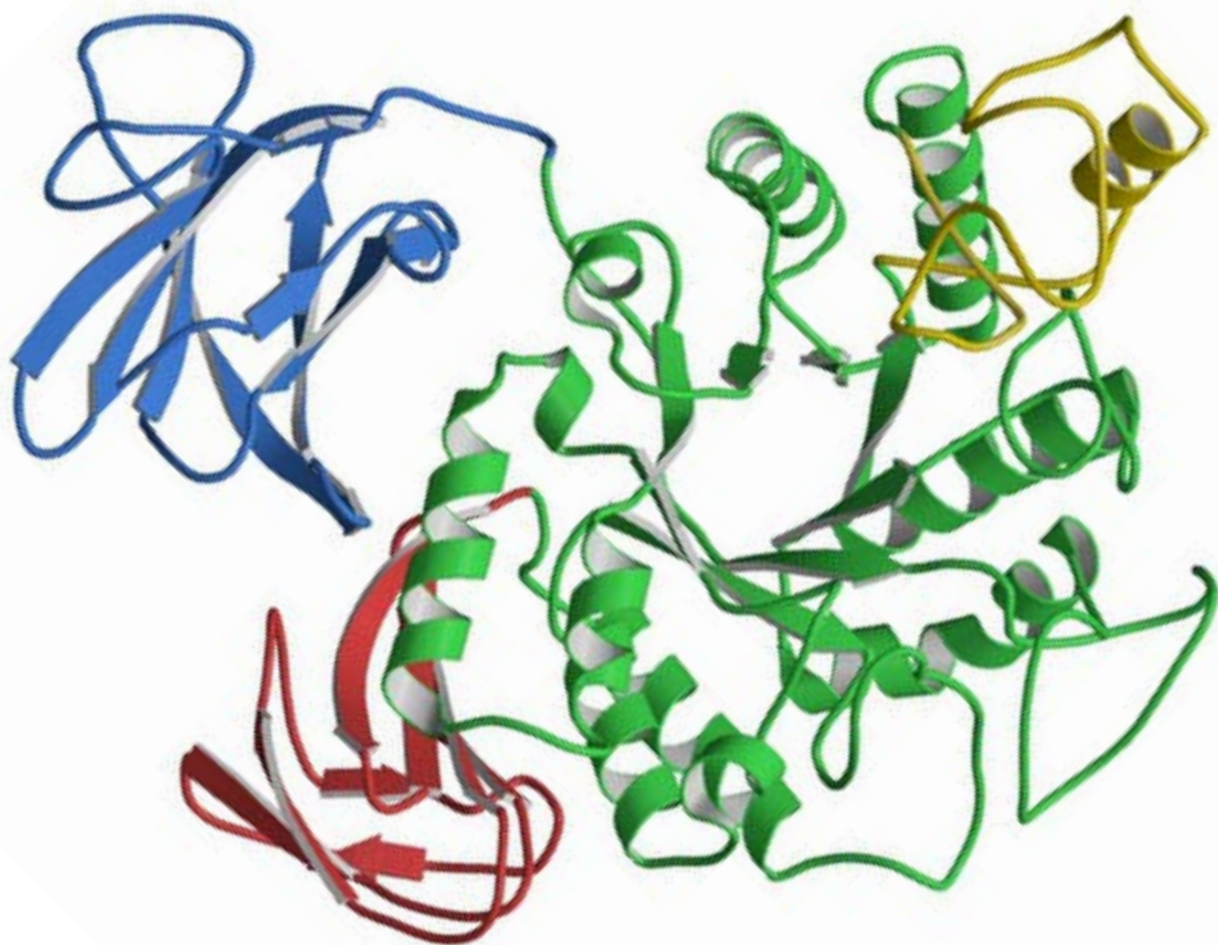


FUNÇÃO E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

A capacidade catalítica das enzimas as tornam adequadas para aplicações industriais, sendo uma delas na indústria alimentícia. As reações enzimáticas são muito importantes em alimentos, pois dependendo delas não somente há formação de compostos altamente desejáveis, como também indesejáveis.



AS ENZIMAS

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 alimentos pelo papel que desempenham no seu processamento e deterioração.

As enzimas foram descobertas no século XIX, aparentemente por Louis Pasteur, que concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos. Pasteur postulou que esses fermentos (as enzimas) eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, declarando que “a fermentação alcoólica é um ato correlacionado com a vida e organização das células do fermento e não com a sua morte ou putrefação”.

Em 1878, 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 usado apenas para as proteínas com capacidade catalítica, enquanto que o termo “fermento” se referia à atividade exercida por organismos vivos.

Em 1897, Eduard Buchner descobriu que os extratos de levedo podiam fermentar o açúcar em álcool e provou que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas das células vivas. Esta descoberta valeu-lhe o Prêmio Nobel de Química em 1907.

Restava determinar qual a natureza das enzimas. Alguns afirmavam que as proteínas, associadas à atividade enzimática, apenas eram o suporte da verdadeira enzima e, por si próprias,

incapazes de catálise.

Em 1926, James Batcheller Sumner purificou e cristalizou a urease, mostrando tratar-se de uma proteína pura; fez o mesmo, em 1937, para a catalase. A prova final foi feita em 1930, com o estudo de três enzimas digestivas, a pepsina, a tripsina e a quimotripsina. John Burdon Sanderson Haldane escreveu um tratado intitulado “Enzimas”, onde continha a notável sugestão de que as interações por ligações fracas, entre a enzima e seu substrato, poderiam ser usadas para distorcer a molécula do substrato e catalisar a reação.

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 a 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 cofatores.

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: oxidoreduases,

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 -14-glucanmalto-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 para a classificação das enzimas, agrupando enzimas que catalisam as mesmas reações em uma mesma classe.

Devido à alta especificidade de suas ações, novas enzimas são constantemente desenvolvidas e catalogadas. O banco de dados de enzimas mais conhecido é o *Protein Data Bank (PDB)*, mantido pelo *Brookhaven National Laboratory*. O PDB, constantemente atualizado, conta com mais de (nesta data) 10.000 entradas. Outra referência é o *Enzyme Databank* mantido por Amos Bairoch, do *Swiss Institute of Bioinformatics*.

Assim, de acordo com a *Comissão sobre Enzimas (E.C)*, da União Internacional dos Bioquímicos (I.U.B.), as enzimas podem ser divididas em seis grandes grupos.

Cada enzima é classificada com quatro números: o primeiro indica a reação que é catalisada (classe), o segundo a função envolvida, o terceiro fornece maiores detalhes sobre a reação catalisada indicando ou o grupo receptor ou o substrato (a molécula cuja reação esta sendo catalisada), e o quarto é o número de série da enzima em sua subclasse (veja Tabela 1).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

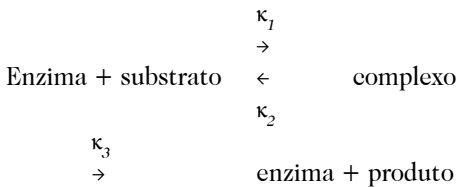
Classe	Nº de subclasses	Tipo de reação	Nomes mais comuns
E.C.1.-.- Oxidoreductases	20	Reações de óxido-redução (REDOX)	Dehidrogenase, reductase, oxidase
E.C.2.-.- Transferases	9	Reações de transferências de grupos de átomos	Nome do grupo doador + transferase ou nome do grupo receptor + transferase
E.C.3.-.- Hidrolases	12	Reações hidrolíticas	Hidrolase, nome do substrato + ase
E.C.4.-.- Liasas (sintases)	7	Reação de adição de dupla ligação e vice versa.	
E.C.5.-.- Isomerases	6	Reações de isomerização	Racemase, epimerase, cis-tran isomerase, tautomerase, mutase
E.C.6.-.- Ligases (sintetases)	5	Reações criando ligações entre duas moléculas menores, criando uma maior	

FUNÇÃO DAS ENZIMAS

As enzimas são proteínas com propriedades catalíticas. Algumas enzimas consistem apenas em proteína, mas a maioria delas contém componentes não protéicos adicionais, como carboidrato, lipídios, metais, fosfatos ou algum outro componente orgânico.

As enzimas apresentam a capacidade de reagir com determinados constituintes das células, denominados substratos, formando complexos, ou mesmo compostos com ligações covalentes. Em uma reação enzimática, o substrato combina com a haloenzima, sendo liberado em uma forma modificada.

Uma reação enzimática envolve as seguintes equações:



O equilíbrio para a formação do complexo é determinado por

$$\kappa_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

onde, E, S e ES é a enzima, substrato e complexo, respectivamente, e κ_m é o constante de equilíbrio.

Isto pode ser expresso na forma de equação de Michaelis-Menten:

$$v = V \frac{[S]}{[S] + \kappa_m}$$

onde, v é o tempo inicial da velocidade da reação da concentração do substrato (S), e V é a velocidade máxima que pode ser atingida a uma concentração alta de substrato, onde toda a enzima está na forma de complexo.

Esta equação indica que quando v é igual a metade de V, o equilíbrio de κ_m constante se iguala numericamente a S. Pode-se utilizar na reação uma taxa de concentração de

substrato diferente para determinar o κ_m .

Como não é sempre possível atingir o máximo de variadas taxas de concentração de substrato, a equação de Michaelis-Menten foi modificada, usando formas recíprocas, sendo conhecida como a equação de Lineweaver-Burke:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{\kappa_m}{V[S]}$$

Reações de $1/v$ como uma função de $1/[S]$ resultam em linhas diretas; o intercepto no eixo Y representa $1/V$; o declive iguala κ_m/V ; e o posterior, κ_m pode ser calculado.

Reações enzimáticas não seguem nenhuma ordem ou a primeira ordem cinética. Quando a concentração do substrato é relativamente alta, a concentração do complexo enzima-substrato é mantida a um nível constante e a quantidade de produto formado é uma função linear do intervalo de tempo. Reações cinéticas sem nenhuma ordem são características de reações catalisadas e podem ser descritas como:

$$\frac{d[S]}{dt} = k^0$$

onde, S é o substrato e k^0 é a ordem zero constante da reação.

As reações cinéticas de primeira ordem são caracterizadas por um lento graduado abaixo da formação de produto. Isto ocorre, porque a taxa de formação é uma função da reação da concentração de substrato, que diminui com a concentração de aumentos do produto. As reações cinéticas de primeira ordem seguem a equação,

$$\frac{d[S]}{dt} = k^1 ([S] - [P])$$

onde, P é o produto e k^1 é a reação constante de primeira ordem.

Para uma reação relativamente curta, a quantidade de

substrato convertida é proporcional a concentração de enzima.

Cada enzima tem um ótimo valor de pH, sendo que umas têm mais e outras menos. A maioria das enzimas se encontra na gama de 4,5 a 8,0. Exemplos de ótimo pH podem ser encontrados na amilase, 4,8; na invertase, 5,0; e na α -amilase pancreática, 6,9. O pH ótimo é normalmente bastante restrito, embora algumas enzimas tenham uma gama mais ampla; por exemplo, a pectina metil-esterase tem uma gama de 6,5 a 8,0. Algumas enzimas têm um pH ótimo a valores muito altos ou muito baixos, como a pepsina, a 1,8, e a arginase, a 10,0.

A temperatura tem dois efeitos contrários na atividade enzimática. A baixas temperaturas há um Q10 de cerca de 2, mas a temperaturas acima de 40°C, a atividade diminui rapidamente, devido a desnaturação da proteína se separar da enzima. O resultado destes fatores é uma curva de atividade campaniforme com uma temperatura distinta ótimo.

As enzimas são proteínas sintetizadas nas células de plantas, animais, ou microorganismos. Atualmente, a maioria das enzimas usadas em aplicações industriais são obtidas de microorganismos.

As coenzimas são moléculas pequenas, de calor estável, orgânicas, que podem se dissociar prontamente da proteína e ser removidas frequentemente através de diálise. Estas coenzimas, frequentemente, contêm vitamina B; exemplos são o ácido tetrahidrofólico e o pirofosfato de tiamina.

Vários fatores, além da concentração de substrato e do pH, podem influenciar na velocidade das reações enzimáticas; o efeito da temperatura é um deles. A velocidade das reações enzimáticas aumenta com o aumento da temperatura de modo semelhante ao das reações químicas, isto é, a velocidade da reação duplica com o aumento de 10°C na temperatura da reação. Nas reações enzimáticas, porém, a velocidade aumenta com a temperatura, até atingir uma velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer. Sob condições específicas, a temperatura ótima para cada reação pode ser determinada.

O efeito da temperatura é muito

complexo e pode ser devido a várias causas. Inicialmente, com o aumento de temperatura, a atividade molecular aumenta, aumentando assim a formação do complexo enzimático; no entanto, com o aumento contínuo da temperatura, poderá haver uma inativação gradativa da enzima, até inativação total, causada pela desnaturação da proteína pelo calor. Em geral as enzimas reagem muito lentamente nas temperaturas de subcongelamento e sua atividade aumenta com o aumento de temperatura até atingir uma atividade ótima em temperaturas ao redor de 45°C, além das quais começa a sua inativação.

A atividade de água é outro fator que influencia a velocidade das reações enzimáticas. Seria de se esperar que enzimas, em presença de teor de água muito baixo, fossem inativas.

No entanto, várias alterações são observadas no aroma de determinados alimentos desidratados, a menos que, antes do processamento desses alimentos, as enzimas existentes sejam inativadas. A quantidade absoluta de água, entretanto, não é o fator decisivo nas reações enzimáticas; muito mais importantes quando se considera a atividade enzimática em alimentos desidratados são a atividade da água e a umidade relativa. Apesar da mobilidade do substrato ser muito importante, as enzimas também podem reagir com substratos secos, e a maneira como esses compostos se difundem no substrato vai influir, não só na velocidade da reação, mas também no modo como essa reação se processa. Enzimas em ausência de água são mais estáveis ao calor, tornando-se mais sensíveis à medida que o teor de umidade aumenta.

A pressão também tem influência na velocidade das reações enzimáticas, porém é pouco significativa e, portanto, pouco empregada para o controle dessas reações. Na desnaturação, proteínas apresentam expansão do volume resultante do desdobramento da cadeia, e a aplicação de pressão poderia, em princípio, reduzir a desnaturação pelo calor.

Pressões muito altas, entretanto, podem modificar a estrutura molecular, causando também desnaturação e consequente desnaturação da enzima; mas essas pressões são muito mais

altas do que as geralmente empregadas no processamento, por isso têm pouca importância para a indústria de alimentos.

TIPOS DE ENZIMAS

As reações enzimáticas são muito importantes em alimentos, dependendo delas não só há 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 oxidoreduções, por exemplo, são enzimas relacionadas com as reações de oxido-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 cetooxidolases, cuja principal função é a

síntese de ácidos di- e tri-carboxílicos, e as hidrolíases, 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 pâncreas, 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-glican-4-glicanohidrolase) é uma endoenzima que hidrolisa o α -1,4-glicosídico, unida fortuitamente ao longo da cadeia. Estas amilopectina 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 formado, que hidrolisa lentamente.

A β -amilase é uma exoenzima que remove unidades de maltose sucessivas de não redução das cadeias de glicídios. A ação é interrompida no ponto onde o acoplamento α -1,6-glicosídeo 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 transglicosidase em preparações de α -amilase e glucoamilase. A transglicosidase catalisa a formação de oligossacarídeos de glicose, reduzindo o rendimento de glicose. Grãos não danificados, como trigo e cevada, contêm 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 é conhecida como pectinase, hidrolisa os acoplamentos de glicídios em substâncias pépticas. As poligalactu-

ronases 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, pode-se 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.

APLICAÇÃO NOS ALIMENTOS

As reações enzimáticas ocorrem não só no alimento natural, mas também durante o seu processamento e armazenamento. Aromas de vegetais e frutas, por exemplo, são devidos pela ação de determinadas enzimas sobre substratos

específicos, sendo denominados precursores de aroma. As tioglucosidases, agindo em compostos tioglucosídicos existentes no repolho e outros vegetais pertencentes à mesma família, produzem compostos voláteis que dão a esses vegetais o cheiro característico; e o aroma da cebola é devido à ação de alinase sobre os sulfóxidos existentes.

Enzimas proteolíticas como papiroamna e bromelina são empregadas no amaciamento de carnes.

Enzimas pépticas têm ação sobre pectinas, tanto na degradação da cadeia poligalacturônica (poligalacturonase) como na desmetoxilação dos compostos (pectinametilesterase) e entre outras aplicações, essas enzimas são empregadas na clarificação de sucos de frutas.

Amilases são enzimas importantes principalmente na produção de xaropes de milho e de D-glicose pela sua capacidade de romper as ligações glicosídicas no amido. Amilases são adicionadas a massas de pão para suplementar o efeito de enzimas naturais, durante a fermentação. Amiloglucosidase hidrolisa ligações glicosídicas 1,4 de oligo- ou polissacarídeos formados por unidades de glicose, com liberação desse monossacarídeo.

Uma reação enzimática muito importante, com resultados não desejáveis é a reação de escurecimento enzimático. Frutas e vegetais que contêm polifenóis na sua composição química, quando cortadas e expostas ao ar sofrem escurecimento, causado pela ação de uma enzima, a olifenoloxidase sobre os fenóis existentes, que são oxidados a ortoquinonas.

Estes últimos compostos polimerizam facilmente formando compostos escuros, as melaninas.

Essas reações de escurecimento enzimático podem ser mais facilmente observadas em vegetais de cores claras, como bananas, batatas, maçãs.

De forma geral, as principais aplicações das enzimas no setor alimentício são nos setores de álcool e derivados; amidos e açúcares; cervejaria; laticínios e derivados; óleos e gorduras; panificação e biscoitaria; vinicultura; e sucos de frutas. As Tabelas 2 e 3 apresentam as enzimas utilizadas na fabricação de alimentos provenientes, respectivamente, de animais e plantas, e de microrganismos.

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 de oligossacarídeos	Panificação; cerveja (malte)
β -amilase	Batata doce	Hidrólise do amido em maltose	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	Tenderização de carne Musculares e do tecido Conjuntivo
Ficina	Látex de frutos	Como a bromelina	Como 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 <i>kappa</i> -caseína	Coagulação do leite em queijos
Pepsina	Abomaso de bovinos	Como a quimosina + hidrólise Da caseína mais geral de 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	Ovo de galinha branco	Hidrólise de polissacarídeos da parede celular bacteriana	Prevenção de defeitos de sopro final em queijos por bactérias formadoras de Esporos
Lactoperoxidase	Soro de queijo; colostro bovino	Oxidação do íon tiocianato	Esterilização a frio de leite para hipotiocianato bactericida

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

Enzima	Fonte	Ação nos alimentos	Aplicação nos alimentos
α -amilase	Aspergillus Spp Bacillus spp.* Microbacterium imperiale	Hidrólise do amido de trigo.	Amolecimento da massa, aumento do volume do pão, ajuda à produção de açúcares para a fermentação de leveduras.
α -acetolactato decarboxilase	Bacillus subtilis*	Converte acetolactato em acetoina.	Redução do tempo de maturação do vinho pela necessidade de contornar a fermentação secundária de diacetil para acetoina.
Amiloglucosidase	Aspergillus niger Rhizopus Spp.	Hidrólise da dextrina do amido em glicose (sacarificação).	Uma fase de produção de xarope de milho de frutose elevada; produção de cervejas light.
Amino peptidase	Lactococcus lactis Aspergillus spp. Rhizopus oryzae	Libera aminoácidos livres a partir do N-terminal.	Proteína de amargor de hidrolisados, acelera a maturação do queijo.

Catalase	Aspergillus niger* Micrococcus luteus	Decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.	Tecnologia de remoção de oxigênio, combinada com glicose oxidase.
Celulase	Aspergillus niger Trichoderma spp.	Hidrólise da celulose	Liquefação da fruta na produção de sucos.
Quimosina	Aspergillus awamori* Kluyveromyces lactis*	Hidrólise da kappa-caseína.	Coagulação do leite para queijo.
Ciclodextrina Glucanotransferase	Bacillus spp.*	Sintetiza ciclodextrinas a partir de amido liquefeito.	Ciclodextrinas microencapsuladas de grau alimentício para cores, sabores e vitaminas.
β -galactosidase (lactase)	Aspergillus spp. Kluyveromyces spp.	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; fabricação de lactulose.
β -glucanase	Aspergillus spp Bacillus subtilis*	Hidrólise de beta-glucanas em cerveja.	Auxiliares da filtração, prevenção de névoa na produção de cervejas
Glicose isomerase	Actinoplanes missouriensis Bacillus coagulans Streptomyces lividans* Streptomyces rubiginosus*	Converte glicose em frutose.	Produção de xarope de milho rico em frutose (adoçante de bebidas).
Glicose oxidase	Aspergillus niger* Penicillium chrysogenum	Oxida glicose em ácido glucônico.	Remoção de oxigênio de embalagens de alimentos; remoção de glicose a partir da clara de ovo para evitar o escurecimento.
Hemicelulose e xilanase	Aspergillus spp.* Bacillus subtilis* Trichoderma reesei*	Hidrólise da hemicelulose (polissacarídeos não amiláceos insolúveis na farinha).	Melhoria da estrutura do miolo de pão.
Lipase e esterase	Aspergillus spp.* Candida spp Rhizomucor miehei Penicillium roqueforti Rhizopus spp. Bacillus subtilis*	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)	Aspergillus spp. Penicillium funiculosum	Hidrólise da pectina.	Clarificação de sucos de frutas por despectinização.
Pentosanase	Humicola insolens Trichoderma reesei	Hidrólise de pentosanas (polissacarídeos não amiláceos solúveis em farinhas de trigo).	Parte da tecnologia para melhorar a massa.
Pululanase	Bacillus spp.* Klebsiella spp.*	Hidrólise das ligações 1-6 que formam ramificações na estrutura do amido.	Sacarificação do amido (melhora a eficiência).
Protease (proteínase)	Aspergillus spp.* Rhizomucor miehei Cryphomectria parasítica Penicillium citrinum Rhizopus niveus Bacillus spp*	Hidrólise da kappa-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.

A produção de bebidas alcoólicas fermentadas a partir de matérias-primas ricas em amidos existe há muitos séculos. A escolha da matéria-prima varia em função das disponibilidades locais e dos hábitos alimentares de cada país.

Nos Estados Unidos, usa-se o milho e o centeio para fazer o uísque, enquanto que na Inglaterra usa-se a cevada mal-

tada para o uísque e os outros cereais para as bebidas espirituosas.

Na Escandinávia a batata, e em escala menor, os cereais, são usados para a produção da famosa akvavit. Na Alemanha, o kornbranntwein é feito de trigo, enquanto que outros alcoóis têm por base a batata e outros cereais. No Extremo Oriente, o arroz serve para

fazer o sake, enquanto que a tequila mexicana é feita a partir do agave! Qualquer que seja a matéria-prima, o amido é o ingrediente básico. Ele é composto de uma longa cadeia de moléculas de glicose e estas devem ser quebradas em moléculas menores para que a levedura possa transformá-las em álcool. Este processo é efetuado por enzimas e

consiste em duas etapas: a liquefação e a sacarificação.

Tradicionalmente, as enzimas estavam presentes no processo de fermentação pela simples adição de malte. Mas, desde o final dos anos 60, houve uma mudança drástica e, em muitos países, o malte foi totalmente substituído por enzimas industriais de origem microbiana, com grandes vantagens no processo.

Alguns litros de uma preparação enzimática podem substituir 100 kg de malte, e são mais fáceis de manusear e estocar. Em termos de custo das matérias-primas pode haver uma economia de 20% a 30%, pois as enzimas industriais são fornecidas com uma qualidade constante, tornando totalmente previsível o processo completo de uma fermentação (o que não ocorre no uso do malte, pois sua qualidade pode variar de uma safra para a outra, assim como de uma remessa para outra). As enzimas microbianas também apresentam uma performance melhor do que suas similares encontradas no malte. As amilases microbianas se comportam melhor em baixo pH, encontrados no mosto, e sendo extremamente termooestáveis, continuam atuando na liquefação dos amidos à temperatura de 100° C, quando as enzimas do malte já foram totalmente destruídas.

Por estes motivos, é facilmente compreensível que as enzimas industriais tenham substituído o malte em muitas empresas tradicionais no mundo dos destilados.

No início do século XIX, o químico alemão Kirchoff descobriu que fervendo amido com um ácido, poderia convertê-lo em uma substância de gosto doce, que basicamente consistia em glicose. Kirchoff procurava um substituto para a cana de açúcar, em falta no mercado europeu, devido ao embargo decorrente das guerras napoleônicas. O produto descoberto por Kirchoff não resolveu o problema do açúcar, porque ele não era tão doce quanto o açúcar de cana ou de beterraba, assim como os rendimentos desta técnica não eram satisfatórios. Não obstante, desde então, os ácidos têm sido utilizados na transformação de amido em glicose.

Esta técnica apresenta vários pontos negativos, como a formação de subpro-

duto indesejáveis, pouca flexibilidade (o produto final somente pode ser alterado, mudando o grau de hidrólise) e a necessidade de equipamentos capazes de resistir aos ácidos e a temperatura de 140°C a 150°C. Em contraste, à facilidade e à superioridade de se trabalhar com enzimas industriais.

O índice DE (dextrose equivalente) é utilizado como indicador do grau de hidrólise de um xarope. O DE do amido é zero, enquanto que da dextrose é 100. Os xaropes com DE de 35 a 43 ainda são produzidos a partir do processo da hidrólise ácida. Mas, no decorrer dos últimos 30 anos, com o desenvolvimento de novos tipos de enzimas, quase todos os processos de fabricação das hidrólises de amido são efetuadas por meio de enzimas, principalmente, após o surgimento dos HFS (*High Fructose Syrupos*) nos anos 70, quando a técnica enzimática tornou possível a produção de xaropes tão doces quanto a sucrose. Os HFS contribuíram de maneira significativa para o desenvolvimento da indústria de amidos em vários países.

O tipo de enzima, utilizado no processamento dos amidos, determina os tipos de xaropes com diferentes composições e propriedades físicas, a serem utilizados numa grande variedade de alimentos e bebidas, tais como refrigerantes, carnes, produtos de panificação e assemelhados, sorvetes, molhos, alimentos infantis, frutas em conservas, doces e balas, etc. O processo de conversão enzimática dos amidos compreende três fases distintas: a liquefação, a sacarificação e a isomerização.

No processo de liquefação, uma α -amilase bacteriana leva a obtenção de maltodextrina, que contém diferentes oligossacarídeos e dextrinas, ligeiramente adocicadas e normalmente sujeitas a novo processo de conversão, chamado de sacarificação. Neste processo, a amiloglucosidase pode, teoricamente, hidrolisar completamente o amido, transformando-o em glicose.

Na prática, um pouco de maltose e isomaltose também são produzidos. A enzima pululase pode ser usada para ajudar na sacarificação. Uma α -amilase fúngica pode ser utilizada para produzir xarope com maior conteúdo de maltose, o que significa maior fermentabilidade

e maior grau de doçura. Um maior conteúdo de maltose também pode ser obtido pela utilização de β -amilase em combinação com uma pululase.

Uma parte da glicose pode ser isomerizada em frutose, duas vezes mais doce que a glicose, utilizando-se uma glicose isomerase, com altos rendimentos e poucos subprodutos.

Os produtos desta isomerização tem hoje grande importância no mercado, com aproximadamente 42% de frutose, 54% de glicose ou 55% de frutose e 41% de glicose; neste último caso são chamados de HFS (HFCS), isoglicose ou açúcar de amido, dependendo da sua utilização final. Eles são tão doces quanto o açúcar de cana ou de beterraba e possuem o mesmo conteúdo energético. Em muitos casos, permitem uma total substituição dos açúcares tradicionais sem que seja percebida nenhuma alteração no caráter do produto final. Nos Estados Unidos, por exemplo, os HFS já substituíram os açúcares usados na produção de bebidas, laticínios e derivados, produtos de panificação e alimentos enlatados.

Tradicionalmente, a produção de cerveja começa a partir de uma mistura de malte de cevada e água quente, no processo de brassagem. Pode-se adicionar também matérias-primas auxiliares, como milho, aveia, trigo ou arroz. Este mosto é filtrado e colocado em cubas de cobre e, após adição de lúpulo, é fervido por cerca de uma hora, quando liberará as substâncias aromáticas e o princípio amargo contido nas folhas. Após o resfriamento a estadia em cubas de fermentação, onde a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*, fermento cervejeiro) é adicionada. A fermentação industrial divide-se em principal e secundária. Na fermentação principal, o fermento cervejeiro desencadeia o verdadeiro processo de fermentação, que consiste na ação desses microorganismos naturais na transformação das moléculas de açúcar em álcool e CO₂, com a liberação de calor. Inicia-se a produção da cerveja propriamente dita, que ocorre geralmente entre 3 e 7 dias, passando-se, então, para a fermentação secundária ou maturação. O produto é transferido para tanques de maturação, onde a cerveja permanece por 12 a 20 dias, repousando a baixa temperatura,

permitindo um amadurecimento da cerveja, que terá um sabor e um aroma mais apurados. A cerveja bruta ainda passa por um processo de filtração e clarificação para a eliminação dos resíduos em suspensão no líquido, dando-lhe o brilho e a translucidez exigidos pelo consumidor.

Neste processo tradicional, o malte é a matéria-prima, fornecendo amido, proteína e fonte de enzimas. Uma forma bastante cara de produzir enzimas. A substituição de parte deste malte, por enzimas industriais e cereais não maltadas, como a própria cevada, pode levar a uma economia considerável. O processo pode ser controlado com maior precisão devido a qualidade e a performance constante das enzimas industriais. O malte é um ingrediente cuja performance está sujeita a variações, ela depende da qualidade da cevada utilizada e da técnica de maltação aplicada.

As principais aplicações para as enzimas industriais em cervejarias incluem substituição do malte por cevada, maior liquefação das matérias-primas auxiliares, melhoria dos processos de filtração, cervejas com baixo teor de calorias, e redução do tempo de maturação.

O setor de laticínios e derivados é, provavelmente, uma das mais antigas aplicações conhecidas para as enzimas. Homero, poeta épico grego considerado autor da *Ilíada* e da *Odisseia*, datando de 800 a.C., já mencionava o uso das enzimas na produção de queijo. Nas suas obras encontram-se trechos mencionando que os estômagos de cordeiros e cabritos, os quais contêm as mesmas enzimas que o estômago do vitelo, eram utilizados na produção de queijos. Estas enzimas de coagulação são conhecidas hoje como sendo a quimosina e a pepsina. A quimosina do vitelo é conhecida como a enzima ideal para a fabricação do queijo, devido a sua atividade de coagulação do leite altamente específica. A pepsina bovina não tem a mesma especificidade e, por isso, tem um tipo de atuação diferente quando utilizada no leite. Ela é mais sensível às variações da qualidade do leite. Nos Estados Unidos, a pepsina de porco é largamente utilizada, em mistura 50/50. A quimosina produzida por fermentação - protease de origem microbiana proveniente do



fungo *Mucor miehei* - é uma alternativa com características semelhantes às da quimosina do vitelo.

Ao lado destas enzimas utilizadas para o processo de coagulação, os pesquisadores trabalham ativamente em enzimas para ajudar na cura dos queijos, um processo lento e custoso em imobilização de capital.

O processo para acelerar a cura utilizando enzimas exógenas, proteases, lipases, ou decarboxilases é um problema complexo que esbarra em duas dúvidas básicas: a quantidade de enzimas e a técnica de adição. A adição destas enzimas em pequenas quantidades pode melhorar o gosto e acelerar a cura do coalho; por outro lado, o aumento da concentração em enzimas leva a defeitos na textura e no sabor e a uma maior amargura.

Nas técnicas de adição existem duas escolas. A adição ao leite é a mais fácil, porém ela leva a uma desestabilização das caseínas, gerando um mau rendimento de coagulação e, por outro lado, a baixa taxa de retenção de enzimas de cura no coalho pode não ser satisfatória do ponto de vista econômico.

A segunda escola, que é a favor da adição de enzimas de cura no coalho, encontra o problema que o fenômeno de difusão no coalho pode gerar desigualdades geográficas na hidrólise da massa. A solução ideal parece estar

no encapsulamento das enzimas e pode ser que a utilização de liposomas seja a resposta.

Se as proteases agem principalmente na textura, as lipases atuam essencialmente no gosto. O uso de lipases intensifica a lipólise durante a maturação de queijos. Elas são muito usadas na fabricação dos queijos "azuis" e italianos (romano, parmesão, provolone). O gosto picante característico provém da presença de ácidos graxos de cadeia curta, liberados pelas lipases.

O uso de enzima pode também ser feito em tratamentos visando hidrolisar a lactosa do leite e de seus subprodutos. Diversos problemas de ordem nutricional (deficiência em lactase intestinal em certos indivíduos), organolépticos (baixo poder adoçante da lactose), ou tecnológicos (baixa solubilidade deste açúcar em meio aquoso, sua propensão a cristalizar-se) podem ser solucionados pela sua hidrólise por meio de uma β -galactosidase. Os principais campos de atuação desta tecnologia são a produção de leite e derivados com baixo teor de lactose; a aceleração na fabricação de queijo e iogurtes pelo aumento do poder de fermentação e/ou modificação do pH; a preparação de leite em pó para sorvetes e produtos cozidos; e a produção de xaropes e edulcorantes para a indústria alimentícia.

As aplicações de enzimas industriais no setor de óleos e gorduras ainda estão engatinhando, alguns produtos já são utilizados comercialmente.

A enzimologia pode trazer soluções diversas para este setor, cujo principal problema é a de eliminar ou minimizar a ocorrência de subprodutos indesejáveis, assim como poder levar a novos produtos.

A tecnologia enzimática permite aos processadores de óleos e gorduras produzir alguns produtos interessantes, tais como, no caso da manteiga de cacau, necessária para a produção de chocolate, frequentemente em falta no mercado e, conseqüentemente, com seu preço oscilando muito, a utilização de um óleo de palma em uma reação química com ácido esteárico, usando interesterificação enzimática, leva a uma gordura com propriedades similares as da manteiga de cacau; na produção de margarina, o ponto de fusão, o poder de dispersão, a vida útil e as propriedades nutricionais podem ser modificadas pelo uso de enzimas.

A aplicação de uma enzima específica no processo de fabricação da lecitina leva a liso-lecitina, que possui

propriedades emulsificantes superiores a da lecitina normal.

No mundo inteiro o pão é um dos alimentos básicos mais comuns e de menor custo. As mudanças no setor de panificação e a demanda cada vez maior por produtos naturais, fizeram com que as enzimas ganhassem uma grande importância na formulação de produtos de panificação. A massa para pão é normalmente composta de farinha, água, fermento, sal e algum outro ingrediente, como açúcar e/ou gordura. A farinha é composta de glúten, amido, polissacarídeos não amiláceos, lipídios e traços de minerais. Tão logo a mistura de ingredientes forme a massa, o fermento começa a agir sobre os açúcares fermentáveis, transformando-os em álcool e dióxido de carbono, e a massa começa a crescer.

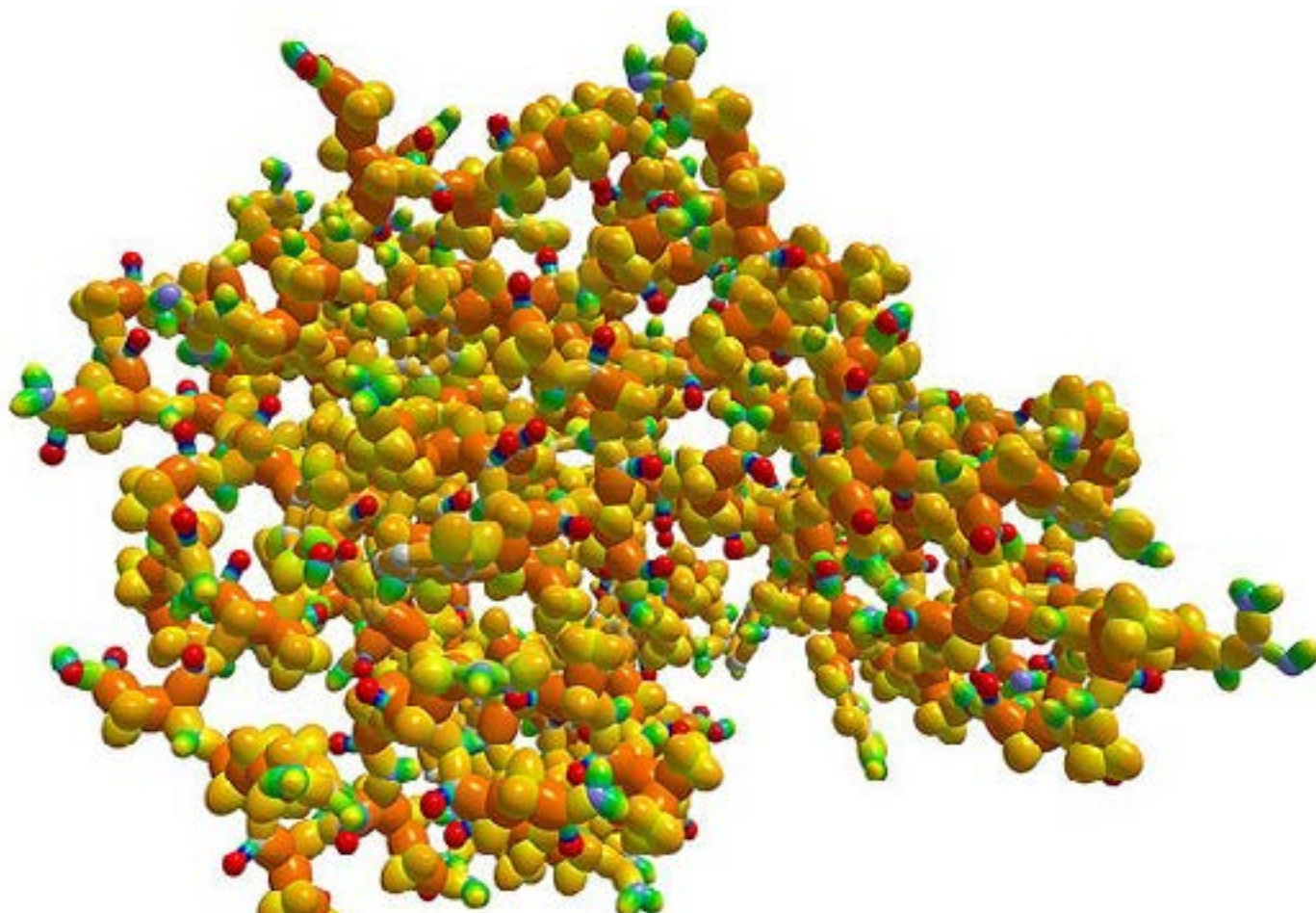
O amido é o maior componente da farinha de trigo. O glúten é uma combinação de proteínas que formam uma ampla cadeia entrelaçada durante a formação da massa. É este entrelaçamento de cadeias que segura os gases dentro da massa durante o seu crescimento e a assadura no forno. A resistência desta cadeia entrelaçada é,

então, muito importante para a qualidade final de qualquer pão, cuja massa cresce usando fermento. Enzimas como as hemicelulases ou xilanases, lipases e oxidases podem melhorar, direta ou indiretamente, a resistência da malha do glúten e assim, melhorar a qualidade do produto final, o pão.

As α -amilases transformam os amidos da farinha de trigo em pequenas dextrinas, permitindo ao fermento agir de maneira mais constante durante a fermentação da massa, seu crescimento e nos primeiros momentos no forno. O resultado é um produto final com maior volume e uma melhor textura do miolo, e os pequenos oligossacarídeos e açúcares como a glicose e maltose, produzidos por estas enzimas, aumentam as reações de Maillard, responsáveis pelo dourado da crosta e pelo aroma de pão quente.

Quando o pão não é mais fresco, ele perde a crocância e o miolo endurece. Este fenômeno de pão amanhecido é responsável por perdas significativas, tanto para os consumidores quanto para os panificadores.

Acredita-se que o endurecimento da crosta e a perda de elasticidade do miolo se devem a uma mudança



na estrutura dos amidos. Hoje, já se produzem enzimas que prolongam o tempo e a conservação do pão.

A farinha contém 2,5% a 3,5% de polissacarídeos não amiláceos, que são polímeros (na maior parte pentosanas), que tem um papel importante na qualidade do pão, devido a capacidade de absorção da água e interação com o glúten. A adição de certos tipos de pentosanase ou xilanase, em dosagens corretas, melhora a maleabilidade da massa, dando-lhe maior flexibilidade, mais estabilidade, com maior elasticidade durante a assadura, resultando um volume maior e melhor textura do miolo.

A farinha de trigo comum contém 1% a 1,5% de lipídios. Alguns deles, especialmente os não polares, como os triglicérides, são ligados ao glúten, impedindo sua funcionabilidade. A adição de lipases funcionais modifica os triglicérides, alterando consequentemente sua interação com o glúten. Conseguem-se, assim, uma cadeia entrelaçada de glúten com maior resistência, propiciando uma massa mais estável, um maior volume do pão e uma melhor estrutura do miolo.

Os oxidantes químicos, como os bromatos, azodicarbonamida e ácido ascórbico, são amplamente utilizados para reforçar o glúten. As enzimas oxidativas, como a glicose oxidase, podem substituir parcialmente o uso destes oxidantes químicos, com melhoria da qualidade do produto final.

Cada uma das enzimas mencionadas tem o seu próprio substrato específico na massa feita de farinha de trigo. Por exemplo, as lipases os lipídios, as xilanases, os pentosanos, as amilases e os amidos. Como a interação desses substratos na massa e no pão é bastante complexa, a utilização de combinações de enzimas deve ser criteriosa. Muitas vezes, uma dosagem excessiva de uma enzima pode ter efeito prejudicial sobre a massa ou o pão. Por exemplo, um excesso de α -amilase fúngica ou hemicelulase/xilanase pode resultar em uma massa demasiadamente grudenta para ser manuseada pelo padeiro ou a masseira. Assim seria benéfico para certos tipos de formulação usar uma combinação

de enzimas com menor dosagem de α -amilases e xilanase e menor dosagem de lipases ou glicose oxidases para conseguir uma massa de consistência ótima, estável, com qualidade de pão ou usar α -amilase maltogênica em combinação com α -amilase fúngica e xilanase ou lipase para assegurar um miolo macio num pão de ótima qualidade em termos de estrutura de miolo, volume, etc.

Todos os tipos de frutas e especialmente as bagas, com algum valor nutricional e processamento industrial significativo, contém em quantidades variáveis, uma substância chamada pectina, que age como uma cola, segurando as paredes celulares das frutas, umas nas outras. Na fruta verde, a pectina está presente na forma insolúvel, chamada protopectina, responsável pela relativa dureza ou firmeza da fruta. Quando a fruta amadurece, a protopectina é parcialmente transformada na forma solúvel, neste estágio, quando a fruta for espremida, somente algumas das pectinas passam para o suco, tornando este mais viscoso, mas ainda, com pouca cor e aroma e sua clarificação e filtração são difíceis, dificultando o rendimento.

Estas dificuldades podem ser superadas pela adição de preparações enzimáticas especiais, antes da prensagem, no mosto, facilitando a futura extração, aumentando consideravelmente o rendimento em suco e o rendimento na prensagem. A completa despectinização pelo uso de enzimas pectinases propicia uma boa clarificação e filtração do suco, bem como maior estabilidade do concentrado de suco produzido. A adição de enzimas no mosto é hoje uma prática normal nos grandes processadores.

A despectinização dos sucos após a prensagem é necessária para se obter um suco com baixa viscosidade. Na produção de sucos concentrados a despectinização é obrigatória para evitar a geleificação durante a concentração ou a estocagem dos concentrados.

O suco de maçã é um exemplo de suco que pode conter uma grande quantidade de amido, que pode ser tratado com a adição de uma enzima.

Para as frutas vermelhas, por exemplo, a cor é uma qualidade importante, a adição de preparações enzimáticas, como as celulases, podem levar a um melhor rendimento e melhor coloração do extrato. Nas frutas cítricas são utilizadas enzimas pectolíticas. No processo de lavagem da polpa usa-se uma enzima para reduzir a viscosidade e evitar geleificação das pectinas durante a fase de concentração. Outras enzimas pectolíticas são utilizadas na clarificação, na recuperação de óleos essenciais ou na produção de extrato, a partir da casca, com alto índice de turbidez, para aplicação na indústria de refrigerantes.

Uma aplicação bastante recente permite a pelagem perfeita da fruta para utilizar em saladas de frutas em conserva, por exemplo - mediante a utilização de enzimas, substituindo, assim, um antigo processo utilizando soda cáustica.

Na indústria de sucos de frutas, a fase de pasteurização desativa as enzimas pouco após elas terem efetuado o seu trabalho. Na fabricação de vinhos, tal processo não existe e consequentemente, a atividade enzimática pode manter-se durante um longo período de tempo. Nas vinícolas, um dos maiores desafios é a extração do maior volume possível de componentes aromáticos. No vinho tinto, como no caso das frutas vermelhas, a extração da cor também é de grande importância.

Um problema específico dos viticultores reside na extrema dificuldade de clarificar e filtrar vinhos produzidos a partir de cachos atacados pelo fungo *Botrytis cinerea*, que produz beta-glucanos (polímeros de glicose com alto peso molecular), que passam para o vinho estas macromoléculas prejudicam a clarificação e entopem rapidamente os filtros, que são facilmente removidos pela adição ao vinho de uma enzima beta-glucanase altamente específica.

Novas enzimas ajudam a liberação de aromas. É o caso das glicosidases que hidrolisam os terpenil glicosídeos. Os terpenos assim liberados são um dos importantes componentes do famoso bouquet.