

ENZIMAS: NATUREZA E AÇÃO NOS ALIMENTOS

Enzimas são proteínas produzidas por todos os organismos vivos. Elas aceleram as reações químicas de forma seletiva como parte do processo essencial da vida, tais como digestão, respiração, metabolismo e manutenção de tecidos. Em outras palavras, são catalisadores biológicos altamente específicos. As enzimas agem sob condições mais ou menos moderadas, o que as tornam catalisadores ideais para utilização na tecnologia de alimentos, em que o fabricante pretenda modificar seletivamente matérias-primas alimentícias, sem destruir os nutrientes essenciais. O uso histórico das enzimas na fabricação de cerveja, vinho, queijo e pão são exemplos da exploração industrial do poder e seletividade das enzimas. As enzimas foram e continuam sendo essenciais para o fornecimento de substratos de fermentação (cerveja e pão), desenvolvimento de sabor e aroma (vinho) ou criação da própria estrutura da produção (queijo).

INTRODUÇÃO E HISTÓRIA

Em todas as células vivas ocorrem ininterruptamente reações que, devido à sua grande complexidade, deveriam ser muito lentas nas temperaturas em que essas reações se processam (ao redor de 37°C). No entanto, essas reações são muito rápidas, o que leva à conclusão de que existem nas células vivas substâncias catalisadoras que diferem dos catalisadores inorgânicos pelo fato de serem substâncias muito mais complexas, formadas pelo organismo vivo. Essas substâncias são denominadas enzimas e podem ser definidas de um modo geral como substâncias orgânicas, formadas no interior das células vivas, mas capazes de agir também fora das células. São fatores importantes na tecnologia de ali-

mentos pelo papel que desempenham no seu processamento e deterioração.

A história moderna das enzimas vem desde 1833 quando, no periódico *Annales de Chimie et de Physique*, os químicos franceses Anselme Payen e Jean-François Persoz isolaram uma substância de um extrato de malte que catalisava a transformação do amido em glicose. Batizaram esta substância de “diastase” (do grego “separar”) porque separava os blocos de amido em unidades individuais de glicose. É a primeira vez que foi isolado uma enzima, um composto orgânico que apresentava as propriedades de um catalisador. O sufixo *ase* de diastase passou a ser usado para designar as enzimas.

Em 1835 o sueco Jöns Jacob Berzelius demonstrou que o amido pode ser mais efi-



cientemente decomposto usando-se extrato de malte preferencialmente ao ácido sulfúrico e cunhou o termo catálise.

Em 1836, ao investigar processos digestivos, o fisiologista alemão Theodor Schwann isolou uma substância responsável pela digestão albuminosa no estômago e denominou-a pepsina, a primeira enzima preparada a partir de tecido animal. Theodor Schwann foi o fundador da teoria da moderna histologia, definindo a célula como a unidade básica do animal.

Em 1839 o eminente químico alemão Justus von Liebig desenvolveu uma explicação mecanística para o papel da levedura no processo de fermentação. Ele via a levedura presente na mistura de fermentação como uma matéria em decomposição que emitia certas vibrações: ... os átomos de açúcar sofrem um deslocamento; eles se rearrumam de uma tal maneira a formar álcool e dióxido de carbono. Por

outro lado, fermentação alcoólica era considerada como sendo uma reação espontânea até 1858, quando o químico e biólogo francês Louis Pasteur provou numa série de publicações que a fermentação ocorre apenas na presença de células vivas - um fenômeno correlacionado com a vida - um ato fisiológico, conforme ele o chamou. Esta divergência no entendimento da natureza da levedura no processo de fermentação causou um caloroso debate entre Liebig e Pasteur. Liebig morreu em 1873 e Pasteur em 1895 sem que o debate fosse concluído. Subseqüentemente, contudo, os químicos alemães Eduard Buchner e Hans Buchner descobriram em 1897 que um extrato de levedura livre de células poderia causar fermentação alcoólica. O antigo quebra-cabeças foi solucionado; a célula de levedura produz a enzima, e a enzima provoca a fermentação. A controvérsia Liebig-Pasteur foi assim finalmente

liquidada, Hans e Eduard Buchner colocando a pedra fundamental da bioquímica moderna demonstrando que o extrato de levedura livre de células podia converter glicose em etanol e dióxido de carbono exatamente como células de levedura vivas. Em outras palavras, a conversão não era atribuível a células de levedura como tais, mas as suas enzimas não viáveis.

Em 1878, o fisiologista alemão Wilhelm Kühne empregou pela primeira vez o termo “enzima” para descrever este fermento, usando a palavra grega *ενζυμων*, que significa “levedar”. O termo passou a ser mais tarde usado apenas para as proteínas com capacidade catalítica, enquanto que o termo “fermento” se referia à atividade exercida por organismos vivos.

O químico dinamarquês Johan Kjeldahl, que foi chefe do Departamento de Química no Laboratório Carlsberg em Copenhague de 1876

até sua morte em 1900, desenvolveu um método analítico para detectar nitrogênio no estado trinegativo em certos compostos orgânicos. O método foi desenvolvido em 1883 e é utilizado amplamente na determinação da proteína em alimentos, já que a proteína é uma macromolécula feita de nitrogênio, contendo aminoácidos ligadas umas às outras. Quando utilizada para determinação quantitativa de proteína, a percentagem de nitrogênio medida é convertida para teor protéico equivalente usando-se um fator numérico apropriado. O método foi a base para o desenvolvimento da enzimologia quantitativa e biotecnologia geral.

No mesmo ano, o botânico, micologista e microbiólogo Emil Chr. Hansen, que foi chefe do Departamento de Fisiologia nos Laboratórios Carlsberg em Copenhague de 1879 a 1909, descobriu e desenvolveu um método para propagar levedura que tornou possível produzir culturas de levedura pura para uso industrial. Seus métodos foram utilizados sempre desde então na incrementação do processo industrial de fermentações.

Durante a parte inicial do Século XX, a tecnologia de enzimas estava também lentamente se desenvolvendo fora da Europa. No Extremo Oriente, uma antiga tradição prevalecia na qual bolores (cogumelos) chamados de koji eram (e de fato ainda são) utilizados na produção de certos gêneros alimentícios e aditivos aromatizantes baseados na proteína de soja (shoyu, miso) e bebidas fermentadas (saquê, álcool). Koji é preparado a partir de arroz cozido no vapor em que se inocula uma mistura de bolores (cogumelos), sendo a composição da mistura passada de geração a geração. Isto formou a base sobre a qual o químico japonês Jokichi Takamine desenvolveu a processo de fermentação para a produção industrial de amilase fúngica. Em 1891, Takamine depositou pedidos de patente nos EUA, Reino Unido, França, Bélgica, Canadá e Ale-

manha para o Taka-koji do *Aspergillus oryzae* cultivado em arroz úmido ou farelo de trigo e para um método de produção para koji. Foi presumivelmente a primeira patente para um produto de enzima microbiana. O produto foi denominado takadiastase. O método de fermentação sugerido por Takamine, a cultura de superfície ou cultura semi-sólida, ainda é utilizado na produção de certas enzimas.

Em 1894, o químico alemão Emil Fischer desenvolveu a teoria fechadura e chave baseada nas propriedades das enzimas glicolíticas. Ele determinou que uma função vital das enzimas também depende da configuração estereométrica das moléculas (ou seja, a posição dos átomos relativa a uma outra). Fischer foi o primeiro a determinar as estruturas moleculares da glicose e frutose e a sintetizá-las a partir do glicerol em 1890. A cinética enzimática fundamental data de 1903.

Naquela época Victor Henri concluiu, em Paris, que uma enzima combina com seu substrato para formar um complexo enzima-substrato como um passo essencial na catálise enzimática. Com base nesta idéia, a teoria geral da ação enzimática foi expressada matematicamente pelo bioquímico e físico alemão Leonor Michaelis e a cientista canadense Maud Leonora Menten do Canadá em 1913.

Restava determinar qual a natureza das enzimas. O fato de que as enzimas são proteínas foi descoberto em 1926 por James Batcheller Sumner da Universidade de Cornell, Ithaca, NY, EUA. O trabalho de pesquisa de Sumner em Cornell centrou-se primeiro sobre os métodos analíticos, mas apesar de seu trabalho firme ele era incapaz de obter quaisquer resultados interessantes. Ele então decidiu isolar uma enzima em forma pura, um objetivo ambicioso nunca alcançado por ninguém até então, mas um tipo de pesquisa apropriado a sua aparelhagem insuficiente e escasso pessoal de laboratório. Em especial, ele trabalhou com urease. Por muitos anos seu trabalho foi sem sucesso,

mas apesar do desencorajamento pelos colegas que duvidavam se alguma enzima poderia vir a ser isolada em forma pura, ele continuou. Em 1921, quando sua pesquisa estava ainda nos estágios iniciais, foi dada a ele uma bolsa belgo-americana e decidiu ir para Bruxelas trabalhar com Jean Effront, que havia escrito vários livros sobre enzimas. O plano fracassou, contudo, porque Effront achou que a idéia de Sumner de isolar a urease era ridícula. De volta a Ithaca, ele retomou seu trabalho até que finalmente, em 1926, ele teve sucesso. Sua isolamento e cristalização da urease encontrou uma receptividade confusa; era ignorada ou desacreditada pela maioria dos bioquímicos, porém rendeu-lhe uma docência plena em 1929 e o Prêmio Nobel de Química em 1946. No mesmo ano, o cientista dinamarquês Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang investigou muitas propriedades químicas detalhadas importantes das proteínas no Laboratório Carlsberg em Copenhague. A publicação de 1924, *The Ionization of Proteins*, estabeleceu um formalismo básico para a produção de enzimas. A teoria de Lang ainda é a primeira aproximação e permanece em uso para muitos problemas onde a estrutura molecular não é conhecida.

A cristalização de enzimas purificadas permitiu que as suas estruturas moleculares pudessem ser examinadas por cristalografia de raios X, o que aconteceu primeiro com a lisozima, uma enzima que existe na saliva, lágrimas e na clara de ovo e destrói a parede celular de bactérias. Começaram assim a bioquímica e biologia estruturais, que se esforçam por compreender o funcionamento das enzimas a nível atômico.

Quimicamente, as enzimas são proteínas com uma estrutura química especial, contendo um centro ativo, denominado apoenzima e, algumas vezes, um grupo não protéico, denominado coenzima. A molécula toda (apoenzima e coenzima) é dado o nome de haloenzima. Dependendo



do tipo de ligação, o grupo prostético pode ser separado da proteína por métodos brandos, como por exemplo, a diálise. Em alguns casos, as enzimas podem estar ligadas a moléculas orgânicas de baixo peso molecular, ou íons metálicos, cuja função é ativar as enzimas a eles ligados, denominados co-fatores.

As enzimas são substâncias sólidas, mas difíceis de serem cristalizadas devido à complexidade de suas estruturas químicas. Com algumas exceções, são solúveis em água e álcool diluído e, quando em solução, são precipitadas pela adição de sulfato de amônio, álcool ou ácido tricloroacético. São inativadas pelo calor e esta, talvez, seja a propriedade mais importante desses compostos em relação a tecnologia de alimentos.

As enzimas são classificadas em seis principais classes: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Cada classe é dividida em subclasses que identificam a enzima em termos mais específicos e que são representadas pelo segundo algarismo. O terceiro algarismo define com exatidão o tipo de atividade enzimática e o quarto é o número da

enzima dentro da sua subclasse. As enzimas podem também ser designadas por nomes que obedecem a uma sistemática e são constituídos de duas partes: uma indicando o substrato e a outra indicando a natureza da reação. Como essa nomenclatura também é complexa, as enzimas são geralmente identificadas por nomes triviais, já em uso há muito tempo. Por exemplo, a enzima classificada como 3.2.1.2 é denominada sistematicamente de α -1,4-glucan-malto-hidrólise, mais comumente conhecida como α -amilase.

As reações químicas que se processam no organismo são de diferentes tipos e necessitam de catalisadores diferentes. Essas reações são catalisadas por enzimas diferentes, fato que serviu de base à classificação das enzimas, agrupando enzimas que catalisam as mesmas reações em uma mesma classe.

OS TIPOS DE ENZIMAS

As reações enzimáticas são muito importantes nos alimentos, dependendo delas não só a formação de compostos altamente desejáveis, como também podem ter consequências indesejáveis. As reações

enzimáticas ocorrem não somente no alimento natural, mas também durante o seu processamento e armazenamento.

As oxidoredutases, por exemplo, são enzimas relacionadas com as reações de óxido-redução em sistemas biológicos e, portanto, com os processos de respiração e fermentação. Estão incluídas nesta classe não somente as hidrogenases e oxidases, mas também as peroxidases, que usam o peróxido de hidrogênio como agente oxidante, as hidroxilases, que introduzem hidroxilas em moléculas insaturadas, e as oxigenases, que oxidam o substrato, a partir de O_2 .

Já as transferases são enzimas que catalisam, como o nome indica, a transferência de grupos de um composto para outro. A metilação em sistemas biológicos é realizada pelas transferases. A transalcaliolase e transcetolase transferem glicolaldido e 1,3-di-hidroacetona, e a transferência de acetilas e alquilas é feita pelas acetiltransferases e alquiltransferases. Outras enzimas pertencentes às transferases são as glicosiltransferases, que transferem resíduos de açúcar. Outras enzimas pertencentes a esta classe transferem nitratos e fosfatos.

As hidrolases incluem enzimas de baixa especificidade, como esterases e tioesterases, que hidrolisam um número muito grande de ésteres e tioésteres, embora com velocidades diferentes, e enzimas de especificidade muito alta, como as glicosilfosfatases (enzimas glicosílicas) e as peptidases (enzimas proteolíticas). Pertencem também às hidrolases, as fosfatases e as pirofosfatases.

As liases modificam o substrato, cindindo compostos ou removendo grupos da molécula de substrato. Pertencem a esta classe as descarboxilases; as cetoácidiolases, cuja principal função é a síntese de ácidos di- e tri-carboxílicos, e as desidratases, que desidratam hidroxiaminoácidos, com posterior rearranjo da molécula e formação de novos compostos.

As isomerases são enzimas que catalisam reações de isomerização. Racemização e epimerização são causadas pelas racemases e epimerases e cistransisomerases mudam a configuração das duplas ligações. Pertencem ainda às isomerases, as oxiredutases intramoleculares, que interconvertem aldoses em cetoses, oxidando uma hidroxila desses compostos e reduzindo a carbonila adjacente, e as transferases intramoleculares, também denominadas mutases, que apenas mudam a posição de determinados grupos da molécula de substrato.

As ligases são enzimas que causam a degradação da molécula de ATP, usando a energia liberada nesta reação para a síntese de novos compostos, unindo duas moléculas.

As esterases estão envolvidas na hidrólise de acoplamentos de éster de vários tipos. Os produtos formados são ácidos e álcool. Estas enzimas podem hidrolisar triglicérides e incluem várias lipases; por exemplo, fosfolipídios são hidrolisados através de fosfolipases e ésteres de colesterol são hidrolisados através de esterase de colesterol. O carboxilesterase são enzimas que hidrolisam triglicérides, como o tributirin. Podem ser distinguidos das lipases, porque hidrolisam substratos solúveis, considerando que as lipases só agem nas interfaces de lipídio de água de emulsões. Assim, qualquer condição que resulta no aumento da área de superfície da interface do lipídio de água, aumentará a atividade da enzima.

Esta é a razão pela qual a atividade da lipase é muito maior na homogeneização (não pasteurização) do leite do que no produto não homogeneizado. A maioria das enzimas lipolíticas são específicas para o ácido ou o componente de álcool do substrato e, no caso de ésteres de álcoois polihídricos, pode haver também uma especificidade posicional.

As lipases são produzidas através de microorganismos, como bactérias e moldes. Está presente em plantas e em animais, especialmente no pân-

creas e no leite. Podem causar desperdício de alimentos, porque os ácidos gordurosos livres provocam o ranço. Em outros casos, a ação das lipases é desejável, sendo produzida intencionalmente. O limite entre o sabor e o sem sabor frequentemente apresenta uma gama muito estreita. Por exemplo, a hidrólise de gordura de leite, no leite, conduz a um desagradável “sem sabor”, com muito baixa concentração de ácido gorduroso livre. Já a hidrólise de gordura de leite, no queijo, contribui para um sabor desejável. Esta diferença está relacionada ao uso no qual estes ácidos gordurosos são sobrepostos e a especificidade para grupos particulares de ácidos gordurosos de cada enzima.

Em sementes, as lipases podem hidrolisar gordura, a menos que as enzimas sejam destruídas pelo calor. O óleo de palma produzido por métodos primitivos na África, consistia em mais do que 10% de ácidos gordurosos livres. Também são encontrados tais problemas de desperdício em grãos e na farinha. A atividade da lipase em trigo e outros grãos é altamente dependente do conteúdo de água. No trigo, por exemplo, a atividade da lipase é cinco vezes, 15,1%, do que a 8,8% de umidade. A atividade lipolítica de aveias é mais alta do que a maioria dos outros grãos.

As amilases são as mais importantes enzimas do grupo de glicídios hidrolisados. Estas enzimas degradantes podem ser divididas em dois grupos, as enzimas denominadas de *branching*, que especificamente hidrolisam 1,6 acoplamentos entre cadeias, e as enzimas que quebram os 1,4 acoplamentos entre unidades de glicose das cadeias diretas. Este último grupo consiste em endoenzimas que partem os laços ao acaso, em pontos ao longo das cadeias, e exoenzimas que partem pontos específicos nos fins de cadeia.

As α -amilases são enzimas distribuídas amplamente nos reinos animal e vegetal. Contém 1 grama-átomo de cálcio por mole. A α -amilase (α -1,4-

glucan-4-glucanohidrolase) é uma endoenzima que hidrolisa o α -1,4-glucosídico, unida fortuitamente ao longo da cadeia. Estas amilopectinas de hidrolise e oligossacarídeo, contendo duas a seis unidades de glicose. Esta ação conduz a uma rápida diminuição na viscosidade e pequena formação de monossacarídeos. Uma mistura de amilase e amilopectina será hidrolisada em uma mistura de dextrina, maltose, glicose e oligossacarídeos. A amilase é completamente hidrolisada por maltose, embora normalmente haja alguma maltotriose formada, que hidrolisa lentamente.

A β -amilase é uma exoenzima que remove unidades de maltose sucessivas de não redução das cadeias de glucídios. A ação é interrompida no ponto onde o acoplamento α -1,6-glucosídeo não pode ser quebrado pela α -amilase. As combinações resultantes são nomeadas dextrina de limite. A β -amilase só é encontrada em plantas mais altas. Malte de cevada, trigo, batata-doce e feijão de soja são boas fontes de β -amilase. Tecnicamente, é importante na indústria alimentícia no processo de assar, bem como no preparo e destilação, onde a goma é convertida em maltose de açúcar de fermentação. O fermento de maltose, sacarose, inverte açúcar e glicose, mas não fermenta dextrinas ou oligossacarídeos que contêm mais de duas unidades de hexose.

A glucoamilase é uma exoenzima que remove unidades de glicose de uma maneira sucessiva, sem redução da cadeia de substrato. O produto formado é apenas glicose, e isto diferencia esta enzima da alfa e beta-amilase. Além da hidrolização dos acoplamentos α -1,4, esta enzima também pode atacar os acoplamentos α -1,6, embora a uma taxa mais lenta. Isto significa que a goma pode ser completamente degradada à glicose. Está presente em bactérias e moldes e é industrialmente usada na produção de xaropes de milho e glicose.

Um problema na conversão da enzima de goma de milho para glicose

é a presença de enzima de transglucosidase em preparações de α -amilase e glucoamilase. A transglucosidase catalisa a formação de oligossacarídeos de glicose, reduzindo o rendimento de glicose. Grãos não danificados, como trigo e cevada, contém muito pouco α -amilase, mas níveis relativamente altos de β -amilase. Quando estes grãos germinam, o nível de β -amilase muda e o conteúdo de α -amilase pode aumentar para 1,000. A ação combinada de alfa e beta-amilase no grão germinado aumenta, grandemente, a produção de açúcar fermentado.

A β -galactosidase é uma enzima que catalisa a hidrólise de β -D-galactosídeos e α -L-arabinosídeos. É mais conhecida por sua ação de hidrólise em lactose, sendo também conhecida como lactase. A enzima é amplamente distribuída e encontrada em animais, bactérias, fermentos e plantas. A β -galactosidase ou lactase é encontrada em humanos nas células da membrana mucosa intestinal. Uma condição ampla em adultos não caucasianos, é caracterizada por uma ausência de lactase. Tais indivíduos tem intolerância a lactose, que é uma inabilidade para digerir leite corretamente.

A presença de galactose inibe a hidrólise de lactose, através da lactase. A glicose não tem este efeito.

As enzimas pépticas são capazes de degradar substâncias pépticas e ocorrem em plantas mais altas e em microrganismos. Estas enzimas são comercialmente importantes no tratamento de sucos de frutas e bebidas, auxiliando na filtração e clarificação e em proporcionar rendimentos crescentes. As enzimas também podem ser usadas para a produção de baixas pectinas de metoxil e ácidos galacturônicos. A presença de enzimas pépticas em frutas e legumes pode resultar em amolecimento excessivo. Em tomate e suco de frutas, as enzimas pépticas podem causar separação de “nuvem”.

Existem vários grupos de enzimas pépticas, inclusive, a pectinesterase, uma enzima que se agrupa e hidrolisa metoxil, e a poligalacturonase, enzimas de polimerização e liase péptica.

A pectinesterase remove os grupos metoxil da pectina. A enzima se refere a vários outros nomes, incluindo pectase, pectina metoxilase, pectina metil esterase e pectina demetilase. A pectinesterase pode ser encontrada em bactérias, fungos e plantas altas, em quantidades elevadas em frutas cítricas e tomates. A enzima é específica para ésteres de galacturonídeo e não ataca galacturonídeo metil ésteres em qualquer extensão.

A poligalacturonase, também conhecida como pectinase, hidrolisa os acoplamentos de glicídios em substâncias pépticas. As poligalacturonases podem ser divididos em endoenzimas, que agem dentro da molécula em acoplamentos de α -1,4 e, em exoenzimas, que catalisam a hidrólise de galacturônicos, moléculas ácidas de não redução no término da cadeia. Uma divisão adicional pode ser feita devido ao fato que alguma poligalacturonase age principalmente em substratos metilados (pectinas), considerando que outros agem em substratos com grupos de ácidos carboxílicos livres (ácidos pépticos). Estas enzimas são nomeadas galacturonases de polimetil e poligalacturonases, respectivamente. As endopoligalacturonases estão presentes em frutas e em fungos filamentosos, mas não em fermento ou bactéria. As exopoligalacturonases estão presentes em plantas (por exemplo, cenouras e pêssegos), fungos e bactérias.

As enzimas imobilizadas foram empregadas apenas na sua forma solúvel, até 1973, quando, a partir de trabalhos de Katchalsk e colaboradores, surgiu a possibilidade de enzimas serem ligadas a compostos insolúveis. Neste processo, a enzima é ligada a uma matriz, que são polímeros insolúveis em água, inativos, cuja função é a de fixar as enzimas, formando um composto relativamente estável, permitindo o uso de processos contínuos. As ligações enzima-matriz podem se dar por ligações covalentes e não covalentes; neste último caso, as enzimas seriam absorvidas na matriz, ou apenas presas em micro cápsulas semipermeáveis ou em membranas semipermeáveis.

Como exemplo, podemos citar os xaropes ricos em glicose e maltose que podem ser preparados passando-se uma solução de amino através de uma coluna contendo β -amilase e glucoamilase.

As enzimas imobilizadas são mais resistentes a temperaturas elevadas do que as naturais.



CINÉTICA ENZIMÁTICA

Os mecanismos de ação enzimática e as interações das enzimas com o seu ambiente físico e químico podem ser descritos matematicamente com razoável precisão. No entanto, a maioria das equações, as constantes e as regras básicas (cinética enzimática), foram elaboradas para situações idealizadas em que as enzimas e os substratos agem unicamente em condições previsíveis dentro das células vivas.

Os tecnólogos em alimentos não só precisam saber quais enzimas degradam, sintetizam ou interconvertem com o material dos substratos alimentícios, como também precisam poder quantificar o quanto de determinada enzima é necessário e em quais condições deverá atuar para atingir a máxima eficiência

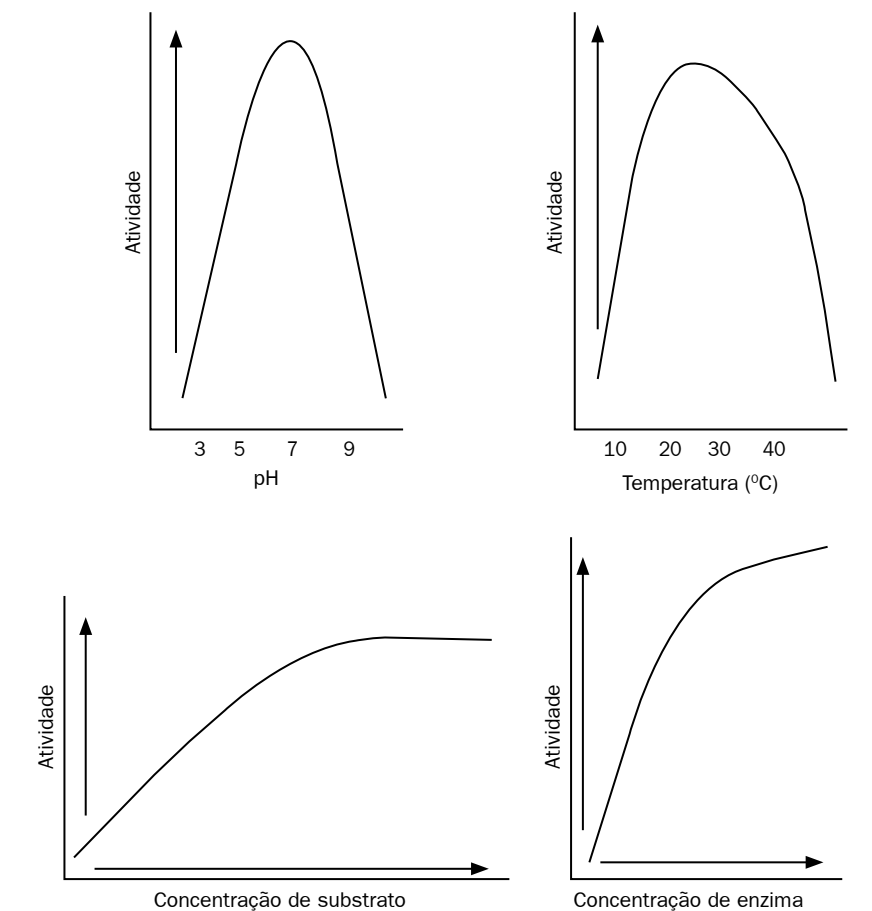
econômica na conversão de material. A cinética enzimática qualitativa e quantitativa mostra que as enzimas se comportam de forma previsível em sistemas ideais simples, como os usados para classificar e caracterizar as preparações enzimáticas em laboratórios de pesquisa e controle de qualidade. Trabalham de forma máxima em valores específicos de pH, temperaturas e concentrações de substrato, de acordo com regras bem estabelecidas (veja Figura 1).

Em concentrações de substrato fixo, as taxas de reação enzimática dependem da concentração da enzima, dependendo da eficiência de volume da preparação enzimática específica. As curvas de atividade, como aquelas representadas esquematicamente na Figura 1, são usadas para definir os valores numéricos desses parâme-

tros, e são insumos básicos vitais para decidir quais preparações enzimáticas devem ser usadas e em qual processo de modificação dos alimentos.

Os perfis de temperatura e pH derivados de condições de teste simples são geralmente aplicáveis em ambientes alimentícios complexos porque são dependentes das propriedades moleculares da proteína da enzima em si e não das propriedades do substrato. As enzimas são cadeias polipeptídicas dobradas, mantidas juntas por forças moleculares relativamente fracas. A estrutura dobrada determina a integridade do sítio catalítico (sítio ativo, veja Figura 2) dentro da enzima, e pode ser facilmente rompido por mudanças energéticas no ambiente da enzima (a temperatura é um excelente exemplo). Esse fenômeno é chamado de “desnaturação” e pode ser reversível ou não, dependendo da severidade da deformação e dos danos estruturais.

FIGURA 1 – EFEITO DO pH, TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A TAXA INICIAL DE REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS EM SOLUÇÃO



DESNATURAÇÃO

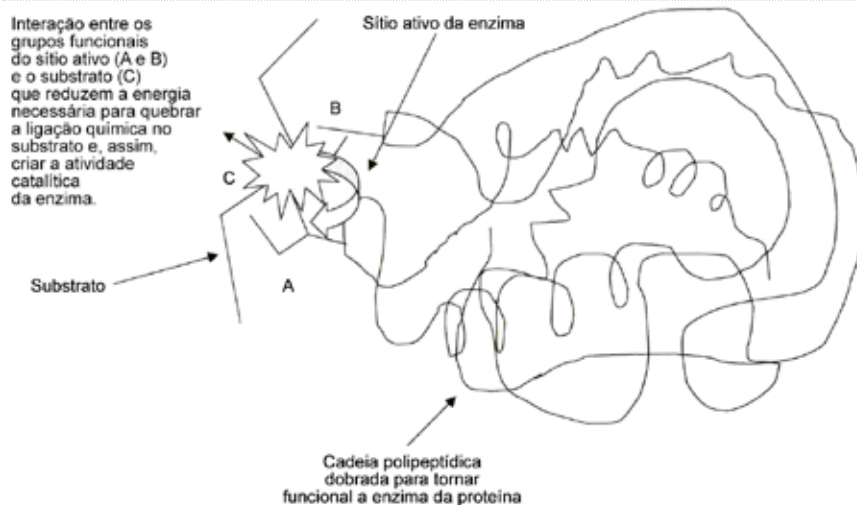
A desnaturação é um processo que se dá em moléculas biológicas, principalmente proteínas, expostas a condições diferentes àquelas em que foram produzidas, como variações de temperatura, mudanças de pH, força iônica, entre outras. A proteína perde a sua estrutura tridimensional e, portanto, as suas propriedades. Este processo é irreversível. Dois exemplos simples de desnaturação ocorrem:

- Ao pingar gotas de limão no leite, o pH é alterado, causando a desnaturação das proteínas, que se precipitam na forma de coalho;

- Ao cozinhar um ovo. O calor modifica irreversivelmente a clara, que é formada pela proteína albumina e água.

A desnaturação também atinge enzimas, que realizam funções vitais no corpo. Por isso que os médicos preocupam-se antes em baixar a febre do que descobrir a causa, pois a alta temperatura pode destruir enzimas de funções vitais, como as enzimas que auxiliam no processo respiratório (transporte de substância via hemoglobina).

FIGURA 2 – CADEIA POLIPEPTÍDICA DOBRADA TRIDIMENSIONAL DE UMA PROTEÍNA ENZIMÁTICA



No entanto, mesmo pequenas mudanças nas forças intramoleculares na enzima, tais como as causadas por pequenas variações de temperatura ou diferenças de cargas dependente do pH sobre os aminoácidos que compõem as estruturas da cadeia primária de polipeptídios, também podem provocar mudanças conformacionais na estrutura, que ficam aquém de desnaturação. Mudanças desta magnitude são mostradas nas curvas típicas de temperatura e atividade de pH apresentadas na Figura 1 e ilustram o quanto precisa deve ser a justaposição dos grupos funcionais do sítio ativo para se atingir a taxa máxima de catálise. Assim, a medida que a temperatura da reação é aumentada, a cinética química clássica dita que a reação acelerará, mas, além de certa temperatura (característica de qualquer enzima particular), a ruptura da estrutura dobrada da proteína da enzima irá reduzir sua eficiência catalítica e sua atividade irá cair novamente.

No caso do pH, a curva em forma de sino é a manifestação de uma ótima estrutura espacial da proteína da enzima, que ocorre em um determinado pH, quando a ionização relativa dentro da estrutura se combina para orientar o sítio ativo para gerar o máximo de ligações de substrato,

modificação da ligação e liberação do produto. Em ambos os lados do pH ótimo para a atividade, as mudanças na carga e a eficiência da ligação de hidrogênio podem, ou distorcer o sítio ativo por meio de mudanças na dobra tridimensional da cadeia polipeptídica da proteína (veja Figura 2), ou reduzir ligações dipolo em grupos funcionais do sítio ativo, reduzindo sua capacidade de diminuir a energia de ativação para conversão do substrato.

A compreensão da relação entre as sequências de aminoácidos e das eficiências das estruturas tridimensionais e catalíticas das enzimas alimentícias são agora suficientemente compreendidas para permitir que os enzimologistas moleculares mudem as estruturas das enzimas para melhorar suas propriedades de transformação tecnológica, tais como resistência ao calor; definição de pH ótimo, resistência aos inibidores catalíticos e mesmo preferência de substratos; isso é chamado de “engenharia de proteínas”, ou engenharia protéica.

INSTABILIDADE E ESTABILIDADE DAS ENZIMAS

As enzimas possuem uma vida finita de trabalho, ou meia-vida, devido à instabilidade física inerente, a ação de antagonistas/inibidores, e a intoxicação por contaminantes na

mistura de reação. Em alimentos e tecnologia de alimentos, a instabilidade física pode ser induzida pelo efeito de pH e temperatura descritos acima, mas também por forças relativamente leves, como a tensão superficial em espumas e emulsões.

A maioria dos inibidores de enzima não está presente nos alimentos, porque geralmente são agentes venenosos (metais pesados e compostos organometálicos, por exemplo); porém, muitos antagonistas da enzima e venenos catalíticos são comuns nos gêneros alimentícios e matérias-primas (i.e., respectivamente, enzimas proteolíticas e radicais livres de ácidos graxos insaturados oxidados). A estabilidade absoluta de uma enzima só pode ser determinada em sistemas alimentícios reais. Qualquer medição de estabilidade por via de proteínas purificadas em sistemas tampões aquosos somente fornece uma orientação de como poderá se comportar a enzima na prática, i.e. em um sistema alimentício real. A primeira decisão a ser tomada é se o processo irá beneficiar de enzimas estáveis ou instáveis.

Enzimas altamente estáveis são normalmente utilizadas em processos que levam muito tempo para serem concluídos, como na malteação da cevada e processo Koji de fermentação, ou sempre que a enzima é parte de um kit de diagnóstico e precisa sobreviver a secagem e ao tempo de armazenamento antes do uso, sem perder sua atividade normalizada na fabricação. Por outro lado, algumas enzimas utilizadas na fabricação de alimentos só são obrigadas a ficar ativas durante um curto período de tempo, por exemplo, para limpar o oxigênio, para precipitar as proteínas do leite ou para auxiliar no amadurecimento, sendo sua persistência em longo prazo no alimento irrelevante, ou até mesmo prejudicial. Exemplos específicos destas aplicações e os critérios utilizados para escolher a enzima certa para o trabalho serão apresentados mais adiante. Alguns dos fatores especiais que influenciam a estabilidade das

TABELA 1 – FATORES ESPECIAIS QUE INFLUENCIAM A ESTABILIDADE DAS ENZIMAS NOS ALIMENTOS

Condições	Efeito na estabilidade	Causas subjacentes
Fase de concentração da enzima	Estabiliza	Aumento a energia necessária por unidade de volume para desnaturar a enzima.
Presença de outras proteínas não-enzimáticas	Estabiliza	Diminui a proporção de energia desnaturante ou fonte molecular disponíveis para desnaturar proteínas enzimáticas.
Presença de outras proteínas enzimáticas	Desestabiliza	Se acompanhadas de enzimas ou proteinases, podem degradar a proteína enzimática adicionada.
Presença de impurezas	Desestabiliza	Envenenamento catalítico <ul style="list-style-type: none"> • de lipases por danos químicos induzidos por radicais livres à enzima (principalmente lipases). • de qualquer enzima por átomos de metais pesados bloqueando o sítio ativo. • de metal que requerem enzimas por agentes quelantes, como o ácido cítrico ou polifosfatos.
Interfaces de fase	Desestabiliza	Desnaturação por forças de tensão superficiais.

enzimas em sistemas alimentícios e no processamento de alimentos estão listados na Tabela 1.

Não existem regras rígidas para orientar os tecnólogos em alimentos nesta área ainda pouco explorada da ciência aplicada as enzimas, pois a comunidade científica não possui estudos sistemáticos sobre os efeitos das fases estruturais e interfaces em alimentos, em todos os fatores utilizados para prever a atividade enzimática. No entanto, com base na Tabela 1, é possível evitar algumas armadilhas ou, até mesmo, aproveitar algumas oportunidades. Por exemplo, um fornecedor pode recomendar uma taxa de adição de enzimas de x unidades por quilo de produto alimentício, com base na atividade medida contra o substrato em solução. O fabricante de alimentos calcula o custo da conversão enzimática com base nesse valor, o ajusta para compensar as diferenças de pH e temperatura, e decide o quanto a fase enzimática custará. Esse processo de decisão é baseado na suposição de que a enzima agirá em um ambiente homogêneo semelhante ao analisado pelo produtor. No entanto, a maioria dos alimentos é heterogênea, constituída por compostos sólidos descontínuos de gordura, proteína, carboidratos e água, ou emulsões e espumas com limites de fase distintos. Em alimentos,

esse tipo de estrutura tende a fazer com que qualquer substância adicionada seja concentrada por afinidade, osmose ou solubilidade diferencial em um determinado componente ou fase do alimento. Portanto, vale buscar a partir dos dados do fornecedor sobre a solubilidade, a hidrofobicidade e a resistência à tensão superficial da desnaturação da enzima, de modo que os valores de custo possam ser ajustados para “ x unidades/kg a granel de proteína, gordura ou carboidratos”, ou mesmo “por unidade de volume de água em uma emulsão”. Isso pode produzir um valor de custo substancialmente maior ou menor do que o baseado em hipóteses de homogeneidade.

COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS COMERCIAIS

A maioria das preparações enzimáticas comerciais contém não apenas a enzima específica, cuja atividade é impressa no rótulo, mas também outras enzimas produzidas pelo mesmo material de origem/organismo. O usuário da enzima deve estar sempre atento a este fator na especificação do produto enzimático, para evitar efeitos colaterais em alimentos complexos (por exemplo, hidrólise do amido por uma preparação enzimática adquirida para a função

de protease). Mesmo que a aplicação seja para um componente isolado de alimento, como proteína de soro de leite, uma preparação enzimática heterogênea pode passar uma atividade enzimática inesperada e indesejável para o cliente que adquire o produto, a menos que medidas sejam tomadas para inativá-la após o processamento.

Assim, o relacionamento enzima/substrato é mais complexo e menos previsível em ambientes de reações alimentícias, porque os materiais alimentícios não são substâncias químicas puras, mas sim estruturas complexas e/ou misturas mal definidas de potenciais (possivelmente concorrentes) substratos e inibidores.

A quantidade de enzima necessária para converter uma determinada quantidade de substrato é medida em “Unidades de Enzima”. Em sistemas simples, a *International Union of Biochemistry Unit* define (U) como a quantidade de enzima que irá catalisar a transformação de um micromole de substrato por minuto, sob condições definidas. A unidade SI (*Sistema Internacional de Unidades do francês Système international d’unités*) para atividade da enzima é o katal (símbolo: kat), definida como a quantidade de enzima que causa a transformação de um milimole de substrato por segundo sob determinadas condições. O katal não é usado para demonstrar a taxa de reações e é expressado em mol/s.

Infelizmente, para os tecnólogos de alimentos até mesmo um substrato que é definível em termos de tecnologia de alimentos (por exemplo, proteína fúngica, extratos de proteínas vegetais, músculo animal, amido de milho, gordura do leite) passa a ser heterogêneo quanto se trata de enzima, e as definições unitárias acima são de pouca utilidade na elaboração de um processo. Por exemplo, o amido de milho é constituído por polímeros de glicose de pesos moleculares infinitamente variáveis, com diferenças enormes de lote para lote, tornando impossível fixar uma dosagem de enzima padrão para alcançar

uma especificação acordada para um produto da hidrólise do amido como ingrediente. Na verdade, seria impossível definir uma unidade de enzima em relação a esse substrato, simplesmente porque um milimole ou micromole de um polímero de peso molecular misto não pode ser definido. Esses fatores significam que não há nenhuma forma simples e consistente para definir ou pré-determinar o quanto adicionar da enzima para qual quantidade de matéria-prima no processamento de alimentos.

Na prática, os fabricantes de enzimas fornecem informações essenciais para os seus clientes através da definição de unidades em termos da função tecnológica da enzima. Isso não só permite ao usuário definir e controlar o processo de hidrólise enzimática em escala industrial, como também estabelece a base para relacionar o preço da enzima com o valor do produto produzido, e permite comparar a produtividade das enzimas de diferentes fornecedores.

FONTES E VARIEDADES DE ENZIMAS PARA ALIMENTOS

As fontes tradicionais de enzimas para processos alimentícios são os tecidos de plantas e animais (veja Tabela 2). Embora estes ainda sejam amplamente utilizados na fabricação de alimentos, há uma tendência para a produção de enzimas alimentícias provenientes de alternativas microbianas, incluindo os derivados geneticamente modificados (OGMS) desses organismos.

Há muitos exemplos do uso de enzimas para a degradação de carboidratos na fabricação de alimentos, especialmente em panificação, fabricação de cerveja e produção de suco de frutas. No entanto, sua produção econômica a partir de microrganismos eficientes em fermentadores de escala industrial significa que a utilização de enzimas, como a amilase e a pectinase presentes nas matérias-primas tradicionais (trigo, cevada, frutas cítricas e farinha), se limita agora a sua ação *in situ*, não sendo amplamente

extraídas para uso exógeno.

Por outro lado, algumas proteínas de plantas e animais continuam amplamente em uso difundido devido a sua eficácia bem estabelecida em alguns processos fundamentais na produção de queijos e carnes processadas. De particular interesse são a papaína (e as proteinases relacionadas, a bromelina e a ficina) na tenderização (amaciamento) da carne, e a quimosina (com um pouco de pepsina para uma boa medida) na fase de coagulação do leite na produção de queijos. A quimosina extraída do abomaso - quarto estômago dos ruminantes - de vitela, é substituída em alguns países pela mesma enzima produzida pela fermentação de leveduras e fungos contendo genes clonados de quimosina; a quimosina natural ainda é a preferida de muitos produtores tradicionais de queijo, apesar das vantagens da oferta e da pureza do produto produzido por fermentação.

A tripsina bovina e suína ainda é utilizada para a produção de proteína

TABELA 2 – ENZIMAS PROVENIENTES DE ANIMAIS E PLANTAS UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DE ALIMENTOS

Enzima	Fonte	Ação nos alimentos	Aplicação nos alimentos
α -amilase	Sementes de cereais (trigo, cevada)	Hidrólise do amido em polissacarídeos.	Panificação; malteação.
β -amilase	Batata doce	Hidrólise do amido em maltose pura.	Produção de xaropes de alta maltose.
Papaína	Látex dos frutos verdes de papaia	Hidrólise de proteínas em alimentos e bebidas.	Tenderização de carnes; prevenção de névoa na cerveja.
Bromelina	Suco de abacaxi e caule	Hidrólise de proteínas musculares e do tecido conjuntivo.	Tenderização de carne.
Ficina	Látex de figueiras tropicais	Idem a bromelina.	Idem a bromelina e a papaína, mas não amplamente utilizado devido ao custo.
Tripsina	Bovina/suína	Hidrólise da proteína dos alimentos.	Produção de hidrolisados de aromas alimentícios (principalmente substituído por proteinases microbianas).
Quimosina (coalho)	Abomaso de bezerro	Hidrólise da kappa-caseína.	Coagulação do leite em queijos.
Pepsina	Abomaso de bovinos	Como a quimosina + hidrólise da caseína em geral, em queijos.	Usualmente presente com quimosina como parte do coalho.
Lipase/esterase	Esôfago de caprinos e ovinos; abomaso de bezerro; pâncreas de porco	Hidrólise de triglicerídeos (gordura).	Realce do sabor em queijos; modificação da função de gordura por interesterificação.
Lipoxigenase	Soja	Oxidação de ácidos graxos insaturados na farinha.	Melhora a massa do pão.
Lisozima	Clara de ovo de galinha	Hidrólise de polissacarídeos	Prevenção em queijos de media e longa duração dos riscos de estufamento tardio pela ação do <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
Lactoperoxidase	Soro de queijo; colostro bovino	Oxidação do íon tiocianato para hipotiocianato bactericida.	Esterilização a frio de leite.

TABELA 3 – ENZIMAS DERIVADAS DE MICROORGANISMOS E UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DE ALIMENTOS

Enzima	Fonte	Ação nos alimentos	Aplicação nos alimentos
α -amilase	<i>Aspergillus Spp.</i> <i>Bacillus spp.*</i> <i>Microbacterium imperiale</i>	Hidrólise do amido de trigo.	Amolecimento da massa, aumento do volume do pão, ajuda na produção de açúcares para a fermentação de leveduras.
α -acetolactato	<i>Bacillus subtilis*</i>	Converte acetolactato em acetoina.	Redução do tempo de maturação do decarboxilase Vinho evitando a necessidade de uma fermentação secundária de diacetil para acetoina.
Amiloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus Spp.</i>	Hidrólise da dextrina do amido em glicose (sacarificação).	Uma fase de produção de xarope de milho de alta frutose (HFCS); produção de cervejas <i>light</i> .
Aminopeptidase	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Libera aminoácidos livres a partir do N-terminal de proteínas e peptídeos.	Reduz o amargor de hidrolisados, acelera a maturação do queijo.
Catalase	<i>Aspergillus niger*</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.	Tecnologia de remoção de oxigênio, combinada com glicose oxidase.
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma spp.</i>	Hidrólise da celulose.	Liquefação da fruta na produção de sucos.
Quimosina	<i>Aspergillus awamori*</i> <i>Kluyveromyces lactis*</i>	Hidrólise da <i>kappa</i> -caseína.	Coagulação do leite para queijo.
Ciclodextrina Glucanotransferase	<i>Bacillus spp.*</i>	Sintetiza ciclodextrinas a partir de amido liquefeito.	Ciclodextrinas são microencapsulantes de grau alimentício para cores, sabores e vitaminas.
β -galactosidase (lactase)	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Kluyveromyces spp.</i>	Hidrólise da lactose do leite em glicose e galactose.	Adoçantes de leite e soro; produtos para indivíduos intolerantes à lactose; redução da cristalização em sorvetes contendo soro de leite; melhorar a funcionalidade do concentrado protéico de soro; fabricação de lactulose.
β -glucanase	<i>Aspergillus spp</i> <i>Bacillus subtilis*</i>	Hidrólise de beta-glucanas em mosto de cerveja.	Auxiliares da filtração, prevenção de névoa na produção de cervejas
Glicose isomerase	<i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Streptomyces lividans*</i> <i>Streptomyces rubiginosus*</i>	Converte glicose em frutose.	Produção de xarope de milho de alta frutose HFCS (adoçante de bebidas).
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger*</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Oxida glicose em ácido glucônico.	Remoção de oxigênio de embalagens de alimentos; remoção da glicose da clara de ovo para evitar o escurecimento.
Hemicelulose e xilanase	<i>Aspergillus spp.*</i> <i>Bacillus subtilis*</i> <i>Trichoderma reesei*</i>	Hidrólise da hemicelulose (polissacarídeos não amiláceos insolúveis na farinha).	Melhoria da estrutura do miolo de pão.
Lipase e esterase	<i>Aspergillus spp.*</i> <i>Candida spp</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Rhizopus spp.</i> <i>Bacillus subtilis*</i>	Hidrólise de triglicérides em ácidos graxos e glicerol; hidrólise de ésteres de alquila em ácidos graxos e álcool.	Realce do sabor em queijos; modificação da função de gorduras por interesterificação; síntese de ésteres de aromas.
Pectinase (poligalacturonase)	<i>Aspergillus spp</i> <i>Penicillium funiculosum</i>	Hidrólise da pectina.	Clarificação de sucos de frutas por despectinização.
Pectinestearase	<i>Aspergillus spp.</i>	Remove grupos metílicos de unidades de galactose em pectina.	Usado com pectinase na tecnologia de despectinização.
Pentosanase	<i>Humicola insolens</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Hidrólise de pentosanas (polissacarídeos não amiláceos solúveis em farinhas de trigo).	Parte da tecnologia para melhorar a massa.
Pululanase	<i>Bacillus spp.*</i> <i>Klebsiella spp.*</i>	Hidrólise das ligações 1-6 que formam ramificações na estrutura do amido.	Sacarificação do amido (melhora a eficiência).
Protease (proteínase)	<i>Aspergillus spp.*</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Cryphomectria parasítica</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Bacillus spp.*</i>	Hidrólise da <i>kappa</i> -caseína; hidrólise de proteínas alimentícia animais e vegetais; hidrólise do glúten do trigo.	Coagulação do leite para fabricação de queijos; produção de hidrolisados para sopas e alimentos salgados; melhora a massa do pão.

* Estas enzimas estão disponíveis comercialmente em versões GMO de fontes de microorganismos

A QUIMOSINA

A renina ou quimosina, é uma enzima protease que contém 323 resíduos de aminoácidos com três pontes de dissulfeto, que adicionada ao leite produz a primeira etapa de formação do queijo ou para a formação do “junket” (espécie de coalhada fresca com sal ou sobremesa de leite coagulado e aromatizado). A enzima converte partículas de caseinato de cálcio do leite no relativamente insolúvel paracaseinato de cálcio, que na presença de íons cálcio coagula para dar forma a um produto coagulado denominado “coalho”. A fonte tradicional de renina é o abomaso (ou coagulador, quarto estômago dos ruminantes) de bezeros lactentes (que ainda dependem para a sua sobrevivência do leite materno) ou de outros ruminantes jovens. Os bezeros recém-nascidos e outros ruminantes produzem no estômago a renina para coagular o leite ingerido produzindo uma massa semilíquida, que permite aumentar o tempo de permanência do leite no organismo. Caso contrário, o leite fluiria pelo sistema digestivo restante produzindo diarreia. Com o tempo a quantidade de renina diminui, sendo substituída pela pepsina, permitindo o desmame do filhote.

No Brasil, encontram-se queijos elaborados por coalhos elaborados a partir de estômagos de bovinos adultos e suínos, praticamente inexistindo a produção de coalho de vitelo.

É também possível produzir a renina a partir de fungos. Atualmente, a maioria da renina comercial é produzida a partir de leveduras (fungos unicelulares) ou bactérias geneticamente modificadas, permitindo a produção de um queijo considerado vegetariano. Acredita-se que a renina produzida deste modo rende um queijo de consistência e com qualidade superior do que aquele produzido a partir da renina animal tradicional. Um substituto da renina é a enzima cinarase existente na cynara (proveniente do cardo selvagem) usada na produção de um queijo tradicional em torno do Mediterrâneo.

alimentícia hidrolisada como ingredientes flavorizantes, mas existem atualmente no mercado tantas boas alternativas microbianas disponíveis a essas serino-proteases clássicas (veja Tabela 3), especialmente aquelas com menor tendência para tornar os produtos amargos, que a tripsina já não é tão importante para os fabricantes de alimentos.

Assim como as proteinases, as lipases animais, que foram o sustentáculo da indústria de aromas lácteos no passado, está sendo gradualmente substituída por enzimas equivalentes de origem microbiana. Mais e mais enzimas usadas na tecnologia de alimentos são provenientes de microorganismos especialmente selecionados ou geneticamente modificados, cultivados em fermentadores de escala industrial; a Tabela 3 apresenta uma série de exemplos e aplicações.

O número e a variedade desses exemplos de fontes alternativas microbianas reflete as vantagens logísticas e comerciais da utilização da fermentação microbiana, ao invés de extração animal ou vegetal para a produção de enzimas alimentícias. A logística é baseada em geografia política e custos de transporte, e é claro que é desejável para um produtor de enzimas e para os usuários ter uma fonte confiável e previsível de uma enzima que é crucial para um processo de fabricação. Esta regra vale para qualidade, quantidade e preço, e a alternativa da fermentação atende melhor em todos os aspectos. Pode ser produzida em qualquer lugar, independentemente do clima e da agro-economia; a produção da enzima é previsível a partir dos parâmetros de fermentação e a pureza é garantida tanto pela especificação da fermentação quanto pela tecnologia de processamento. Além disso, a fermentação evita completamente os problemas oriundos da propagação de doenças em população animal e/ou em plantas.

Nada ilustra melhor esses pontos do que o uso de microorganismos de grau alimentício para produção de quimosina, o agente coagulante na fabricação de queijo. A quimosina é uma

proteínase ácida que é um subproduto tradicional da indústria láctea e bovina. É extraída do abomaso de bezerro após o abate, e idealmente possui uma alta proporção de quimosina vs. pepsina, a proteinase ácida do bovino adulto. Mesmo antes da disseminação da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e sua forma humana CID, o fornecimento de abomaso de bezerro pela indústria da carne era imprevisível e insuficiente para atender a demanda global da indústria de queijo. A BSE tornou a situação de abastecimento ainda pior e a falta do produto natural foi compensada através do fornecimento e da utilização de alternativas microbianas produzidas pela indústria de enzimas alimentícias. Essas alternativas vão desde proteinases ácidas fúngicas (principalmente a partir de *Rhizomucor miehei*) até a quimosina de bezerro produzida por tecnologia de clonagem de genes.

A disponibilidade e a utilização de enzimas microbianas é tão difundida que um conjunto considerável de legislações nacionais emergiu e amadureceu para garantir a segurança ambiental e do consumidor. Isso se aplica a enzimas derivadas tanto de microorganismos geneticamente modificados quanto a microorganismos não modificados geneticamente.

CONCLUSÃO

A fabricação de alimentos e a indústria de ingredientes fazem amplo uso de enzimas em vários setores tradicionais, tais como na panificação, em cervejaria e na fabricação de queijo, mas novas áreas de aplicação estão surgindo, como a tecnologia de modificação de gorduras e adoçantes.

Certo cuidado é muitas vezes necessário para a adaptação destes frágeis catalisadores biológicos aos processos industriais, mas uma combinação de conhecimentos básicos de bioquímica e moderna biotecnologia está abrindo novas áreas de aplicação, especialmente para as enzimas de origem microbiana e enzimas animais produzidas por micróbios através da tecnologia de engenharia genética.