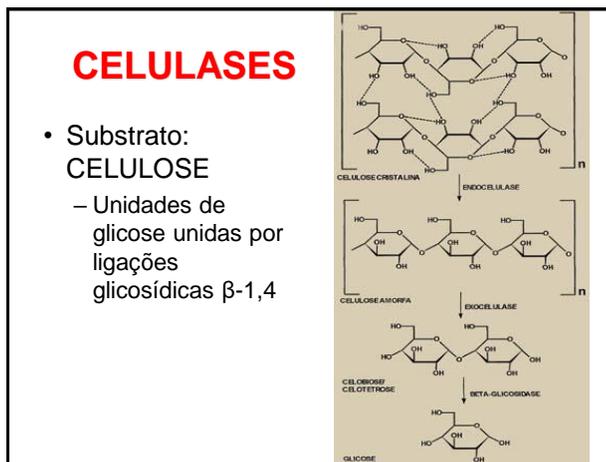
PRODUÇÃO DE PASTAS VISCOSAS (Ketchups, sopas e molhos)

ESQUEMAS DO MODO DE AÇÃO



CELULASES

TAMBÉM USADAS NA INDÚSTRIA DE SUCOS



CELULASES

- Capazes de romper as ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades de glicose.
- Produzidas apenas por microrganismos:
 - bactérias do trato gastrointestinal de ruminantes;
 - fungos filamentosos do solo
 - *Aspergillus niger*,
 - *Penicillium oxalium*,
 - *Trichoderma viridae*

Tipos de celulases

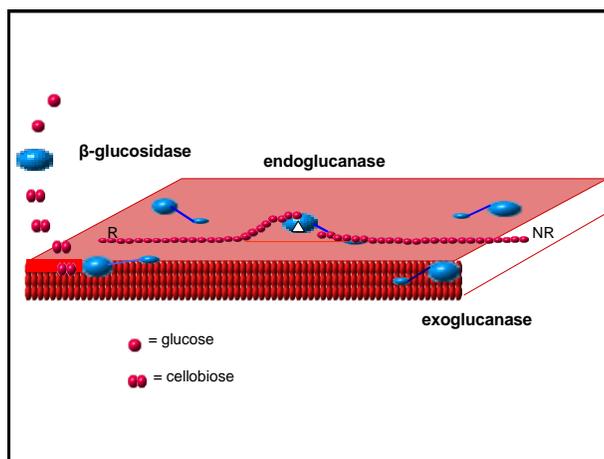
Tipos de celulases:

ENDO-1,4- β -GLICANASES (EC 3.2.1.4) – CELULASE

Rompem a celulose desordenadamente, no meio da molécula liberando oligossacarídeos β -1,4

EXO-1,4- β -GLICANASES (EC 3.2.1.91) – CELOBIO-HIDROLASE

- Rompem a celulose a partir da extremidade liberando glicose e celobiose (dissacarídeo de glicose β 1,4)



Tipos de celulases:

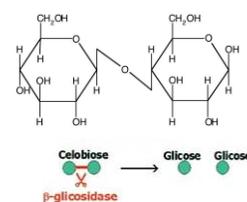
GLICOHIDROLASES (EC 3.2.1.74)

- Rompem unidades de glicose da extremidade de polímeros de celulose e oligômeros

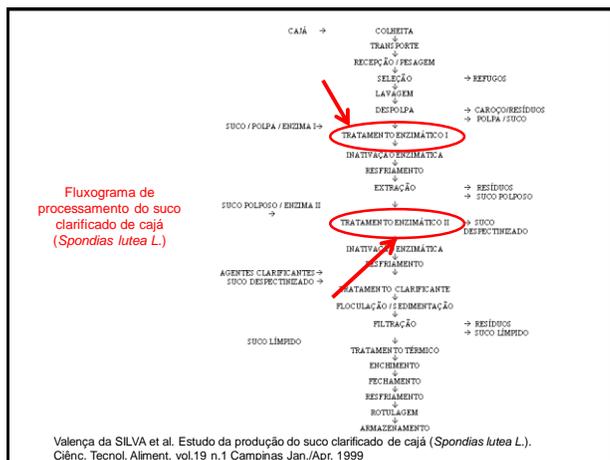
Tipos de celulases:

CELOBIASE (EC 3.2.1.21)

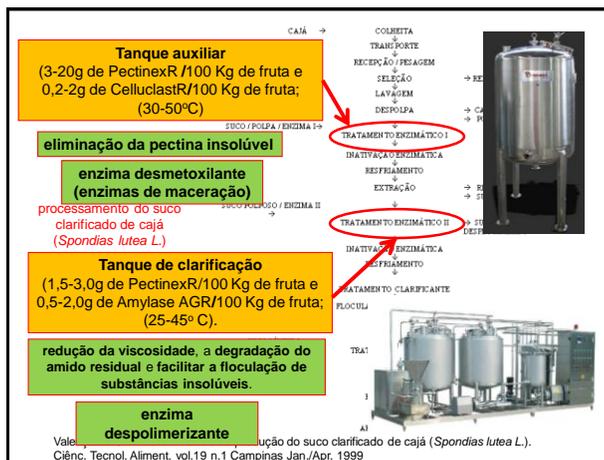
- Rompem A CELOBIOSE, LIBERANDO GLICOSES.
- Atuam também como exo enzimas sobre oligossacarídeos β - 1,4.



DESAFIO



Vale da SILVA et al. Estudo da produção do suco clarificado de cajá (*Spondias lutea L.*). Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.19 n.1 Campinas Jan./Apr. 1999



Vale da SILVA et al. Estudo da produção do suco clarificado de cajá (*Spondias lutea L.*). Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.19 n.1 Campinas Jan./Apr. 1999

APLICAÇÃO INDUSTRIAL DAS PECTINASES E CELULASES

- Enzimas endógenas: Pectinaesterase:

Separação de fases em sucos de frutas cítricas:

↑ atividade pectinaesterase

↓ atividade enzimas despolimerizantes

A desesterificação da pectina forma ácido pécico que precipita na presença de Ca^{+2}

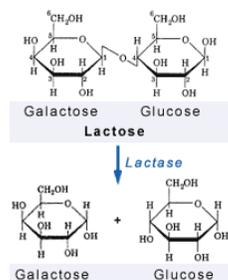
SOLUÇÃO PARA O PROBLEMA: adição de pectinaliases ou poligalacturonases.

- Convertem o ácido pécico em oligômeros não sensíveis ao Ca^{+2} .
- Ocorre diminuição da viscosidade do suco.

Outras Carboidrases

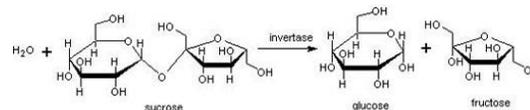
Lactases

- Principal substrato = lactose (glicose e galactose unidas por ligação glicosídica β -1,4)



Invertase

- Hidrolisam sacarose em frutose e glicose = açúcar invertido.
- Leva a inversão na rotação óptica do meio de reação



REFERÊNCIAS

- NAGODAWHITANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3 ed. London: Academic Press, 1993. 480p.
- UENOJO, MARIANA; PASTORE, GLAUCIA MARIA. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, p.388-394, Abr, 2007.