

Enzimas

A chave da biotecnologia

Beneficiando-se da evolução da biotecnologia, em particular da engenharia genética, as enzimas têm evoluído muito nas suas funcionalidades tecnológicas, convertendo-se em mais uma alternativa de ingrediente disponível para a indústria de alimentos.

ENZIMAS INDUSTRIAIS

As enzimas podem modificar e melhorar as propriedades funcionais, nutricionais e sensoriais de ingredientes e produtos e, portanto, encontram ampla aplicação no processamento e produção de todos os tipos de produtos alimentícios.

Na produção de alimentos, as enzimas oferecem várias vantagens. A primeira e mais importante é que as enzimas são usadas como alternativa à tecnologia tradicional baseada em produtos químicos, podendo substituir substâncias químicas sintéticas em uma ampla gama de processos. Isso permite vantagens no desempenho ambiental dos processos, diminuindo os

níveis de consumo de energia e a biodegradabilidade dos produtos. Além disso, como as enzimas são mais específicas em sua ação do que os reagentes químicos, os processos catalisados por enzimas apresentam menos reações colaterais e subprodutos (produtos residuais). O resultado são produtos de maior qualidade e menos poluição. As enzimas podem catalisar reações sob condições muito suaves, permitindo condições de processamento que não destroem atributos valiosos dos alimentos e dos seus componentes.

A indústria de enzimas como a conhecemos hoje é o resultado de um rápido desenvolvimento

visto principalmente nas últimas quatro décadas, graças a evolução da biotecnologia moderna. As enzimas encontradas na natureza têm sido usadas desde a Antiguidade na fabricação de produtos alimentícios. Esses processos dependiam de enzimas produzidas por microorganismos de crescimento espontâneo ou enzimas presentes em preparações adicionadas, como rúmen de bezerros ou mamão. As enzimas nunca foram, portanto, usadas em nenhuma forma pura ou bem caracterizada.

O desenvolvimento de processos de fermentação durante a última parte do século passado, visando especificamente a produção de





enzimas por meio de cepas de produção selecionadas, tornou possível a fabricação de enzimas com preparações purificadas e bem caracterizadas, inclusive em larga escala. Esse desenvolvimento permitiu a introdução de enzimas nos mais variados processos industriais.

O uso de tecnologia de genes recombinantes melhorou ainda mais os processos de fabricação e possibilitou a comercialização de enzimas que antes não podiam ser produzidas. Além disso, os últimos avanços na biotecnologia moderna, introduzindo a engenharia de proteínas e a evolução dirigida, revolucionaram ainda mais o desenvolvimento de enzimas industriais. Esses avanços tornaram possível fornecer enzimas sob medida, exibindo novas atividades adaptadas as novas condições de processo, permitindo uma expansão adicional do seu uso industrial. **O resultado disso é uma indústria altamente diversificada que ainda está crescendo em termos de tamanho e complexidade.**

A indústria alimentícia utiliza mais de 55 produtos enzimáticos diferentes no processamento de alimentos. Esse número aumenta à medida que se descobrem novos métodos de como aproveitar a extraordinária diversidade do mundo microbiano e obter novas enzimas que são importantes no processamento de alimentos.

A maioria das enzimas industriais utilizadas atualmente são de ação hidrolítica, sendo utilizadas para a degradação de várias substâncias naturais. As proteases continuam a ser o tipo de enzima dominante, devido ao seu extensivo uso na indústria de laticínios. Várias carboidrases, principalmente amilases e celulases, usadas nas indústrias de amido e de panificação representam o segundo maior grupo.

A BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

A biotecnologia é definida como qualquer aplicação tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para fabricar ou modificar produtos ou processos para uso específico.

Os ingredientes alimentícios são substâncias utilizadas para aumentar o valor nutricional, alterar a consistência e melhorar o sabor. **A biotecnologia aplicada ao processamento de alimentos faz uso de inoculantes microbianos para melhorar propriedades como sabor, aroma, prazo de validade, textura e valor nutricional dos alimentos.** O processo pelo qual os microorganismos e suas enzimas provocam essas mudanças desejáveis nos materiais alimentícios é conhecido como fermentação. O processo de

fermentação também é amplamente aplicado na produção de culturas microbianas, enzimas, sabores, fragrâncias, aditivos alimentícios e uma variedade de outros produtos de alto valor agregado.

As enzimas são catalisadores biológicos usados para facilitar e acelerar reações metabólicas em organismos vivos. São proteínas e requerem um substrato específico para sua atividade. As suas condições de catalisação estão dentro de limites estreitos e temperatura ótima, condições de pH e concentração de oxigênio. A maioria das enzimas é desnaturada a temperaturas acima de 42°C. No entanto, algumas enzimas bacterianas são tolerantes a um intervalo de temperatura mais amplo.

Hoje, bactérias e fungos são explorados e utilizados para a produção comercial de uma diversidade de enzimas. Várias cepas de microorganismos foram selecionadas ou geneticamente modificadas para ampliar a eficiência com a qual se produzem enzimas. Na maioria dos casos, os genes modificados são de origem microbiana, embora também possam ser de diferentes reinos. Por exemplo, o DNA que codifica a quimosina, uma enzima encontrada no estômago dos bezerros, que gera a coalhada do leite durante a produção de queijo, foi clonada com sucesso

em leveduras (*Kluyveromyces lactis*), bactérias (*Escherichia coli*) e fungos (*Aspergillus niger*). A quimosina produzida por esses microorganismos recombinantes é atualmente produzida comercialmente e amplamente utilizada na fabricação de queijos.

A produção industrial de enzimas por microorganismos envolve o cultivo de microorganismos em

A evolução dirigida é um dos principais métodos atualmente utilizados pela engenharia de proteínas. Esta técnica envolve a criação de um grande número de novas variantes enzimáticas por mutação genética aleatória e, subsequentemente, a sua seleção para identificar as variantes melhoradas. Este processo é realizado repetidamente, imitando, assim, os processos naturais de evolução.

uso desses produtos especializados.

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) estão desempenhando papéis cada vez mais importantes no processamento de alimentos. A criação de OGMs



enormes tanques, onde as enzimas são secretadas no meio fermentativo como metabólitos da atividade microbiana. As enzimas assim produzidas são extraídas, purificadas e utilizadas como auxiliares de processamento na indústria alimentícia e para várias outras aplicações. As enzimas purificadas são isentas de células e não contêm outras macromoléculas, como o DNA.

As tecnologias genéticas não apenas melhoraram a eficiência com a qual as enzimas podem ser produzidas, mas aumentaram sua disponibilidade, reduziram seus custos e melhoraram sua qualidade. Além disso, através da engenharia de proteínas, é possível gerar novas enzimas com estruturas modificadas que conferem novas propriedades desejadas, como melhor atividade ou estabilidade térmica ou, ainda, a capacidade de trabalhar em um novo substrato ou em um pH mais alto.

ENGENHARIA GENÉTICA MELHORANDO A QUALIDADE

O uso de enzimas em aplicações alimentícias existe há séculos. Alguns dos primeiros exemplos foram o uso de enzimas que ocorrem naturalmente no substrato fonte, como a α -amilase, que está naturalmente presente nos grãos usados para a fabricação de cerveja. As enzimas também foram extraídas de fontes vegetais e animais e, mais tarde, produzidas microbialmente, onde eram os produtos naturais da cultura microbiana. Hoje, a maioria das enzimas ainda é produzida microbialmente; no entanto, muitas das enzimas não são mais enzimas nativas, mas versões projetadas. A engenharia de proteínas permite que as propriedades da enzima sejam otimizadas para uso específico. Atualmente, muitas das suas aplicações só são possíveis com o

envolve o uso de tecnologias de DNA recombinante, algumas vezes chamados de engenharia genética, modificação/manipulação genética ou processamento de genes.

A tecnologia de DNA recombinante é considerada como um dos maiores avanços do século XX e estabelece as bases para a biotecnologia moderna, englobando engenharia de proteínas, engenharia celular e engenharia metabólica. Usando esta tecnologia, pode-se clonar um único gene para facilitar a produção do produto gênico, que pode ser uma proteína ou uma enzima; reorganizar vários genes em um estado de fusão para bioconversões eficientes; manipular os genes das vias metabólicas de um organismo para produzir, de forma

eficiente, um produto específico; e criar células clonadas que podem ser cultivadas. Uma vez isolado, o gene pode ser alterado ou modificado por vários métodos, a fim de “sintonizar” a proteína que codifica, dando-lhe propriedades mais desejáveis. Alternativamente, um gene pode ser dividido aleatoriamente e recombinado para gerar uma mistura de genes, que contém versões

realizado no DNA do genoma com informação de sequência genética parcial conhecida.

Além do organismo doador, um fator elementar é o organismo hospedeiro. Um hospedeiro é o organismo no qual o gene alvo pode ser replicado, transcrito e posteriormente traduzido no produto de interesse. Na maioria dos casos, o organismo hospedeiro é escolhido

mais vulgarmente utilizado é o DNA plasmídico circular de dupla hélice fechado. Geralmente, contém uma região para replicação e tipicamente alguns genes resistentes a antibióticos como marcadores de seleção e múltiplos locais de restrição para emenda e junção com genes alvo; pode-se também utilizar um cosmídeo (moléculas de DNA circulares extracromossomais que combinam as vantagens de um plasmídeo com a de um bacteriófago). Um vetor de transporte possui a característica de funcionar em múltiplos hospedeiros de diferentes gêneros.

Um gene alvo pode ser isolado do organismo doador por clonagem *shotgun* (método usado para sequenciamento de fitas longas de DNA) ou usando *primers* projetados a partir de sequências conhecidas do gene alvo. Essas sequências podem ser deduzidas a partir de sequências de aminoácidos N-terminal (amino-terminal) ou internas da proteína correspondente. Um gene alvo pode também ser sintetizado com base no conhecimento das sequências conhecidas.

A descoberta de um grupo de enzimas (endonucleases ou enzimas de restrição) que clivam ou emendam moléculas de DNA de hélice dupla marcou o início da tecnologia do DNA recombinante.

As enzimas de restrição são necessárias porque podem clivar moléculas de DNA em locais específicos, produzindo extremidades coesivas ou extremidades ceegas, dependendo do padrão de ação da enzima. As moléculas de DNA podem ser reunidas por uma ligase, que é capaz de ligar segmentos de genes diferentes com sequências complementares em conjunto, por exemplo, para ligar o gene alvo isolado a transportadores plasmídicos.

Outra enzima importante na manipulação do DNA é a polimerase, usada na amplificação de moléculas de DNA por uma reação em cadeia da polimerase (PCR). As moléculas de DNA de cadeia dupla iniciais são desnaturadas pela primeira vez pelo calor para moléculas de DNA de



alteradas ou mutantes do gene original. Essa mistura de genes pode, então, ser rastreada ou selecionada para produtos alvo com as propriedades desejadas.

A tecnologia de DNA recombinante envolve o isolamento de um gene alvo, conectando-o a um portador, transformando-o em outro organismo e usando esse organismo para propagar o produto gênico; esse processo também é chamado de “clonagem”.

O organismo doador, ou seja, o organismo que fornece o gene de interesse, pode ser derivado de fontes de mamíferos, plantas ou, na maioria dos casos, de microorganismos. A escolha de um doador adequado depende dos requisitos específicos para a propriedade do produto gênico, podendo ser encontrado através de processo de rastreio concebido para localizar o gene de interesse ou através de processo de correspondência de DNA

devido a sua fácil reprodução. Pode ser células de mamíferos, células vegetais ou um sistema de insetos. A escolha do organismo hospedeiro correto é muito importante para a expressão bem-sucedida de um gene alvo. Embora, infelizmente, não existam regras definidas a esse respeito, tem sido geralmente estabelecido que a expressão gênica homóloga, ou seja, genes de uma origem expressa no mesmo organismo ou intimamente relacionado, é a melhor escolha. No entanto, um vasto número de expressões heterólogas obtidas na bactéria *E. coli* suportam a conclusão de que é um hospedeiro bastante universal. A escolha de um hospedeiro não pode ser separada da escolha de um vetor.

O vetor é o transportador, ou seja, é capaz de transportar o gene alvo e replicá-lo nas células hospedeiras correspondentes, tendo a propriedade de se integrar no cromossomo do hospedeiro. O vetor



filamento único, que servem como moldes. Iniciadores com sequências complementares são emparelhados ao DNA molde na presença das unidades construtoras da molécula de DNA, isto é, trifosfatos de desoxinucleósidos de quatro tipos e outros elementos necessários, tais como tampões e íons; a reação enzimática é realizada repetidamente através de ciclos de recozimento desnaturante com uma quantidade aumentada de moléculas de DNA após cada ciclo. As polimerases são enzimas estáveis a altas temperaturas ($> 90^{\circ}\text{C}$), permitindo que a reação seja realizada automaticamente através de um termociclador, sem a necessidade de adicionar mais enzimas ao longo dos ciclos. O desenvolvimento da PCR tornou o processo de clonagem mais preciso e eficiente.

A introdução de moléculas de DNA recombinante em células hospedeiras pode ser feita, atualmente, através de três métodos. O primeiro é usar células competentes de *E. coli*. As células hospedeiras são cultivadas e tratadas com cloreto de cálcio, o que permite que as células absorvam DNA estranho

a uma frequência de tipicamente 10^7 - 10^9 colônias por grama de DNA plasmidial superenrolado (molécula de DNA bicatenário que está retorcida ou sofre giros sobre si mesma, de tal modo que o eixo da dupla hélice própria do DNA não segue uma curva plana, mas que forma outra hélice, uma super-hélice).

Outro método envolve expor as células e moléculas de DNA a um campo elétrico (eletroporação). Este método é usado em DNA transformador em bactérias e células eucarióticas com frequência típica de 10^9 - 10^{10} colônias por grama de DNA com bactérias.

O terceiro método envolve o uso de células de protoplasto, geradas pelo tratamento de células com polietilenoglicol ou sacarose e lisozima, permitindo que as células absorvam DNA estranho a uma frequência mais baixa de 10^6 - 10^7 colônias por grama de DNA plasmidial superenrolado. A frequência de transformação depende do estado das células e das condições de tratamento.

Uma vez que um DNA recombinante é introduzido na célula hospedeira, as células são cultivadas

e colocadas em placas de ágar, frequentemente contendo produtos químicos, como antibióticos, para facilitar a seleção de clones recombinantes. Colônias com o gene necessário podem ser rastreadas, selecionadas ou confirmadas pelo ensaio de atividades enzimáticas, detecção de proteínas com anticorpos ou hibridização *in situ* com sondas derivadas de sequências de DNA conhecidas.

Uma vez que um DNA recombinante é introduzido na célula hospedeira e o organismo

recombinante isolado, são necessárias tecnologias de fermentação ou de cultura celular para a expressão ótima do gene clonado. A compreensão do metabolismo do organismo recombinante ou sistema celular e as características dos elementos reguladores, tais como promotores de genes e reguladores, são essenciais. Técnicas tradicionais para o cultivo de um organismo sob ótimas condições de produção também são aplicáveis.

A tecnologia de DNA recombinante provou ser uma ferramenta poderosa na produção eficiente de uma enzima alvo. As práticas de tecnologia evidentemente trouxeram méritos na redução das necessidades de energia e matérias-primas usadas na fabricação de enzimas, reduzindo assim os custos de produção. Como resultado, enzimas usadas como biocatalizadores tornaram-se facilmente disponíveis e isso, por sua vez, facilita a aplicação de enzimas em várias indústrias. No entanto, além do fator custo e disponibilidade, outros problemas com enzimas são encontrados. Originadas de formas vivas, as enzimas geralmente só funcionam

em substratos específicos sob condições específicas, o que nem sempre se ajusta a real situação da indústria; por exemplo, uma enzima muitas vezes não é robusta o suficiente, ou seja, não funciona nas condições de pH exigidos ou perde sua funcionalidade facilmente a uma temperatura elevada, pH extremo ou quando em contato com solventes. Às vezes, uma reação não funciona bem simplesmente porque a enzima não é o candidato certo, o que significa que não pode reconhecer o substrato de maneira eficiente ou a velocidade de reação está muito baixa. Para resolver esses problemas, uma alternativa é rastrear recursos naturais de microorganismos até que a enzima certa seja encontrada. Neste caso, é necessária uma variedade de recursos microbianos confiáveis e condições adequadas de cultivo. Outra opção é tentar modificar o que já está à mão para melhorar as suas propriedades, processo chamado de "engenharia de proteínas". Devido às características específicas das enzimas não é possível manipular livremente uma

proteína em seu estado conformacional ou sua estrutura primária sem perder as funções físicas. Entretanto, graças as tecnologias de DNA recombinante, a modificação de uma proteína ou enzima pode ser feita à nível genético. O gene que codifica a proteína pode ser alterado de tal forma que um aminoácido ou ácidos específicos sejam trocados por outros aminoácidos. Alternativamente, novos aminoácidos podem ser inseridos ou excluídos. O gene alterado é expresso em um hospedeiro adequado e os portadores mutantes do gene modificado podem ser rastreados ou selecionados para propriedades adequadas.

A escolha de estratégias e métodos para obter uma enzima com as propriedades desejadas depende de quanto se sabe sobre a proteína existente e qual propriedade alvo é requerida. Se uma enzima foi purificada, sua informação estrutural foi obtida (através de cristalografia de raios X ou RMN) e o sítio ativo foi claramente entendido, pode-se postular precisamente quais aminoácidos são cruciais para realizar

as reações catalíticas ou manter a enzima estável. Nesse caso, os métodos de mutagênese racional são melhor empregados, sendo os mais comumente usados também chamados de mutagênese dirigida, incluindo saturação e mutagênese. Por outro lado, se a estrutura terciária de uma enzima não tiver sido determinada, os métodos de mutagênese aleatória são a única escolha.

O uso de técnicas de engenharia genética para melhorar a eficiência e a qualidade da produção e desenvolver novos produtos apresenta claras vantagens para a indústria e para os consumidores, com grandes melhorias na produção de enzimas, gerando melhores produtos e processos.

PRINCIPAIS ENZIMAS MICROBIANAS APLICADAS NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

A aplicação de microorganismos, como bactérias, leveduras e principalmente fungos, pela indústria alimentícia levou a uma indústria de alimentos altamente diversificada, com ativos econômicos relevantes. As enzimas que decompõem moléculas complexas em unidades menores, como carboidratos em açúcares, são substâncias naturais envolvidas em todos os processos bioquímicos. Devido às especificidades das enzimas, cada substrato possui uma enzima correspondente.

Embora plantas, fungos, bactérias e leveduras produzam a maioria das enzimas, as produzidas por fontes microbianas são mais vantajosas do que seus equivalentes de origem animal ou vegetal. As vantagens incluem menores custos de produção, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, ampla gama de características físicas e químicas, possibilidade de manipulação genética, ausência de efeitos provocados pela sazonalidade, rápido desenvolvimento de cultura e uso de métodos não one-



rosos. Tais características tornam as enzimas microbianas biocatalizadores adequados para várias aplicações industriais.

As enzimas microbianas desempenham papel significativo em diferentes processos alimentícios, devido a facilidade de produção e disponibilidade. São usadas principalmente pela indústria alimentícia para otimizar o processo, melhorar a eficiência, qualidade, prazo de validade e, o mais importante, para alcançar as características organolépticas desejadas do produto final. Enquanto lactase, lipase, protease, transglutaminase, asparaginase e pectinase são amplamente empregadas para remover a lactose, amadurecer o queijo, amaciar a carne, minimizar a formação e a clarificação da acrilamida, outras enzimas como fitase, lacase, complexo de xilanase e celulase estão ganhando importância em várias tecnologias de processamento de alimentos para melhorar a biodisponibilidade de minerais, minimizar odores, estabilizar bebidas e na produção de nutracêuticos.

As enzimas auxiliam nas reações de catalisação e aceleração, podendo ser obtidas de diferentes fontes, ou seja, animais, plantas e microorganismos; não são tóxicas e podem ser inativadas uma vez que a reação desejada tenha sido completada. A inativação enzimática previne mudanças desfavoráveis (aparência e propriedades organolépticas) no produto final, já que a atividade enzimática contínua é evitada.

Em geral, as enzimas são utilizadas para três finalidades, como aditivo, como ingrediente e para favorecimento de processos relacionados a laticínios, carnes, panificação, bebidas fermentadas e sucos.

A indústria de processamento de alimentos usa cerca de 29% do total de enzimas produzidas, sendo que 58% dessas enzimas são obtidas de fungos e 28% e 5% de bactérias e leveduras, respectivamente.

Os produtos lácteos represen-

tam uma área ampla na indústria de alimentos, que produz uma grande variedade de produtos, como leite, queijo, manteiga, sorvete e iogurte, e onde a principal função das enzimas microbianas é melhorar o processo ou característica dos produtos finais, tais como sabor, cor, consistência, composição, aparência e estrutura.

Um dos principais focos da indústria de laticínios é o desenvolvimento de produtos sem lactose. O índice de intolerância à lactose varia de acordo com a origem étnica; 5% entre norte-europeus, norte-americanos e australasianos (habitantes da região que inclui a Austrália, a Nova Zelândia, a Nova Guiné e algumas ilhas menores da parte oriental da Indonésia), cerca de 17% britânicos e mais de 50% na América do Sul, África e Ásia. Os produtos isentos ou com baixa lactose permitem que pessoas intolerantes consumam leite fermentado com baixo teor de lactose, sorvetes e bebidas lácteas. A lactose é removida por hidrólise parcial pela β -amilase ou hidrólise completa pela lactase. A enzima lactase hidrolisa a ligação glicosídica, resultando na

união do hidrogênio no oxigênio e do carbono OH- livre, obtendo glicose e galactose.

Entre outras enzimas, as proteases ácidas, como a quimosina, são empregadas como coagulantes na fabricação de queijos. A quimosina representa cerca de 20% a 30% dos coagulantes do leite usados em todo o mundo. As proteínases favorecem o amadurecimento do queijo, acelerando a hidrólise de proteínas, que é o evento bioquímico mais importante nesse estágio e tem alto impacto na textura e no sabor. Adicionalmente, as peptidases são usadas para remover o amargor produzido pelas proteínases durante o amadurecimento. As transglutaminases ajudam na ligação cruzada de ligações peptídicas e aumentam as propriedades funcionais dos produtos lácteos. As lipases são utilizadas para o desenvolvimento de sabores característicos. Estas enzimas hidrolisam os ácidos graxos de cadeia curta, diminuindo a formação de ácidos graxos *trans* e obtendo cerca de 15 a 30 vezes mais sabor do que o processo tradicional.



Os tipos de queijo dependem do processo de maturação, o que confere textura e aroma característicos. No amadurecimento, as lipases desempenham papel importante na hidrólise de triglicérides, diglicérides, monoglicérides, ácidos graxos e glicerol para ácidos graxos livres, responsáveis pelo desenvolvimento característico do sabor. O processo de amadurecimento com lipases é cerca de duas a cinco vezes mais rápido. No entanto, é importante otimizar a quantidade de enzima adicionada e sua atividade enzimática, pois altos níveis de lipase podem levar a rancidez e redução no rendimento.

Os produtos cárneos são uma importante fonte de proteínas alimentares e também de minerais e vitaminas. A melhora das características organolépticas é um enorme desafio para a indústria da carne. O amaciamento da carne pelo uso de enzimas proteolíticas ajuda a evitar o uso de produtos químicos e salmouras. Embora a transglutaminase seja amplamente utilizada, a papaína e a ficina também encontram aplicação nessa área. Esta enzima

também é usada no processamento de alimentos para aumentar o valor nutricional, pois pode adicionar aminoácidos essenciais em matrizes de proteínas. Além disso, ajuda na ligação de pequenos pedaços de carne, criando peças maiores; melhora a textura, a firmeza e a elasticidade; emulsifica e homogeneiza os produtos cárneos, como as salsichas, levando a uma maior qualidade e a mais variedades. Também permite o uso de matérias-primas de baixa qualidade, como o colágeno, aumentando seu valor nutricional ao suplementar com aminoácidos deficientes. Juntamente com as proteases, a termolisina é utilizada para produzir proteína alimentar e acelerar o amadurecimento de salsichas secas.

As principais características dos produtos de panificação são suavidade, frescor e cobertura crocante no pão. Além de compensar as variações na farinha, as enzimas microbianas são importantes para melhorar o sabor e contribuem para mais de um quarto do mercado mundial de panificação. As lipoxigenases embranquecem a farinha e

forneem propriedades viscoelásticas à massa, enquanto a α -amilase, a lacase, a xilanase, a protease e as lipases aumentam a elasticidade e qualidade da massa, através da formação de uma estrutura homogênea e fina. Além disso, proporciona cor, miolo, maciez, frescura, prazo de validade, maior volume e menor sabor aos produtos finais.

A reação de Maillard pode gerar descoloração durante o cozimento, mas o uso de glicose oxidase previne essas mudanças desfavoráveis e ainda reduz o tempo de fermentação. Açúcares juntamente com asparagina contida na farinha produzem acrilamida através da reação de Maillard. A asparaginase inibe a formação de acrilamida durante o cozimento pela hidrólise da asparagina livre em ácido aspártico, o que não favorece a reação de Maillard. A concentração de acrilamida diminuiu em 95% sem afetar as características sensoriais dos produtos finais.

Por outro lado, as fitases são utilizadas para aumentar o volume e melhorar a textura do pão. Além disso, reduzem o conteúdo de fitatos nos pães, bem como o tempo de fermentação da massa sem afetar o pH, a viscosidade e a mastigabilidade. As proteases de sulfidril também melhoram a elasticidade e a firmeza da massa, bem como as propriedades viscoelásticas, a retenção de gás e as propriedades termofixas dos produtos de panificação. As transglutaminases também aumentam a elasticidade e o volume (aumento de 14% em relação aos métodos tradicionais). A transglutaminase é usada em conjunto com a lacase para a obtenção de pães sem glúten. Enfim, o uso de enzimas melhora significativamente o prazo de validade e reduz o endurecimento do pão.

Em bebidas fermentadas, como o vinho e a cerveja, as principais preocupações são a otimização do processo, a melhoria do rendimento e a manutenção ou aprimoramento de cor e sabor. As enzimas contribuem com esses fatores e



também reduzem as calorias da cerveja e os níveis de enxofre, além de melhorarem a clareza do vinho. Especificamente, as proteases sulfidrilas aumentam a clareza; e o acetolactato descarboxilase remove o odor da manteiga na cerveja, causada pela presença de diacetil como produto de fermentação. As β -glucanases são utilizadas para reduzir a viscosidade da cerveja; e as pectinases desempenham papel importante no vinho e na cerveja, facilitando as etapas de extração e filtração, melhorando o rendimento do suco, o sabor, o odor e o processo de clarificação. Embora as pectinases com baixa atividade estejam naturalmente presentes nos sucos de frutas e vegetais, as enzimas microbianas são utilizadas, principalmente, devido a sua estabilidade e resistência as condições de fermentação.

No caso de bebidas aromatizadas, como suco de frutas e verduras, os pontos cruciais de fabricação estão relacionados à estabilidade, qualidade, clarificação, viscosidade e rendimento durante a elaboração, qualidade críticas para a aceitação do consumidor.

O primeiro passo na elaboração do suco é a maceração de frutas e vegetais e as enzimas empregadas nesse processo são as pectinases, as celulases e as hemicelulases, também conhecidas como enzimas de maceração, as quais catalisam a degradação de heteropolissacarídeos, como celulose e pectina, em açúcares simples e, assim, aumentam o rendimento. Além do seu uso na extração de suco, as celulases aumentam a estabilidade e a textura, diminuindo a viscosidade em néctares e purês. Já as pectinases ajudam a manter a estabilidade da mistura, diminuindo a viscosidade e a turbidez de néctares e polpas. As lacases são amplamente empregadas na produção de sucos para diminuir o sabor proveniente de compostos fenólicos e para aumentar a estabilização das bebidas. As peroxidases também são empregadas para eliminar cores e sabores

indesejados. As transglutaminases ajudam a manter a vida útil e a frescura por mais tempo, facilitando o desenvolvimento de filmes proteicos que atua como uma barreira em frutas e legumes. Outra enzima importante é a naringinase, que remove o amargor do suco cítrico, além de possuir propriedades antioxidantes e manter a estabilidade e as características organolépticas do produto.

Atualmente, o valor nutricional dos produtos alimentícios é uma característica muito importante para os consumidores. Enzimas como a α -galactosidase e as fitases são usadas como melhoradores alimentícios, especialmente em produtos originários de leguminosas e cereais.

O fitato é bem conhecido por seu caráter antinutriente por meio de quelação de cátions bivalentes e multivalentes e por sua ligação com proteínas carregadas positivamente e, com isso, reduz a biodisponibilidade desses nutrientes. A fitase ajuda na desfosforilação eficiente do fitato, liberando minerais e, assim, aumentando sua biodisponibilidade e nutrição.

Os adoçantes representam uma grande área de oportunidade para as enzimas; amilases e glucoamilases catalisam a hidrólise do amido com uma taxa de conversão de cerca de 95%. As invertases auxiliam na redução da intensidade de doçura e a termolisina é empregada na produção de aspartame.

Os alimentos hipoalergênicos oferecem outra área potencial de desenvolvimento de mercado. Alimentos como trigo, amendoim, soja, grão de bico, leite e ovos possuem proteínas antigênicas que podem causar reações alérgicas. As enzimas mais específicas e eficientes, como as proteases, actinase, alcalase e neutrase ajudam a reduzir os alérgenos, proporcionando benefícios para a saúde.

Outra aplicação das enzimas na indústria de alimentos está no monitoramento dos parâmetros de qualidade de processos. O uso de

enzimas como biossensores ajuda na monitoração e detecção dos compostos alvo, combinando fortemente elementos de reconhecimento biológico e transdutores físicos. O primeiro biossensor foi desenvolvido em 1962, mas somente em 1967 foi relatado o primeiro biossensor enzimático baseado em glicose oxidase, usado para monitorar a fermentação de vinho e cerveja. Existem outros biossensores enzimáticos destinados a determinação de frutose, lactose, ácido láctico, ácido málico e ácido acético.

Os nutracêuticos, substâncias ou parte de alimentos que proporcionam benefícios à saúde, ganharam importância mundial. A potencial aplicação de diferentes enzimas para a produção de nutracêuticos é um vasto campo de exploração. O xilooligossacarídeo é um nutracêutico produzido da biomassa lignocelulósica, usado como adoçante artificial. A xilanase é empregada para extrair xilana (hemicelulose) e obter xilooligossacarídeo. A β -galactosidase é usada para hidrolisar a lactose a fim de obter oligossacarídeos de leite, que são benéficos para melhorar o sistema de defesa em bebês.

As enzimas também podem contribuir para manter a segurança e o prazo de validade dos alimentos, controlando as populações microbianas. A lisozima, por exemplo, é um agente antimicrobiano natural empregado em alimentos, uma vez que previne o crescimento de bactérias gram-positivas em queijos e aumenta o controle de deterioração em vinhos, cervejas, carnes etc., além de prolongar a vida útil. O uso de enzimas, como a glicose oxidase, como antioxidante também ajuda a aumentar o prazo de validade dos alimentos. Podem ser usadas para remover oxigênio e espécies reativas de oxigênio, reduzindo, assim, os hidroperóxidos lipídicos. Outra enzima envolvida na conservação de alimentos é a transglutaminase, eficiente na conservação de carnes e na prevenção da sua contaminação.

