



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

ZEA – 0561 – BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS



1S2019

Aula 05 – HIDROLASES

LIPASES

Profa. Marta Mitsui Kushida

Dica

Capítulo 8 Livro "Enzymes in food processing" de NAGODAWITHANA e REED

e
Capítulo 4 do livro "BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS" de M. G. Koblitz das referências!!!!



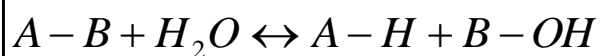
Classes de enzimas

- 1 – Óxido redutases
- 2 – Transferases
- 3 – Hidrolases
- 4 – Liases
- 5 – Isomerases
- 6 – Ligases

INTRODUÇÃO

HIDROLASES

- Grupo que inclui todas as enzimas que envolvem água para a formação de seus produtos



HIDROLASES

- Catalisam reações entre um substrato e a água
- Moléculas grandes são quebradas em unidades menores
- Catalisam a quebra de
 - ligações peptídicas em proteínas,
 - ligações glicosídicas em carboidratos,
 - ligações éster em lipídios

HIDROLASES

1. Lipases

- | | | |
|------------------|---|---------------|
| 2. Proteases | } | 1. Amilases |
| | | 2. Pectinases |
| 3. Carbohidrases | | 3. Celulases |
| | | 4. Lactases |
| | | 5. Invertases |

1. LIPASES

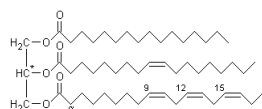
EC 3.1.1.3

DEFINIÇÃO

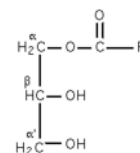
- LIPASES –
– EC 3.1.1.3. – Triacilglicerol éster hidrolases
- Relacionadas com metabolismo e degradação de gorduras.
- Catalisam rapidamente a hidrólise de ligações ésteres de cadeias longas de ácidos alifáticos, com formação de glicerol e ácidos graxos na interface óleo/água.

SUBSTRATO

- LIPASES hidrolisam preferencialmente tri e diglicerídeos, sendo os monoglicerídeos hidrolisados mais lentamente



TRIGLICERÍDEO

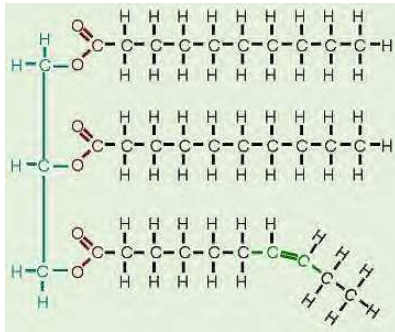


MONOGLICERÍDEO

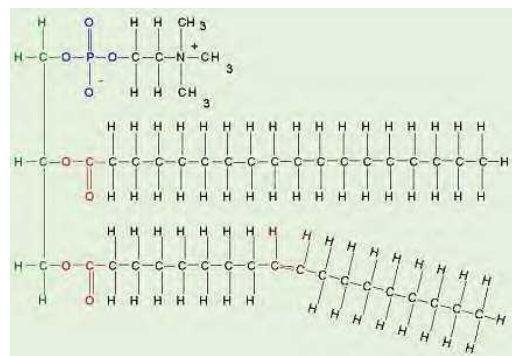
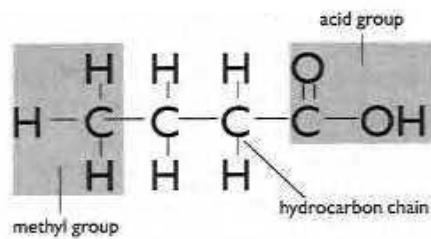
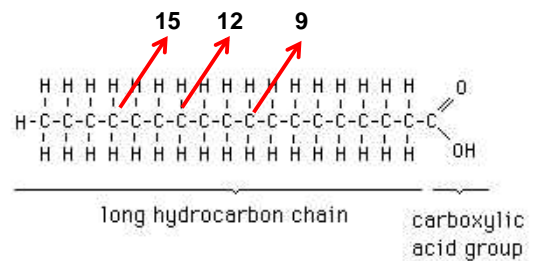
LIPÍDEOS

DEFINIÇÃO

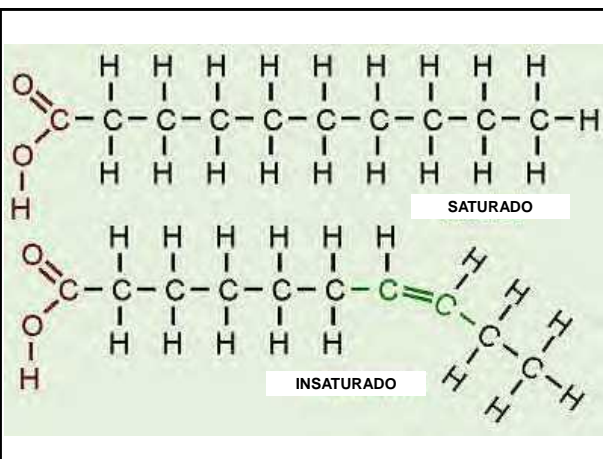
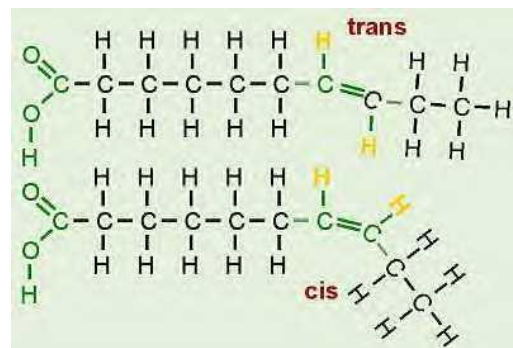
- Compostos encontrados nos organismos vivos, geralmente insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos.
- Podem ser extraídos de células animais e vegetais com solventes orgânicos de baixa polaridade (éter, benzeno, clorofórmio).

ESTRUTURA DE UM TRIGLICERÍDEO

TRIACILGLICEROL

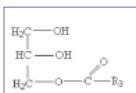
FOSFOLIPÍDEO**ESTRUTURA DE UM ÁCIDO GRAXO (ÁCIDO CARBOXÍLICO)****CARACTERÍSTICA DE UM ÁCIDO GRAXO**

Ácido esteárico

AC. OLEICO - 18:1 Δ⁹AC. LINOLEICO - 18:2 Δ^{9, 12}AC. LINOLÊNICO - 18:2 Δ^{9, 12, 15}**ISOMERIA:
ESTRUTURA CIS E TRANS**

MONO e DIGLICERÍDEOS

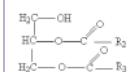
1 – MONOGLICERÍDEO →



2 – MONOGLICERÍDEO →



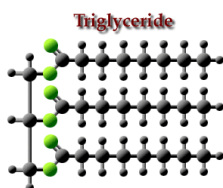
1,2 – DIGLICERÍDEO →



1,3 - DIGLICERÍDEO →

**A ENZIMA****ESTERASES**

- Envolvidas na hidrólise de ésteres
- Formação de ácido e álcool
- Incluem várias **lipases**

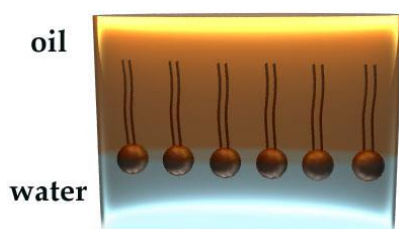
**LIPASES**

- Presentes no alimento
- Produzidas por microrganismos e plantas
- Presentes em animais, especialmente no pâncreas
- Atividade enzimática altamente dependente do conteúdo de água do alimento

IMPORTANTE = INTERFACE ÓLEO/ÁGUA

LIPASES

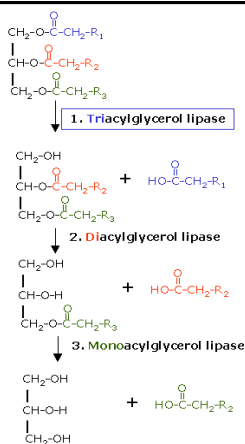
- Atuam na interface água-lipídio das emulsões



Watch a Novozymes lipase
attack greasy stains



REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASE



Nomenclatura

- Nomes comuns:
 - Lipase
 - Triacilglicerol lipase
- Nome sistemático:
 - Triacilglicerol acilhidrolase
- EC 3.1.1.3

Outras enzimas lipolíticas

- Fosfolipase A1 (EC 3.1.1.32)
- Fosfolipase A2 (EC 3.1.1.4.)
- Fosfolipase C (EC 3.1.4.3)
- Fosfolipase D (EC 3.1.4.4)

LIPASES

- Qualquer condição que resulte no aumento da área superficial da interface lipídio-água aumentará a atividade da enzima:

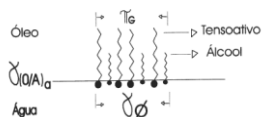
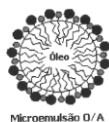
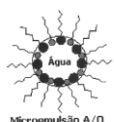
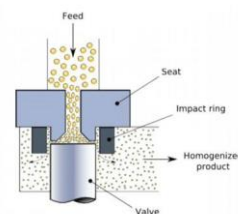


Figura 3. Representação do gradiente da tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa nas microemulsões

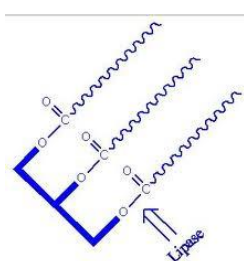
Figura 1. Estrutura das microemulsões

A atividade da lipase é muito maior em leite homogeneizado (não pasteurizado) comparado ao produto não homogeneizado



ATIVIDADE

- Pode ser medida por determinação direta ou indireta do desaparecimento do substrato ou da produção dos compostos finais como os ácidos graxos livres.



DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE

1. Titulometria = neutralização de FFA por titulação com NaOH;
2. Uso de reagentes cromogênicos = complexação de FFA com reagente - monitorado por espectrofotômetro;
3. Uso de triacilgliceróis radioativos e medida da radioatividade dos FFA liberados;
4. Análise cromatográfica dos FFA liberados;
5. Conversão enzimática dos FFA para produtos que podem ser medidos por espectrofotometria.



CLASSIFICAÇÃO

- Baseado na inibição de sua atividade enzimática por modificações químicas, lipases foram inicialmente classificadas como **serina hidrolases**.

– **Serina presente em seu sítio ativo** tem demonstrado estar diretamente envolvida na catálise e representa o aspecto mais comum das lipases.

ESTRUTURA

- Estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*
- Fitas- β são representadas como flechas (lilás-amarronzado) e α -hélices como rolo (azul e amarelo);
- A hélice amarela pode formar uma "tampa" sobre o sítio ativo.
- Resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251
- Posição potencial do ion Ca^{2+} é indicada pela bola verde

(Jaeger and Reetz, TIBTECH, v. 16, p. 396-403, 1998).

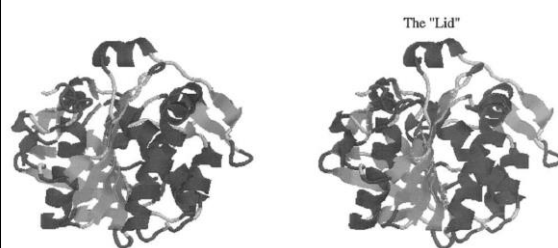
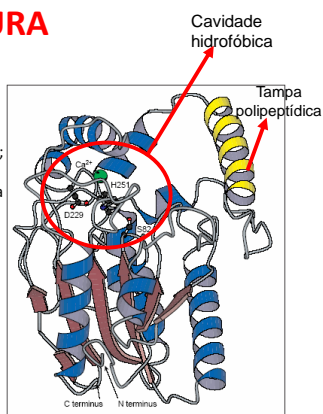


Figure 2 A stereo view of *Candida rugosa* lipase (PDBid: 1trb).

3 ligações dissulfeto = Cys29–Cys268, Cys40–Cys43, Cys235–Cys244, promovem uma estabilização global da proteína.

Sítio Ativo = (Ser144...His257...Asp203) = coberto por uma tampa helicoidal de natureza anfipática.

FONTES

FONTES

- Amplamente distribuídas na natureza:
 - Animais (secreção pancreática),
 - Vegetais (grãos cereais)
 - Microorganismos (bactérias e fungos filamentosos).
- Alguns microrganismos produtores de lipases :
 - *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Penicillium roqueforti* :
 - um pó ou líquido – por fermentação controlada.

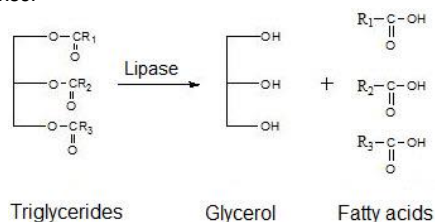
FONTES

- A maioria das lipases de leveduras são:
 - extracelulares,
 - glicoproteínas monoméricas,
 - Massa molecular na faixa entre 33 a 65 kD.

REAÇÃO QUÍMICA

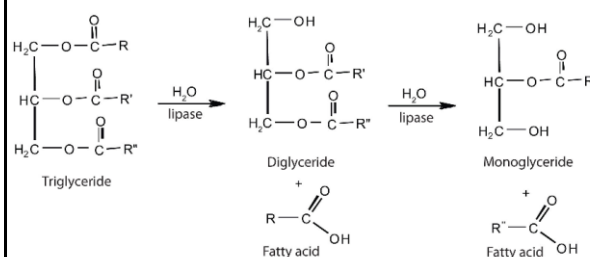
REAÇÃO QUÍMICA

- É geralmente representada pela reação química reversível que consiste na adição de água a um glicérido, produzindo glicerol e 3 moles de ácidos graxos.



Hydrolysis of triglycerides

REAÇÃO QUÍMICA



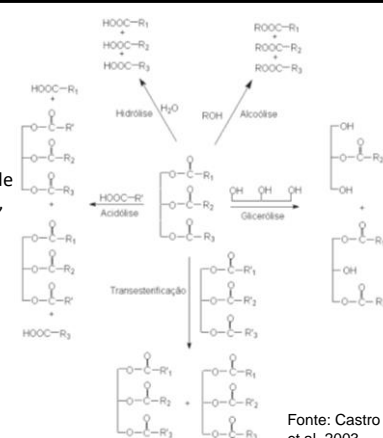
CARACTERÍSTICAS ESPECIAIS

- A hidrólise enzimática de um lipídeo = diferencial:
 - Reação heterogênea =
 - enzima é solúvel em água,
 - substrato não.
 - A interação enzima/substrato precisa ocorrer na **interface** do substrato e água.
- Os glicéridos são os substratos normalmente preferidos, enquanto que a hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos, solúveis em água, apresenta-se extremamente baixa.

Representação esquemática de reações catalisadas por lipases

- Catalisam um grande número de reações, incluindo:

1. hidrólises,
2. Interesterificação,
3. Alcoólise,
4. Acidólise,
5. Esterificação



LIPASES: CONDIÇÕES DE REAÇÃO

PRODUÇÃO

- **LIPASES** = geralmente produzidas por microrganismos em
 - meio contendo uma fonte de carbono lipídico = óleos, ácidos graxos e glicerol ou tween na presença de uma fonte de nitrogênio orgânico.



Foto: Vivian Chies/Embrapa

- Dependendo da fonte = massa molecular variando entre 20 a 75 kDa.

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

• pH

- Podem atuar em uma grande faixa de pH e temperatura, embora as **lipases bacterianas alcalinas** sejam as mais comuns.

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

• TEMPERATURA

- Ampla faixa de temperatura = variando até 70°C:
- Estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente.
- A maioria = **atividade ótima 30 e 40°C**.
- Termoestabilidade = depende da origem.
 - lipases microbianas possuem maior estabilidade térmica.

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Muitas enzimas lipolíticas necessitam de extensos períodos de incubação para a detecção da atividade.
- Sobre a mistura de reação é necessário agitação vigorosa durante a incubação para renovar constantemente a superfície de contato óleo/água.

ESPECIFICIDADE

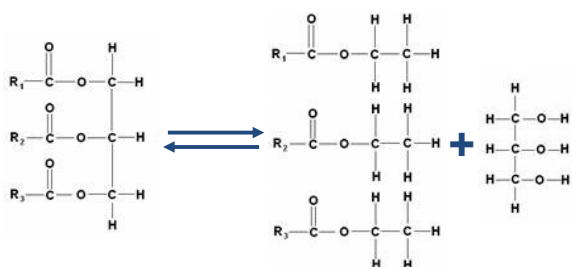
ESPECIFICIDADE

- Tipos:
 - Grupo 1 - Lipases não específicas
 - Grupo 2 - Lipases 1,3 específicas
 - Grupo 3 - Lipases ácido graxo específicas
 - Grupo 4 - Lipase estereoespecífica

CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A ESPECIFICIDADE

- GRUPO 1 = lipases não específicas**
 - não apresenta especificidade marcante;
 - hidrolisa indiferentemente qualquer posição da molécula do TG:
 - libera FFA e glicerol,
 - di- e monoglicerídeos aparecem como intermediários da reação
 - ex: produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas sp.*

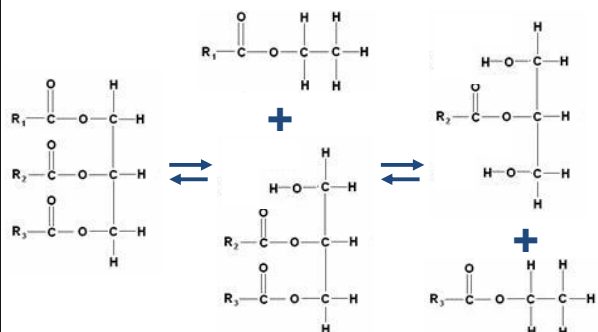
GRUPO 1



CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A ESPECIFICIDADE

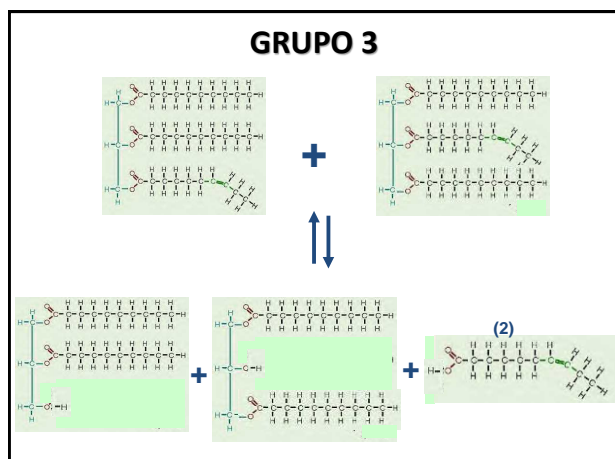
- GRUPO 2 = Lipases 1,3 específicas**
 - Catalisa a liberação de ácidos graxos especificamente da posição 1 e 3 (posições externas ou α-posições) dos glicerídeos.
 - Os produtos são:
 - Ácidos graxos livres - FFA;
 - 1,2 ou (2,3) diglicerídeos;
 - 2 monoglicerídeos.
 - Devido à instabilidade química de 1,2 (2,3) diglicerídeos e especialmente 2 monoglicerídeos, estes sofrem acil migração, obtendo-se 1,3 diglicerídeos e 1 (3) monoglicerídeos.
 - ex: de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*

GRUPO 2



CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A ESPECIFICIDADE

- GRUPO 3 = Lipases ácido graxo específicas**
 - Catalisa a liberação de um tipo particular de ácido graxo da molécula do glicerídeo.
 - Muitas lipases microbianas extracelulares mostram uma baixa especificidade quando incubadas com óleos e gorduras naturais, no entanto lipase de *Geotrichum candidum* apresenta especificidade por ácido oléico, independente de sua posição no triglicerídeo.



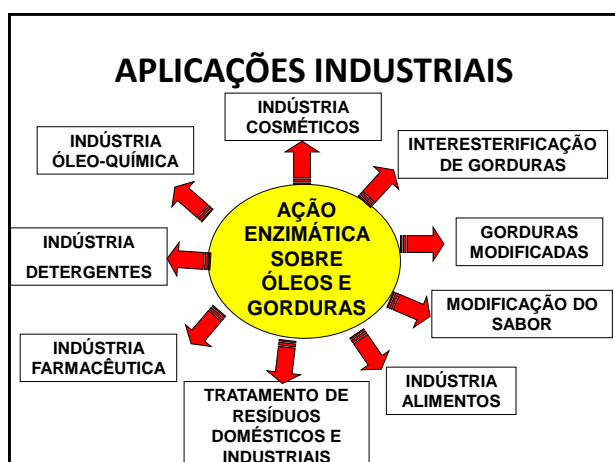
CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A ESPECIFICIDADE

- **GRUPO 4 = Lipase estereoespecífica**
 - habilidade de discriminar enânciômeros de uma mistura racêmica;
 - É decorrente da orientação imposta pelas dimensões e estrutura do sítio ativo.
 - Advém da própria simetria estrutural (quiralidade da enzima), que limita a ação em substratos que não satisfaçam determinadas relações espaciais.
 - Utilização: resolução de racematos, para obtenção de ésteres, alcoóis e ácidos opticamente puros.

Efeitos das formas enantioméricas de alguns fármacos (Koblitz, 2008)

Fármaco	R-enantiômero	S-enantiômero
Carnitina	Eficaz no tratamento de doenças cardíacas de ordem muscular	Tóxico
Ibuprofeno	Inativo	Anti-inflamatório
Penicilamina	Tóxico	Anti-ártrítico
Talidomida	Sedativo	Provoca a morte ou deformação do feto

APLICAÇÕES INDUSTRIAIS



Vantagens para o processo industrial:

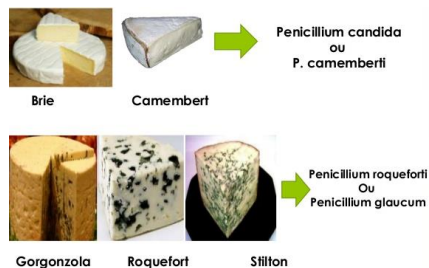
1. **Especificidade**
 - Permite controle dos produtos desejados
 - Pode aumentar o rendimento por redução da quantidade dos tipos de produtos
2. **Condições suaves de reação**
 - Reações químicas necessitam de altas temperaturas ou pressão
 - Operação com menor capital e custo energético
3. **Baixo custo no tratamento de resíduos**
 - As enzimas são naturalmente biodegradáveis
 - Subprodutos indesejáveis são reduzidos ou eliminados.

APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

- Hidrólise de lipídeos;
- Fabricação de queijos e flavour de queijo;
- Modificação de lipídeos;
- Produção de produtos lácteos;
- Desenvolvimento de flavour .

CURA DO QUEIJO

- Sabor característico em queijos, muitas das reações envolvidas são de caráter enzimático.
- Enzimas = naturais, adicionadas ou do crescimento de culturas adicionadas.



INDÚSTRIA

APLICAÇÃO

INDÚSTRIA	APLICAÇÃO
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite Aumento do aroma, da qualidade e da vida de prateleira
Cervejaria	Aumento do aroma e aceleração do processo fermentativo
Molhos e condimentos	Aumento de propriedades funcionais da gema de ovo
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aromas e redução no conteúdo de gorduras
Óleos e gorduras	Transesterificação de óleos – introdução de ácidos graxos de interesse em óleos e gorduras naturais
Química fina	Síntese de ésteres
Detergentes	Hidrólise de gorduras
Farmacêutica	Auxiliares de digestão
Médica	Determinação de lipídeos no sangue (biossensores)
Couros	Remoção de gordura da matéria-prima
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídeos de efluentes.

ESTUDOS RECENTES...

- **DESCOBERTAS:**
 - Capacidade de catalisar reações de síntese;
 - Quando baixa A_w no meio.
 - Relativa estabilidade em diversos solventes orgânicos
 - Reações de transesterificação ou interesterificação
 - Ex.: manteiga de cacau produzida a partir de azeite de Dendê ou óleo de oliva.

NOVAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

- Síntese de biopolímeros;
- Produção de biodiesel;
- Tratamento de efluentes contendo gorduras;
- Síntese enantiômeros puros para medicamentos e nutracêuticos.

Bioaromas

- Síntese de ésteres a partir de ácidos graxos de cadeia curta e média e alcoóis



Na indústria de alimentos como constituintes do **sabor e aroma**

Lipases comerciais e uso na indústria de alimentos

Table 1—Commercial lipases produced by Nova Nordisk¹⁰

Brand name	Mechanism	Application
Lipopan ®	Hydrolysis and oxygen uptake	Baking industry
Lipozyme ®	Interesterification	Oils and fats industry
Novozym ® 27007	Hydrolysis	Pasta/noodles
Palatase	Hydrolysis	Dairy industry
Novozyme ® 871	Emulsification	Pet food industry

REFERÊNCIAS

- GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p.763-781, 2004 .
- CASTRO, HEIZIR F. de; MENDES, ADRIANO A.; SANTOS, JÚLIO C. dos; AGUIAR, CLÁUDIO L. de. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, Jan./Feb., p.146-156, 2004.
- PRAZERES, JANAINA NICANÚZIA dos. **Produção, purificação e caracterização da lipase alcalina de *fusarium oxysporum***. 2006. 134p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- NAGODAWHITANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3 ed. London: Academic Press, 1993. 480p.

Table 4—Lipase applications in the food industry¹⁴

Food industry	Action	Product of application
Dairy foods	Hydrolysis of milk fat, cheese ripening, modification of butter fat.	Development of flavouring agents in milk, cheese and butter
Bakery foods	Flavour improvement	Shelf-life propagation.
Beverages	Improved aroma	Alcoholic beverages, e.g. sake, wine
Food dressings	Quality improvement	Mayonnaise, dressings and whippings
Health foods	Transesterification	Health foods
Meat and fish	Flavour development	Meat and fish product, fat removal
Fats and oils	Transesterification, hydrolysis	Cocoa butter, margarine, fatty acids, glycerol, mono and diglycerides