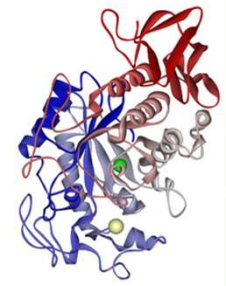


# Carboidrases: características, modo de ação e aplicação em alimentos



## INTRODUÇÃO

- **São enzimas que catalisam a degradação de carboidratos;**
- **Hidrolisam ligações glicosídicas entre oligossacarídeos e polissacarídeos;**
- **As carboidrases também são capazes de catalisar a reação inversa da hidrólise, sintetizando oligossacarídeos em condições de reação especiais (baixa atividade de água e excesso de substrato);**
- **Realizam também reações de transglicosilação.**

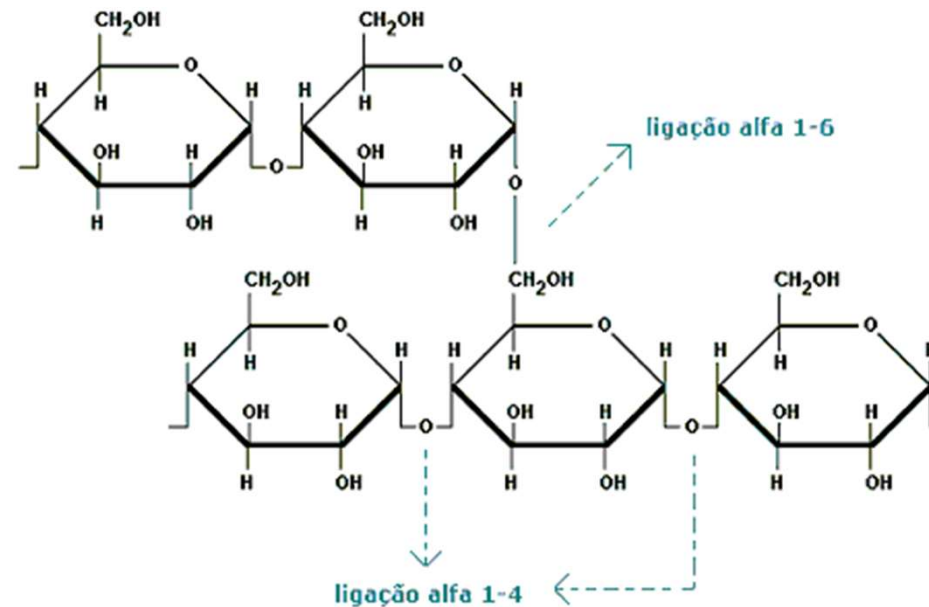
# Características e modo de ação

## ♦ Clivagem da ligação glicosídica

- Em geral são específicas com relação ao **resíduo** que será transferido para água;
- Assim, as glicosidases, galactosidases e frutofuranosidases são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas envolvendo glicoses, galactoses e frutoses, respectivamente;
- Normalmente, a **aglicona** (molécula à qual está ligado o resíduo a ser hidrolisado) não é importante para a eficiência da catálise.

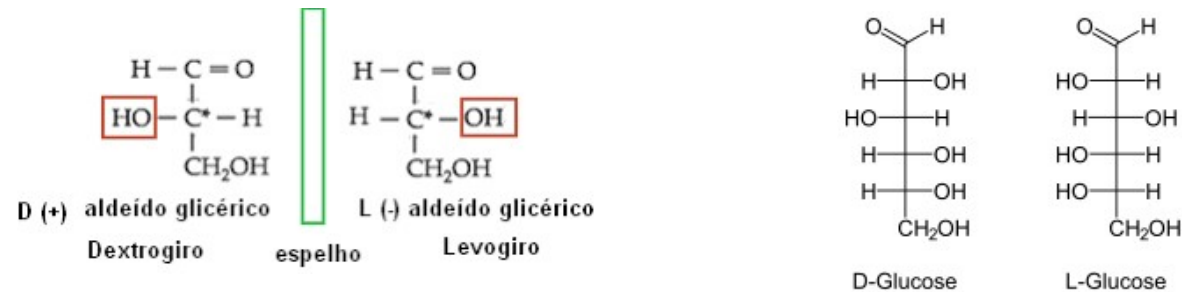
## ◆ Posição da ligação à aglicona

- Quando a aglicona é uma pentose, uma hexose ou polímero destas, a posição da ligação do resíduo é importante para a ação ou não da enzima;
- Por exemplo, enzimas podem ser capazes de hidrolisar ligações  $\alpha$ -1,4 entre duas hexoses mas não entre  $\alpha$ -1,6 entre as mesmas hexoses;

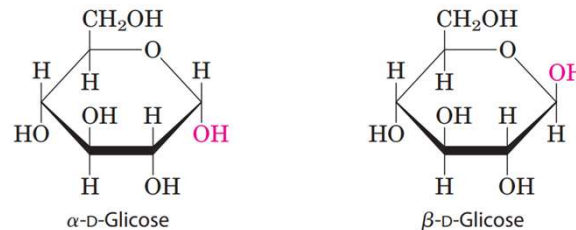


## ◆ Configurações do substrato

- Os carboidratos naturais são constituídos primordialmente de resíduos do tipo **D-monossacarídeos**, sendo exceções a L-ramnose, a L-fucose e a L-arabinose;



- Em consequência, as enzimas envolvidas em sua hidrólise são específicas para cada tipo de configuração;
- O carbono anomérico de monossacarídeos (carbono 1 de aldoses e carbono 2 de cetoses) pode se apresentar nas configurações  $\alpha$  ou  $\beta$ , em que sua hidroxila fica para baixo ou para cima do plano do anel, respectivamente.



## ◆ Tamanho da molécula do substrato

- **Algumas carboidrases apresentam alta atividade sobre substratos poliméricos. À medida que o seu tamanho é reduzido, diminui também a atividade dessas enzimas sobre ele;**
- **O inverso também é verdadeiro, onde certas enzimas hidrolisam apenas substratos de baixo peso molecular.**

## ◆ Padrões endo- e exo- de atividade

- Algumas carboidrases (**exoenzimas**) atacam seus substratos de forma ordenada, podendo ser específicas para a extremidade redutora ou não redutora;
- Outras carboidrases hidrolisam o substrato de forma aleatória, clivando ligações no interior do polímero (**endoenzimas**).

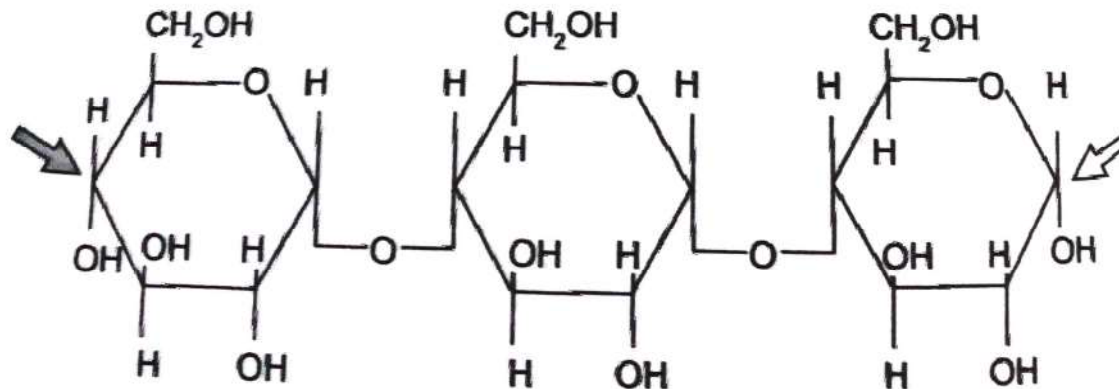


Figura 2.3 Extremidade redutora (seta branca) e não redutora (seta cinza) da maltotriose.

# PRINCIPAIS CARBOIDRASES DE APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

## ♦ Amilases

- São carboidrases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e/ou  $\alpha$ -1,6 presentes no amido, no glicogênio e em sacarídeos diversos;
- Podem ser agrupadas de acordo com diferentes características: modo de ação (endo- ou exo-); retenção da configuração ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), afinidade por ligações tipo  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6 e atividade de transglicosilação ou não;
- Basicamente existem 4 grupos de enzimas que atuam sobre o amido: **exoamilases, endoamilases, enzimas desramificantes e transferases.**



**Tabela 2.1** Enzimas que agem sobre amido e glicogênio (alguns exemplos).

Enzima	Ligação preferencial para hidrólise	Substrato preferencial	Resultado da reação
<b>Endoenzimas</b>			
$\alpha$ -amilase EC 3.2.1.1	$\alpha$ -1,4	Amido	Dextrinas, maltose
Isoamilase EC 3.2.1.68	$\alpha$ -1,6	Amilopectina	Amilose (dextrinas lineares)
Isomaltase EC 3.2.1.10	$\alpha$ -1,6	Dextrinas limite	Maltose, maltotriose
Cidomaltodextrinase EC 3.2.1.54	$\alpha$ -1,4	Ciclodextrinas e dextrinas lineares	Maltose, maltotriose
Pululanase EC 3.2.1.41	$\alpha$ -1,6	Pululana e amido	Maltotrioses e dextrinas lineares
Isopululanase EC 3.2.1.57	$\alpha$ -1,4	Pululana	Isopanose
<b>Exoenzimas</b>			
$\beta$ -amilase EC 3.2.1.2	$\alpha$ -1,4	Amido	$\beta$ -maltoses
Glicoamilase EC 3.2.1.3	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	Amido	$\beta$ -glicoses
$\alpha$ -glicosidase EC 3.2.1.20	$\alpha$ -1,4	Diversos	$\alpha$ -glicoses
Cidomalatodextrina glicana transferase EC 2.4.1.19	$\alpha$ -1,4	Amido	Ciclodextrinas
4- $\alpha$ -glicana transferase EC 2.4.1.25	$\alpha$ -1,4	Amido	Amilopectina, glicogênio
Enzima ramificadora EC 2.4.1.18	$\alpha$ -1,4	Amido e glicogênio	Amilopectina, glicogênio

## ◆ Substratos

- O amido é um polissacarídeo constituído por centenas/milhares de unidades de glicose;
- Possuem normalmente duas frações: amilose (15 a 30%) e amilopectina (70 a 85%);
- Em seu estado nativo, grânulos de amido são resistentes à ação da maior parte das enzimas amilolíticas. No entanto, quando aquecidas, absorvem água, sofrendo gelatinização e tornando suscetíveis à hidrólise enzimática.

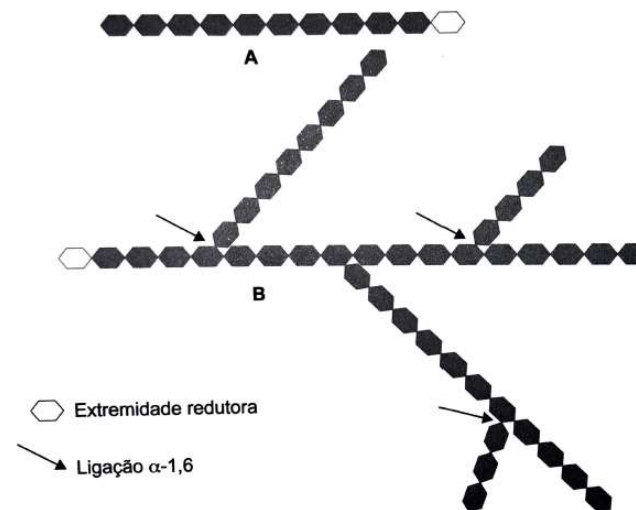


Figura 2.4 Representação esquemática da amilose (A) e da amilopectina (B).

## ♦ $\alpha$ -amilases

- São enzimas largamente distribuídas na natureza;
- As  $\alpha$ -amilases são endocarbohidrases que hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,4 existentes na amilose e na amilopectina de forma aleatória, na porção central das moléculas;
- Inicialmente, a ação dessas enzimas sobre o amido é rápida, gerando uma mistura de oligossacarídeos de diferentes tamanhos, lineares e/ou ramificados, chamada de **dextrina ou maltodextrina**;



- **As  $\alpha$ -amilases microbianas apresentam pH extremamente variável (pH 3,0 a 7,0);**
- **Há amilases microbianas com atividade ótima acima de 70 °C (são as que apresentam maior aplicação na indústria de alimentos);**
- **As  $\alpha$ -amilases mais aplicadas na indústria de alimentos são as obtidas de bactérias do gênero *Bacillus* (*B. licheniformis* e *B. subtilis*) e as produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* (*A. oryzae* e *A. niger*).**

## ♦ $\beta$ -amilases

- São exoenzimas que hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido, **a partir da extremidade não redutora**, liberando unidades de maltose, com inversão da configuração do carbono anomérico de  $\alpha$  para  $\beta$ ;
- A soja é considerada a melhor fonte para obtenção comercial da  $\beta$ -amilases em virtude do baixo teor de  $\alpha$ -amilase. Microrganismos também são produtores dessa carboidrase (*Bacillus polimeria*);
- O resultado da hidrólise de amilose por  $\beta$ -amilases é de cerca de **90% maltose** e **10%** de glicose e maltotriose;

## ♦ Glicoamilase ou amiloglicosidase

- São exoenzimas que removem unidades de glicose a partir de extremidade não redutora das cadeias de amilose e amilopectina;
- São capazes de romper tanto ligações  $\alpha$ -1,4 quanto ligações  $\alpha$ -1,6 e  $\alpha$ -1,3, tendo **mais afinidade pelas ligações  $\alpha$ -1,4**;
- Com isto, as glicoamilases são, teoricamente, capazes de converter completamente o amido em glicose. **Na prática, entretanto, na ausência de  $\alpha$ -amilases, a conversão nunca é completa, motivo pelo qual as duas enzimas são usadas em conjunto**;
- As glicoamilases são produzidas basicamente por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*.

## ◆ Enzimas desramificantes

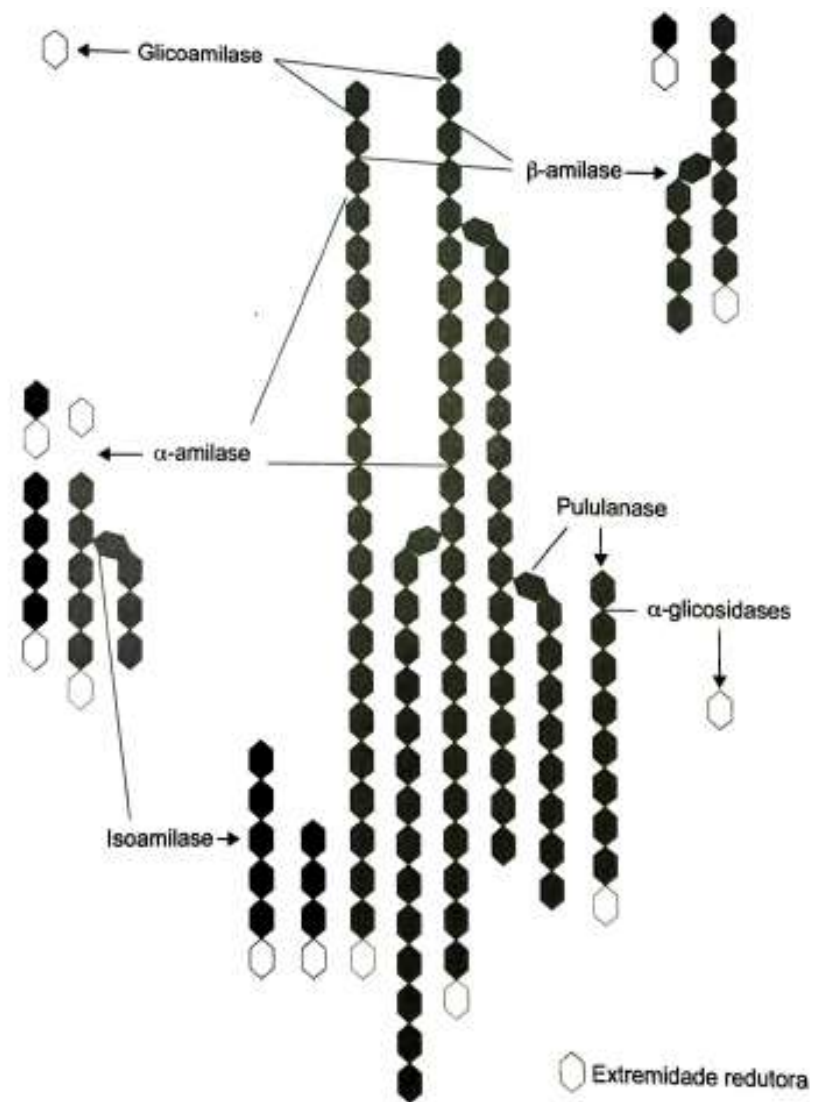
- São enzimas que apresentam maior afinidade pela ligação  $\alpha$ -1,6 do que pela ligação  $\alpha$ -1,4;

### ◆ ◆ Isoamilase

- Sua ação é restrita a dextrinas de tamanho médio (não atua satisfatoriamente sobre a amilopectina);
- Produzida por vegetais (feijões) e bactérias (*Flavobacterium* sp).

### ◆ ◆ Pululanase

- Tipo especial de isoamilase. Tem a mesma função desramificante, porém possui a particularidade de ser capaz de hidrolisar **pululana** (polímero de maltotrioses);
- Produzida por bactérias dos gêneros (*Aerobacter* e *Klebsiella*).



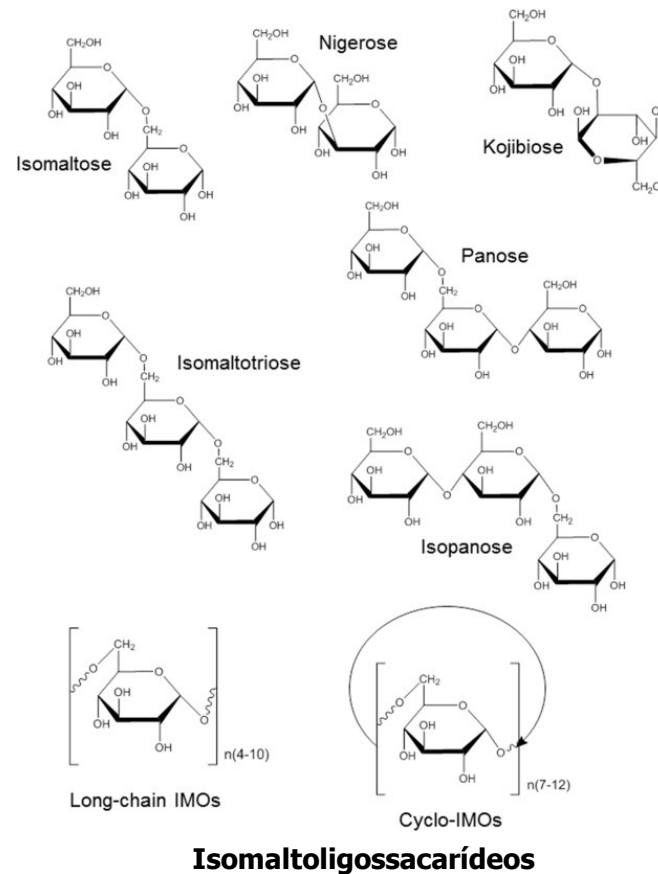
**Figura 2.5** Resumo da atividade das principais amilases sobre amilose e amilopectina.

<sup>1</sup>Pululana: polímero de maltotrioses, ligadas entre si por ligações  $\alpha$ -1,6, produzido pelo fungo *Aureobasidium pullulans*.



## ◆ Transferases

- As glicanas transferases (AGTases) atuam sobre substratos poliméricos contendo uma sequencia de ligações glicosídicas consecutivas tipo  $\alpha$ -1,4, como amilose, amilopectina e maltodextrinas.



## APLICAÇÃO INDUSTRIAL

### ♦ Bebidas alcoólicas

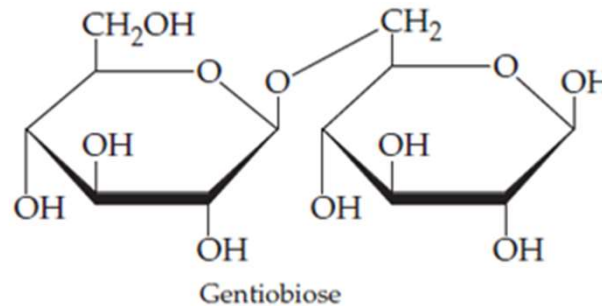
- **As leveduras não são capazes de fermentar amido, pois não produzem amilases;**
- **Em consequência disso, antes da fermentação é indispensável uma etapa de sacarificação do amido (hidrólise do amido a glicose, maltose e maltodextrinas – açúcares fermentáveis);**
- **A produção de bebidas em muito países, usando diversas fontes da enzima:**
  - \* **Europa e países andinos: uso do malte (amilases vegetais) para a produção de cervejas, uísque etc.;**
  - \* **Oriente e América do Sul: Uso de amilases fúngicas para a produção de saquê e tiquira;**
  - \* **Indíos da Amazônia: uso de amilase salivar para a produção de caxiri, cauim (bebidas à base de mandioca e milho);**

## ♦ Panificação

- Da mesma forma que nas bebidas alcoólicas, a massa pão também é fermentada pelas leveduras. Neste caso o importante é a produção de  $\text{CO}_2$ , que faz massa crescer;
- A ocorrência de açúcares fermentáveis naturais na massa é muito pequena; a adição de açúcares pode apresentar uma produção de  $\text{CO}_2$  muito rápida e escapa da malha do glúten;
- Melhor solução é a adição de amilases (Porém, em excesso pode deixar a massa grudenta);
- A produção de dextrinas pela  $\alpha$ -amilase **retarda a retrogradação de pães.**

## ◆ Amido hidrolisado

- Os primeiros processos de hidrólise eram químicos que tinham por objetivo obter adoçantes que pudessem substituir a sacarose em diferentes formulações de alimentos;
- O Amido era levado a pH=1,5 por adição de HCl e cozido a 140 °C, em autoclave;
- O produto obtido chega no máximo a 40 DE (Dextrose Equivalente);
- Não é aconselhável a se utilizar um tempo muito longo, pois pode haver a formação de **gentiobiose** (dissacarídeo formado por duas unidades de glicose unidas por ligação  $\beta$ -1,6) de sabor muito amargo.



- O surgimento de enzimas comerciais provocou a mudança dos processos industriais de **químico para enzimático**;

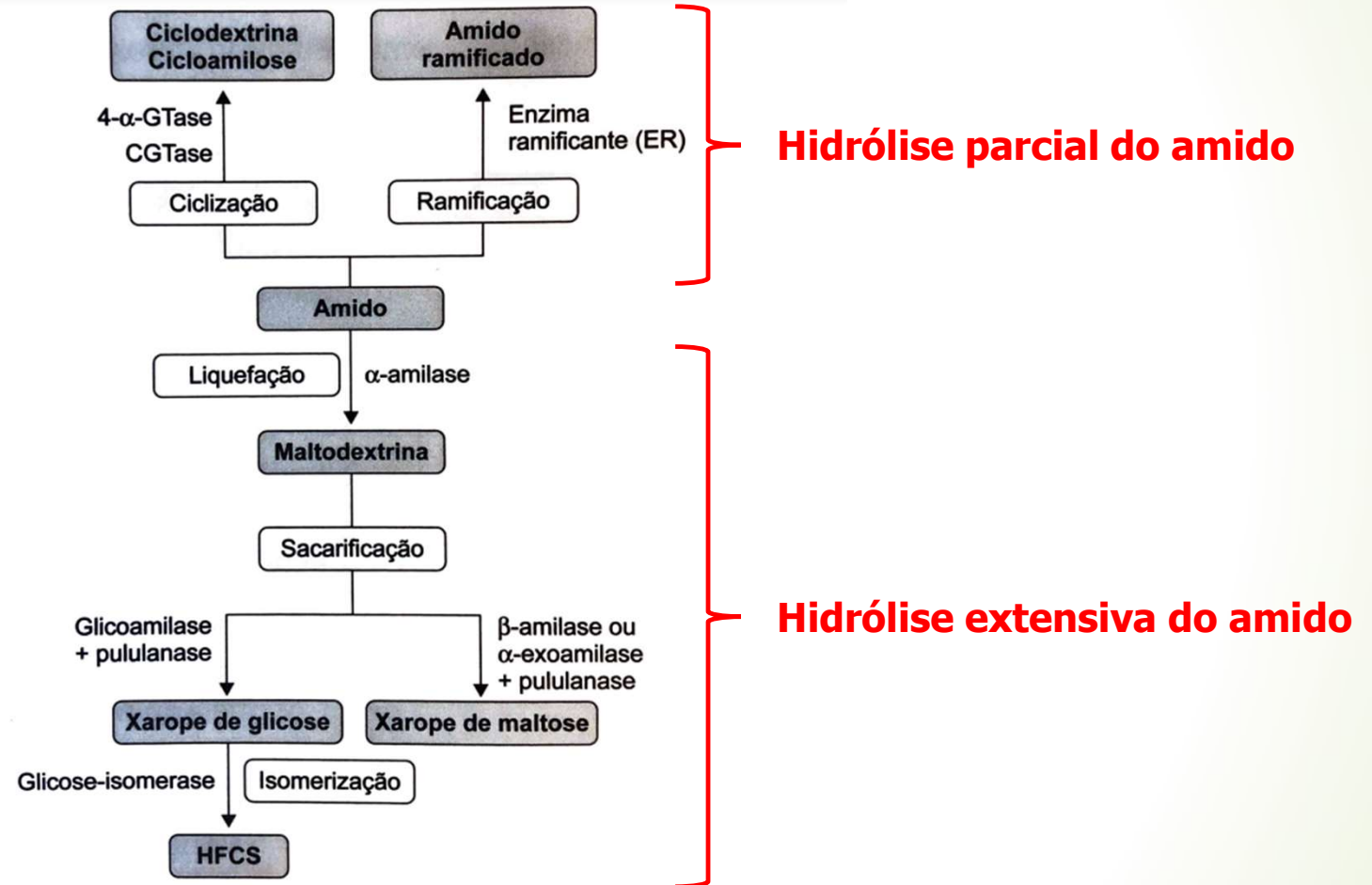


Figura 2.7 Processos e produtos obtidos pela modificação enzimática do amido. HFCS: xaropes de milho com alto teor de frutose (do inglês, *high-fructose corn syrup*).

## ◆ Hidrólise parcial do amido ou liquefação | Obtenção de maltodextrinas

- **Consiste na hidrólise do amido gelatinizado por  $\alpha$ -amilase de origem bacteriana ou fúngica;**
- **O processo recebe o nome de liquefação, pois a ação das enzimas provoca considerável redução da viscosidade do amido;**
- **Produtos:**
  - ✓ **Xarope de 5 a 8 DE (usado como substituto de gorduras);**
  - ✓ **Xarope de 8 a 15 DE (obtenção de xaropes de glicose e maltose);**
  - ✓ **Xarope de 15 a 40 DE (aplicado como estabilizantes e espessantes em diversos produtos alimentícios).**

## ♦ Hidrólise extensiva do amido | Sacarificação

- **Consiste na obtenção de xarope de glicose;**
- **Conversão de maltodextrina para até 97% de glicose pela aplicação de glicoamilases auxiliada por enzimas desramificantes;**
- **A glicose obtida pode ser transformada em frutose para a produção de xaropes com maior poder adoçante (HFSC – *high fructose corn syrup*), para substituição da sacarose.**

## ◆ Obtenção de xarope de maltose

- **Consiste na aplicação de enzimas maltogênicas ( $\alpha$ -amilase fúngicas,  $\beta$ -amilase de cevada ou de soja) sobre a maltodextrina;**
- **Normalmente se obtém um produto com 50 a 55% de maltose;**
- **O xarope de maltose pode ainda ser utilizado na produção de maltitol, adoçante de baixo teor calórico e que não provoca cáries;**



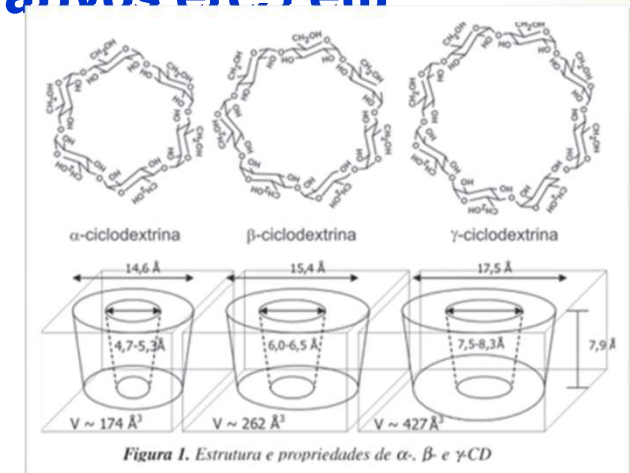
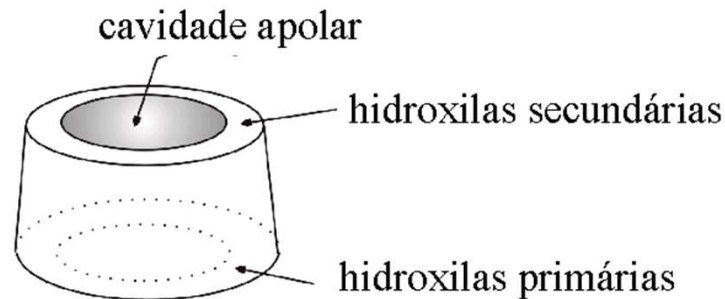
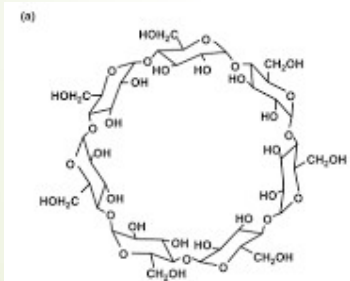
**Tabela 2.2 Principais aplicações dos xaropes de maltose, glicose e frutose.**

Maltose (%)	Glicose (%)	Frutose (%)	Aplicação	Efeito
50 a 65	2 a 12	0	Produtos de panificação, confeitaria, congelados e cervejas	Controle da textura, da umidade e das características de congelamento, melhoria da cor e controle da concentração de açúcares fermentáveis
70 a 88	0 a 10	0	Sorvetes e balas	Controle da higroscopicidade, evita cristalização
30 a 37	43 a 53	0	Geleias, refrigerantes, panificação	Controle da doçura, da viscosidade e da higroscopicidade. Estabilização do <i>flavor</i> e espessante
1 a 2	94 a 97	0	Alimentos infantis e para atletas, geleias, produtos de panificação	Fonte de energia instantânea, controle da doçura, confere brilho e promove caramelização e reação de Maillard
0	10 a 55	42 a 90	Doces, refrigerantes, condimentos e molhos, cereais, sorvetes, panificação	Substituição da sacarose, umectante, evita cristalização e promove reações de escurecimento

- Mais recentemente xaropes de glicose e maltose vêm sendo utilizados como matérias-primas para a obtenção enzimática de **oligossacarídeos prebióticos**, que são adicionados aos alimentos como ingredientes funcionais;

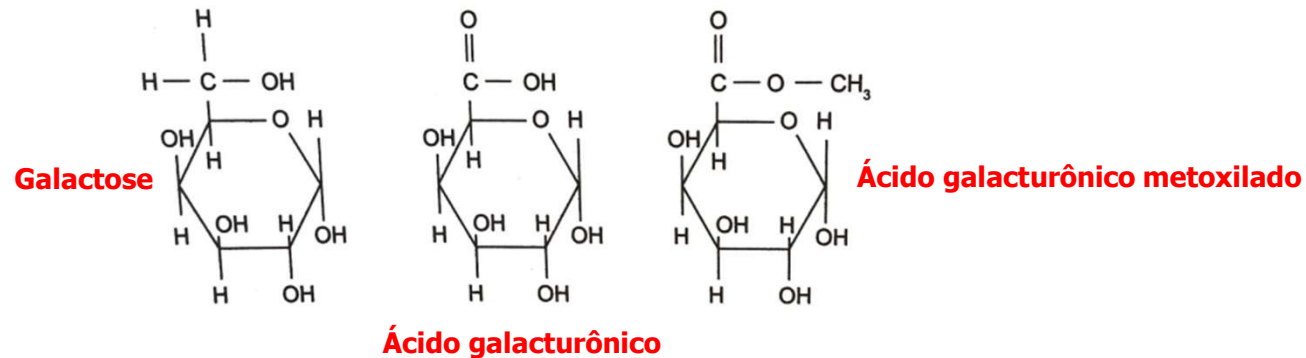
## ◆ Ciclização

- Produção de ciclodextrinas e de cicloamilases, que são polissacarídeos cíclicos produzidos pelas enzimas CGTase (Ciclomaltodextrina-glicana-transferase) e 4- $\alpha$ Gtase (4- $\alpha$ -glicana-transferase), respectivamente;
- A aplicação das ciclodextrinas está intimamente ligada à sua estrutura (hidroxilas da glicose se projetam para fora e uma cavidade hidrofóbica interna capaz de complexar diversos compostos);
- Assim, ciclodextrinas são **excelentes veículos para dispersão de compostos hidrofóbicos** (aromas, pigmentos, fármacos, compostos ativos etc.) em matrizes aquosas;

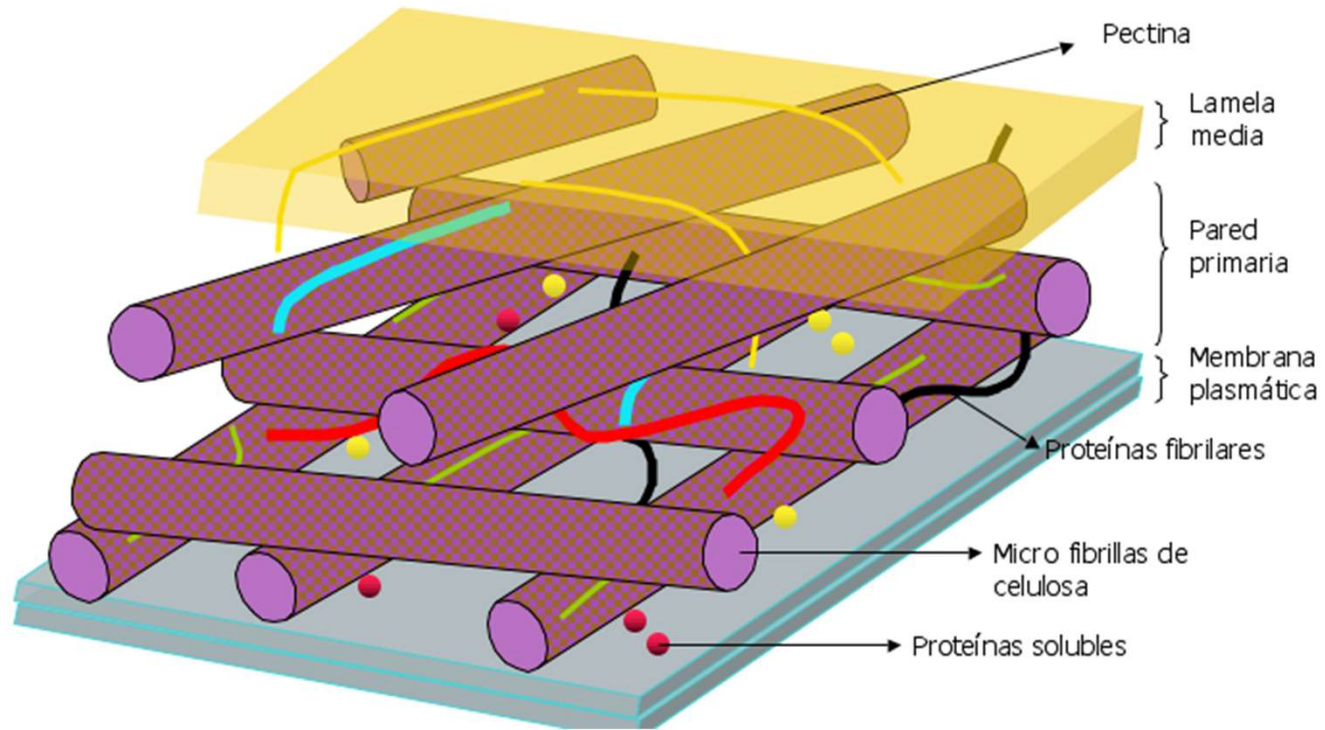


## ◆ Pectinases

- São enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 entre unidades de ácido galacturônico ou seu derivado metoxilado;



- Sua aplicação na indústria de alimentos pode trazer uma série de benefícios na obtenção de produtos de origem vegetal;



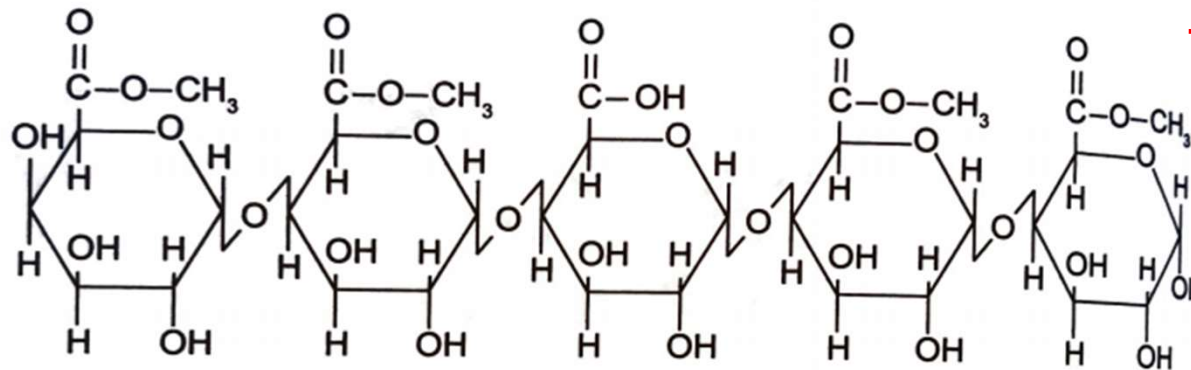


Figura 2.11 Estrutura da pectina com alto teor de metoxilação.

**Formam gel na presença de alta concentração de açúcares**

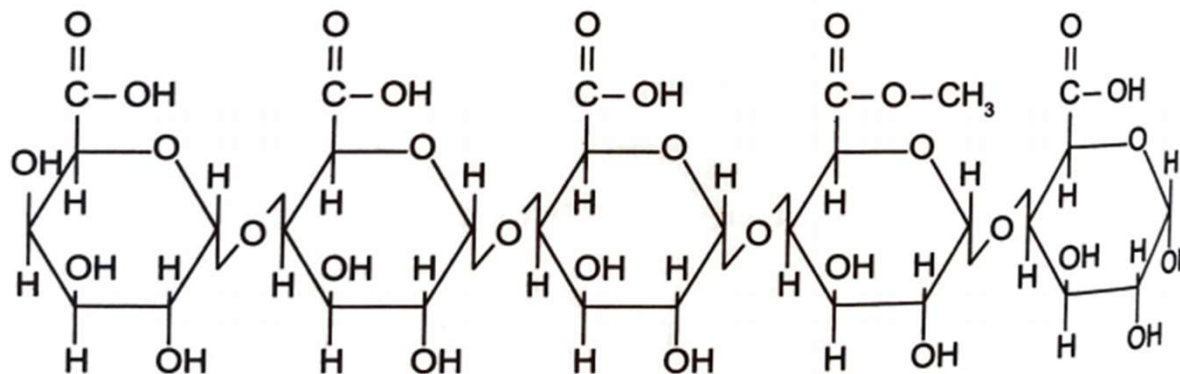
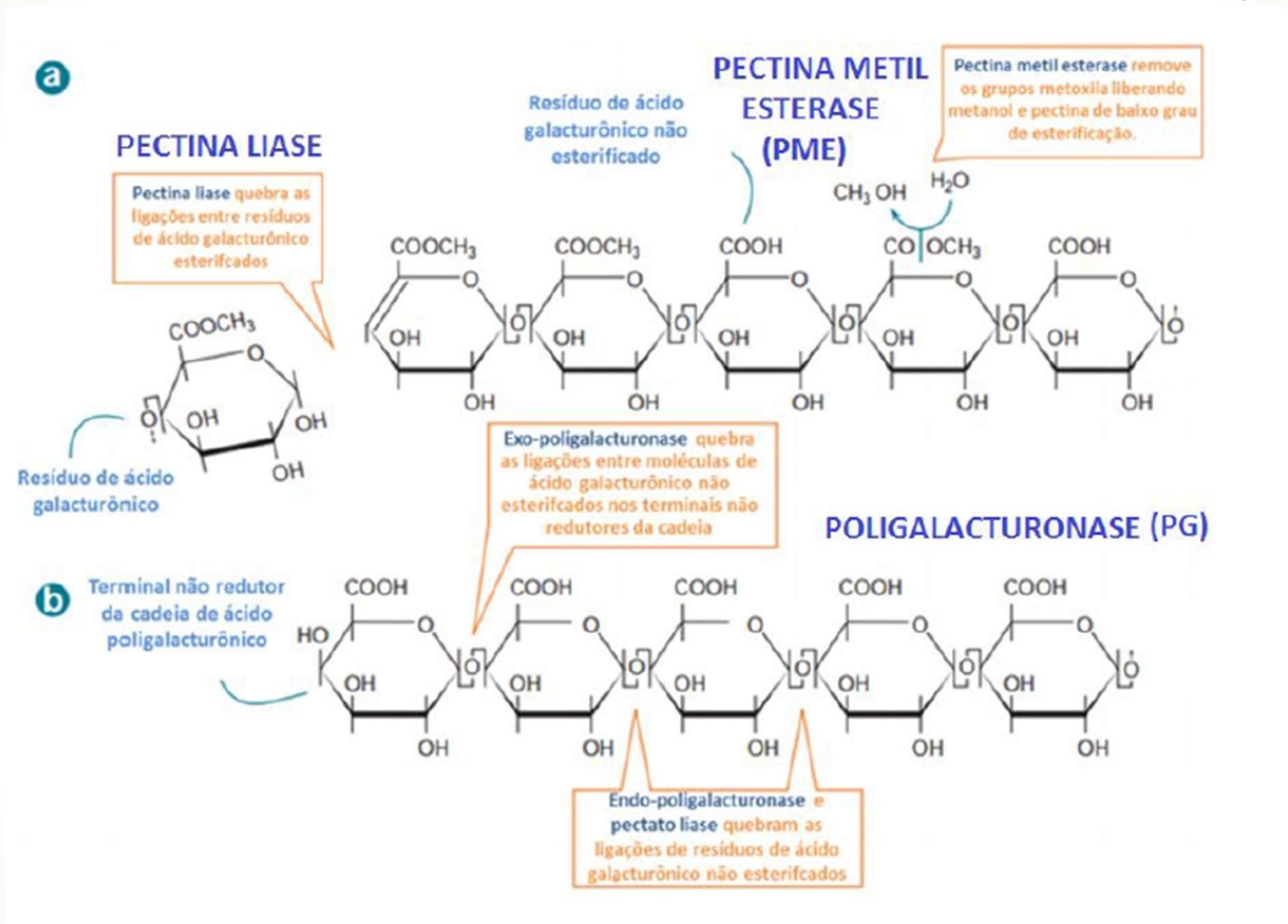


Figura 2.12 Estrutura da pectina com baixo teor de metoxilação.

**Tendem a gelificar na presença de íons divalentes, como cálcio**





## APLICAÇÃO INDUSTRIAL

### ◆ Sucos cítricos

- **Perda da turbidez e separação de fases no suco;**
- **Isso acontece quando pectinaesterases desesterificam a pectina em suspensão no suco, gerando ácido poligalacturônico, que, na presença de cálcio natural precipitam, causando clarificação;**
- **Uma das formas de se resolver este problema é a adição de pectinaliases ou poligalacturonases ao suco;**
- **Na presença dessas enzimas a pectina ou ácido poligalacturônico são hidrolisados a oligômeros não sensíveis ao cálcio.**



## ♦ Tomate (pectinesterase e poligalacturonase)

- A presença dessas enzimas influencia significativamente a **conservação pós-colheita e o processamento do fruto;**
- A atividade combinada dessas duas enzimas reduz a vida de prateleira, por provocar **rápido amaciamento;**
- Uma solução foi o desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas;
- Na obtenção de produtos de tomate processados, são utilizados dois tipos básicos de tratamentos:
  - ✓ **Hot-break (90 oC):** Processo que promove a inativação térmica das pectinases imediatamente após o despulpamento. Assim, se garante o conteúdo de pectina e a alta viscosidade para a produção de ketchup, sopas e molhos.
  - ✓ **Cold-break (40 oC):** Obtenção de sucos pouco viscosos, para uso como flavorizantes.



## ◆ Clarificação de sucos de frutas

- **Eliminação da turbidez de sucos de uva, maçã e pera, por exemplo, por pectinases e poligalacturonases.**



## ♦ Lactases

- São enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  envolvendo galactoses e arabinoses - principal substrato é a lactose;
- Atualmente as lactases comerciais são de origem microbiana (*Apergillus niger*, *A. oryzae*, *Candida pseudotropicalis* e *Kluveromyces lactis*);
- Lactases possuem atividade de transferase, podendo ligar uma unidade de galactose a outra unidade de galactose livre por uma ligação  $\beta$ -1,6 (gerando lactobiose e lactotriose, por exemplo).

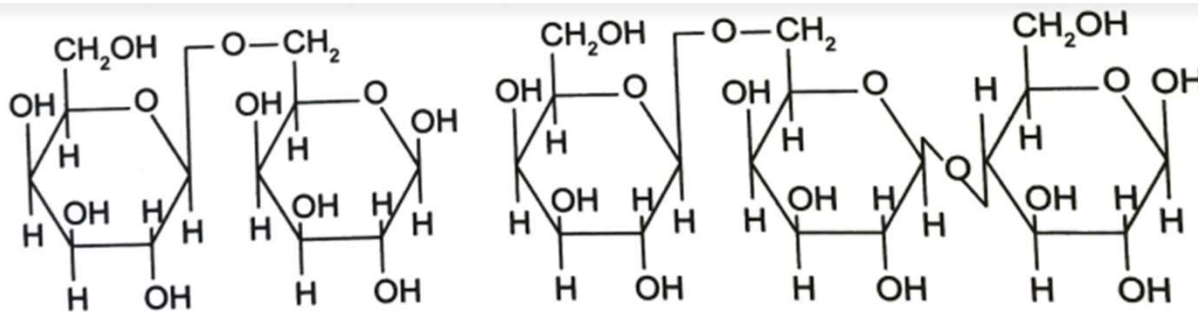


Figura 2.22 Lactobiose e lactotriose.

## APLICAÇÃO INDUSTRIAL

### ◆ Produtos para consumidores intolerantes a lactose

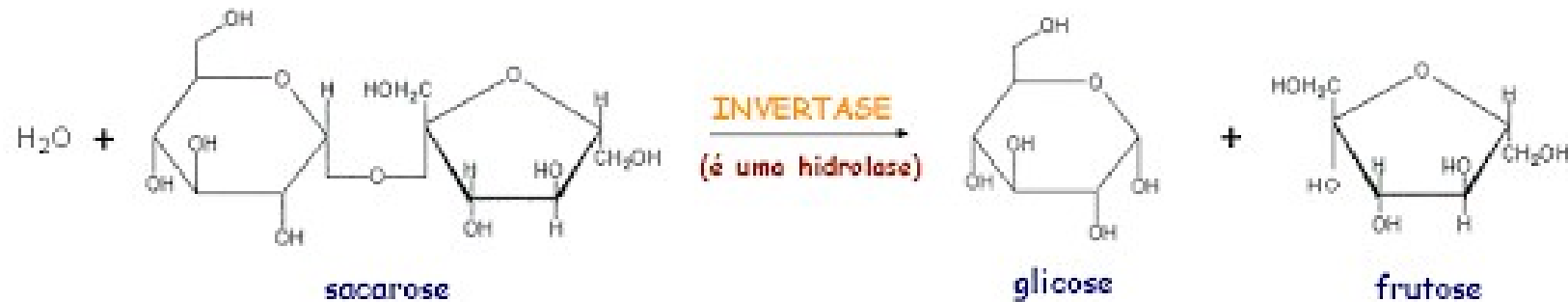
- Existem no mercado cápsulas contendo lactase, para serem ingeridas por pessoas intolerantes a lactose;
- Leites com baixo teor de lactose.

### ◆ Pré-tratamento do leite (*lactfree*) para obtenção de diversos produtos

- Iogurte: aumenta a doçura sem aumentar calorias. Reduz tempo de fermentação e melhora a textura;
- Queijo: Reduz o tempo de fermentação e maturação em queijos tipo cheddar;
- Doce de leite e sorvete; Evita a formação de cristais de lactose e sensação de arenosidade nesses produtos.

## ◆ Invertases

- São enzimas capazes de hidrolisar sacarose em glicose e frutose;
- Podem apresentar atividades de transfrutolisação;



## APLICAÇÃO INDUSTRIAL

### ♦ Lactossacarose

- É composto de galactose, glicose e frutose com ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e  $\alpha$ -1,2
- É um açúcar amplamente utilizado no Japão para a preparação de alimentos funcionais;
- A procura pela lactossacarose tem aumentado significativamente, sendo que em 2007 o mercado foi de 3.000 toneladas/ano, com uma taxa de crescimento de 10%.

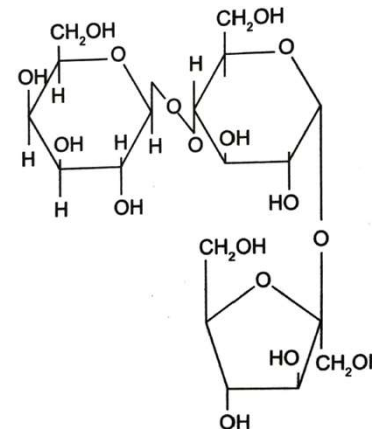
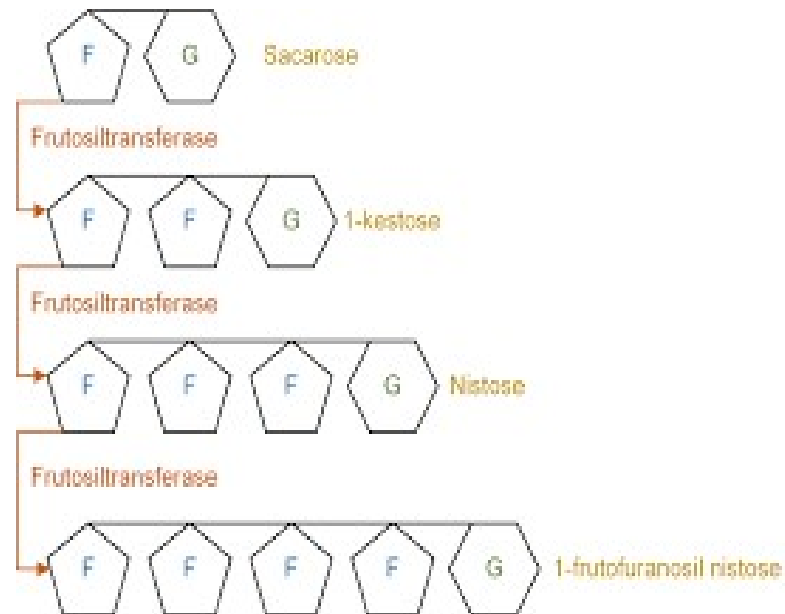


Figura 2.26 Estrutura da lactossacarose.

## ♦ Frutooligossacarídeos

- São carboidratos complexos, oligômeros de frutose;
- São considerado prebióticos;
- Inibem o crescimento de bactérias nocivas.



Será disponibilizado material texto na plataforma e-disciplina

Obrigado