

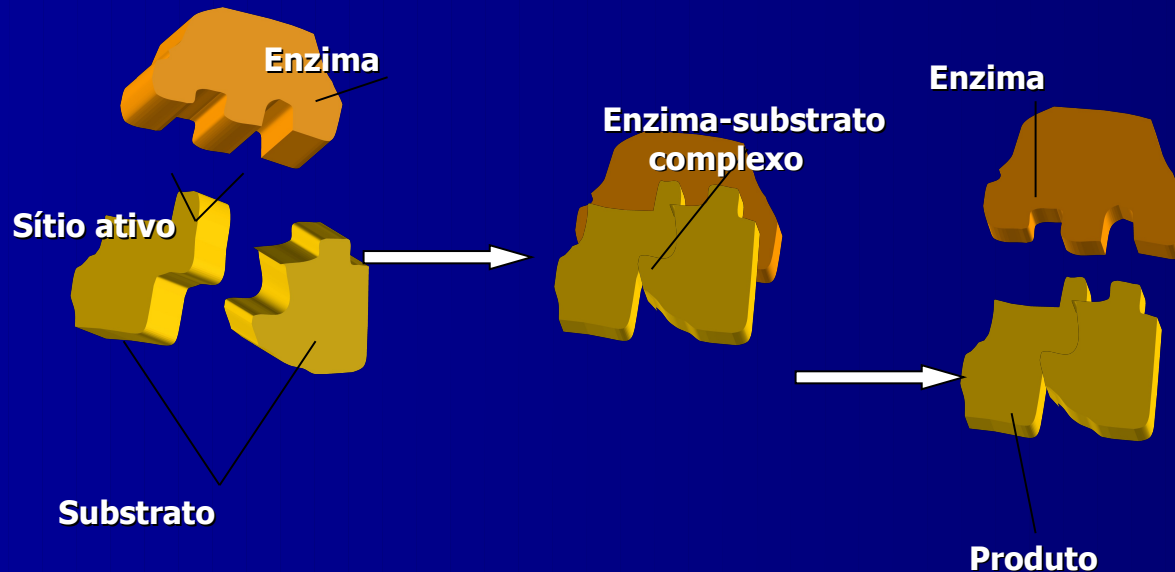
# **Importância Industrial da Produção de Enzimas**

# II – Considerações

## ■ Enzimas:

- Proteínas que apresentam atividade catalítica;
- Aceleram as reações químicas;
- Tem uma especificidade por cada substrato;

### Ilustração:

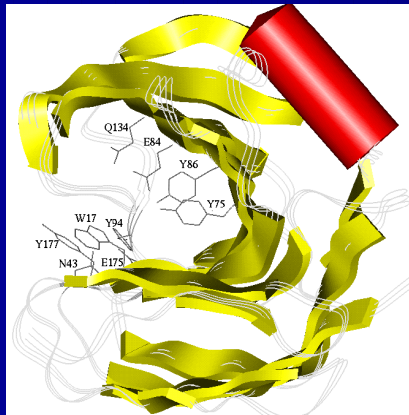


# II – Considerações

## ■ Estrutura das Enzimas :

- Proteínas são heteropolímeros formadas por aminoácidos ligados por ligações peptídicas.
- Estrutura Tridimensional das enzimas:

Xilanase



Celulase – *Humicola grisea*



# II – Considerações

## ■ Nomenclatura

- Estabelecida em 1956 pela União Internacional de Bioquímica (IUB) pela Comissão de Enzima – ( CE );

### Definição:

- Terminação - sufixo + ase

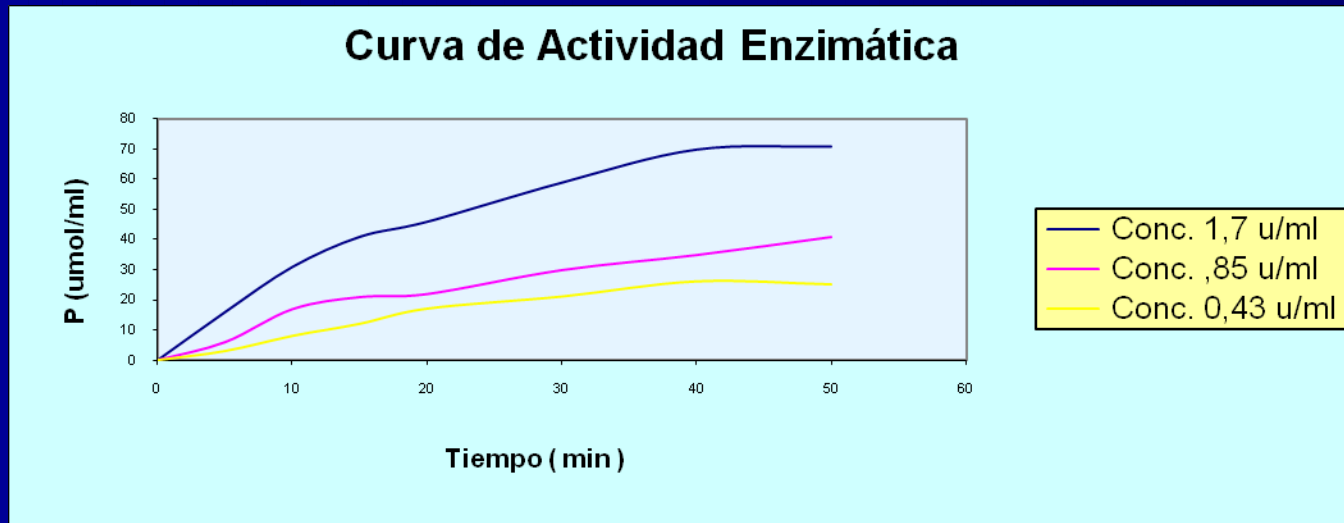
- Segundo as Classe de acordo com as reações catalisadas:

Classe	Reações catalisada
Oxiredutases	Óxido-reducao
Tranferases	Translacao de grupos de una molécula a outra
Hidrolases	Hidrólise
Liasas	Quebra e adição de ligação com a formação de dupla ligação
Isomerases	troca intracelular em que um substrato e traformado em um produto isomero
Ligases	ligação covalente de moléculas com quebra de una ligação

# II – Considerações

## ■ Atividade enzimática

- E medida através de sua velocidade de reação em determinada condição experimental estabelecida.



Curva del progreso de reacciones para três diferente concentraciones enzimáticas iniciais 1,7 u/ml ; 0,85 u/ml y 0,43 u/ml.

# II – Considerações

## ■ Substratos empregados para determinação de Atividade para celulase

Enzima	Substrato	Ensaio
Celulase Total (TC)	- Algodão  - Papel de filtro (PF), Avicel <sup>a</sup> , Solka Floc <sup>b</sup> e BMCC <sup>c</sup> - Celulose amorfa - Celuloses tingidas	- Solubilização; perda de peso e de resistência; Açúcares redutores libertados; Estimativa do residuo de celulose; Poder redutor do algodão;  - Açúcares redutores libertados; Determinação do DP; - Diminuição da turbidez; - Liberação de fragmentos solúveis tingidos;
Celobiohidrolases (CBHs)	- Substratos celulósicos anteriores - Celooligosacarídeos substituídos (com marcadores cromóforos, fluorogênicos ou radioactivos) e não substituídos	- Ensaio anteriores;  - Análise dos açúcares por HPLC; liberação do cromóforo; aumento do poder redutor;
Endoglucanases (EGs)	- Substratos celulósicos anteriores - CMC <sup>d</sup>  - HEC <sup>e</sup>	- Ensaio anteriores;  - Liberação de açúcares redutores; - Diminuição da viscosidade;
$\beta$ - glucosidase ou celobiase	- Celobiose - <i>o</i> - ou <i>p</i> - nitrofenil- $\beta$ - D- glucosídeo - Celooligosacarídeos	- Liberação de glucose; - Liberação de <i>o</i> - ou <i>p</i> - nitrofenol; - Aumento do poder redutor;

<sup>a</sup> Avicel é uma celulose microcristalina comercial;

<sup>b</sup> Solka Floc é composta por celuloses cristalinas e amorfas. É relativamente pura, contém pelo menos 99,5% de celulose;

# II – Considerações

- **Equipamento usado para a determinação de produto da ação enzimática**

Viscosímetro dinâmico



Cromatográfico líquido



espectofotômetro



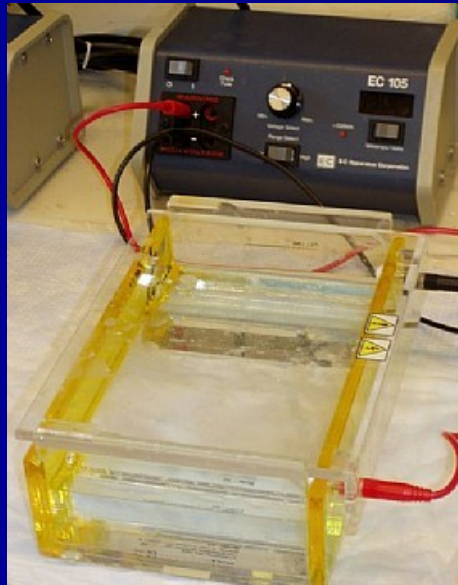
Calorímetro



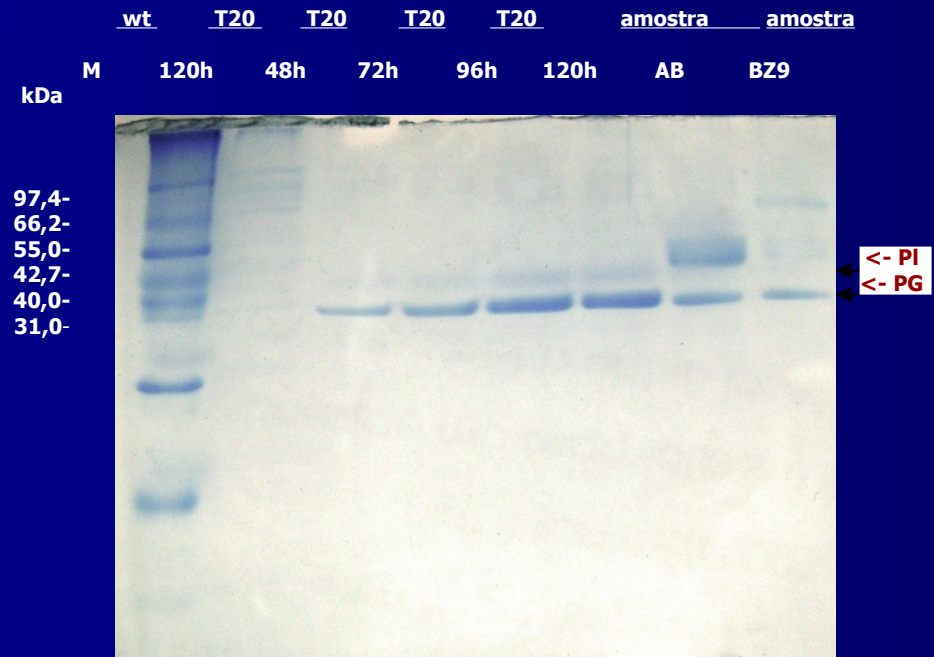
# II – Considerações

- **O método de Eletroforese para a Determinação de tamanho das enzimas.**

Equipamento para a determinação das bandas moleculares de enzimas



Perfil Eletroforético





# **ENZIMAS PARA USO INDUSTRIAIS**

# III – Aplicação industrial de las enzimas

## ■ Panificação



### Enzimas

---

Alfa – amilase

Beta - amilase

Glucoamilase

Xilanase

Protease

---

### Efeito Pan/ biscoito

---

maciez

Crocância

Aroma/volume

Maciez

Uniformização

---

# III – Aplicação industrial das enzimas

## ■ Panificação



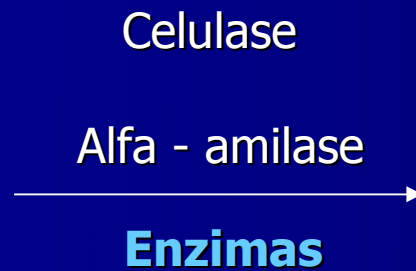
Efeito do uso de Xilanase em pão

# III – Aplicação industrial das enzimas

## ■ Têxtil



Tecido natural (cru)



Tecido acabado

# III – Aplicação industrial das enzimas

## ■ Suco



Pectinase / Pectinálise



**Enzimas**

**Efeito**

Homogenidade

Estabilidade

# III – Aplicação industrial das enzimas

## ■ Ração Animal



**Enzimas**



Fitase /  
Hemicelulases

**Efeito**

Otimiza a degradação  
dos ingredientes das  
rações no sistema  
Digestivo dos animais

# **FATORES QUE INFLUENCIAO A PRODUCAO DAS ENZIMAS**

# IV – Produção de Enzimas

## Peróxido de Produção de Enzimas

As enzimas podem ser produzidas em estado sólido ( CES ) ou em cultivos submerso (CESm).

**Cultivo e estado sólido ( CES )** – . Qualquer tipo de cultivo que não tenha água livre;  
. o crescimento de microorganismo a formação de produto ocorrem na superfície ou dentro do sólido;

Alguns tipos de cultivo sólido para a manutenção de cepas

**fungos**



**Aspergi-los**



**Trichoderma**

**Bactérias**



**Clostridium**



**Actinomycetes**



# IV – Produção de Enzimas

## Cultivo em Estado Sólido ( CES ):

- o **Vantagem** -
  - . Volume reduzido do meio de cultura
  - . Baixos custos de manipulação
  - . Rendimento de produto que pode ser maior que o submerso;
  - . Uso direto de produto concentrado no substrato;
  - . Menor quantidade de substância extratora para a obtenção de enzimas;
  - . Maior simplicidade na formação final de meio de cultura;
  - . Menor risco de contaminação bacteriana;
  - . Equipamento menos complexos que os de cultivos submerso;
- o **Desvantajes** –
  - . Uso restrito a microorganismo capaz de desenvolver em baixos níveis de umidade;
  - . Dificuldade de transferência de calor, de controle de umidade, pH,  $O_2$  e  $CO_2$ .
  - . Necessidade de grande quantidade de inóculo;
  - . Dificuldade na determinação da massa de fungo;

**OBS:** Apesar das vantagens do CES, somente 5% das enzimas comercialmente importantes são produzidas por este método.

# IV – Produção de Enzimas

**.Cultivo em Estado Submerso ( CESm )** – o crescimento microbiano é realizado em suspensão no meio líquido.

**Permite um maior controle de :** pH, Temperatura, O<sub>2</sub> e concentração de nutrientes;

**Tipos de Cultivos em Estado Submerso ( CESm )** – Batelada; Batelada alimentada; Contínuo.

**Reator com capacidade para 5L.**



# IV – Produção de Enzimas

## . Microorganismo :

Para que a produção de enzimas tenha viabilidade econômica, é necessário que haja uma acentuada expressão de proteína, pelo microrganismo.

Selvagem -

- Microorganismo repressivo a glicose;
- Produz pouca quantidade de enzimas no meio;
- Não é viável do ponto de vista econômico;
- Não produz enzimas seletivas;

Modificado geneticamente -

- Normalmente não é repressivo a glicose;
- Seletivo na produção de enzimas;
- Alta capacidade de expressão de enzimas;
- Tem a capacidade de produzir enzimas com característica diferente de acordo com as alterações feito em seu gene;

# IV – Produção de Enzimas

## . Meio de Cultivo :

### - Composição :

- . Interação com as necessidades fisiológicas do microorganismo;
- . Insumos de baixo Custo;

### - Nutrientes:

- . Fonte de nitrogênio - É um dos mais importantes fatores que afetam diretamente a produção de enzimas, pois fazem parte dos distintos metabólicos produzidos pelo microorganismo;

#### . Principal fontes -

- Sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;
- Uréia;
- nitrato  $\text{NO}_3$ ;
- extrato de levedura;
- Milhocina;

# IV – Produção de Enzimas

Diferentes fontes de nitrogênio empregadas na produção de xilanases por *Chaetomium thermophilum* em meio contendo 1%(m/v) de palha de trigo como fonte de carbono (Katapodis et al., 2007)

Fonte de Nitrogênio	Xilanase (U/ml)
Extrato de levedura	37,20 +- 1,30
Milhocina	33,20 +- 1,50
Peptona de carne	32,60 +- 1,40
Uréia	19,60 +- 0,50
Fosfato de amônio	14,40+-0.30
Sulfato de amônio	13,80
Nitrato de sódio	39,10 +- 1,20
Nitrato de amônio	21,30 +- 0,70

# IV – Produção de Enzimas

## - Nutrientes : Fonte de carbono

Produção de enzimas extracelulares por mutante NTG III/6 de *Penicilium* em frascoagitados com o uso de diferentes fontes de celulose (Brown et. All., 1978)

Fonte de Carbono	CMCase (U./ml)	Xilanase (U./ml)	Beta glucosidase ( U/ml)	FPA (U/ml)	Proteína (mg/ml)
Polka floc (BW 40)	33,90	7,50	8,50	1,58	1,54
HMBS	21,94	8,09	8,95	1,20	
HMBS	21,27	8,36	8,30	1,20	1,91
Farelo de Trigo	3,64		8,50	80	1,20
Avicel PH101	39,90	8,36	11,96	1,34	1,40
Polka floc(BW 40) + HMBS	27,67	7,78	8,27	1,55	1,73
Polka floc(BW 40) + HMBS	36,40	7,28	11,19	1,86	1,82
Polka floc(BW 40) + F. Trigo	22,68	8,15	10,23	1,80	1,77
CMC	23,00	8,12	8,23	1,50	1,56

# IV – Produção de Enzimas

## . Fatores Físicos

### - pH

- . O comportamento das enzimas nos diferentes pHs está relacionado :
  - Com as ligações de substrato das enzimas;
  - O estado de ionização dos resíduos dos aminoácidos envolvidos na atividade catalítica;
  - A ionização do substrato;
  - A variação da estrutura das proteína.

Fungo	pH	Referências
<b>Chaetomium</b>		Ganju et al. (1989)
Xilanase I	4,8 – 6	
Xilanase II	5,4 – 6	
<b>Xilanase comercializadas pela NOVO</b>		Düsterhöft (1997)
Xilanase I	6 – 6,5	
Xilanase II	6 – 6,6	
<b>Melanocarpus albonryces</b>		Prabhu et al. (1999)
Xilanase I	6 – 6,5	
Xilanase II	6 – 6,6	
<b>Penicilium echinulatum</b>	4,0 -4,50	Dillon et al (2001)

pHs que proporcionam as melhores atividades das xilanases de diferentes origens

# IV – Produção de Enzimas

## . Fatores Físicos

### - Temperatura :

- . Interferem no desempenho das enzimas e na estabilidade;
- . Nem Sempre temperatura ótima de catálise e a ótima para a estabilidade;
- . A temperatura está relacionada com o tipo de substrato que a enzima foi induzida;

Fungo	Temperatura (°C)	Referência
<b>Endoglicnase</b>		
Humicola Isolens	50	Hayashida et al. (1980)
T. reesei QM 9414	38	Sriniva & Panda (1998)
<b>Beta-glicosidases</b>		
Penicillium purpurogenum	60	Hidalgo et. Al (1992)
T. Ressei	60-70	Chenet al. (1992)
<b>Xilanase</b>		
T. reesei	40 - 45	Tenkanen et al. (1992)
Aspergillus ochaceus	30 - 45	Biswas et. Al (1990)



# IV – Produção de Enzimas

## . Oxigênio diluído

Participa nas reações de síntese da molécula, para a sobrevivência das células e para o surgimento de novas células. Também no processo de proliferação da biomassa microbiana, para a qual é fundamental a introdução de energia.

Para ocorrer a oxidação de 1mol de glicose, é necessário o consumo de 6 mols de O<sub>2</sub> e o O<sub>2</sub> tem uma baixa solubilidade em água, e de 7mg/L a 35 °C.

Concentração de oxigênio diluído na saturação em diferentes condições

Temp (°C)	Conc. NaCl ( M )	P. Parc. O <sub>2</sub> ( atm )	Conc. O <sub>2</sub> sat. (mg/L)
25	-	0,209	8,10
35	-	0,209	6,99
25	-	1,0	40,30
25	0,5	1,0	34,20
25	2,0	1,0	22,70

# **PRODUCAO DE ENZIMAS PELO PROCESSO DE CULTIVO SUBMERGIDO**

# V – Procedimentos para a Produção de Enzimas industriais em Cultivo Submergido

## . Esterilização do equipamento e do meio

- O calor úmido é utilizado para a esterilização de frascos e reatores menores para a produção de inóculo



Frascos = erlenmeyer



reator

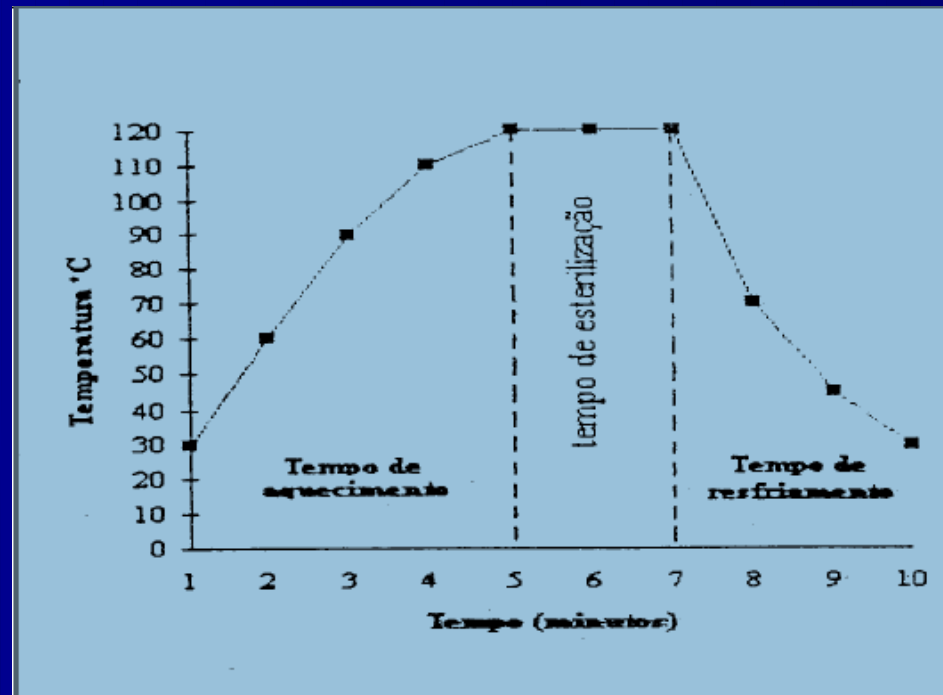


Autoclave – esterilização humida

# V – Procedimentos para a Produção de Enzimas industriais em Cultivo Submerso

## . Esterilização de equipamento e do meio

esterilização de um meio de cultura em autoclave a 121°C.



# V– Procedimentos para a Produção de Enzimas industriais em Cultivo Submerso

## . Produção de inoculo



Manutenção do fungo



Shaker – inoculo 1



Reator – inoculo

# V – Procedimentos para a Produção de Enzimas industriais em Cultivo Submerso

## . Produção : inoculo / Pré-inóculo / Enzimas

Pré inoculo

Inoculo 3



Reator Cap- 1m<sup>3</sup>

Reator Cap- 150L

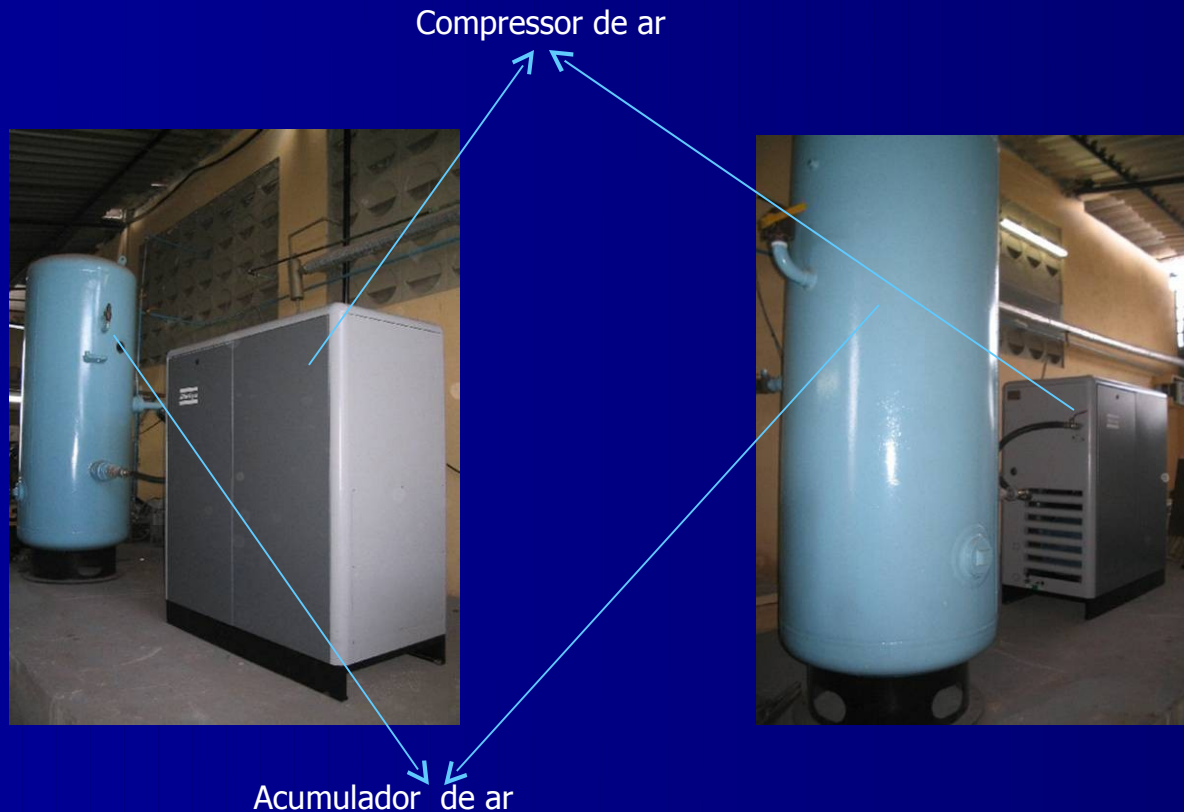
Fermentação  
Produção de enzimas



Reator Cap- 5m<sup>3</sup>

# V – Procedimentos para a Produção de Enzimas industriais em Cultivo Submerso

## . Sistema de ar:



# V – Procedimentos para a Produção de Enzimas industriais em Cultivo Submerso

## . Esterilização do ar e do meio para os reatores de fermentação

A esterilização do ar e do meio em reatores maiores realizada, por vapor direto por meio da filtração do ar. Que é usada filtro absoluto para reter os microorganismos contaminantes.

Tamanho do microorganismo

Díâmetro (micra - $\mu$ )	Microorganismo
10 $\mu$	Grandes esporos de Fungos e Grãos de Pólen
10 - 2.5 $\mu$	Grandes bactérias e Esporos de fungos
2.5 - 0.5 $\mu$	Bactérias menores e seus esporos
0.5 - 0.01 $\mu$	Vírus e componentes alergênicos de fungos e bactérias

Filtros coalescentes





# V – Procedimentos para a Produção de Enzimas industriais em Cultivo Submerso

## . Separação e Recuperação de enzimas

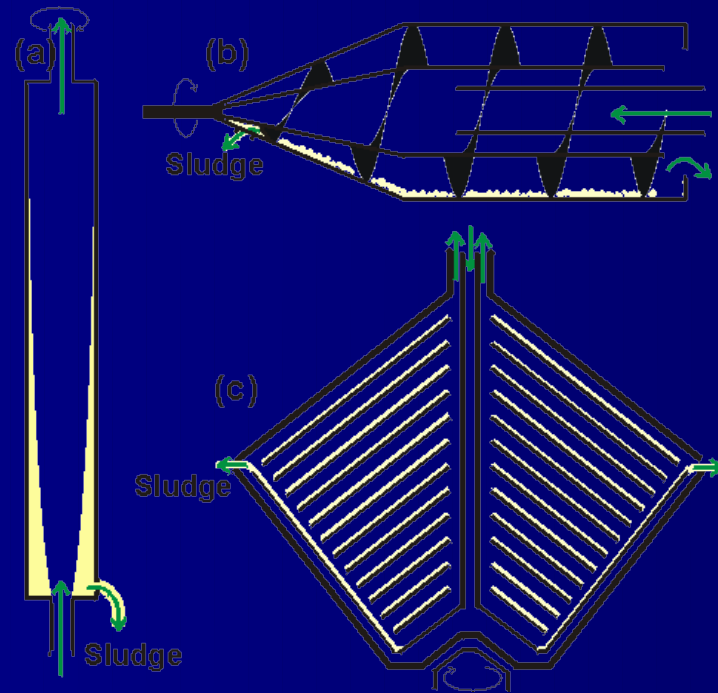
Filtro a vácuo



Filtro prensa



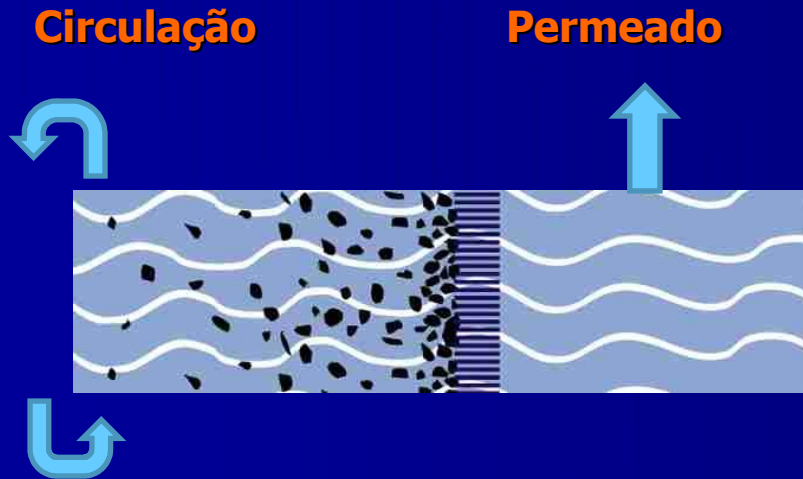
Sistema de centrifugação



# V – Procedimentos para a Produção de Enzimas industriais em Cultivo Submerso

## . Concentração de enzimas

### Sistema de Ultrafiltração



# V – Procedimentos para a Produção de Enzimas industriais em Cultivo Submerso

## . Controle de qualidade

### Observação microscópica



### Sistema de ultrafiltração

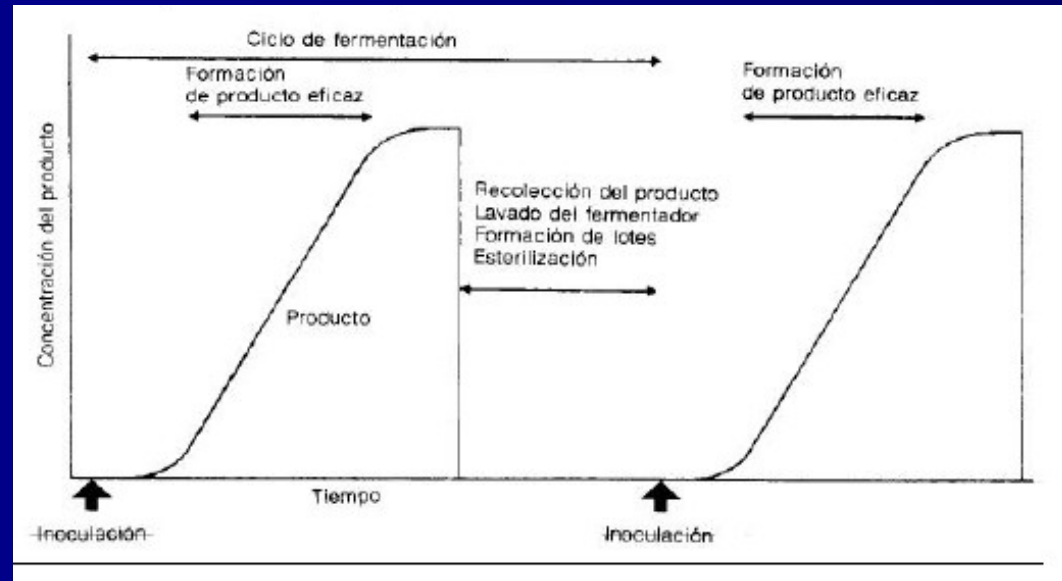


ilustração do ciclo de uma fermentação por batelada

**Obrigado pela atenção**