



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

ZEА – 0561 – BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS



Aula 1 – FUNDAMENTOS DA ENZIMOLOGIA

Profa. Marta Mitsui Kushida

TÓPICOS A SEREM VISTOS

- | | |
|--|--|
| 1. Introdução | 9. Nomenclatura e Classificação |
| 2. Histórico | 10. Especificidade |
| 3. Campos de aplicação da enzimologia | 11. Como as enzimas funcionam |
| 4. Importância das enzimas | 12. Inibidores e Ativadores |
| 5. Fontes de enzimas | 13. Regulação da atividade enzimática |
| 6. Característica e natureza das enzimas | 14. Expressão da atividade enzimática |
| 7. Tipo de enzimas | 15. Produção de Enzimas (Aspectos gerais). |
| 8. Vantagens e limitações | |

Dica:

Estude:

- 1) capítulo 5 do livro "Biotecnologia Industrial" (Borzani, 2001) – vol.1.
- 2) capítulo 5 de Marzzoco e Torres, 2007
- 3) capítulo 6 do Lehninger, 2006



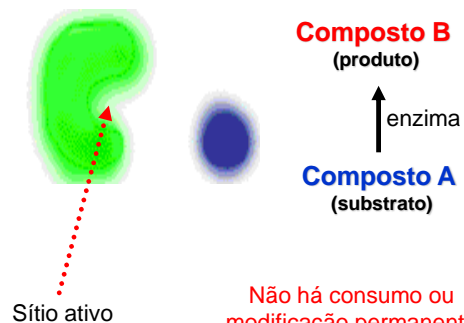
1. INTRODUÇÃO

BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS

- "É a ciência que visa proporcionar alimentos de alta qualidade, com respeito ao meio ambiente e com redução dos custos de produção" (KOBELITZ, 2008).

- A **enzimologia** é a ciência encarregada do estudo das enzimas.

Enzimas - catalizadores biológicos:



Não há consumo ou modificação permanente da enzima!

Perfil das enzimas

- Formadas no interior das células vivas e capazes de agir fora delas.
- Específicas para cada reação
- Muito sensíveis à variações de temperatura e pH
- Extremamente importantes na tecnologia de alimentos = processamento e deterioração**

VÍDEO – SÍNTESE PROTEICA

Definição segundo diversos autores

- São **catalizadores biológicos** que possuem a capacidade de acelerar certas reações bioquímicas específicas.
- São substâncias orgânicas específicas compostas por **polímeros de aminoácidos**, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos
(ROSAS, 2003).
- São biocatalisadores de estrutura **protéica** globular terciária ou quaternária, **termolábeis** e não dialisáveis, que **aceleram** muito a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações
(HARGER, 1982).
- São **polipeptídeos** que catalizam uma reação com certo grau de especificidade
(PARKIN, in NAGODAWHITANA & REED, 1993)

Natureza

- maioria das atividades catalíticas nas células ➔ **enzimas protéicas**.
- Porém...
- RNA ribossômico (uma ribonucleoproteína) = clivagem de ligações internucleotídeas - **RIBOZIMA**
(Cech e Altman, Cell 26: 487-496, 1981)

Velocidade de atuação das enzimas

- Uma reação catalisada por uma enzima ocorre **muuuuuuito** mais rápido



Como aumentar a velocidade das reações?????

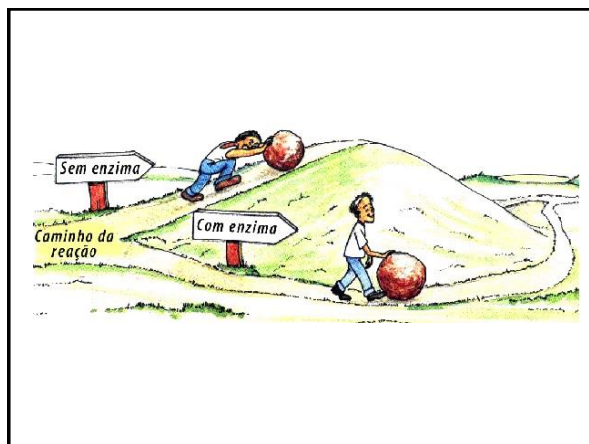
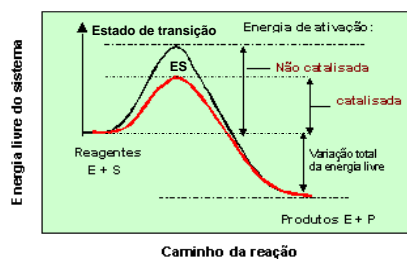
↑ [] ;
↑ choques
↓ E. ativação

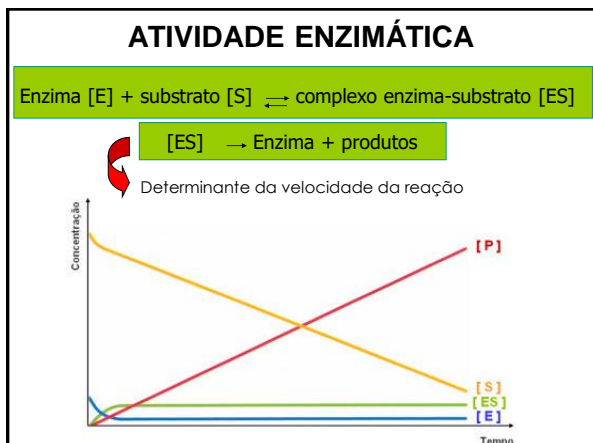
Reações químicas

REAÇÃO QUÍMICA

TERMODINÂMICA
CINÉTICA

TERMODINÂMICAMENTE VIÁVEL:
Conteúdo energético dos Produtos < reagentes!
Pode ter velocidade ~ zero





Enzima	Velocidade na ausência de enzima Reações/seg	Velocidade da reação catalisada Reações/seg	Poder catalítico
Anidrase carbônica $H_2O_2 \rightleftharpoons H_2O + \frac{1}{2} O_2$	1.3×10^{-1}	1.0×10^6	7.7×10^6
Triosefosfato isomerase	4.3×10^{-6}	4.300	1.0×10^9
Carboxipeptidase A	3.0×10^{-9}	578	1.9×10^{11}
AMP nucleosidase	1.0×10^{-11}	60	6.0×10^{12}
Nuclease de estafilococos	1.7×10^{-13}	95	5.6×10^{14}

Aumento na velocidade produzido por enzimas

Ciclofilina	10^5
Anidrase carbônica	10^7
Triose fosfato isomerase	10^9
Carboxipeptidase A	10^{11}
Fosfoglicomutase	10^{12}
Succinil-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidina monofosfato descarboxilase	10^{17}

2. HISTÓRICO

Origem das enzimas

- Há muito tempo atrás...

Documentos datados de **800 anos AC**

Panificação, fabricação de cerveja, produção de álcool e de queijos empregam enzimas conhecidas desde tempos pré-históricos

Século XIX

1833

Isolamento de amilase a partir da germinação da cevada por Payen e Persoz

Anselme Payen
(1795 – 1871)

Jöns Jacob Berzelius
(1779 – 1848)

1835

Berzelius demonstrou que o amido poderia ser degradado de modo mais eficiente com extrato de malte ("pacote" de enzimas) do que com ácido sulfúrico.


•Surgimento do termo "**catálise**"

Louis Pasteur (1822 – 1895)

Década de 1850

Concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pelo levedo era catalizado por "**fermentos**" que acreditava ser inseparáveis das células vivas.

Século XIX



1867

Enzima

Enzym


Dentro das leveduras

Wilhelm Kühne (1837 – 1900)
Fisiologista alemão

EN – em/dentro
ZYMÇ – levedura

Século XIX

1894

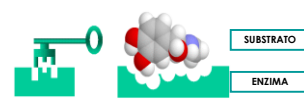


Emil Fischer (1852 – 1919)

Teoria "chave-fechadura"

- baseada nas propriedades das enzimas glicolíticas.

Realizou os primeiros estudos sistemáticos da especificidade enzimática.




SUBSTRATO

ENZIMA

TEORIA ESTÁ CORRETA?

Século XIX



1897

Extraiu com sucesso o lèveo o conjunto de enzimas que cataliza a fermentação do açúcar em álcool, na forma solúvel ativa

Eduard Buchner (1860 – 1917)

- Demonstrou junto com seu irmão que extratos de células de levedura poderiam degradar a glicose em etanol e dióxido de carbono.
- "zymase" fermento livre de células

Início das tentativas de isolamento de enzimas diferentes e estudos de suas propriedades catalíticas.

Século XX

Victor Henri


1903

Enzima combina com seu substrato para formar um complexo denominado enzima-substrato


$E + S \rightleftharpoons ES$

- Etapa essencial na catálise enzimática

Século XX



Leonor Michaelis (1875 – 1949)



Maud Menten (1879 – 1968)


1913

Expressão matemática da teoria geral da ação enzimática

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_p} E + P$$

Etapa rápida Etapa lenta

Século XX



J. B. S. Haldane (1892-1964)

1925

Desenvolvem a expressão de Michaelis e Mentem.

ESTADO ESTACIONÁRIO


$$E + S \rightleftharpoons ES \quad v_1 = d[ES]/dt = k_1[E][S] - k_{-1}[ES]$$

$$ES \rightarrow E + P \quad v_2 = d[ES]/dt = -k_2[ES]$$

Esquema de Briggs e Haldane


1926

Século XX


James Batcheller Sumner
(1887 - 1955)

- Cristalizou a urease (extrato de soja).
- Cristais de urease → formados por proteínas.
- Postulado → todas as enzimas = proteínas.


1930


John H. Northrop
(1891 - 1987)

- Cristalização da *pepsina* e a *tripsina* (suco duodenal).
- Também eram proteínas.
- Passou-se a aceitar a natureza protéica das enzimas.

1958

Século XX


Daniel Koshland

- **Hipótese do ajuste induzido** (Induced-fit hypothesis)
 - Ligação do substrato leva a mudança conformacional na enzima (otimizam as interações com os resíduos do sítio ativo)
 - = alinhamento favorável dos grupos reativos no complexo ES.

E AGORA???????

A partir de 1960

- descrição das estruturas enzimáticas em termos químicos.
- dedução das sequências de aminoácidos da *ribonuclease*.

Leiam:
VERLI, H.; BARREIRO, E. J. um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova*, V. 28, No. 1, 95-102, 2005

MODELO CHAVE-FECHADURA
Teoria de Emil Fischer – NÃO É MAIS UTILIZADA!

Hipótese do ajuste induzido (Induced-fit hypothesis) – teoria de *Daniel Koshland*
ESTA É A TEORIA ACEITA HOJE!

Modelo Chave-Fechadura

(A) **Formas rígidas**

Enzyme

Não explica a interação das enzimas com inibidores e análogos dos substratos.

Modelo de encaixe induzido

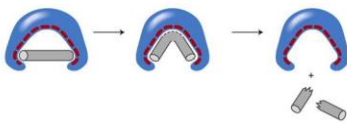
(B) state conformation

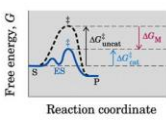
E e S se deformam, para otimizar o encaixe

Esse é o modelo aceito hoje em dia.

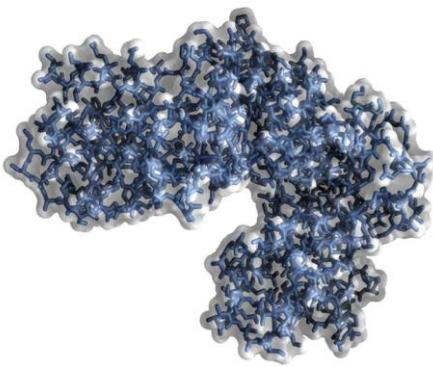
Modelo do encaixe induzido

(c) Enzyme complementary to transition state



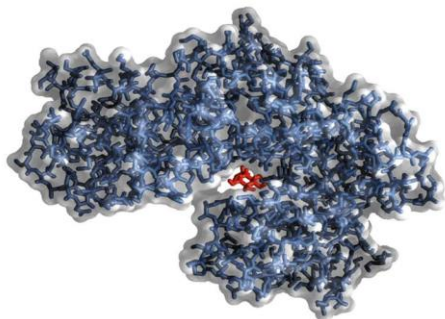


Modelo do encaixe induzido



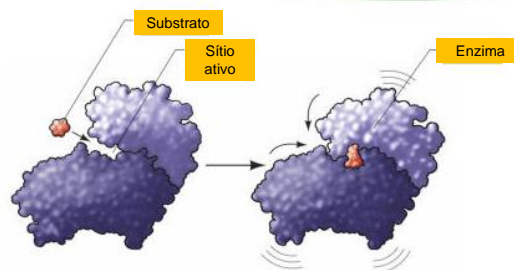
(a)

Encaixe induzido: enzima e o substrato sofrem conformação para o encaixe. O substrato é distorcido para conformação exata do estado de transição.



(b)

MODELO DO ENCAIXE INDUZIDO



Marzzoco e Torres, 2007

Final do Século XX

1988

- Aplicação de enzimas produzidas a partir de organismo geneticamente modificado.

Ex.: lipase para detergentes

- Intensificação de pesquisas com enzimas que catalisam as reações do metabolismo celular
- Purificação de milhares de enzimas
- Elucidação da estrutura molecular e mecanismo de ação
- Maior compreensão sobre o funcionamento das enzimas

HOJE

- Mais de 10 mil enzimas diferentes já foram identificadas!

- Aproximadamente 3.000 enzimas são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica.
 - Há cerca de 25.000 enzimas na natureza.
 - 90% das enzimas ainda nem mesmo foram descobertas!
- (FABER, 2000)

3. Campos de aplicação da enzimologia

Áreas de aplicação da enzimologia

- Físico-química
- Microbiologia
- Genética
- Botânica
- Zoologia
- Toxicologia
- Medicina
- Engenharia química
- Biotecnologia
- **Bioquímica**
- **Ciência e tecnologia de alimentos**
- **Engenharia de Alimentos**



4. Importância das Enzimas

IMPORTÂNCIA

- A vida no planeta não seria possível!
 - Reações químicas como a hidrólise da celulose, realizadas em condições drásticas (ex.: 72% de ácido sulfúrico) acontecem com pH neutro na presença de enzimas (celulases), sem necessidade de outros produtos químicos.
- Nos últimos anos seu uso em grande quantidade nas indústrias.
- Vantagens em relação aos catalizadores não biológicos (sintéticos).
- Muitos processos industriais podem ser realizados sob condições mais brandas e economizando produtos químicos.

IMPORTÂNCIA

- Conforme PANDEY *et al* (2005), o mercado mundial de enzimas industriais está estimado ao redor de 1,7 a 2,0 bilhões de dólares para 2005
- Cerca de 62% das enzimas produzidas são usadas pela indústria de alimentos, 33% em detergentes e 5% nas indústrias têxtil e de couro.
- Das enzimas produzidas, 80% são hidrolíticas, utilizadas para a despolimerização de produtos naturais.
- Destas,
 - 60% são proteases,
 - 30% carboidrases,
 - 3% lipases e
 - o restante enzimas especializadas tais como as pectinases.
- Na indústria de alimentos o maior uso está:
 - no processamento do amido
 - seguido pela produção de queijos,
 - processamento de sucos de frutas e vegetais,
 - clarificação de sucos e vinhos,
 - panificação e
 - cervejaria.

5. FONTES DE ENZIMAS

- três grandes fontes (HARGER,1982)

ORIGEM ANIMAL

PRINCIPAIS ENZIMAS DE ORIGEM ANIMAL

ENZIMA	FONTE
Catalase	Fígado e sangue de boi e porco; fungos e bactérias. Decomposição da água oxigenada (sabor e cor do alimento);
Tripsina Quimitripsina	pâncreas (atividade amilolítica, proteolítica e lipolítica)
Renina	Estômago de bezerro
Pepsina	Mucosa estômago de porcos (Tratamento com ácido para ativação do pepsinogênio a pepsina)



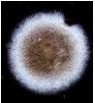
OBTENÇÃO DE ENZIMAS DE ORIGEM ANIMAL

- Trituração por moinhos ou homogeneizadores
- Extração com água ou solução tampão
- Filtração ou centrifugação para remoção do resíduo insolúvel

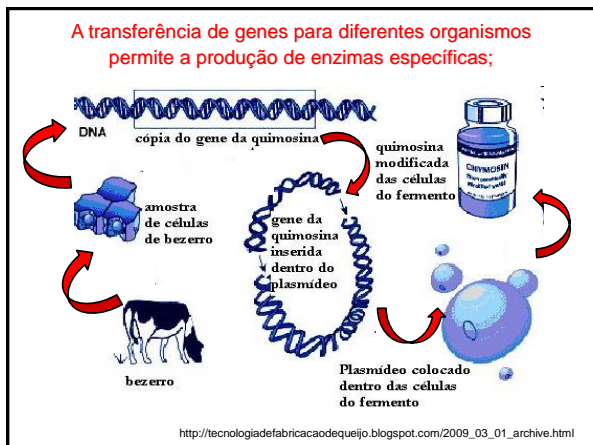
ORIGEM VEGETAL

ENZIMA	FONTE	APLICAÇÕES	OBSERVAÇÕES
Papaina (proteolítica) 	látex do fruto verde do mamão (<i>Carica papaya</i>), além de suas folhas e talos	clarificação da cerveja, amaciamento de carnes, auxiliar da digestão	inativada por oxidação (necessidade de agentes redutores como sulfeto de hidrogênio, cianeto de hidrogênio, etc.)
Bromelina (proteolítica) 	talo e fruto do abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	amaciamento de carnes e clarificação da cerveja	mistura de 4 proteases com ações distintas, dependentes do pH
Ficina (proteolítica) 	látex de certas espécies de <i>Ficus</i>	amaciamento de carnes e clarificação da cerveja	Agente anti-helmíntico (digere os ascarídeos) Economicamente inviável (extração de grande quantidade)
Enzimas do malte	Cevada 	Fabricação cerveja.	amilases , diastases, proteases, lipases, oxirredutases e hemicelulases

ORIGEM MICROBIANA

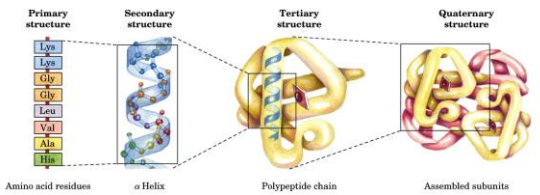
extracelulares					
	<table border="1"> <tr> <th>PROTEASE</th> <th>FONTE</th> </tr> <tr> <td>bacteriana</td> <td><i>Bacillus spp</i></td> </tr> </table>	PROTEASE	FONTE	bacteriana	<i>Bacillus spp</i>
PROTEASE	FONTE				
bacteriana	<i>Bacillus spp</i>				
	<table border="1"> <tr> <th>GLICOSIDASE</th> <th>FONTE</th> </tr> <tr> <td>pectinase</td> <td><i>Aspergillus niger</i></td> </tr> </table>	GLICOSIDASE	FONTE	pectinase	<i>Aspergillus niger</i>
GLICOSIDASE	FONTE				
pectinase	<i>Aspergillus niger</i>				
	<table border="1"> <tr> <th>ENZIMA</th> <th>FONTE</th> </tr> <tr> <td>lipase</td> <td>Bolores</td> </tr> </table>	ENZIMA	FONTE	lipase	Bolores
ENZIMA	FONTE				
lipase	Bolores				

- ### Enzimas microbianas
- Estáveis ao calor;
 - Faixa de pH ótimo mais ampla;
 - Menor custo e tempo de produção;
 - Provêm de microrganismos selecionados;
 - Apresentam maior especificidade.
 - Gêneros principais
 - Bacillus* e *Aspergillus*



6. Características e natureza das enzimas

Funcionalidade das enzimas



Primary structure: Lys, Lys, Gly, Gly, Leu, Val, Ala, His

Secondary structure: α Helix

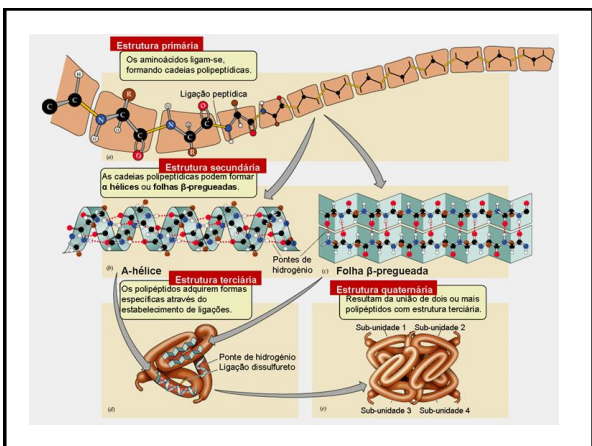
Tertiary structure: Polypeptide chain

Quaternary structure: Assembled subunits

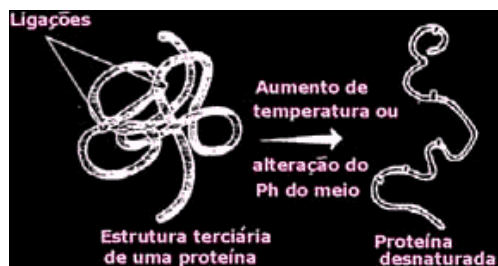
Ligação peptídica

$$\begin{array}{c}
 \text{H} & & \text{H} \\
 | & & | \\
 \text{R} - \text{C} - \text{CO} - \text{NH} - & \text{C} - \text{R}' \\
 | & & | \\
 \text{NH}_2 & & \text{COOH}
 \end{array}$$

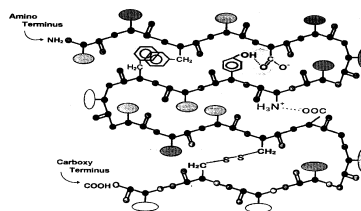
VÍDEO – PROTEÍNAS E LIGAÇÕES PEPTÍDICAS (12:39)



- ❑ Forma é alterada, a proteína torna-se inativa = **desnaturação**
- ❑ altas temperaturas, alterações de pH e outros fatores



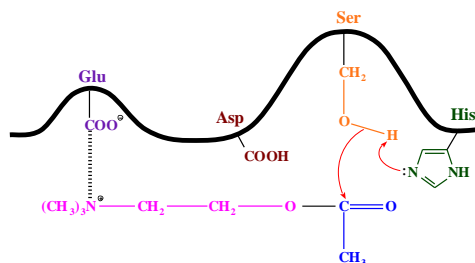
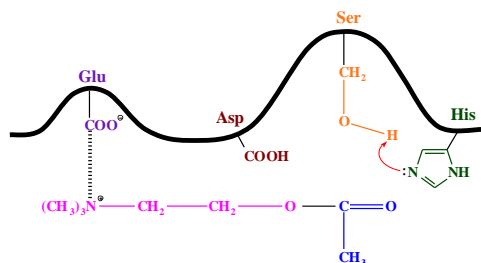
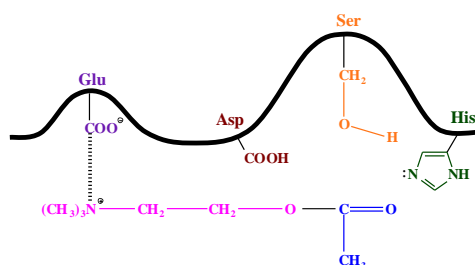
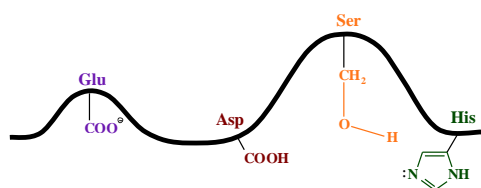
O funcionamento das enzimas...

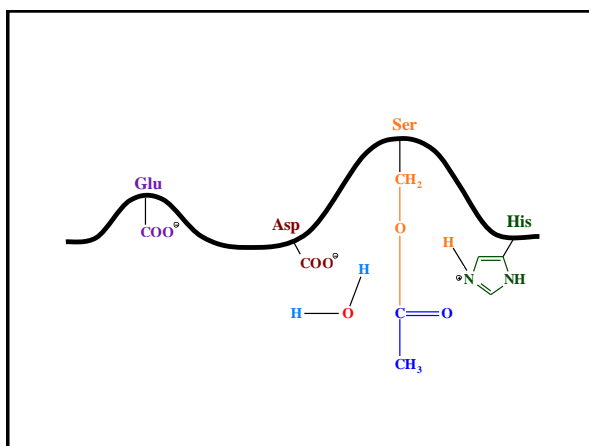
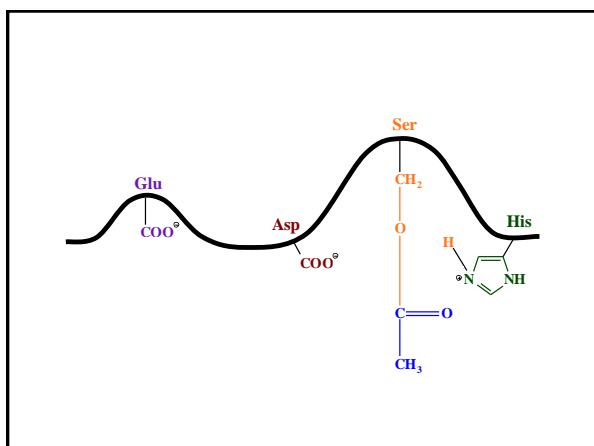
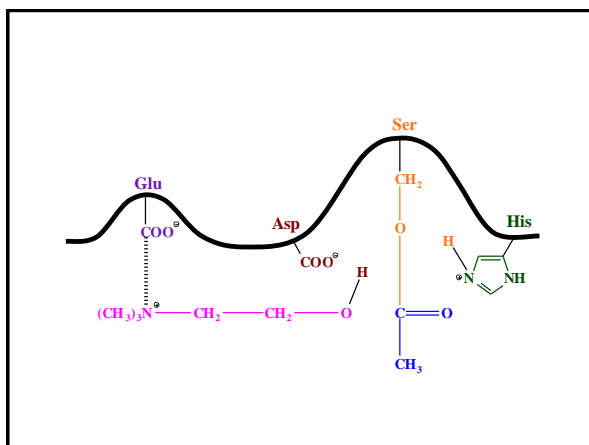
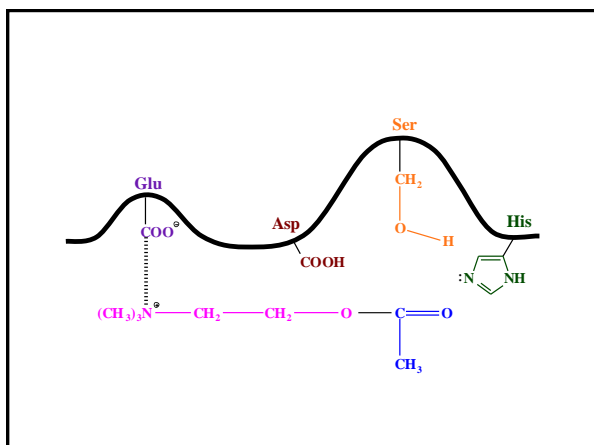
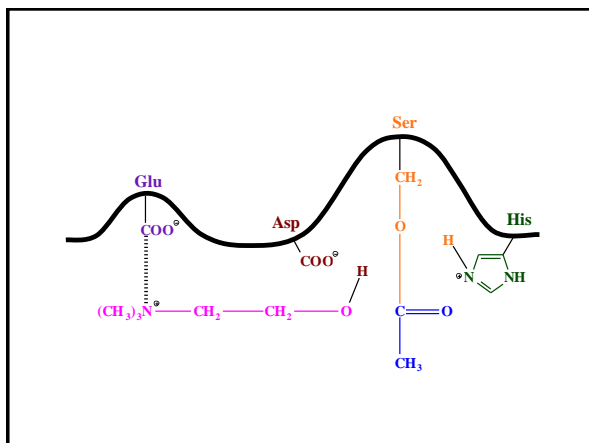
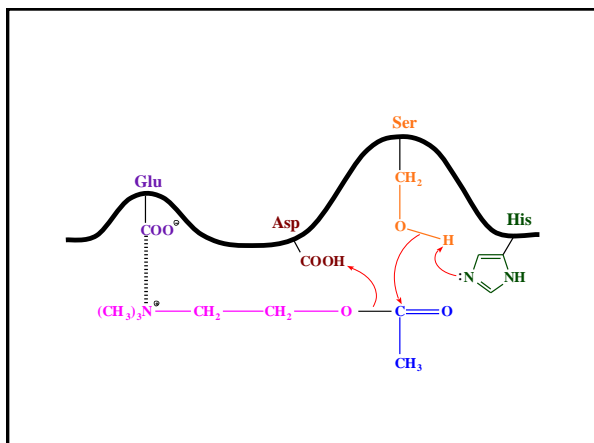


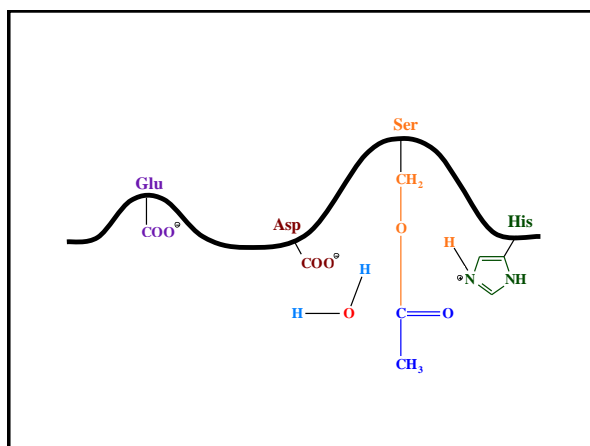
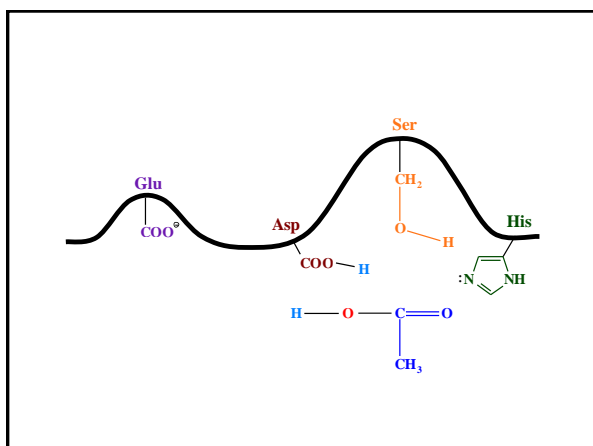
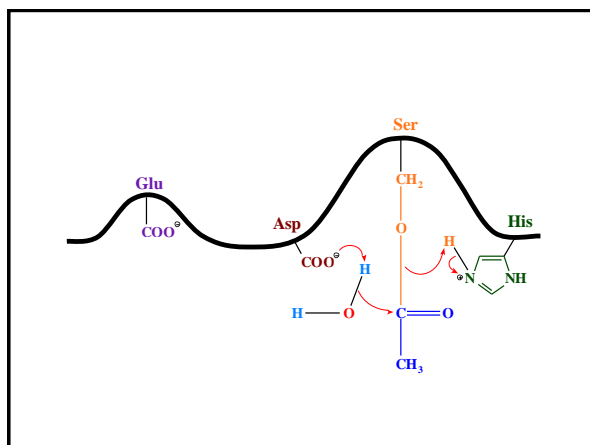
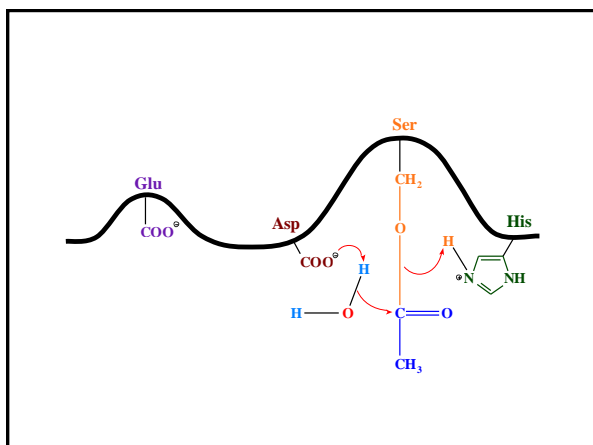
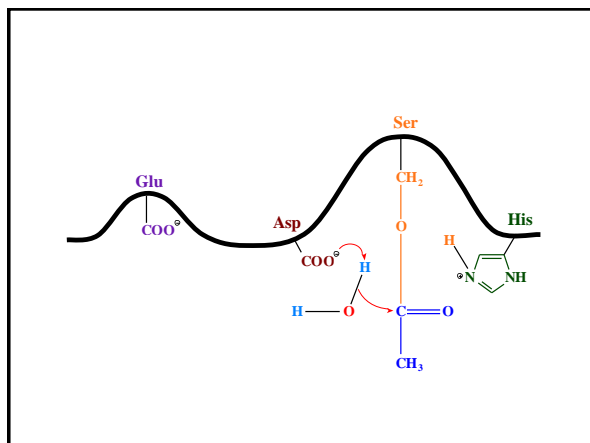
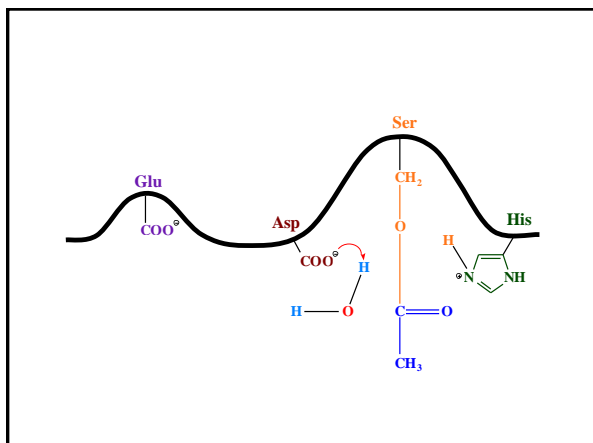
Depende da estabilidade da sua estrutura proteica

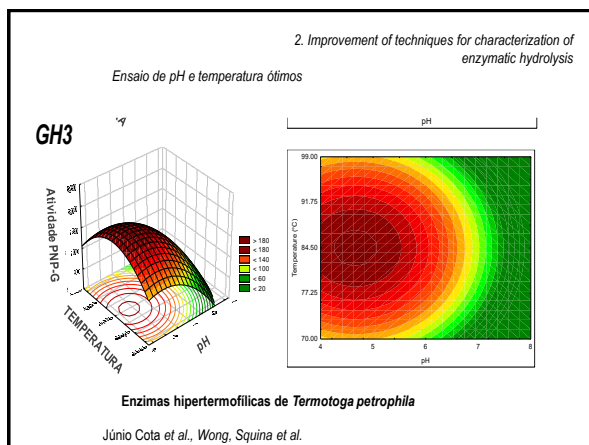
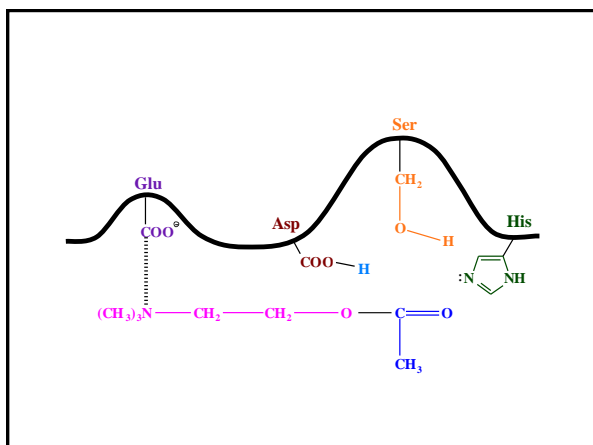
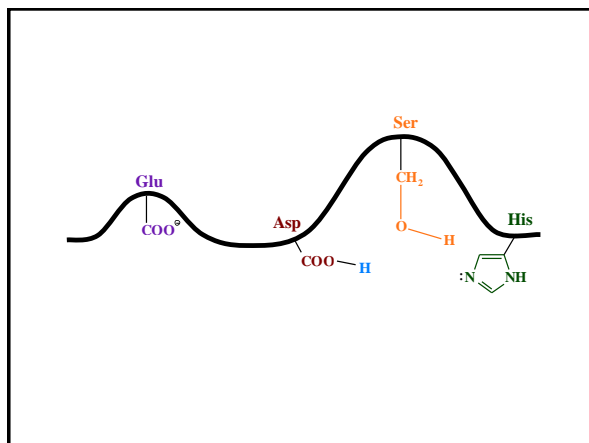
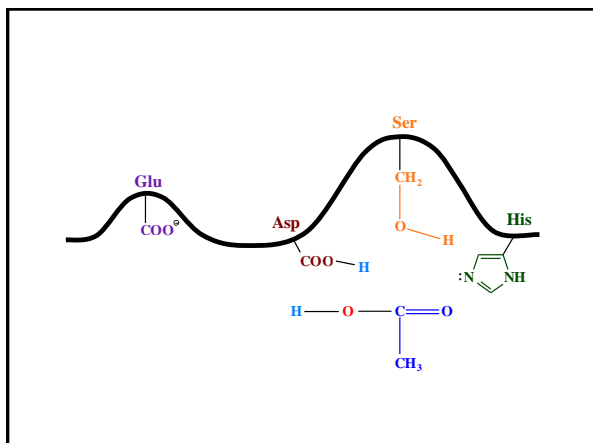
Fig. 1-2. A protein polymer composed of a linear combination of amino acids. Forces holding the protein in proper conformation include hydrophobic interaction (blue), disulfide bonds (green), hydrogen bonds (gray), and electrostatic interaction (red).

Mudanças ambientais que afetem essa estrutura irá alterar a capacidade de transformação das enzimas









7. TIPOS DE ENZIMAS

Enzimas intracelulares

- **ENDOCELULAR/ENDOENZIMAS** =
 - dentro das células.
 - Extração da enzima envolve lise da células.
 - Atuam dentro da célula
 - Sintetizam o material celular
 - Reações catabólicas que suprem as necessidades energéticas das células
 - Permitem rigoroso controle metabólico intracelular
 - São enzimas **regulatórias**, geralmente de alta Massa Molecular

Enzimas extracelulares

- **EXOCELULAR/EXOENZIMA =**
 - produzidas e excretadas diretamente no meio de cultivo (extracelular).
 - Excretadas através da parede celular
 - Executam alterações necessárias à penetração dos nutrientes para o interior das células
 - Geralmente de baixa Massa Molecular e **muitas pontes dissulfeto**, (manutenção da estrutura protéica em resposta ao ambiente)

8. Vantagens e limitações da utilização de enzimas

Enzimas X Catalizadores Químicos

ENZIMAS – VANTAGENS/DESVANTAGENS

Característica	Enzimas	Catal. Químicos
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 (10^{14})	Baixa ($10^2 - 10^3$)

ENZIMAS - LIMITAÇÕES

- Baixa estabilidade em condições drásticas,
 - Ex.: pH extremo e temperaturas elevadas.
- Isolamento de enzimas de microrganismos que vivem em condições extremas e ajustando alguns processos industriais a condições mais brandas.

9. NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO

NOMENCLATURA DAS ENZIMAS:

- **Nome Recomendado:**
 - Mais curto.
 - Dia a dia de quem trabalha com enzimas;
 - Sufixo "ase" para caracterizar a enzima.
 - Ex: Urease, Hexoquinase, Peptidase, etc.
- **Nome Sistemático:**
 - Mais complexo.
 - Informações precisas sobre a função metabólica da enzima.
 - Ex: ATP-Glicose-Fosfo-Transferase
- **Nome Usual:**
 - Consagrados pelo uso
 - Ex: Tripsina, Pepsina, Pتيالina.

PADRONIZAÇÃO NOMENCLATURA e CLASSIFICAÇÃO**International Union of Biochemistry (I.U.B)**

- Nomes das enzimas indicam o substrato sobre o qual a enzima atua e o tipo de reação catalisada.
- Cada enzima recebe uma numeração sistemática contendo 4 números denominado E.C. (Enzyme Commission number):

ATPase (Adenosinatrifosfatase): EC 3.6.1.3
 - é uma hidrolase.....3
 - atua num anidrido.....3.6
 - o anidrido contém fosfato.....3.6.1
 - esse anidrido é ATP.....3.6.1.3

1º dígito	Representa a classe da enzima
2º dígito	Subclasse identifica mais especificamente a enzima. representa a primeira subclasse e refere-se ao grupo ou ligação que sofre a transformação
3º dígito	Tipo de atividade representa a segunda subclasse e identifica um composto aceptor, uma característica secundária do grupo em transformação, um tipo de reação ou uma característica posicional
4º dígito	Número da enzima dentro da sua subclasse representa a terceira subclasse, servindo para diferenciar enzimas que possuem os três primeiros números idênticos.

Classificação das enzimas

Nome trivial	α -amilase
Nome sistemático	α -1,4-glucan-4-glucanohidrolase
Número da comissão (EC)	EC 3.2.1.1

EC = Enzyme Commission

International Union of Biochemistry (I.U.B)

- Enzimas = divididas em 6 grandes grupos
 – de acordo com a reação que catalisam,

**TABELA:
Base
sistemática
da
classificação
de enzimas.**

1. Oxido-reduzases (Reações de oxido-redução).	Transferência de elétrons Se uma molécula se reduz, há outra que se oxida.	
2. Transferases (Transferência de grupos funcionais)	*grupos aldeído *grupos acila *grupos glicosil *grupos fosfatos (quinases)	
3. Hidrolases (Reações de hidrólise)	*Transformam polímeros em monômeros. Atuam sobre: *Ligações éster *Ligações glicosídicas *Ligações peptídicas *Ligações C-N	
4. Liases (Adição a ligações duplas)	*Entre C e C *Entre C e O *Entre C e N	
5. Isomerases (Reações de isomerização)		
6. Ligases (Formação de laços covalentes com gasto de ATP)	*Entre C e O *Entre C e S *Entre C e N *Entre C e C	

ENZIMAS

- A relação completa das enzimas com suas classificações pode ser encontrada na página:

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

Óxido-redutases

- Relacionadas com as reações de óxido-redução em sistemas biológicos
respiração e fermentação
- Hidrogenase, oxidase, peroxidase, hidroxilase, oxigenase, catalase, polifenoloxidase



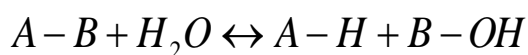
Transferases

- Catalisam a transferência de grupos de um composto para outro
- Glicosiltransferase, aminotransferase



Hidrolases

- Envolvem água na formação de seus produtos
- Catalisam reações entre um substrato e a água
- Ligam a água a certas moléculas



Hidrolases

- Moléculas grandes são quebradas em unidades menores
- Quebra de:
 - ligações peptídicas em proteínas,
 - ligações glicosídicas em carboidratos;
 - ligações éster em lipídios
- Proteases, lipases, amilases, pectinases

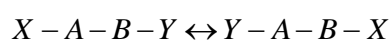
Liases

- Catalisam a adição de grupos a duplas ligações ou a formação de duplas ligações através da remoção de grupos
- Pectato liase, descarboxilase



Isomerases

- Catalisam reações de isomerização
- Transferência de grupos de uma posição para outra na mesma molécula
- Alteram a estrutura de um substrato através do rearranjo de seus átomos
- Glicose isomerase



Ligases

- Catalisam a degradação da molécula de ATP utilizando a energia liberada nesta reação para a síntese de novos compostos unindo duas moléculas
- DNA ligase



10. Especificidade da catálise enzimática

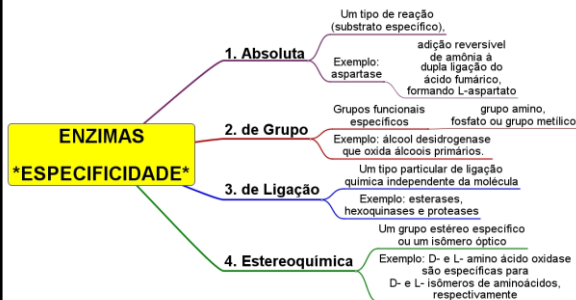
Propriedade → MUITO IMPORTANTE!!

Marcante especificidade pelo substrato!

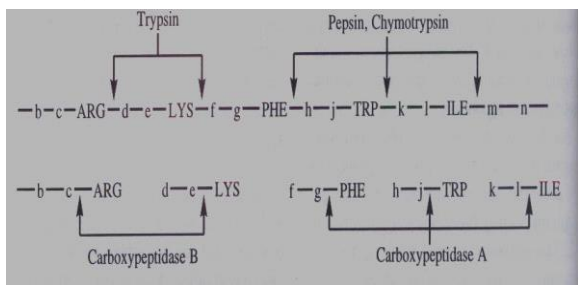
Porque → estrutura do substrato + sítio ativo



TIPOS DE ESPECIFICIDADE

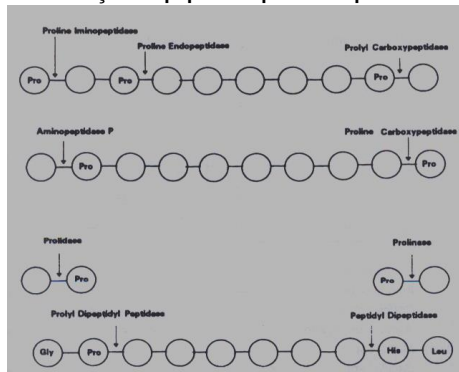


- Cada reação enzimática é altamente específica
- Elementos importantes
 - Forma e o tamanho do sítio ativo da enzima
 - Tipo de substrato



ESPECIFICIDADE ENZIMÁTICA

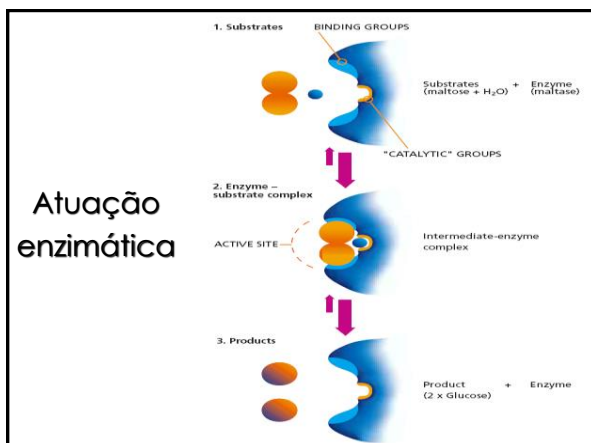
Modo de ação da peptidase prolina-específica



11. Como as enzimas funcionam...

- As enzimas catalisam as reações químicas reduzindo sua energia de ativação

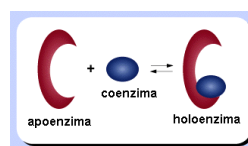
A energia de ativação de uma reação é a quantidade de energia necessária para levar todas as moléculas a um estado de transição no topo da barreira de energia



Constituição química das enzimas

- Proteínas com uma estrutura química especial
- Sítio ativo
- Grupo não protéico (presente algumas vezes)

apoenzima + cofator → HOLOENZIMA



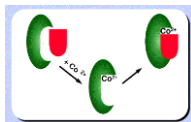
COFADORES

- Algumas enzimas são ativas somente na presença de um cofator

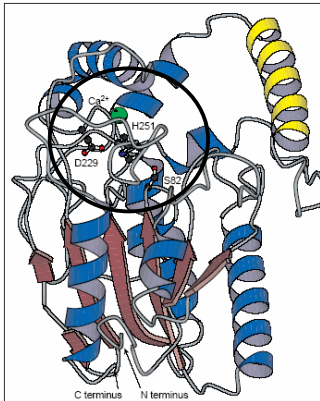
➢ Cofatores inorgânicos um ion metálico (Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Mo²⁺);

➢ Cofatores orgânicos (coenzimas)

- (uma molécula orgânica complexa de caráter não protéico, termoestável, fracamente ligada a enzima;



Estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*



Resíduos do sítio ativo
Ser82, Asp229 e His251.

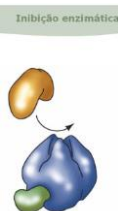
Posição potencial do ion
Ca²⁺ é indicada pela
bola verde

Jaeger and Reetz, TIBTECH
SEPTEMBER 1998 (VOL 16)

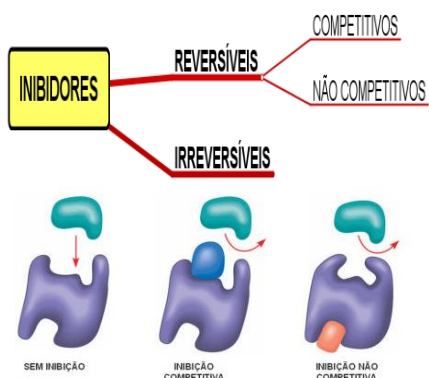
12. Inibidores e ativadores

Inibidores e ativadores

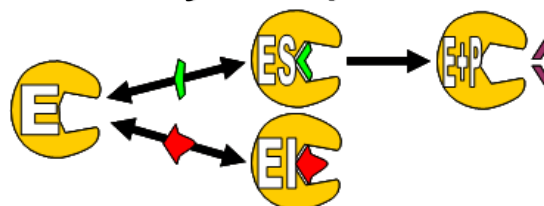
- Inibidor**
 substância que reduz a velocidade de uma reação enzimática
- Ativador**
 Um ativador aumenta essa velocidade, sem incluir os efeitos de pH e/ou temperatura



TIPOS DE INIBIDORES



Inibição competitiva



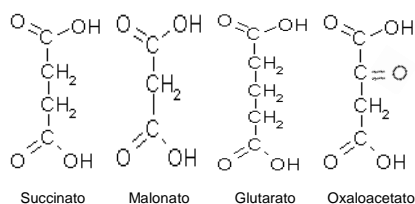
Substrato e substância similar ao substrato: competem pelo sítio catalítico

reação não se processa

É possível reverter ou diminuir o efeito da inibição aumentando a concentração do substrato

EXEMPLO: Estrutura do substrato (succinato) e de 3 inibidores competitivos da succinato desidrogenase

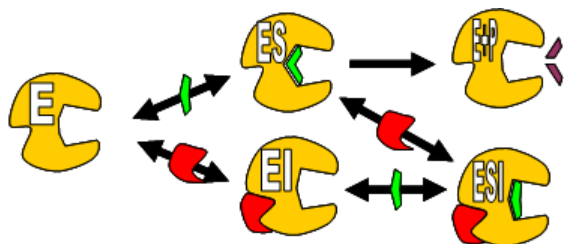
- succinato desidrogenase** é uma flavoproteína ligada à membrana interna mitocondrial que intervém no ciclo de Krebs e na cadeia respiratória



Inibidores não competitivos

- Não apresenta semelhança com o substrato
- Ligam-se a grupos geralmente fora do sítio ativo da enzima
- pode ligar-se tanto a enzima, quanto ao complexo enzima substrato
- Alteram a conformação espacial da enzima impedindo a catálise
- Metais pesados
 - Pb²⁺ e Hg²⁺** ligam-se facilmente a grupos -SH

Inibição não competitiva



Inibidores de proteases

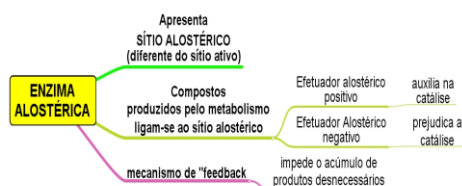
- Encontrados em sementes de soja, batata, clara de ovo
- Polipeptídeos
- Prejudica a digestão de proteínas

14. Regulação da atividade enzimática

Regulação da atividade enzimática

- Pode acontecer por:
 - Regulação alostérica;
 - Modificação covalente

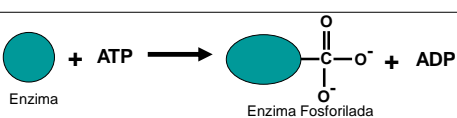
Regulação alostérica



Modificação Covalente

Ligação covalente de um grupo químico à estrutura da enzima

um exemplo:
transferência de um grupo fosfato proveniente do ATP para a enzima.



15. Expressão da atividade enzimática

Expressão da atividade enzimática

- Unidades internacionais (UI) – *Enzyme Commission*

Quantidade de enzima capaz de formar $1 \mu\text{ mol}$ de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, T, [S], etc.), especificadas para cada caso.

- Atividade da enzima
U/mL

Importante!

- Atividade específica
Número de Unidades de Enzima por mg de proteína presente na preparação da solução enzimática
U/mg

Como expressar a atividade de uma enzima?

- A dosagem de enzimas é feita através da medida de sua atividade
- A atividade é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa
- A quantificação de uma determinada enzima presente em um meio é complexa.
 - Parte da enzima pode estar inativa, ou parcialmente ativa;
 - Possibilidade da existência de outras enzimas no mesmo meio.
- Desnaturações parciais podem levar duas soluções de mesma concentração enzimática a ter atividades muito diferentes

Dosagem da atividade enzimática

- Incubação da solução enzimática com concentrações altas de substratos

Garante a velocidade máxima e impede que pequenas variações na concentração do substrato afetem as medidas

Exemplo: Determinação da atividade de celulase

- Celulases agem na hidrólise de celulose.
 - Atividade determinada pela liberação de açúcares redutores.
 - 1 unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que produz $1 \mu\text{mol}$ de açúcar redutor por minuto na condições dadas (pH, T, [S]).

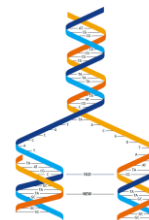
16. Produção de Enzimas (Aspectos gerais).

Síntese bioquímica das enzimas

- As enzimas são produzidas dentro das células pelos ribossomas que conectam aminoácidos em suas cadeias

Síntese bioquímica

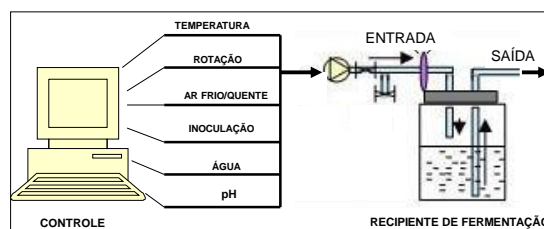
- A estrutura e propriedades das enzimas produzidas por uma determinada célula são determinadas por instruções genéticas codificadas no DNA, encontrado nos cromossomas da célula



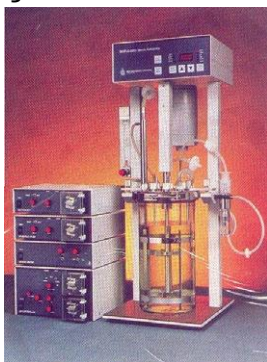
Produção industrial de enzimas

- Fermentação em batelada e contínua
- Microrganismos selecionados
- Liberação de enzimas durante a degradação de nutrientes
- Controle rigoroso de temperatura, pH, taxa de alimentação, consumo de oxigênio e formação de dióxido de carbono para otimizar o processo fermentativo

Esquema de instrumentação para aquisição de dados e controle dos parâmetros envolvidos na fermentação



CONDIÇÕES LABORATORIAIS



CONDIÇÕES INDUSTRIAIS



REFERÊNCIAS

- 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.
- TORRES, B. B. Elementos de Enzimologia. In: WALTER, Borzani et al. **Biotecnologia Industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 151-176. (Volume 1). Cap.5.
- KOBLITZ, MARIA GABRIELA BELLO (coord.). **Bioquímica de Alimentos – Teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Koogan. 2008.
- BERTUCCI NETO, VICTOR; COURI, SÔNIA. Instrumentação para automação de processo de fermentação semi-sólida. **Embrapa**, n.7, p.1-4, dez, 1996.
- 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.