



Enzimas: características gerais

Propriedades
Obtenção
Purificação

Prof. Sandra H da Cruz

{ 1 }

1 Introdução

- História da Bioquímica começa com pesquisas sobre enzimas
- Catálise biológica - início séc.XIX
 - estômago - digestão da carne
 - saliva - digestão do amido
- Década de 30
 - 1930 - amilase ou ptialina
 - 1936 - pepsina e tripsina

{ 2 }

Introdução

- Início do Século XX
75 enzimas → isoladas e cristalizadas
– ficou evidenciado caráter proteico
- Atualmente
 - 4000 enzimas conhecidas
 - 200 são de uso comercial

{ 3 }

Introdução

- Início do Século XX
75 enzimas → isoladas e cristalizadas
– ficou evidenciado caráter proteico
- Atualmente
 - 4000 enzimas conhecidas
 - 200 são de uso comercial

(4)

Introdução

- Enzimas: aditivos autorizados nos alimentos
- Característica importante que constitui uma vantagem na utilização de enzimas:
 - atividade da enzima pode ser facilmente controlada a partir de um ajuste nas condições da reação, assim como interromper a reação por aquecimento quando necessário.
- Limitação principal:
 - ✓ dificuldades técnicas (organização de sistemas multienzimáticos)
 - ✓ necessidade de proporcionar a energia necessária para realizar possíveis reações sintéticas termodinamicamente desfavoráveis

(5)

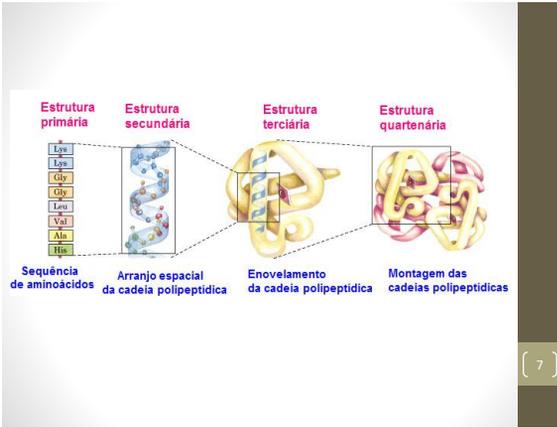
2. CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS

2.1 Definição

Enzimas como polipeptídeos

- Estrutura proteica;
- Sequência;
- Tamanho: maioria 30 a 50 kDa;
- Estabilidade térmica.

(6)



Características

ENZIMAS: polipeptídeos que catalisam uma reação com certo grau de especificidade

As enzimas são catalisadores de todas as reações que ocorrem nos seres vivos

CATALISADOR - acelera a velocidade das reações e não são consumidos

MECANISMO DE AÇÃO: SÍTIOS ATIVOS

E = polipeptídeo / catálise / especificidade

(8)

2.2 Propriedades das enzimas

- Enzimas – catalizadores biológicos
- Sítios ativos
- Eficiência catalítica
- Especificidade
- Cofatores
- Regulação
- Condições amenas de pH e temperatura

(9)

Vantagens da utilização de enzimas na fabricação de produtos:

- ✓ As enzimas transformam rapidamente seus substratos em temperaturas moderadas e em valores de pH próximos a neutralidade, normalmente com uma alta especificidade.
- ✓ Esta alta especificidade requer a utilização de uma única enzima. Para isto é necessária uma *purificação* para se obter uma determinada atividade enzimática, eliminando as enzimas contaminantes que existem em um extrato bruto obtido a partir de microrganismos, plantas ou uma fonte animal. Isto aumenta o custo da enzima.

{ 10 }

Características: propriedades

Enzimas = Catalisadores

- Propriedades
 - Aceleram as reações
 - Não são consumidos na reação
 - Atuam em pequenas concentrações
 - Não alteram o equilíbrio das reações

{ 11 }

Propriedades das enzimas

- Catalizador de reação
 - Sítio ativo
- Especificidade
 - ✓ atuam em condições brandas de T e pH
 - ✓ são eficientes em baixas concentrações
 - ✓ Não alteram o equilíbrio das reações

{ 12 }

Características: propriedades

E = aceleram reações químicasDecomposição do H₂O₂

Condições da Reação	Energia livre de Ativação		Velocidade Relativa
	kJ/mol	kcal/mol	
Sem catalisador	75,2	18,0	1
Platina (cat químico)	48,9	11,7	2,77 x 10 ⁴
Enzima Catalase	23,0	5,5	6,51 x 10⁸

(13)

Características: propriedades

E = não são consumidas na reação

(14)

Características: propriedades

E = Atuam em pequenas concentrações

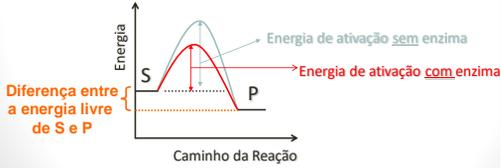
1 molécula de Catalase \longrightarrow 5 000 000 de moléculas de H₂O₂
decompõe
pH = 6,8 em 1 min

(15)

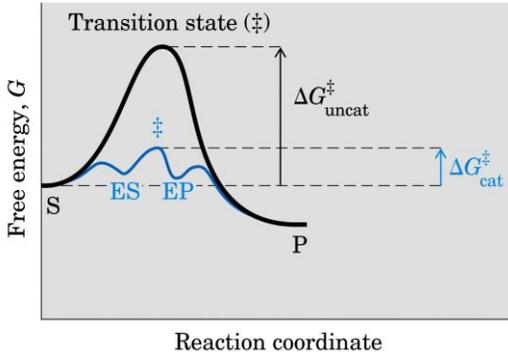
Características: propriedades

E = Não alteram o estado de equilíbrio

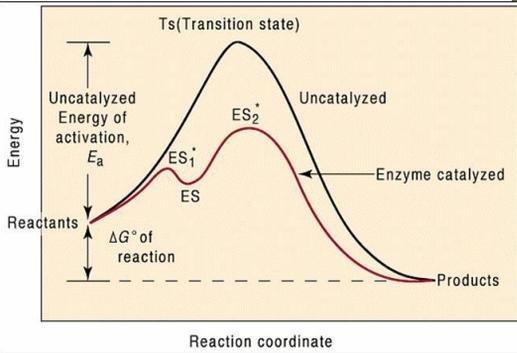
- no nível basal (forma estável), S e/ou P contém uma quantidade característica de energia livre
- o **equilíbrio** entre S e P reflete a diferença em energia livre dos seus estados basais



16



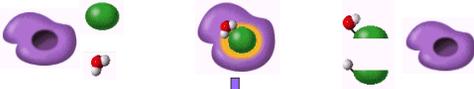
17



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

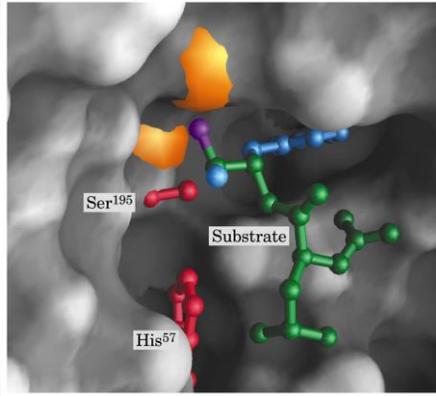
18

2.3 Modo de ação das enzimas



Substrato se liga
ao
SÍTIO ATIVO
da enzima

19



20

Modo de ação...

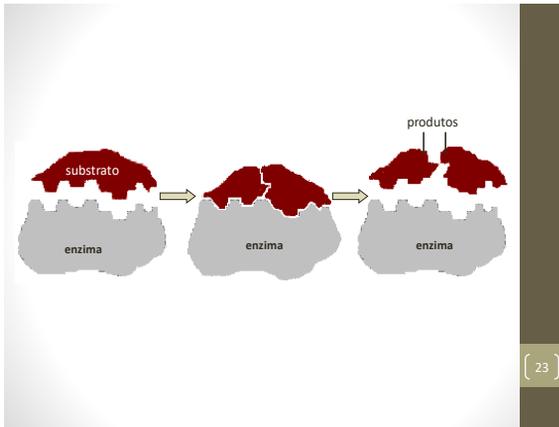


Energia livre de ativação

Velocidade de reação

21





Formação do Complexo Enzima / Substrato

✓ 2 modelos propostos:

- Chave-Fechadura 
- Encaixe Induzido 

[24]

Enzimas

Ligação da enzima ao substrato

Modelo
Chave-Fechadura

(25)

Modelos de ligação da enzima ao substrato

Modelo Encaixe Induzido

(a)

(b)

Modelo Encaixe Induzido combinado com a tensão do substrato

Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

2.4 Nomenclatura

No século XIX - poucas enzimas identificadas

- Adicionava-se sufixo **ASE** ao nome do substrato
 - enzima que hidrolisam
 - gorduras (lipo - grego) - **LIPASE**
 - amido (amylon - grego) - **AMILASE**
 - proteínas - **PROTEASE**
- Nomes arbitrários
 - **Tripsina** e **pepsina** - proteases
 - **Catalase** - H_2O_2

Nome comum: sufixo ASE

Nome sistemático: União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB)

7 classes

(27)

International Classification of Enzymes*

No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group-transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage
7	Translocases	The movement of ions or molecules across membranes or their separation within membranes

*Most enzymes catalyze the transfer of electrons, atoms or functional groups. They are therefore classified, given code numbers, and assigned names according to the type of transfer reaction, the group donor, and the group acceptor.

28

- Sistema Oficial IUB
- Cada enzima - n° de código (E.C.- Enzyme Commission) com 4 dígitos que caracterizam o tipo de reação

1º dígito - classe

2º dígito - subclasse

3º dígito - sub-subclasse

4º dígito - indica o substrato

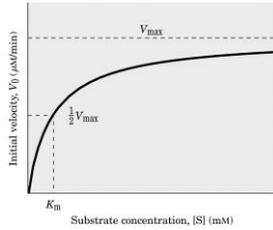
29

Classe da Enzima	Número		Tipo de reação
	Classificadas	Disponíveis	
1.oxidoreductases	650	90	Redução-oxidação: oxigenação de ligações de C-H, C-C, C=C; ou remoção total ou adição de equivalentes de átomos de hidrogênio
2.transferases	720	90	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, açúcar, fosfato ou metila
3.hidrolases	636	150	Hidrólise: formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilasnitrídeos, glicosídeos, organohaletos
4.liases	255	35	Adição-eliminação de pequenas moléculas nas ligações C=C, C=N, C=O
5.isomerases	120	6	Isomerização tais como racemização, epimerização, re-arranjos
6.ligases	80	5	Formação-clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C com concomitante clivagem de trifosfato
7.translocases			movimento de íons ou moléculas através de membranas ou sua separação dentro de membranas

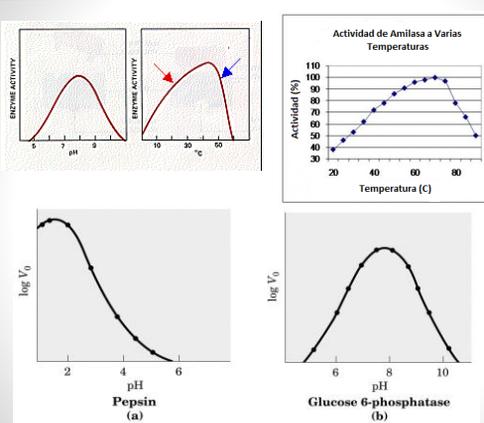
30

2.5 Fatores que afetam a ação das enzimas

- ❖ Concentração do substrato
- ❖ Temperatura
- ❖ pH

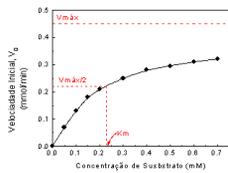


31

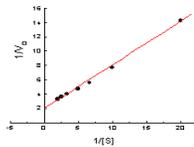


32

3 Cinética enzimática



$$V_0 = V_{\text{max}} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$



$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\text{max}}} + \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \frac{1}{[S]}$$

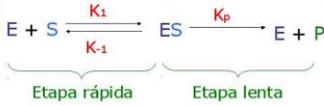
33

CINÉTICA ENZIMÁTICA

* Victor Henri (1903): $E + S \leftrightarrow ES$????????

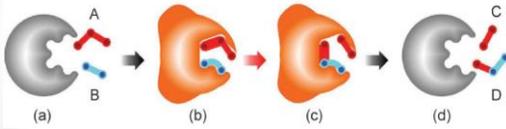


* 1913
 Leonor Michaelis - Enzimologista
 Maud Menten - Pediatra



34

Formação do complexo transitório



35

Constante de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

K_m – indica a afinidade da enzima pelo substrato, diferente de substrato para substrato e de enzima para enzima.

$V_{máx}$ - velocidade máxima que a reação pode alcançar, na situação virtual em que todos os enzimas se encontram ligados ao substrato.

36

Termos básicos utilizados em cinética enzimática

- **Atividade enzimática:** designa a própria atividade catalítica da enzima, em geral expressa em unidades de velocidade (massa transformada por unidade de tempo – p.e. $\mu\text{mol minuto}^{-1}$)
- **Substrato:** nome dado a substância que será catalisada pela enzima
- **Produto:** substância resultante da transformação enzimática do substrato

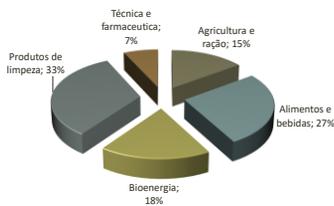
(37)

Termos básicos

- **Unidade de Enzima**
 - quantidade de enzima capaz de transformar 1,0 μmol de substrato por minuto em condições definidas de pH, temperatura e força iônica
- **Atividade específica:**
 - atividade da enzima,
 - geralmente expressa em massa por unidade de tempo, dividida pela quantidade de proteína.
 - Medida do grau de pureza de uma preparação enzimática.

(38)

4 Áreas que utilizam enzimas



Distribuição das vendas da Novozymes – Dados de 2015

<http://report2015.novozymes.com/the-big-picture/2015-in-brief#map>

(39)

Consumo de enzimas industriais

- Indústrias detergente;
- Amido;
- Indústrias têxtil;
- Álcool combustível

Kirk et al., 2002

(40)

Enzimas utilizadas em alimentos e bebidas

- Amilases
- Peptidases
- Pectinases
- Glicose-isomerase

(41)

Enzimas em alimentos

- Papel destacado - Influi na composição, processamento e deterioração dos alimentos
- Podem ser úteis ou indesejáveis
- Detecção da atividade em determinado produto pode servir de indicador da eficiência de uma determinada operação
 - Ex. vegetais branqueados – atividade peroxidásica = indicador do processo térmico empregado

(42)

Efeito desejáveis

➤ Modificar matérias-primas e/ou obter produtos específicos

- ✓ Panificação
- ✓ Modificação enzimática de materiais amiláceos
- ✓ Fabricação de sucos de frutas
- ✓ Modificação de proteínas
- ✓ Fabricação de bebidas alcoólicas
- ✓ Fabricação de laticínios

(43)

Efeito indesejáveis

- ✓ Escurecimento de frutas e vegetais causado pelas polifenoloxidasas
- ✓ Rancidez de farinhas causada pela ação de lipases e lipoxigenases
- ✓ Amolecimento de tecidos vegetais provocado pelas enzimas pécticas

(44)

Papaína

- Obtenção: Frutos verdes da *Carica papaya*;
- Facilmente inativada pela oxidação, podendo ser inicialmente revertida pela adição de agentes redutores como sulfeto de hidrogênio, cianeto de hidrogênio, sulfetos e sulfitos;
- Presença de quantidades significativas em outras partes da planta exceto as raízes;

(45)

Papaína

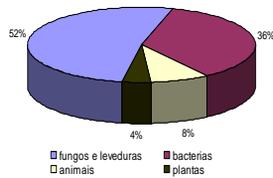
- pH: 5,0
- Apresenta alta estabilidade, principalmente térmica;
- pH dependente – perde atividade em condições ácidas;
- Ampla atividade hidrolítica – atua tanto em proteínas como em pequenos peptídeos
- Ação hidrolisante em substratos sintéticos, amidas e ésteres;

46

6 Fontes de enzimas

Enzimas biologicamente ativas podem ser extraídas a partir de qualquer organismo vivo.
Uma grande variedade de fontes são utilizadas para produção de enzimas comerciais.

- animais
- vegetais
- microrganismos



47

Obtenção de enzimas

- Enzimas de interesse industrial:
 - trituração de vegetais (sementes, polpas e raízes);
 - trituração de tecidos animais (mucosa gástrica, pâncreas, fígado e sangue);
 - através de microrganismos.
- Materiais de partida:
 - Células vegetais
 - Tecidos animais
 - Células microbianas

48

Enzimas de fontes microbianas

- substituem as enzimas de origem vegetal e animal,
- rápido ciclo reprodutivo dos m.o.;
- grande população de células com redução no tempo de produção

- manipulação genética \Rightarrow cepas de alta produtividade e especificidade
- operações envolvidas na extração de enzimas: simples
 - controle da produção pode ser feito desde a fonte até a comercialização.

49

Obtenção de enzimas microbianas

A Seleção de m.o. (linhagem pura)

a composição exata dos meios varia de acordo com:

- a indústria;
- a linhagem do m.o.
- o sistema enzimático desejado
- o tipo de cultivo usado

Nutrientes empregados na preparação dos meios:

- farelo de trigo,
- extrato de levedura,
- resíduos de destilação,
- polpa de citrus e
- outros

50

B Método de cultivo

➤ Cultura líquida submersa

Processo de fermentação submersa (FS)

➤ Cultivo em superfície ou método do meio semi-sólido

Fermentação em estado sólido

- fermentação semisólida (FSS)
- sólida (FS)
- em estado sólido (FES)

51

O meio resfriado do fermentador é inoculado com a cultura pura do microorganismo cultivado em frascos agitados ou em pequenos pré-fermentadores providos de agitação e aeração.

Amostragem periódica para controle:

- temperatura,
- pH
- mistura
- pureza da cultura
- consumo de certos componentes
- a quantidade / produção da enzima

55

C Recuperação da enzima

- ✓ Extração da enzima feita com água contendo agente preservante diretamente sobre o material úmido após o final do processo de crescimento ou após a secagem da cultura.
- ✓ Filtração (separa-se os sólidos insolúveis do filtrado)
- ✓ Clarificação (centrifugação ou filtração)
- ✓ Obtenção do extrato bruto

56
