

# Proteases: características e aplicação em alimentos



# INTRODUÇÃO

- São também conhecidas como **peptidases ou proteinases**;
- Tem como principal função a hidrólise de proteínas;
- Estão envolvidas no processo de digestão, ativação de enzimas e no transporte de proteínas pelas membranas;
- Todas as proteases apresentam algum grau de especificidade em relação aos substratos;



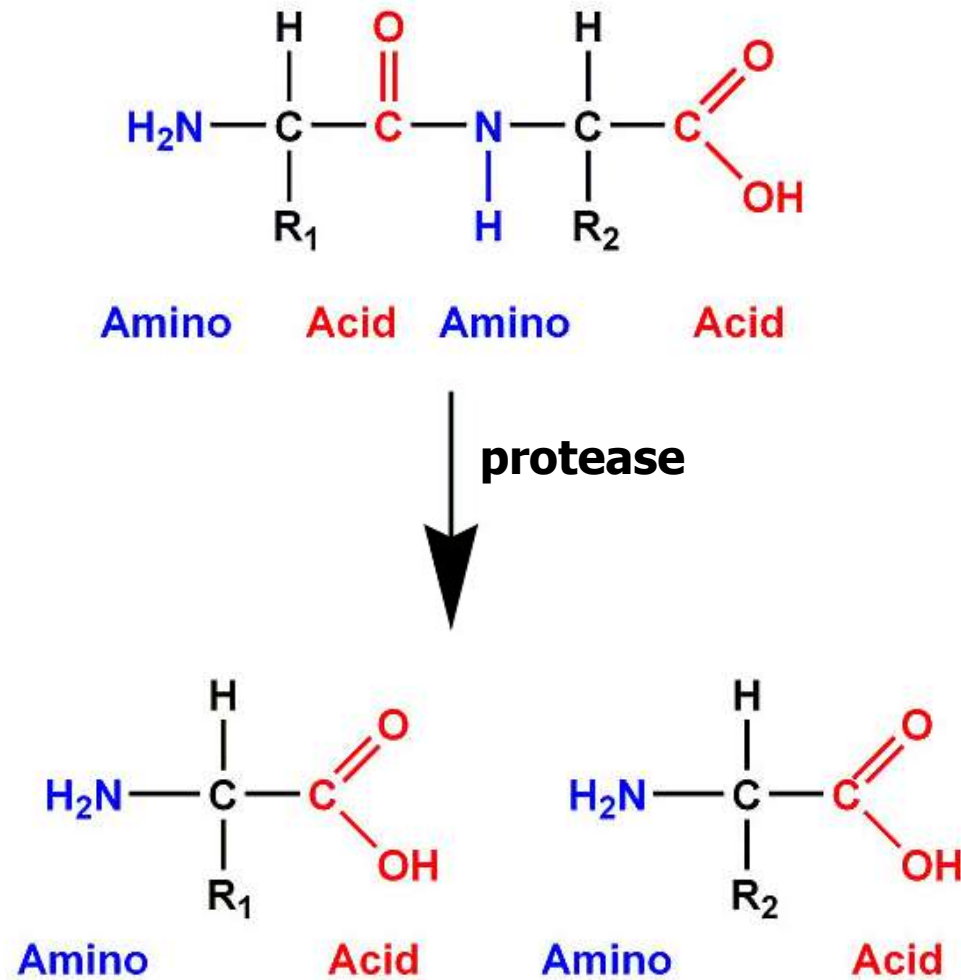
# Enzimas produzidas em escala comercial

- **75% são hidrolases;**
- **Destas, 60% são proteases;**
  - ✓ **25% proteases alcalinas**
  - ✓ **10% quimiosina**
  - ✓ **3% tripsina**
  - ✓ **21% outras proteases**
- **A indústria de alimentos é a segunda maior consumidora de proteases.**

## Hidrólise de proteínas

- Favorece a digestão e absorção pelo organismo;
- Formação de compostos responsáveis pelo aroma e textura específicos;
- Proteases são enzimas que pertencem ao grupo das **Hidrolases**;
- Catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas;
- Atividades também nas ligações éster e amida.

# Ação das proteases



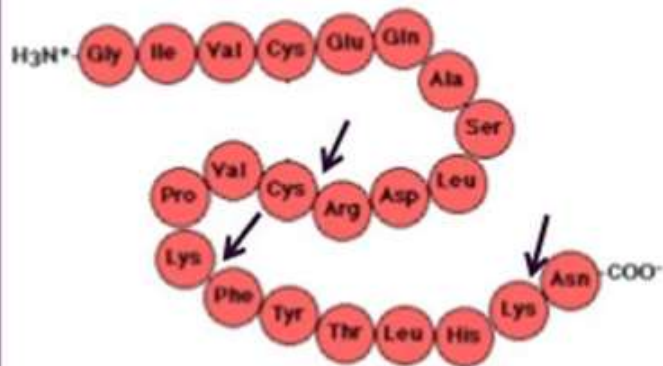
# Especificidade das Proteases

**Hidrólise limitada  
(poucos sítios de cortes)**

Very specific protease

**Trypsin**

specific for Arginine and Lysine

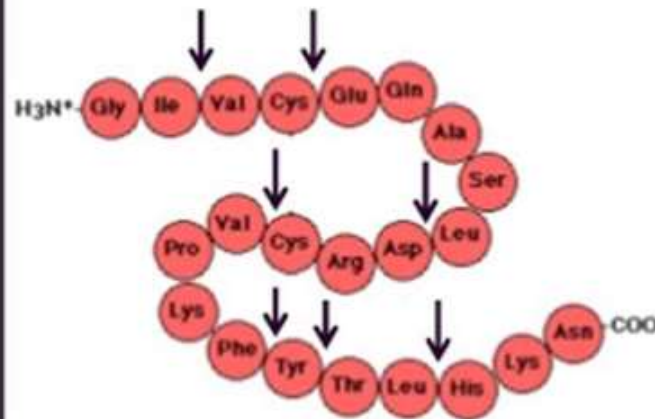


**Hidrólise é intensa  
(muitos sítios de cortes)**

Less specific protease

**RONOZYME® ProAct**

preference for hydrophobic amino acids



## Classes de Proteases

**Tabela 3.2** Classes de proteases.

Classe	Exemplo	Aminoácidos do sítio ativo
Serina-protease	Quimotripsina	His <sup>57</sup> , Asp <sup>102</sup> , Ser <sup>195</sup>
	Subtilisina	Asp <sup>32</sup> , His <sup>64</sup> , Ser <sup>221</sup>
Cisteína-protease	Papaína	Cys <sup>25</sup> , His <sup>159</sup> , Asp <sup>158</sup>
Protease aspártica	Pepsina de <i>Penicillium</i> sp.	Asp <sup>33</sup> , Asp <sup>213</sup>
Metallo-protease	Carboxipeptidase A bovina	Zn, Glu <sup>270</sup> , Try <sup>248</sup>

Asp: ácido aspártico; Ser: serina; His: histidina; Cys: cisteína; Glu: glutamina; Try: triptofano; Zn: zinco.

## Modo de ação das Proteases

As proteases são classificadas pelo modo de ação pelo em dois grandes grupos:

- **Exopeptidases (atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica)**
  - ✓ Aminopeptidases
  - ✓ Carboxipeptidases
- **Endopeptidases (agem nas ligações no interior da cadeia proteica)**

**Tabela 3** Classificação de peptidases de acordo com o sítio ativo catalítico

Peptidases	EC subclasses
<b>Carboxipeptidases</b>	
Serina-carboxipeptidase	3.4.16
Metalo-carboxipeptidase	3.4.17
Cisteína-carboxipeptidase	3.4.18
<b>Endopeptidases</b>	
Serina-endopeptidase	3.4.21
Cisteína-endopeptidase	3.4.22
Aspártico-endopeptidase	3.4.23
Metalo-endopeptidase	3.4.24
Treonina-endopeptidase	3.4.25
Endopeptidase com mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99

Fonte: Zanin e Moraes (2004)



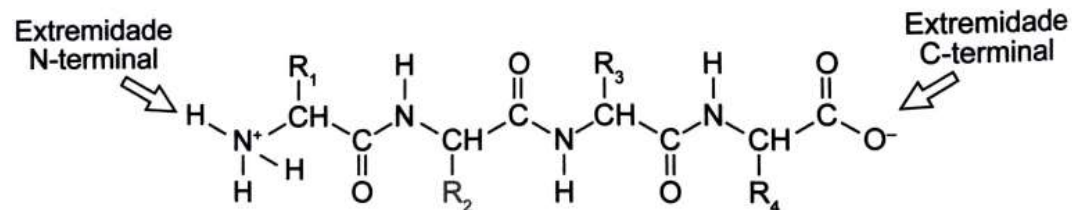
## ◆ Exopeptidases

### • Aminopeptidases

- Proteases que agem na extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica;
- Liberam aminoácidos livres, dipeptídeos ou tripeptídeos.

### • Carboxipeptidases

- Proteases que agem na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica;
- Liberam aminoácidos livres, dipeptídeos ou tripeptídeos.



## ◆ Endopeptidases

São normalmente classificadas pela natureza química e por seu mecanismo de ação em 4 grupos

- **Serina-proteases (EC 3.4.21)**

- **Presença do aminoácido serina no sitio ativo;**
- **Inibidas irreversivelmente:**
  - \***3,4-dicloroiscocumarina (3,4-DCI)**
  - \***Disopropilfluorofosfato (DFP)**
  - \***Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF)**
- **Exemplos: tripsina, qimotripsina e subtilisina.**

- **Cisteína-proteases ou proteases sulfidrílicas (EC 3.4.22)**
  - **Apresentam em seu sitio ativo cisteína conjugada com histidina;**
  - **Mais ativas em meios de pH neutro do que ácido**
  - **Ativadas na presença de agentes oxidantes e substância**
  - **Reagem com grupo sulfidril, como *p*-cloromercuriobenzoato (PCMB)**
  - **Exemplos: bromelina, ficina e papaína**

- **Proteases aspárticas ou ácidas (EC 3.4.23)**

- **Contém ácido aspártico em seu sítio ativo;**
- **Inibidas por 1,2-epoxy-3-*p*-nitrofenoxipropano (EPNP) na presença de íons cobre;**
- **Maior atividade em pH baixo e maior afinidade por ligações que envolvem aminoácidos apolares e aromáticos;**
- **Exemplos:**
  - \* **Pepsina e a renina**
  - \* **Proteases microbianas fúngicas (gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Endothia* e *Rhizomucor*)**

- **Metallo-Proteases (EC 3.4.24)**

- **Dependem de íons metálicos divalentes para sua atividade;**
- **Inibidas por agentes quelantes, como ácido etilindiaminotetracético (EDTA)**

**Contém ácido aspártico em seu sítio ativo;**

- **Inibidas por 1,2-epoxy-3-*p*-nitrofenoxipropano (EPNP) na presença de íons cobre;**
- **Maior atividade em pH baixo e maior afinidade por ligações que envolvem aminoácidos apolares e aromáticos;**

# Fontes de proteases e principais características

## ◆ Proteases Vegetais

- Muito empregadas na indústria de alimentos;
- Consideradas seguras para consumo humano;
- Papaína, bromelina e ficina são as mais importantes (representam cerca de 5% do mercado mundial de proteases).



## ◆ Papaína

- É uma cisteína-protease extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*);
- Geralmente comercializada na forma de extrato bruto que contém:
  - \* Papainas (QP-A)
  - \* Quimopapaina (QP-B)
- Apresenta atividade proteolítica em valores de pH 5,0 a 9,0;
- Enzima permanece estável até 90° C.



## ◆ Bromelina

- É uma cisteína-protease extraída do pendúnculo do fruto do abacaxizeiro (*Ananas comusus*)
- \* Atividade ótima pH 6,0 a 8,0
- \* Perda atividade > 70° C





## ◆ Ficina

- **Extraída do látex de diversas espécies do gênero *Ficus*;**
- \* **Apresenta maior atividade: pH 6,0 a 8,0**
- \* **Temperatura estável até 60° C**
- \* **Baixa especificidade de substrato e hidrolisa ligações que envolve diversos aminoácidos.**



## ◆ Proteases Animais

As mais importantes comercialmente são as proteases gástricas (**quimosina ou renina e pepsina**) e as pancreáticas (tripsina e quimotripsina);

### ◆ Quimosina ou renina

- É uma das proteases que apresenta maior valor para a indústria de alimentos;
- É uma protease extraída do quarto estômago (abomaso) de bezerros;
- Utilizada para elaboração de queijos.



## ◆ **Proteases microbianas**

- **São excelentes fontes de enzimas em razão da grande diversidade e produção em escala;**
- **No passado todas as enzimas comercializadas eram de origem animal ou vegetal;**
- **Representam cerca de 40% do total utilizado no mercado de enzimas.**



## ◆ Origem bacteriana

- A maior parte das proteases comerciais é produzida por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Geobacillus*.
- Proteases neutras:
  - \* Ativas pH 5,0 a 8,0
  - \* Baixa estabilidade térmica
  - \* Preferência ligações hidrofóbicas
- Proteases alcalinas:
  - \* pH 8,0 a 11,0 – temperatura 50 a 60° C
  - \* Baixa especificidade de substrato mais utilizadas na indústria de detergentes



## ◆ Origem fúngica

- **Uma única espécie de fungo pode produzir diferentes proteases (alcalinas, neutras e ácidas);**
- **Extrato é obtido por fermentação;**
- **Atividade proteolítica pH 4,0 a 11,0;**
- **Temperatura ótima 40° C;**
- **Inativas a 50° C.**



# APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

## ◆ Turvação da cerveja

- Interação de **compostos fenólicos** e **polipeptídios** provenientes do malte e de cereais não-maltados, que se **insolubilizam em temperatura baixa**;
- A simples filtração não garante que não ocorra nova precipitação, portanto é necessário tratamento com **proteases**;
- As proteases hidrolisam os peptídeos e impedem que eles se insolubilizem, evitando a turvação;
- Em geral é usado papaína, pois tem baixa especificidade e hidrolisam peptídeos de diferentes fontes e tem baixo preço no mercado;
- Em alguns casos, o uso de papaína vem sendo substituído pela aplicação de proteases microbianas.



## ◆ Amaciamento de carne (tenderização enzimática)

- A maciez é a característica mais desejada em carnes;
- O método convencional de se atingir a maciez é por meio da maturação prolongada (10 dias a 4 semanas após o abate);
- Uma possibilidade de acelerar esse processo é a aplicação de proteases que irão as proteínas da carne;
- As de origem vegetal são as mais utilizadas (**papaína**, por exemplo);
- Em alguns casos, o uso de papaína vem sendo substituído pela aplicação de **proteases microbianas**.

## ♦ Coagulação do leite

- Se a hidrólise do leite não for limitada, haverá a destruição dos coágulos, com perda da caseína para o soro;
- Historicamente a quimosina é a enzima mais utilizada neste processo;
- A quimosina possui preço elevado e insuficiente para atender toda a demanda do mercado;
- Uma possibilidade é utilização de proteases microbianas (*Rhizomucor mihei*, *R. pusillus*, *Aspergillus oryzae* e *Endothia parasitica*) que apresentam especificidade semelhante à da quimosina;



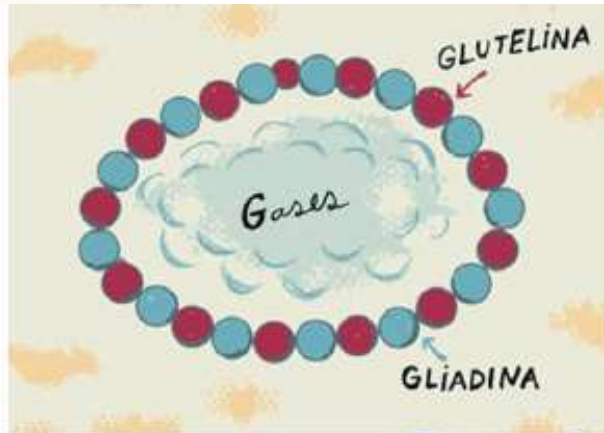
## ◆ **Maturação de queijo**

- **As importantes modificações de textura e aroma no queijo são devidas, principalmente, à presença de proteases que geram peptídeos, aminoácidos, aminas, compostos sulfurados e tio-ésteres;**
- **Adição em queijos do tipo *Cheddar***



## ♦ Panificação

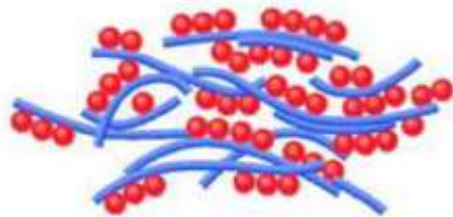
- **As farinhas de trigo para uso industrial são classificadas de acordo com seu conteúdo de proteínas:**
  - \* **Variam de 5 a 20%**
  - \* **Essa variação deve-se a fatores genéticos. Ambientais e de manejo do trigo.**
- **Fração proteica do trigo: chamada glúten**
  - \* **A força do glúten é uma função da concentração dessas proteínas e da sua composição**
  - \* **Formada por dois constituintes básicos:**
    - \* **Glutelina – proteína fibrilar se dispõem em forma de rede**
    - \* **Gliadina – proteína globular que interage com a glutelina**



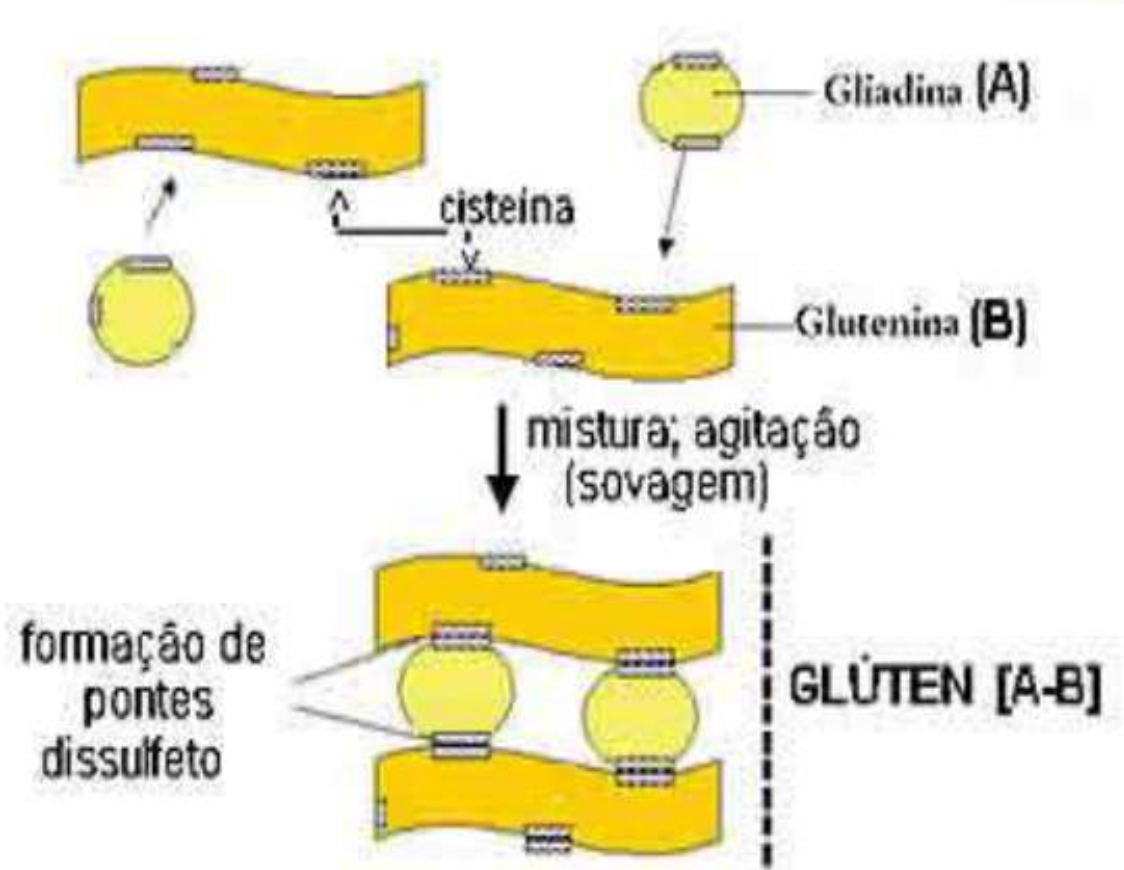
Gliadina



Glutenina



Glúten (gliadina + glutenina)



- **A rede de glúten é formada por ligações do tipo de dissulfeto e quanto maior o numero dessas ligações mais difícil será trabalhar a massa;**
- **A quantidade de proteína na farinha e a proporção de seus constituintes determinam as características de extensibilidade e de elasticidade da massa e do produto final;**
- **Uma massa de pão que contem pouco glúten gerará um produto pouco macio incapaz de se expandir pela ação do gás produzido pelo fermento químico.**

- **As propriedades do glúten e redução da sua força pode ser feito pela adição de **metabissulfito de sódio** que torna a farinha mais adequada a finalidade desejada (produção de bolos, biscoitos, etc);**
- **A utilização deste produto é regulamentada por legislação específica para cada país;**
- **Uma alternativa é utilizar proteases;**
- **As proteases modificam a rede proteica pela quebra das ligações Peptídicas;**
- **A extensão da quebra depende do tipo de protease utilizada, sua concentração e do tempo de reação:**
  - \* **Fornece produto mais macio**
  - \* **Menor densidade**
  - \* **Aparência agradável**
  - \* **Elimina o sabor (*after taste*) provocado pelo metabissulfito.**

## O Custo da Alimentação sem Glúten no Brasil

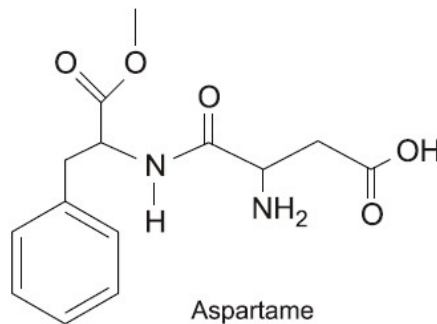


## ◆ Valor proteico das farinhas

- **Uso de proteases em farinhas com alto teor proteico, dará origem a produtos com valor nutricional;**
- **Em biscoitos do tipo cracker o uso de proteases de *A. oryzae* permite a abertura homogênea da massa e evita deformação do pão no forno;**
- **Produção de bolos e *waffers*, que exigem farinhas com baixo conteúdo de proteínas o uso de proteases vegetais pode substituir a aplicação de metabissulfito de sódio**

## ◆ Síntese de aspartame

- O **aspartame** é o nome comercial do adoçante de baixa caloria formado pelo dipeptídeo do ácido L-aspártico e pela L-fenilalanina esterificada por um grupo metil;
- Seu poder edulcorante é cerca de 200 vezes maior que o da sacarose;
- O isômero de aspartame formado pelo ácido L-aspártico e pela **D-fenilalanina** apresenta **sabor amargo**;
- Uso de proteases imobilizadas de *Bacillus thermoproteolyticus* (termolisina)





Será disponibilizado material texto na plataforma e-disciplina

Obrigado