

Capítulo 2

Carboidrases

Haroldo Yukio Kawaguti • Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 22
- ▶ Características gerais e modo de ação, 22
- ▶ Principais carboidrases de aplicação em alimentos, 24
- ▶ Outras carboidrases de interesse em alimentos, 84
- ▶ Bibliografia, 90

Introdução

Carboidrases são as enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos formadores de oligossacarídeos e/ou polissacarídeos.

Carboidrases são também capazes de catalisar a reação inversa da hidrólise, além da reação de transglicosilação.

Carboidrases são as enzimas que catalisam a degradação de carboidratos, isto é, hidrolisam as ligações glicosídicas entre monossacarídeos formadores de oligossacarídeos e/ou polissacarídeos. Como todas as hidrolases, as carboidrases são também capazes de catalisar a reação inversa da hidrólise, sintetizando oligossacarídeos em condições de reação especiais que envolvem baixa atividade de água e excesso de substrato. Além disso, carboidrases catalisam ainda reações de transglicosilação, hidrolisando ligações glicosídicas e transferindo o resíduo liberado para outro aceptor, diferente da água.

Características gerais e modo de ação

Clivagem da ligação glicosídica

Em geral, carboidrases são específicas com relação ao resíduo que será transferido para a água, isto é, o tipo de monossacarídeo ao qual a enzima é capaz de se ligar para efetuar a reação de hidrólise. Assim, glicosidases, galactosidases e frutofuranosidases são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas envolvendo glicoses, galactoses e frutoses, respectivamente. Normalmente, a aglicona (molécula à qual está ligado o resíduo a ser hidrolisado) não é importante para a eficiência da catálise. No entanto, quando a aglicona é também constituída de carboidratos (caso dos oligo- e polissacarídeos), a posição da ligação que os une se torna um fator a considerar.

Carboidrases são específicas com relação ao tipo de monossacarídeo ao qual a enzima é capaz de se ligar para efetuar a reação.

Posição da ligação à aglicona

Quando a aglicona é uma pentose, uma hexose ou polímeros destas, a posição da ligação do resíduo determina a habilidade, ou não, de uma dada enzima hidrolisar a ligação. Assim, enzimas capazes de hidrolisar, satisfatoriamente, ligações α -1,4 entre duas hexoses podem ser totalmente inúteis na hidrólise de ligações α -1,6 entre as mesmas hexoses (Figura 2.1).

Enzimas capazes de hidrolisar ligações α -1,4 entre duas hexoses podem ser totalmente inúteis na hidrólise de ligações α -1,6 entre as mesmas hexoses.

Configurações do substrato

Os carboidratos naturais são constituídos primordialmente de resíduos do tipo D-sacarídeos, sendo exceções a

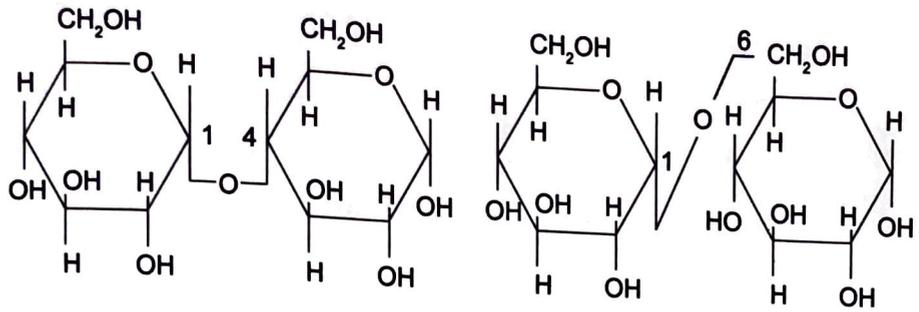


Figura 2.1 Ligação α -1,4 e α -1,6 entre unidades de glicose (maltose e isomaltose).

L-ramnose (6-desoxi-L-manose), a L-fucose (6-desoxi-L-galactose) e a L-arabinose, encontradas nos polissacarídeos da parede celular de vegetais. Em consequência, as enzimas envolvidas em sua hidrólise são específicas para cada tipo de configuração.

O carbono anomérico de monossacarídeos (geralmente o carbono 1 de aldoses e o carbono 2 de cetoses) pode se apresentar nas configurações α ou β em que sua hidroxila fica para baixo ou para cima do plano do anel, respectivamente (Figura 2.2). Dependendo dessa configuração, serão estabelecidas diferentes ligações glicosídicas para as quais as carboidrases são altamente específicas. Assim, α -glicosidases são capazes de hidrolisar ligações α -glicosídicas, porém não são capazes de promover a clivagem de ligações β -glicosídicas.

Uma vez que a ligação é rompida, o resíduo liberado pode manter sua configuração (α ou β) ou esta pode sofrer inversão, dependendo da enzima envolvida na reação.

Tamanho da molécula de substrato

Algumas carboidrases apresentam alta atividade sobre substratos poliméricos. À medida que a massa molecular

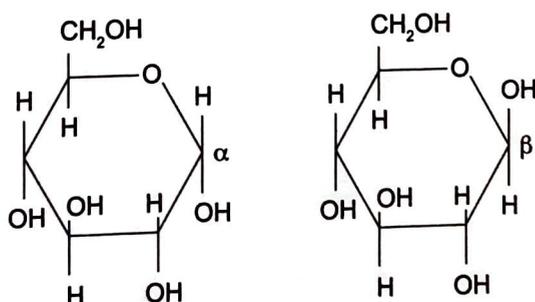


Figura 2.2 Representação de Haworth para α -D-glicopirranose e β -D-glicopirranose.

O carbono anomérico de monossacarídeos pode se apresentar nas configurações α (hidroxila para baixo) ou β (hidroxila para cima).

Algumas carboidrases apresentam alta atividade sobre substratos poliméricos enquanto outras apresentam atividade apenas sobre oligossacarídeos, não sendo capazes de hidrolisar moléculas idênticas, porém de maior massa molecular.

Exoenzimas clivam seus substratos de forma ordenada, a partir da extremidade, podendo ser específicas para a extremidade redutora ou para a não redutora

Endoenzimas hidrolisam o substrato de forma aleatória, clivando ligações no interior do polímero.

Amilases são as carboidrases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas α -1,4 e/ou α -1,6 presentes no amido, no glicogênio e em sacarídeos derivados.

do substrato é reduzida, diminui também a atividade dessas enzimas sobre ele. De forma similar, certas enzimas apresentam atividade apenas sobre oligossacarídeos, não sendo capazes de hidrolisar moléculas idênticas, porém de maior massa molecular.

Padrões endo- e exo- de atividade

Algumas carboidrases (exoenzimas) atacam seus substratos de forma ordenada, a partir da extremidade, podendo ser específicas para a extremidade redutora ou para a extremidade não redutora (Figura 2.3). Sua atividade pode ser relacionada com a rápida liberação de açúcares redutores e com pequena alteração na viscosidade do meio reacional, a curto prazo.

Outras carboidrases hidrolisam o substrato de forma aleatória, clivando ligações no interior do polímero. Estas são conhecidas como endoenzimas, e sua atividade pode ser relacionada com a rápida perda de viscosidade da solução, acompanhada de pequena liberação de açúcares redutores.

Principais carboidrases de aplicação em alimentos

Amilases

São as carboidrases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas α -1,4 e/ou α -1,6 presentes no amido, no glicogênio e em sacarídeos derivados. Existe uma variedade de enzimas que correspondem a essa definição (Tabela 2.1) e que podem ser agrupadas de acordo com diferentes características: modo de ação (endo- ou exo-), retenção ou inversão de configuração (α ou β), afinidade por ligações tipo α -1,4 ou α -1,6, atividade de transglicosilação ou não.

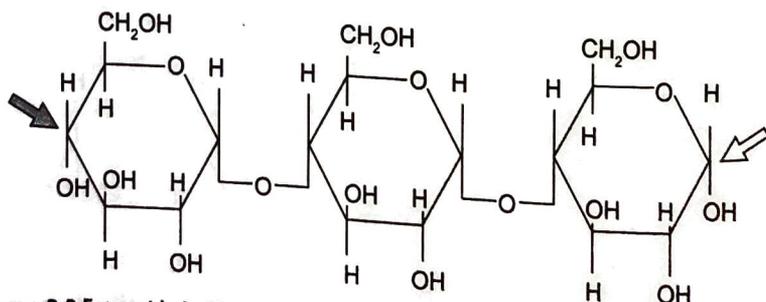


Figura 2.3 Extremidade redutora (seta branca) e não redutora (seta cinza) da maltotriose.

Tabela 2.1 Enzimas que agem sobre amido e glicogênio (alguns exemplos).

Enzima	Ligação preferencial para hidrólise	Substrato preferencial	Resultado da reação
Endoenzimas			
α -amilase EC 3.2.1.1	α -1,4	Amido	Dextrinas, maltose
Isoamilase EC 3.2.1.68	α -1,6	Amilopectina	Amilose (dextrinas lineares)
Isomaltase EC 3.2.1.10	α -1,6	Dextrinas limite	Maltose, maltotriose
Ciclomaltodextrinase EC 3.2.1.54	α -1,4	Ciclodextrinas e dextrinas lineares	Maltose, maltotriose
Pululanase EC 3.2.1.41	α -1,6	Pululana e amido	Maltotrioses e dextrinas lineares
Isopululanase EC 3.2.1.57	α -1,4	Pululana	Isopanose
Exoenzimas			
β -amilase EC 3.2.1.2	α -1,4	Amido	β -maltoses
Glicoamilase EC 3.2.1.3	α -1,4, α -1,6	Amido	β -glicoses
α -glicosidase EC 3.2.1.20	α -1,4	Diversos	α -glicoses
Ciclomalatodextrina glicana transferase EC 2.4.1.19	α -1,4	Amido	Ciclodextrinas
4- α -glicana transferase EC 2.4.1.25	α -1,4	Amido	Amilopectina, glicogênio
Enzima ramificadora EC 2.4.1.18	α -1,4	Amido e glicogênio	Amilopectina, glicogênio

Adaptada de Whitaker, 1994.

Quatro grupos de enzimas atuam sobre o amido: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e transferases.

Basicamente, existem quatro grupos de enzimas que atuam sobre o amido: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e transferases. As endoamilases são capazes de quebrar aleatoriamente as ligações α -1,4 nas moléculas de amido, produzindo oligossacarídeos de diferentes tamanhos, ramificados ou não. As exoamilases são capazes de hidrolisar as ligações α -1,4 a partir da extremidade não

reduzindo a molécula de amido, gerando apenas produtos de baixa massa molecular, principalmente glicose e maltose. As enzimas desramificantes quebram ligações do tipo α -1,6, e as transferases são enzimas que clivam as ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador a um aceptor diferente da água, com a formação de uma nova ligação glicosídica.

Em razão de sua importância para a indústria de alimentos, serão discutidas aqui, em maiores detalhes, α -amilases, β -amilases, glicoamilases, além de algumas enzimas desramificantes e transferases.

► Substrato

O amido é um polissacarídeo constituído de centenas ou milhares de unidades de glicose. É o principal material de reserva das plantas (em sementes, tubérculos, raízes, bulbos e rizomas) e a principal fonte de energia da nutrição animal. Em alimentos, o amido é o principal constituinte em uma grande variedade de produtos, responsável por sua estrutura, textura e/ou consistência. Nos vegetais, o amido se encontra em pequenos grânulos, de características peculiares a cada espécie, contendo as duas frações que constituem o amido nativo: amilose (de 15 a 30%) e amilopectina (de 70 a 85%).

A amilose é um polímero linear, formado por unidades de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 2.4A). Em solução, a amilose apresenta conformação helicoidal e tem a propriedade de se complexar com iodo formando composto de cor azul-escura. A amilopectina é um polímero ramificado formado por cadeias de glicose semelhantes à amilose, que são unidas entre si por ligações do tipo α -1,6 (Figura 2.4B). A amilose e a amilopectina estão organizadas em uma estrutura semicristalina com zonas amorfas e cristalinas.

Em seu estado nativo, grânulos de amido são resistentes à ação da maior parte das enzimas amilolíticas. No entanto, quando aquecidos em água até uma dada temperatura (característica para cada tipo de grânulo), estes absorvem grande quantidade de água, sofrendo gelatinização e se tornando suscetíveis à hidrólise enzimática.

O amido é um polissacarídeo formado por centenas ou milhares de unidades de glicose. É constituído de cerca de 80% de amilopectina e 20% de amilose.

A amilose é um polímero linear de unidades de glicose ligadas entre si por ligações α -1,4. A amilopectina é um polímero ramificado formado por cadeias de amilose, unidas entre si por ligações do tipo α -1,6.

Em seu estado nativo, grânulos de amido são resistentes à ação da maior parte das enzimas amilolíticas, mas após a gelatinização se tornam suscetíveis à hidrólise enzimática.

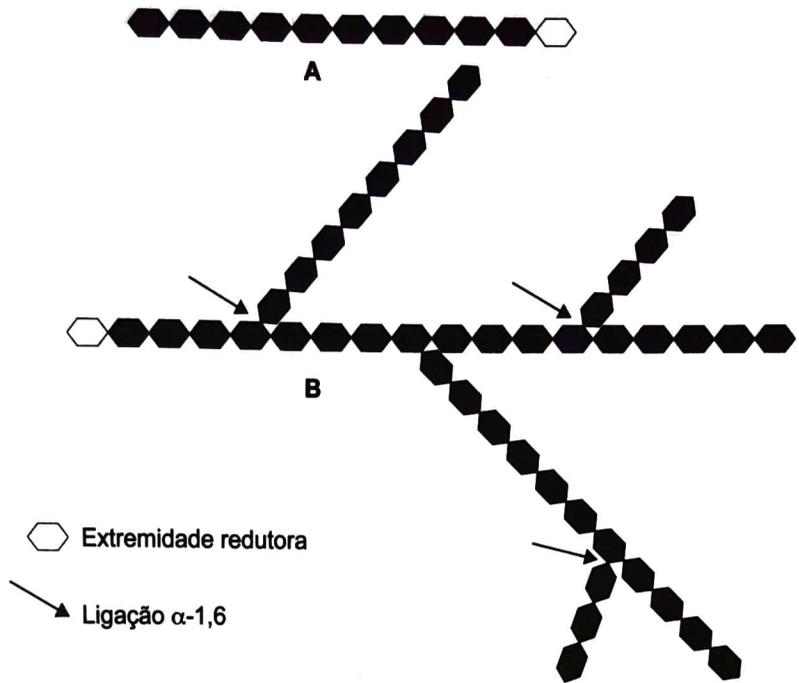


Figura 2.4 Representação esquemática da amilose (A) e da amilopectina (B).

O glicogênio é um polímero de glicoses produzido e armazenado por animais. Assemelha-se à amilopectina, porém é mais ramificado.

O glicogênio é um polímero de glicoses produzido e armazenado por animais (principalmente no fígado e nos músculos). Sua estrutura se assemelha à da amilopectina, sendo, porém, mais ramificado (apresenta maior número de ligações α -1,6).

► Fontes e principais características

α -amilases (EC 3.2.1.1)

α -amilases são endocarbohidrases que hidrolisam ligações α -1,4 de forma aleatória nas moléculas de amido.

São enzimas largamente distribuídas na natureza, produzidas por animais (saliva, pâncreas), vegetais (principalmente sementes amiláceas e especialmente durante a germinação) e microrganismos (bactérias e fungos filamentosos, mas não leveduras alcoólicas). As α -amilases são endocarbohidrases que hidrolisam ligações α -1,4 existentes na amilose e na amilopectina de forma aleatória, na porção central das moléculas.

Inicialmente, a ação dessas enzimas sobre o amido é rápida, uma vez que elas apresentam maior afinidade sobre substratos de alta massa molecular, gerando uma mistura de oligossacarídeos de diferentes tamanhos, lineares e/ou ramificados, chamada dextrina ou maltodextrina. Em maiores tempos de reação, α -amilases são capazes de

A ação das α -amilases sobre o amido gera uma mistura de oligossacarídeos chamada dextrina ou maltodextrina.

α -amilases são capazes de produzir glicose e maltose a partir de amilose e uma série de oligossacarídeos contendo as ligações α -1,6, conhecidos como dextrina α -limite, a partir de amilopectina.

produzir glicose e maltose a partir de amilose e uma série de oligossacarídeos (de 4 ou mais unidades de glicose) contendo as ligações α -1,6 glicosídicas, conhecidos como dextrina α -limite, a partir de amilopectina. A maior parte dos autores considera α -amilases incapazes de hidrolisar ligações do tipo α -1,6 embora, segundo Kulp (1975), algumas dessas ligações possam ser rompidas em longos tempos de reação. A composição da dextrina obtida é dependente da fonte do amido e, principalmente, da fonte da enzima utilizada.

As α -amilases são geralmente estabilizadas na presença de íons de cálcio. Estes não aumentam a velocidade de reação, mas aumentam a estabilidade da enzima, reduzindo a desnaturação e garantindo maior vida útil. Algumas α -amilases, dependendo das fontes, são ativadas (apresentam maior taxa de hidrólise) na presença de halogênios.

As características bioquímicas dessas carboidrases são bastante variáveis com a fonte, sendo muitas delas produtoras de diferentes isoenzimas. As α -amilases de mamíferos têm pH ótimo em torno da neutralidade (entre 6,0 e 7,0), enquanto as de cereais têm pH ótimo de atividade em meio ácido (em torno de 5,0). As α -amilases microbianas apresentam pH ótimo extremamente variável: α -amilases de *Bacillus subtilis* apresentam maior atividade em valores de pH entre 5,0 e 7,0, enquanto α -amilases de *Geobacillus stearothermophilus* apresentam ótima atividade em pH = 3,0. Quanto à temperatura, a maior parte das α -amilases animais e vegetais apresenta ótima atividade em torno de 40°C. Entre as amilases microbianas, as enzimas produzidas por fungos apresentam menor resistência térmica e temperaturas ótimas de atividade geralmente inferiores que as de bactérias. Há, no entanto, amilases microbianas com atividade ótima acima de 70°C e altíssima estabilidade térmica. Estas são as que encontram maior aplicação na indústria de alimentos, por dois motivos principais:

Amilases microbianas com atividade ótima acima de 70°C e altíssima estabilidade térmica são as de maior aplicação na indústria de alimentos.

- O uso de altas temperaturas de reação reduz consideravelmente o risco de contaminação microbiana do meio reacional

O uso de altas temperaturas reduz o risco de contaminação microbiana e evita a necessidade de gelatinização prévia do amido e subsequente resfriamento do meio reacional.

- O amido da maior parte das fontes gelatiniza em temperaturas superiores a 50°C. Desta forma, enzimas com altas temperaturas de atividade evitam a necessidade de gelatinização prévia do amido e subsequente resfriamento do meio reacional.

As α -amilases mais aplicadas em processos na indústria de alimentos são as obtidas de bactérias do gênero *Bacillus* (*B. licheniformis* e *B. subtilis*, pH = 6,0 a 7,0; temp. = 60 a 85°C) e aquelas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* (*A. oryzae* e *A. niger*, pH = 5,0; temp. = 50°C).

β -amilases (EC 3.2.1.2)

São exoenzimas que hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4 do amido, a partir da extremidade não redutora, liberando unidades de maltoses, com inversão da configuração do carbono anomérico de α para β . São produzidas principalmente por vegetais: em sementes amiláceas são encontradas em conjunto com α -amilases (trigo e cevada, por exemplo), são também encontradas em batata-doce e em grãos de soja. Esta é considerada a melhor fonte para obtenção comercial de β -amilases em virtude do baixo teor de α -amilases produzido pela soja. Microrganismos também são produtores dessas carboidrases (*Bacillus polymyxa*, por exemplo) mas não são conhecidas β -amilases de origem animal.

O resultado da hidrólise de amilose por β -amilases é cerca de 90% de maltose e 10% de glicose e maltotriose. A hidrólise desta última acontece de forma extremamente lenta e requer altas concentrações de enzima, uma vez que a maltose atua como seu inibidor competitivo. Sobre amilopectina, β -amilases realizam hidrólise incompleta, gerando de 50 a 60% de maltose, e o restante corresponde a oligossacarídeos de alta massa molecular contendo todas as ligações α -1,6 do polímero; esses são conhecidos como dextrina β -limite.

As β -amilases vegetais apresentam maior atividade em valores de pH entre 5,0 e 6,0 e são estáveis entre 4,0 e 8,0, a 20°C. As enzimas de soja apresentam maior estabilidade em meio ácido do que as de trigo e cevada. Com relação à temperatura, sua atividade ótima é em torno de 30°C. Não

As α -amilases mais aplicadas na indústria de alimentos são produzidas por *Bacillus* sp. e por *Aspergillus* sp.

β -amilases são exoenzimas que hidrolisam exclusivamente ligações α -1,4 do amido, a partir da extremidade não redutora, liberando unidades de maltose. São produzidas apenas por vegetais e microrganismos.

A hidrólise de amilose por β -amilases gera maltoses, além de glicose e maltotriose.

Sobre amilopectina, a hidrólise gera maltose e oligossacarídeos de alta massa molecular contendo todas as ligações α -1,6 do polímero, conhecidos como dextrina β -limite.

são enzimas particularmente termoestáveis, perdendo grande parte de sua atividade após 30 min a 70°C. β -amilases são enzimas sulfidrílicas sendo inativadas por oxidação. Sua atividade pode ser protegida e mesmo recuperada na presença de agentes redutores.

Glicoamilase ou amiloglicosidase (EC 3.2.1.3)

São exoenzimas que removem unidades de glicose a partir da extremidade não redutora das cadeias de amilose e amilopectina. São capazes de romper tanto ligações α -1,4 quanto ligações α -1,6 e α -1,3, tendo mais afinidade pelas ligações α -1,4. Com isto, as glicoamilases são, teoricamente, capazes de converter completamente o amido em glicose. Na prática, entretanto, na ausência de α -amilases, a conversão nunca é completa, motivo pelo qual as duas enzimas são usadas em conjunto. Isso ocorre pois as glicoamilases apresentam baixa atividade sobre substratos de alta massa molecular, dependendo de uma hidrólise inicial da amilopectina para apresentar atividade satisfatória. Quando o meio reacional apresenta altos teores de glicose, as glicoamilases tendem a sintetizar isomaltoses (dissacarídeo composto por duas unidades de glicose ligadas por ligações α -1,6, ver Figura 2.1), que essas enzimas não são capazes de hidrolisar. Em escala industrial, esse aspecto pode representar uma perda significativa no rendimento final. As glicoamilases são produzidas basicamente por microrganismos, principalmente fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*. Essas enzimas costumam apresentar atividade ótima em valores de pH entre 4,0 e 5,0 em temperaturas de 50 a 60°C.

.....
Glicoamilases são exoenzimas que removem unidades de glicose a partir da extremidade não redutora das cadeias de amilose e amilopectina. São capazes de clivar tanto ligações α -1,4 quanto ligações α -1,6 e α -1,3.

.....
Na presença de altos teores de glicose, glicoamilases sintetizam isomaltoses, o que representa uma perda significativa no rendimento industrial.

.....
As glicoamilases são produzidas principalmente por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*.

.....
Enzimas desramificantes são amilases capazes de remover as ramificações de substratos ramificados como amilopectina, glicogênio e dextrinas limite. São elas: isoamilase e pululanase (capaz de hidrolisar pululana).

Enzimas desramificantes

São amilases que apresentam maior afinidade pela ligação α -1,6 que pela ligação α -1,4, capazes de remover as ramificações de substratos ramificados como amilopectina, glicogênio e dextrinas limite.

Isoamilase. Sua ação é restrita a dextrinas de tamanho médio (não atua satisfatoriamente sobre a amilopectina nativa nem é capaz de hidrolisar isomaltose). Produzida por vegetais (principalmente feijões) e por bactérias (do gênero *Flavobacterium*).

Pululanase. Tipo especial de isoamilase. Tem a mesma função desramificante porém possui a particularidade de ser capaz de hidrolisar pululana.¹ Produzida por bactérias dos gêneros *Aerobacter* e *Klebsiella*. A Figura 2.5 ilustra a atividade das amilases discutidas até aqui.

Transferases

As α -glicana-transferases (AGTases) são amilases que atuam sobre substratos poliméricos contendo uma sequência de ligações glicosídicas consecutivas do tipo α -1,4, como

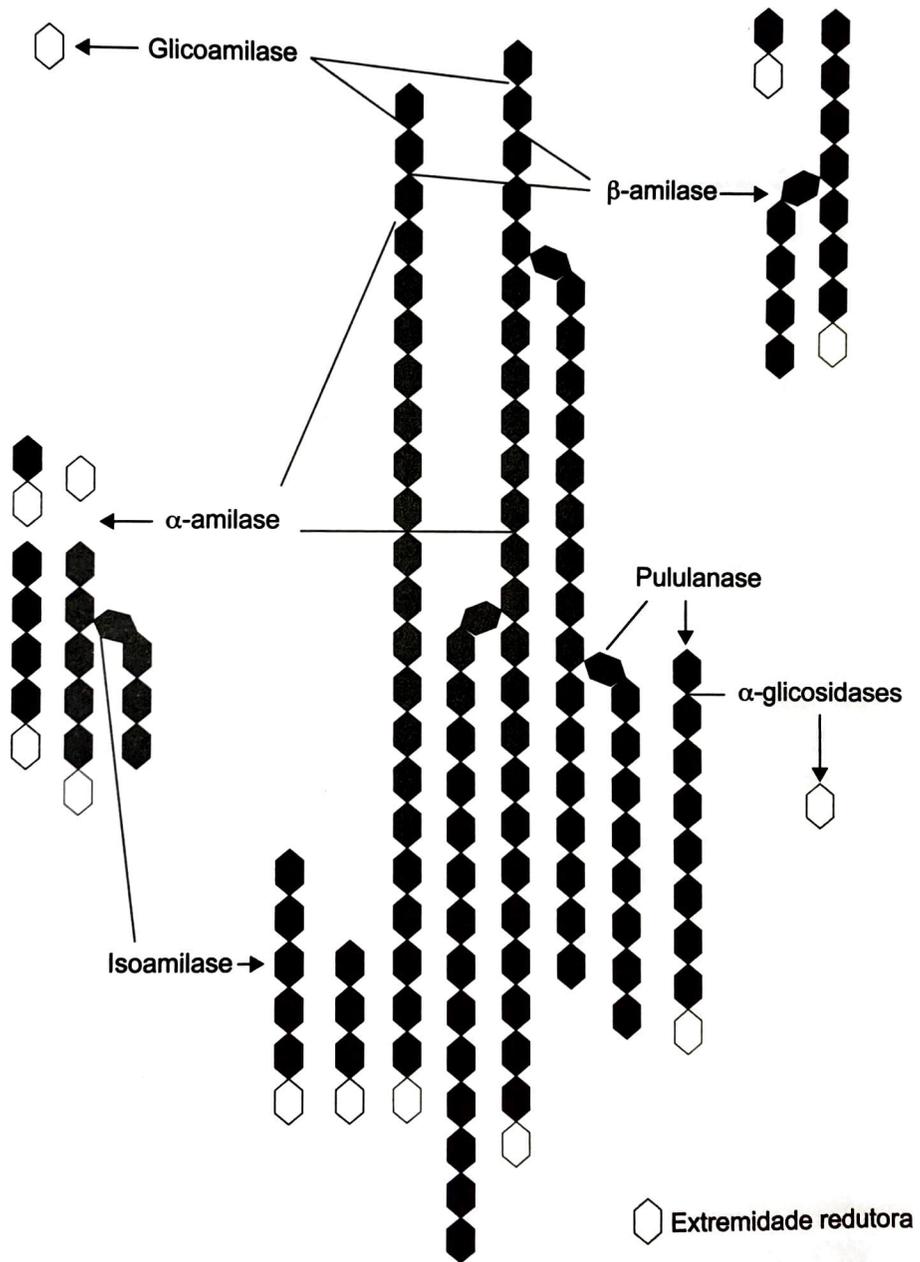


Figura 2.5 Resumo da atividade das principais amilases sobre amilose e amilopectina.

¹Pululana: polímero de maltotrioses, ligadas entre si por ligações α -1,6, produzido pelo fungo *Aureobasidium pullulans*.

Transferases são amilases que catalisam a hidrólise seguida da transferência da cadeia de glicana clivada para um aceptor, formando uma nova ligação α -glicosídica.

GTases geram ciclodextrinas. São produzidas por bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Geobacillus* e *Paenibacillus*.

4- α GTases geram isomaltoligossacarídeos ou cicloamiloses que contêm até centenas de unidades de glicose.

Enzimas ramificantes criam ramificações formando ligações do tipo α -1,6 em cadeias lineares de amido.

a amilose, a amilopectina, as maltodextrinas e o glicogênio. Catalisam a reação de hidrólise seguida da transferência da cadeia de glicana clivada para um aceptor diferente da água, formando uma nova ligação α -glicosídica.

O grupo das AGTases é composto pelas enzimas descritas a seguir.

Cidomaltodextrina-glicana-transferase (CGTase; EC 2.4.1.19). Enzima capaz de hidrolisar as cadeias do amido, separando oligossacarídeos de 6, 7 ou 8 unidades de glicose e subsequentemente de formar oligossacarídeos cíclicos (alfa, beta e gamaciclodextrinas, respectivamente) por transglicosilação intramolecular. CGTases são produzidas por algumas bactérias, sendo as mais importantes as do gênero *Bacillus* (*B. macerans* e *B. circulans*), *Geobacillus* e *Paenibacillus*. Todas as classes de CGTases são capazes de produzir as 3 ciclodextrinas mais comuns, sendo a proporção entre elas variável com a fonte da enzima, do amido e com as condições de reação. As condições para a produção de ciclodextrinas são geralmente 40 a 60°C, pH 6 a 7, em meio aquoso. No entanto, dependendo da fonte microbiana da CGTase, algumas condições incomuns podem ser observadas, como 25°C ou pH 12.

4- α -glicana-transferase (4- α GTase; EC 2.4.1.25). Em contraste com as CGTases, as 4- α GTases catalisam preferencialmente a transglicosilação intermolecular, liberando cadeias de α -1,4-glicana a partir de amilose, de oligossacarídeos, ou de sequências lineares de cadeias laterais de amilopectina, gerando novas ligações α -1,4 com formação de isomaltoligossacarídeos. Essas enzimas, entretanto, podem também catalisar a transglicosilação intramolecular. Nesse caso, elas geram glicanas cíclicas denominadas cicloamiloses, de massa molecular bem superior à das ciclodextrinas, com de 17 até centenas de unidades de glicose.

Enzima ramificante (ER; EC 2.4.1.18). Como o nome sugere, são enzimas com atividade inversa à das enzimas desramificantes, isto é, criam ramificações formando ligações do tipo α -1,6 em cadeias lineares de amido. Para tanto, as enzimas ramificantes clivam a ligação α -1,4 de uma sequência linear

de amilose ou amilopectina e transferem o segmento de α -glicana para uma hidroxila livre do carbono 6 de uma glicose em outra cadeia linear de α -1,4-glicana, fazendo uma ligação do tipo α -1,6 e criando uma ramificação.

► Aplicação industrial

Bebidas alcoólicas

As fermentações que proporcionam a produção de bebidas alcoólicas são levadas a cabo por leveduras alcoólicas. Entretanto, esses microrganismos não são capazes de fermentar amido, pois não produzem amilases. Em consequência disso, antes da fermentação é indispensável uma etapa de sacarificação do amido, isto é: hidrólise do amido a glicose e maltose (além de maltodextrina), estes, sim, açúcares fermentáveis por leveduras alcoólicas.

A produção de bebidas fermentadas é, em geral, tradicional em seus países de origem, portanto, os processos de sacarificação usados dependem diretamente dos recursos disponíveis nos locais onde essas bebidas foram originalmente produzidas. Por exemplo:

- Europa e países andinos: uso de malte (amilases vegetais) para produção de cerveja, uísque etc.
- Oriente e América do Sul: uso de amilases fúngicas para a produção de saquê e tiquira
- Índios da Amazônia: uso de amilases animais (saliva) para produção de caxiri, cauim (bebidas à base de mandioca e milho).

A preparação do malte ou maltagem (processo de obtenção de amilases de origem vegetal) consiste em germinação e secagem controladas do grão de cevada ou outro cereal. São usadas sementes descascadas e selecionadas de cevada ou trigo, por exemplo, que devem ser submersas em água por de 2 a 3 dias, para absorção de umidade. As sementes são, então, levadas à câmara de germinação em condições controladas (temperatura de 15°C). Durante o processo de germinação são formados fito-hormônios (giberelinas – que também podem ser adicionadas, na forma purificada, para aceleração

Leveduras não são capazes de fermentar amido, pois não produzem amilases. Para fermentação é indispensável uma etapa prévia de sacarificação do amido. Os processos de sacarificação são característicos dos locais onde as bebidas alcólicas foram originalmente produzidas.

A maltagem consiste em germinação e secagem controladas do grão de cevada ou outro cereal.

Durante a germinação são sintetizadas α - e β -amilases, β -glicanases, xilanases e proteases. Quando a concentração das enzimas aumenta ao máximo, as sementes são secas e moídas, gerando o malte.

Muitas cervejarias utilizam cereais não maltados como fonte de amido, o que exige a aplicação de amilases exógenas para garantir boa sacarificação.

A massa do pão é fermentada por leveduras para geração do CO_2 que faz a massa crescer.

do processo), que induzem à síntese de α - e β -amilases além de β -glicanases, xilanases e proteases. Na natureza, essas enzimas são usadas pela semente para hidrólise do amido de reserva do grão, fornecendo glicose para germinação do embrião. Quando a concentração das enzimas aumenta ao máximo (cerca de mil vezes), as sementes são secas, para causar a morte do embrião e paralisar a germinação, e então moídas. Essa preparação, quando misturada com água e aquecida para gelatinização do amido, será capaz de formar o mosto, rico em açúcares fermentáveis, para o desenvolvimento das leveduras e a produção do álcool.

Nos processos tradicionais, a ação das amilases produzidas leva à obtenção de uma concentração balanceada de açúcares fermentáveis a partir do amido de cevada (ou do cereal que tiver sido maltado), enquanto as outras carboidratos presentes no malte hidrolisam resíduos das paredes celulares do cereal, auxiliando nos processos de clarificação e filtração posteriores. Atualmente, por questões econômicas, muitas cervejarias utilizam como fonte de amido outros cereais diferentes da cevada ou do trigo (cereais não maltados, como milho, sorgo, arroz), o que exige a aplicação de amilases exógenas para aumentar a eficiência da sacarificação. São, então, aplicadas α - e β -amilases, bem como enzimas desramificantes, de origem microbiana.

Panificação

Da mesma forma que as bebidas alcoólicas, a massa do pão também é fermentada por leveduras. Neste caso, o importante é a geração de CO_2 pelos microrganismos, que faz a massa crescer, gerando pães com maior volume e melhor textura. A ocorrência de açúcares fermentáveis naturais na massa é muito pequena para fazer diferença no processo fermentativo, e a adição de açúcares pode apresentar o seguinte problema: com grande disponibilidade de substrato, as leveduras fermentam em taxa muito acelerada, e a produção de CO_2 é muito rápida. Com isso, a massa não consegue absorver o gás produzido, que escapa. A melhor solução é a adição de amilases à massa. Nas proporções corretas, as enzimas liberam glicose, maltose e dextrinas

A adição de amilases à massa libera glicose, maltose e dextrinas gradualmente, fazendo a massa crescer mais e melhorando a qualidade do pão.

de forma lenta e gradual durante os períodos de mistura e descanso da massa, e as leveduras fermentam na taxa ideal, fazendo a massa crescer mais e melhorando a qualidade do pão. Pequenas quantidades de glicose livre ainda auxiliam na formação da cor da casca, entrando como substrato da reação de Maillard (escurecimento químico). Em excesso, as amilases podem provocar sacarificação da massa, deixando-a grudenta e mais difícil de ser trabalhada. Em casos extremos, após o período no forno, o pão apresentará textura muito dura e interior caramelizado.

Outro efeito da adição de amilases à massa do pão é o aumento de sua vida de prateleira.

Outro importante efeito da adição de amilases à massa do pão é o aumento de sua vida de prateleira. Uma das principais causas do fim da vida útil de produtos de panificação é seu endurecimento. Essa mudança na textura, que determina o fim do “frescor” do produto e provoca rejeição do consumidor, é causada pela retrogradação do amido. A geração de dextrina na massa tem o efeito de retardar a ocorrência de retrogradação e o endurecimento de pães, prolongando seu período de comercialização e de consumo.

A perda de frescor é causada pela retrogradação do amido, e a geração de dextrina na massa retarda a retrogradação.

A escolha da fonte das amilases a serem aplicadas na massa depende basicamente da termoestabilidade das enzimas e, em consequência, do risco de superdosagem. Tradicionalmente, são aplicadas à massa α -amilases de *Aspergillus oryzae*, que, em conjunto com as amilases naturalmente presentes na farinha de trigo (e também de outros cereais), apresentam bons resultados quanto ao volume final do pão. Entretanto, por serem termolábeis, essas enzimas só são ativas até o momento em que a massa vai para o forno. Nesse período, o amido ainda não foi gelatinizado, e apenas a fração danificada durante a obtenção da farinha (de 7 a 9% do amido) está disponível para a ação das enzimas. Assim, esse procedimento, tanto quanto a adição de malte – tradicional em alguns países –, garante o aumento do volume do pão, mas tem relativamente pouco efeito na manutenção do frescor ao longo da vida de prateleira, pela reduzida produção de dextrina.

Tradicionalmente são usadas α -amilases de termolábeis *Aspergillus oryzae*, ativas apenas até o momento em que a massa vai para o forno, que garantem o aumento do volume do pão, mas não o prolongamento do frescor.

A aplicação de amilases termorresistentes, de origem bacteriana, apresenta melhores resultados, pois essas

enzimas resistem à temperatura do forno e têm acesso ao amido gelatinizado, o que pode aumentar a proporção de dextrina na massa, influenciando a manutenção do frescor. Entretanto, por serem termorresistentes, tais enzimas apresentam alto risco de superdosagem, com efeitos extremamente indesejados. Para minimizar esse risco, uma alternativa é aplicar uma mistura de amilases termorresistentes bacterianas e amilases termolábeis de origem fúngica. Mais recentemente, vêm sendo aplicadas amilases de estabilidade térmica intermediária (produzidas por espécies de *Aspergillus* e por *Bacillus megaterium*) capazes de suportar o período inicial de cozimento no forno, tendo acesso ao amido gelatinizado mas não resistindo ao cozimento completo, portanto, oferecendo pequeno risco de hidrólise excessiva.

Amilases de estabilidade térmica intermediária têm acesso ao amido gelatinizado (gerando dextrina) mas não resistem ao cozimento completo – sem risco de superdosagem.

Amido hidrolisado

Os primeiros processos de hidrólise do amido eram processos químicos que tinham por objetivo obter adoçantes que pudessem substituir a sacarose em diferentes formulações de alimentos. Segundo essa metodologia, a suspensão de amido é levada a pH = 1,5, por adição de HCl, e é cozida a temperatura de 140°C, em autoclave. O produto obtido chega a no máximo 40 DE² (dependendo do tempo de cozimento), e não é aconselhável utilizar um tempo muito longo, pois pode favorecer a formação de gentiobiose – dissacarídeo formado por duas unidades de glicose ligadas entre si por uma ligação do tipo β -1,6 (Figura 2.6),

Amido hidrolisado: uma grande variedade de produtos pode ser gerada por enzimas a partir do amido, com aplicação em diversos alimentos.

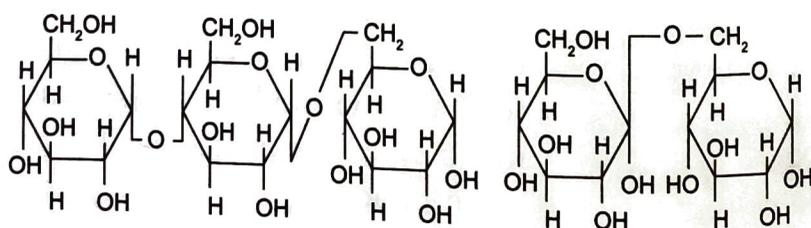


Figura 2.6 Estrutura dos isomaltoligosacarídeos e da gentiobiose.

²O equivalente de dextrina (DE) é calculado, geralmente, pela média ponderada das concentrações de glicose, maltose e maltotrioses. O fator de ponderação usado é o grau de polimerização (DP) dos produtos (glicose: DP = 1,0; maltose: DP = 0,5; maltotriose: DP = 0,33).

de sabor muito amargo, que inutiliza o produto. O surgimento de enzimas comerciais de ação eficaz e em altas temperaturas provocou a mudança dos processos industriais de químico para enzimático. Esse processo apresenta um produto final de muito melhor qualidade, em condições muito mais brandas.

Dependendo da enzima usada e das condições de reação utilizadas, uma gama de produtos pode ser obtida a partir do amido com aplicação em vários produtos alimentícios e não alimentícios. Os diferentes processos podem ser didaticamente divididos em hidrólise parcial e extensiva do amido e estão resumidos na Figura 2.7.

Hidrólise parcial do amido ou liquefação | Obtenção de maltodextrinas. Consiste na hidrólise do amido gelatinizado por α -amilases de origem bacteriana (*Geobacillus stearothermophilus*, temp. = 85 a 110°C, pH = 5,3 a 6,5) ou fúngica (*Aspergillus*

Liquefação: obtenção de maltodextrinas. Consiste na hidrólise do amido gelatinizado por α -amilases bacterianas. O processo provoca redução da viscosidade da suspensão de amido.

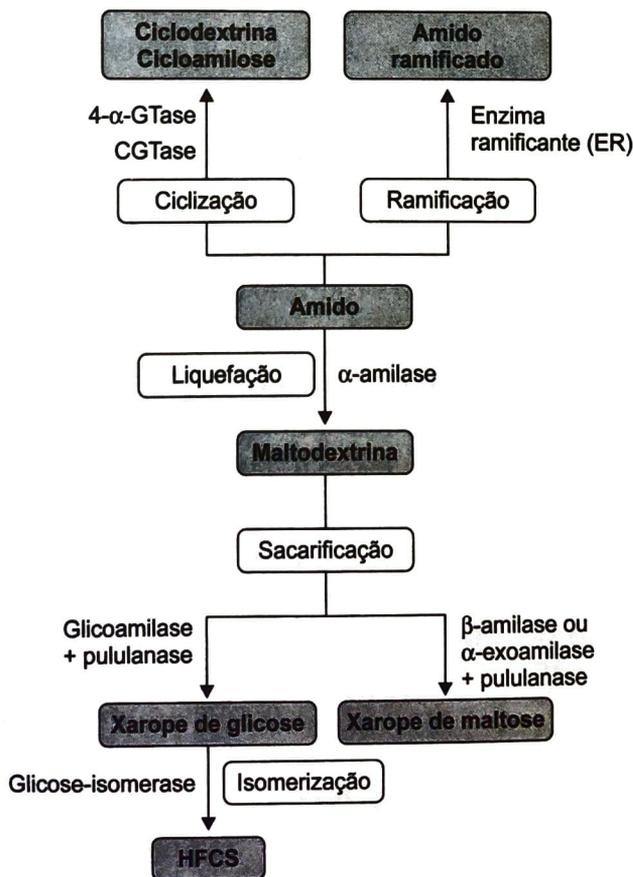


Figura 2.7 Processos e produtos obtidos pela modificação enzimática do amido. HFCS: xaropes de milho com alto teor de frutose (do inglês, *high-fructose corn syrup*).

oryzae, temp. = 55 a 70°C, pH = 4,0 a 5,0). O processo recebe o nome de liquefação, pois a ação das enzimas sobre a suspensão de amido provoca considerável redução de sua viscosidade.

Em geral, o meio reacional é composto por uma suspensão de amido de 30 a 40% de sólidos (altas concentrações de substrato tendem a estabilizar α -amilases) adicionada de CaCl_2 , cuja finalidade é o aumento da estabilidade da enzima. A extensão da hidrólise é controlada pelo tempo de reação e expressa em equivalentes de dextrina (DE). O valor de DE é variável de acordo com a aplicação da maltodextrina obtida:

- Entre 5 e 8 DE: tem a capacidade de formar géis termorreversíveis e é usada como substituinte de gordura
- Entre 8 e 15 DE: usada para subsequente sacarificação (obtenção de xaropes de glicose ou maltose)
- Entre 15 e 40 DE: aplicada como estabilizante e espessante em diversos produtos, sendo mais aplicadas as maltodextrinas de até 25 DE.

As maltodextrinas são carboidratos perfeitamente digeridos e absorvidos no intestino humano, logo não são consideradas substâncias prebióticas (ver mais detalhes em Produção de galactoligosacarídeos no tópico Lactases, adiante neste capítulo). Entretanto, alguns autores relataram a redução de populações de bactérias putrefativas (*Clostridium perfringens*, por exemplo) em consumidores de xaropes de glicose e maltose ricos em maltotetroses, um fato indicativo de que o consumo de maltoligosacarídeos possa ser benéfico para a saúde.

Hidrólise extensiva do amido | Sacarificação. Obtenção de xarope de glicose. Consiste na conversão de maltodextrina para até 97% de glicose pela aplicação de glicoamilases (*Aspergillus niger*, temp. = 55 a 65°C, pH = 3,5 a 5,0) auxiliadas por enzimas desramificantes (pululanase de *Bacillus acidopolluticus*, temp. = 55 a 65°C, pH = 3,5 a 5,0).

A glicose assim obtida pode ser transformada em frutose para produção de xaropes com maior poder adoçante

O meio reacional é composto por uma suspensão com alto teor de sólidos de amido adicionada de CaCl_2 , que aumenta a estabilidade das α -amilases.

Sacarificação: obtenção de xarope de glicose. Consiste na conversão da maltodextrina para até 97% de glicose por glicoamilases e enzimas desramificantes.

A glicose pode ser transformada em frutose para produção de xaropes com maior poder adoçante pela ação da enzima glicose-isomerase.

Obtenção de xarope de maltose: uso de α -amilases fúngicas produzindo maltose e glicose, ou de β -amilases de malte ou soja. A adição de pululanases aumenta significativamente o rendimento do processo.

Os xaropes de glicose e frutose podem ser usados na obtenção de álcool de cereais e de oligossacarídeos prebióticos – isomaltoligossacarídeos e gentioligossacarídeos. O xarope de maltose pode ser aproveitado na obtenção de maltitol.

(HFSC – *high-fructose corn syrup*), cuja principal aplicação é a substituição da sacarose nos mais diversos produtos. Os principais produtos comerciais, HFCS42 e HFCS55, têm, respectivamente, 42% e 55% de frutose, que é obtida pela ação da enzima xilose-isomerase,³ tendo glicose como substrato. O processo aplica enzimas intracelulares, imobilizadas, extraídas de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, em pH entre 7,0 e 8,0 e temperatura entre 55 e 60°C.

Obtenção de xarope de maltose. Consiste na aplicação de enzimas maltogênicas sobre a maltodextrina. Podem ser aplicadas α -amilases fúngicas, com produção de maltose e glicose, ou β -amilases de cevada (malte) ou de soja. Essa sacarificação é geralmente conduzida a 55 a 60°C, em pH 4,8 a 5,2, partindo de uma solução contendo 35 a 45% de sólidos. Normalmente obtém-se um produto com 50 a 55% de maltose. Para melhor conversão é recomendável o uso de dextrinas de baixo DE e a adição de pululanases, o que pode elevar os níveis de maltose para cerca de 80%.

Além das aplicações apresentadas na Tabela 2.2, xaropes de maltose e glicose podem ainda ser utilizados na produção de álcool de cereais por fermentação com leveduras alcoólicas. O álcool de cereais é mais puro que o de cana-de-açúcar, pois contém menos odores, pigmentos etc. É utilizado na produção de licores finos e em produtos farmacêuticos. O xarope de maltose pode ainda ser utilizado na produção de maltitol, adoçante de baixo teor calórico e que não provoca cáries.

Mais recentemente, xaropes de maltose e glicose vêm sendo utilizados como matérias-primas para a obtenção enzimática de oligossacarídeos prebióticos, que são adicionados aos alimentos como ingredientes funcionais. Entre eles os mais importantes são os isomaltoligossacarídeos (tri- e tetrassacarídeos: uma unidade de maltose e uma de glicose ou duas unidades de maltose ligadas por ligação do tipo α -1,6) obtidos por ação de α -glicosidases e/ou 4- α GTases e os gentioligossacarídeos (várias unidades de glicose ligadas entre si por ligações β -1,6) sintetizados por β -glicosidases.

³A enzima xilose-isomerase tem como substrato preferencial a xilose, porém essa enzima apresenta suficiente atividade sobre a glicose para ser aplicada em processos industriais. Na prática ela é muitas vezes denominada glicose-isomerase.

Tabela 2.2 Principais aplicações dos xaropes de maltose, glicose e frutose.

Maltose (%)	Glicose (%)	Frutose (%)	Aplicação	Efeito
50 a 65	2 a 12	0	Produtos de panificação, confeitaria, congelados e cervejas	Controle da textura, da umidade e das características de congelamento, melhoria da cor e controle da concentração de açúcares fermentáveis
70 a 88	0 a 10	0	Sorvetes e balas	Controle da higroscopicidade, evita cristalização
30 a 37	43 a 53	0	Geleias, refrigerantes, panificação	Controle da doçura, da viscosidade e da higroscopicidade. Estabilização do <i>flavor</i> e espessante
1 a 2	94 a 97	0	Alimentos infantis e para atletas, geleias, produtos de panificação	Fonte de energia instantânea, controle da doçura, confere brilho e promove caramelização e reação de Maillard
0	10 a 55	42 a 90	Doces, refrigerantes, condimentos e molhos, cereais, sorvetes, panificação	Substituição da sacarose, umectante, evita cristalização e promove reações de escurecimento

Ciclização. Produção de ciclodextrinas e de cicloamiloses. Ciclodextrinas e cicloamiloses são oligo- ou polissacarídeos cíclicos produzidos pela ação das enzimas CGTase e 4- α GTase, respectivamente, sobre o amido.

Nas ciclodextrinas, as hidroxilas se projetam para fora formando uma cavidade interna hidrofóbica capaz de complexar compostos. São usadas na dispersão de compostos hidrofóbicos em matrizes aquosas.

Cicloamiloses apresentam massa molecular muito superior à das ciclodextrinas, mas também são capazes de formar complexos de inclusão com diversos compostos.

A aplicação das ciclodextrinas está intimamente ligada à sua estrutura, na qual as hidroxilas das glicoses se projetam para fora do anel formando uma superfície exterior hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica capaz de complexar diversos compostos (Figura 2.8). Pela formação desses complexos, ciclodextrinas são excelentes veículos para dispersão de compostos hidrofóbicos (aromas, pigmentos, fármacos, compostos ativos) em matrizes aquosas. Para aumentar essa capacidade, a solubilidade de ciclodextrinas em água pode ser melhorada pela inclusão de ramificações (glicoses e/ou maltoses) através da ação reversa de enzimas desramificantes ou pela aplicação de enzimas ramificantes. Cicloamiloses apresentam menos aplicações industriais conhecidas que as ciclodextrinas, em virtude de sua massa molecular muito superior, mas também são capazes de formar complexos de inclusão com diversos compostos proporcionando maior solubilização, maior estabilidade ou alteração de sua reatividade. Em consequência, existe

um grande potencial para a aplicação de cicloamiloses nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos.

As CGTases são ainda utilizadas na produção de glicosil-sacarose, trissacarídeo formado pela transferência de uma unidade de glicose do amido para uma molécula de sacarose. Esse açúcar, conhecido como *coupling sugar*, não tem atividade prebiótica, mas é um produto não cariogênico com cerca de 50% da doçura da sacarose, utilizado como agente anticristalização, que não sofre escurecimento químico e que tem ação supressora da retrogradação.

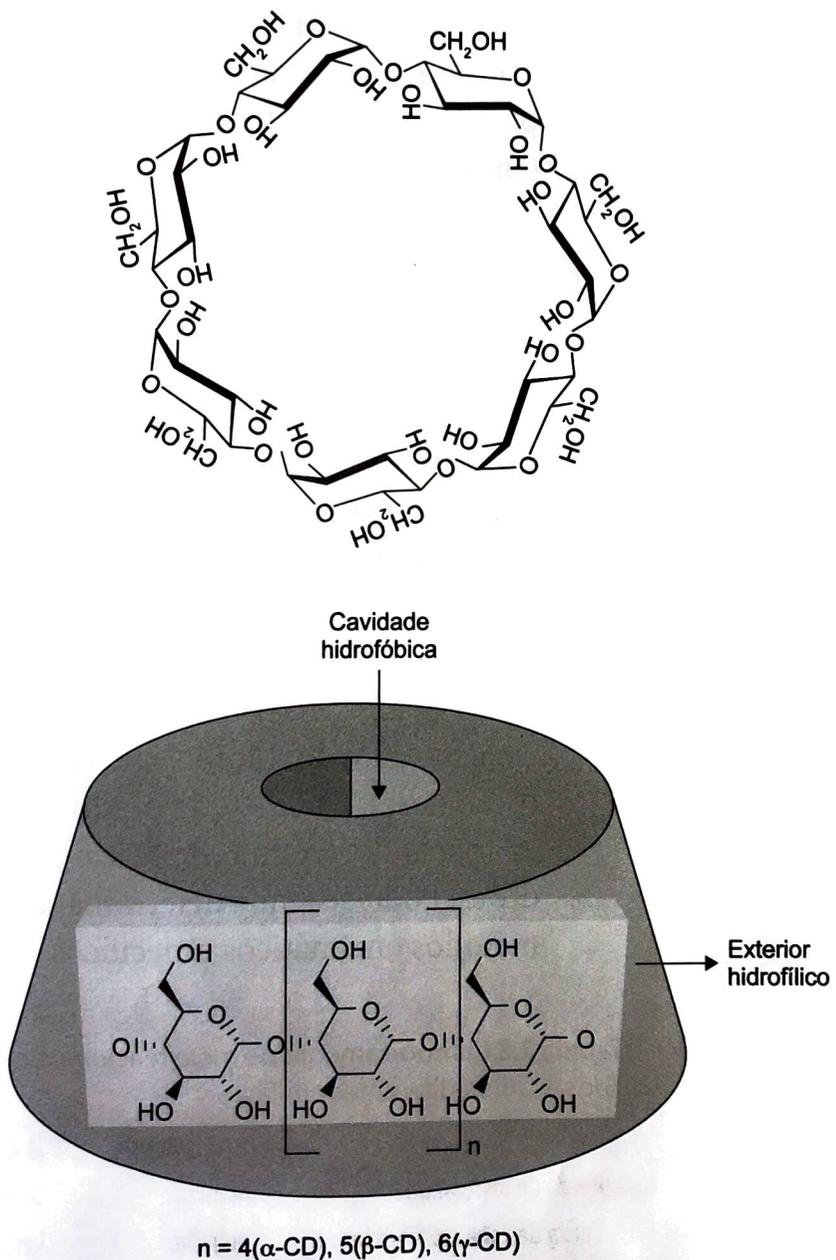


Figura 2.8 Estrutura química da β-ciclodextrina e representação esquemática das ciclodextrinas.

Enzimas ramificantes são usadas para obtenção de amidos ramificados que sofrem menos retrogradação e formam géis com melhores cor, brilho e textura.

Os métodos para determinação da atividade de amilases se baseiam em: perda de viscosidade da solução de amido, perda da capacidade de formar complexos azuis na presença de iodo e surgimento de grupos redutores no meio reacional.

Obtenção de amido ramificado. Conforme discutido anteriormente, no tópico “Panificação”, amidos naturais, quando cozidos e resfriados, podem facilmente sofrer retrogradação, com consequências indesejadas em diversos produtos alimentícios: perda de frescor, sinérese etc. A retrogradação acontece de forma mais intensa entre as cadeias de amilose e é significativamente reduzida quanto mais ramificado for o amido em questão. Assim, as enzimas ramificantes podem ser utilizadas para obtenção de amidos ramificados, capazes de gerar soluções viscoestáveis, que não sofrem retrogradação – ou a sofrem de forma muito reduzida – uma vez que as cadeias laterais transferidas são curtas e incapazes de fazer interações fortes. A aplicação de enzimas ramificantes pode ainda melhorar outras propriedades de géis de amido, como a cor, o brilho e a textura.

► Métodos de detecção da atividade

Os principais métodos para determinação da atividade de amilases se baseiam em: perda de viscosidade da solução de amido, perda da capacidade de formar complexos azuis na presença de iodo, surgimento de grupos redutores no meio reacional. De acordo com o resultado obtido por esses ensaios, pode-se determinar que tipo de amilase está presente na amostra, como apresentado na Tabela 2.3.

Para que se possa distinguir entre as β -amilases e glicoamilases é necessário um ensaio para verificação do principal produto de reação – glicose (glicoamilase) ou maltose (β -amilase). Um método prático consiste na cromatografia em papel do produto de reação, em comparação com padrões. Pode-se ainda determinar a liberação de glicose por métodos enzimáticos específicos.

Tabela 2.3 Comportamento do meio reacional (solução/suspensão de amido) após ação de diferentes amilases.

	α -amilase	β -amilase	Glicoamilase
Perda de viscosidade	Rápida	Lenta	Lenta
Perda de cor azul (com iodo)	Rápida	Lenta	Lenta
Formação de grupos redutores	Lenta	Rápida	Rápida

A atividade de CGTases pode ser avaliada em placas de Petri pela capacidade das ciclodextrinas formadas de incluir indicadores como fenolftaleína e alaranjado de metila em sua cavidade, provocando a perda da coloração. Essa mesma redução da cor pode ser utilizada para quantificação espectrofotométrica da presença de ciclodextrinas. A principal desvantagem desse método é o uso de pH alcalino para garantir a formação de cor pelos indicadores usados.

A atividade de CGTases pode ser avaliada pela capacidade das ciclodextrinas formadas de incluir indicadores de pH em sua cavidade, provocando a perda da coloração.

Pectinases

Pectinases são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre unidades de ácido galacturônico ou seu derivado metoxilado (Figura 2.9). São produzidas por vegetais e microrganismos, e seu substrato são os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais. Em virtude disso, pectinases endógenas podem causar importantes alterações na textura de frutas e hortaliças. Sua aplicação na indústria de alimentos, no entanto, pode trazer uma série de benefícios na obtenção de produtos de origem vegetal. Nesses casos, geralmente são aplicadas pectinases microbianas.

Pectinases são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre unidades de ácido galacturônico ou seu derivado metoxilado. Seu substrato são os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais.

Pectinases endógenas podem causar importantes alterações na textura de frutas e hortaliças. Sua aplicação na indústria de alimentos pode trazer benefícios na obtenção de produtos de origem vegetal.

► Substrato

As substâncias pécticas, carboidratos poliméricos componentes da parede celular e da lamela média de vegetais, são um grupo bastante heterogêneo de polissacarídeos com diferentes massas moleculares e graus de esterificação.

A parede celular confere rigidez e proteção à célula vegetal sem, no entanto, interferir na permeabilidade da

As substâncias pécticas são um grupo heterogêneo de polissacarídeos encontrados na parede celular de vegetais.

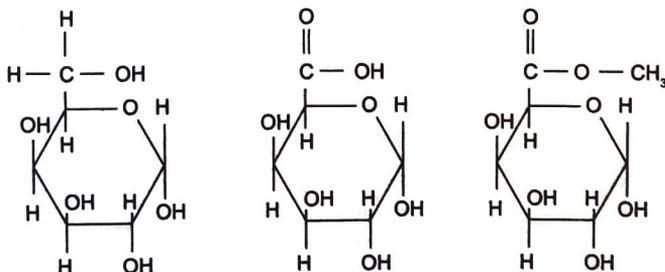


Figura 2.9 Galactose, ácido galacturônico e ácido galacturônico metoxilado.

membrana. É a responsável pela manutenção da turgidez do tecido vegetal. Em células jovens, ainda em crescimento, encontra-se apenas uma parede primária envolvendo a membrana plasmática. Essa parede primária é formada principalmente por celulose (na forma de microfibrilas) envolvida por matriz de substâncias pécticas (cerca de 35%) e de hemicelulose. A parede primária, por sua vez, é envolvida pela lamela média (formada principalmente por substâncias pécticas), que é a responsável por manter as células unidas umas às outras (como um cimento) (Figura 2.10).

Quando para de crescer e entra no estágio de amadurecimento, a célula passa a depositar material entre a membrana plasmática e a parede primária, formando a chamada parede secundária. Esta é mais rígida e mais espessa que a primária, pois contém maiores proporções de celulose e menores de substâncias pécticas e hemicelulose. É comum, na parede secundária, a deposição de lignina (conjunto de compostos fenólicos complexos), o que confere muito maior rigidez e impermeabilidade ao tecido vegetal. A estrutura da parede secundária pode ser dividida em duas partes, de acordo com a orientação das microfibrilas de celulose que a formam.

Em frutos verdes, a substância péctica predominante é a protopectina, que é insolúvel em água e responsável pela textura firme desses frutos.

Em frutos verdes, a substância péctica predominante é chamada de protopectina e consiste em cadeias de ácidos galacturônicos metoxilados (esterificados com metanol) ligadas entre si por íons metálicos divalentes (Ca^{2+} ; Mg^{2+}), por cadeias de outros carboidratos (arabinose, galactose, ramnose e xilose, principalmente), por grupos fosfatados, além de ligações de hidrogênio. A protopectina é insolúvel

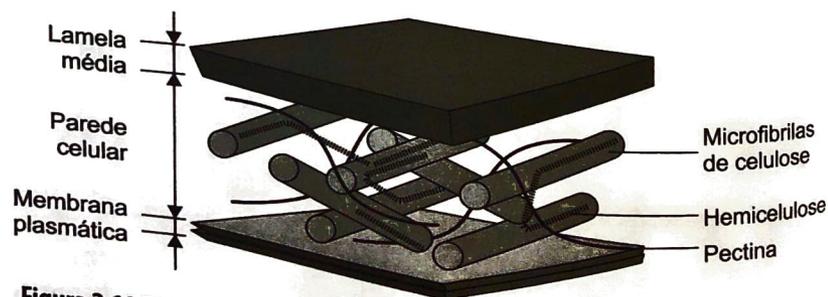


Figura 2.10 Esquema da estrutura da parede celular primária e da lamela média.

em água e uma das responsáveis pela textura firme dos frutos verdes. Ao longo da maturação, pectinases endógenas (protopectinases) modificam a protopectina, gerando pectinas solúveis e contribuindo para o amaciamento do fruto. O processo de maceração, no qual são aplicadas poligalacturonases fúngicas, funciona de forma bastante semelhante.

Em frutos maduros, a maior parte das substâncias pécticas (de 60 a 90%) consiste na chamada pectina linear (*smooth-region pectin*) composta por cadeias de ácidos galacturônicos e por seus derivados metoxilados ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Em geral essas substâncias são altamente esterificadas (de 65 a 98% das unidades) e apresentam grau de polimerização entre algumas dezenas até várias centenas de unidades monoméricas. De 10 a 40% das substâncias pécticas dos vegetais consistem em regiões ramificadas (*hairy region pectin*) compostas por açúcares neutros (arabinose, xilose, ramnose e galactose, principalmente), que se ligam às cadeias de ácidos galacturônicos (nas posições 2 e/ou 3) e à hemicelulose presente nas paredes celulares de vegetais. No entanto, geralmente, as formas de extração das substâncias pécticas para aplicação industrial promovem a hidrólise e a solubilização da fração neutra ramificada, liberando a fração linear, que fica concentrada no produto final.

Outras denominações são ainda aplicadas às substâncias pécticas: pectina – termo geral para substâncias pécticas capazes de formar géis. Normalmente se refere ao produto extraído comercial e pode apresentar diferentes graus de metoxilação no polímero, o que interfere na sua capacidade de gelificar. Pectinas com alto teor de metoxilação (ATM) formam gel na presença de alta concentração de açúcares em meio ácido, enquanto pectinas com baixo teor de metoxilação (BTM) tendem a gelificar na presença de íons divalentes. Pectinas ATM são também conhecidas como ácido pectínico (Figura 2.11), enquanto pectinas BTM podem ser denominadas ácido poligalacturônico, ácido péctico ou pectato (Figura 2.12).

Em frutos maduros, a maior parte das substâncias pécticas consiste em pectina linear: cadeias de ácidos galacturônicos e seus derivados metoxilados unidos por ligações α -1,4.

Uma menor fração das substâncias pécticas dos vegetais consiste em regiões ramificadas compostas por açúcares neutros.

Pectina: termo geral para substâncias pécticas capazes de formar géis.

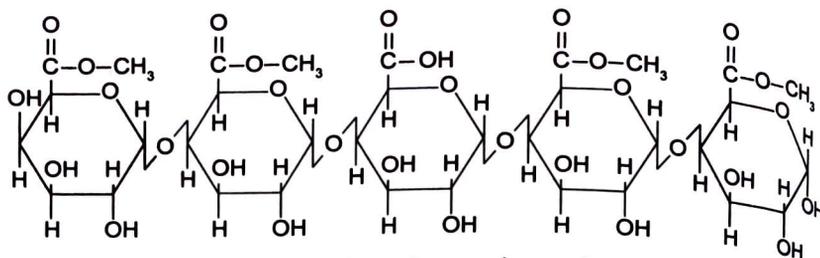


Figura 2.11 Estrutura da pectina com alto teor de metoxilação.

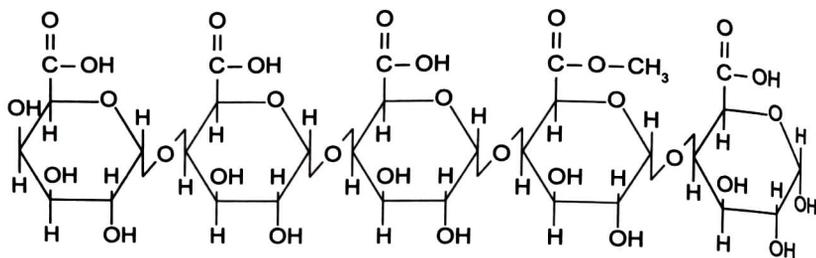


Figura 2.12 Estrutura da pectina com baixo teor de metoxilação.

Pectinases são classificadas de acordo com seu modo de ação, substrato preferencial e reação catalisada em dois grupos: enzimas desmetoxilantes e enzimas despolimerizantes.

► Fontes e principais características

As pectinases são classificadas de acordo com seu modo de ação, substrato preferencial e reação catalisada. Inicialmente, elas podem ser divididas em: enzimas desmetoxilantes e enzimas despolimerizantes (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 Resumo das pectinases, seus substratos e produtos.

	Enzima	Substrato	Produto da reação	Fonte
Desmetoxilante 1	Pectinaesterase EC 3.1.1.11	Pectina	Ácido poligalacturônico + metanol	Vegetais e microrganismos
Despolimerizante 1	Endopoligalacturonase EC 3.2.1.15	Ácido poligalacturônico	Oligossacarídeos (ação aleatória)	Vegetais e microrganismos
	Exopoligalacturonase EC 3.2.1.67		Mono e dissacarídeos (extremidade não redutora)	
2	Endopectatoliase EC 4.2.2.2	Ácido poligalacturônico	Oligossacarídeos (ação aleatória)	Microrganismos
	Exopectatoliase EC 4.2.2.9		Mono e dissacarídeos (extremidade redutora)	
3	Endopectinaliase EC 4.2.2.10	Pectina	Oligossacarídeos (ação aleatória)	Microrganismos

Enzimas desmetoxilantes

São conhecidas como pectinaesterases ou pectina-metilesterases. São hidrolases que clivam a ligação éster, desmetoxilando ácidos galacturônicos esterificados com metanol. O resultado de sua ação são pectinas com baixo teor de metoxilação ou ácido poligalacturônico, além de metanol (Figura 2.13). A ação das pectinaesterases sobre a pectina tem duas importantes consequências, em razão da geração de pectato:

- Aumento da suscetibilidade do polissacarídeo ao ataque de certas enzimas despolimerizantes
- Suscetibilidade do polissacarídeo à precipitação na presença de Ca^{2+} , pela geração de pectato de cálcio (Figura 2.14). A presença de grupos carboxílicos sucessivos ao longo do polímero permite a formação de ligações cruzadas mediadas por cálcio (e outros íons divalentes), que provoca sua insolubilização/precipitação.

Pectinaesterases são produzidas tanto por vegetais quanto por microrganismos. As de origem vegetal atacam a extremidade não redutora da cadeia de polissacarídeo (no caso das exoenzimas) ou regiões próximas a grupos carboxílicos livres (endoenzimas) e seguem a desmetoxilação ao longo da molécula por mecanismo de cadeia simples (ou única), o que gera longos trechos de ácidos galacturônicos na molécula, deixando-a altamente sensível à precipitação por cálcio. Irregularidades na cadeia (como a presença de regiões ramificadas, acetilações etc.) inibem a ação dessa enzima. Sua atividade é maior em substratos de alto grau de

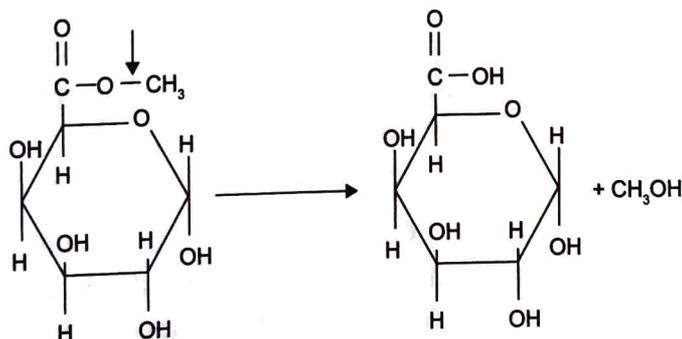


Figura 2.13 Ação das pectinaesterases.

Pectinaesterases são hidrolases que clivam a ligação éster, desmetoxilando ácidos galacturônicos esterificados com metanol. Geram pectinas com baixo teor de metoxilação ou ácido poligalacturônico, além de metanol. São produzidas por vegetais e microrganismos.

A formação de ácido péctico tem como consequências: o aumento da suscetibilidade ao ataque por enzimas despolimerizantes; a possibilidade de precipitação com Ca^{2+} na forma de pectato de cálcio.

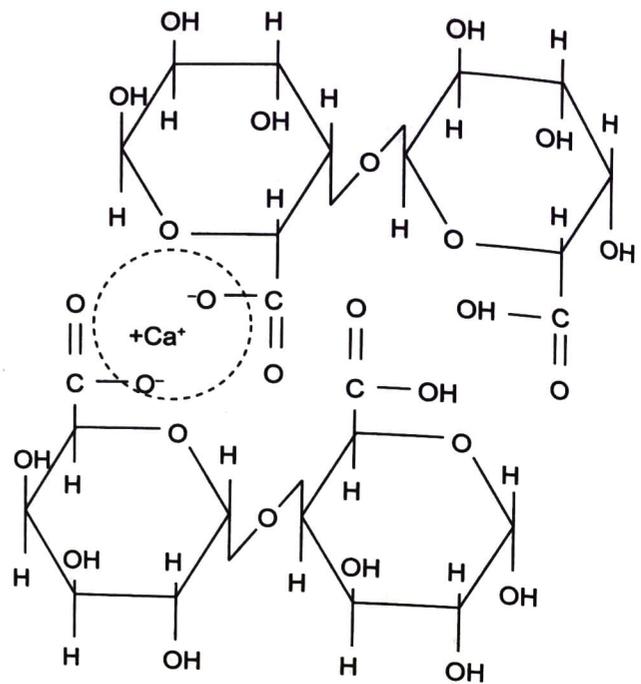


Figura 2.14 Formação de pectato de cálcio.

polimerização, sendo inativas sobre substratos de três unidades monoméricas ou menos. São enzimas altamente específicas que hidrolisam outros ésteres em taxas extremamente lentas. As pectinaesterases fúngicas diferem das vegetais por agirem por mecanismo multicadeia, promovendo a desmetoxilação totalmente ao acaso e, portanto, gerando pectinas com baixo teor de metoxilação, porém bastante resistentes à precipitação por cálcio, aplicadas na confecção de geleias com baixo teor de açúcares.

As enzimas despolimerizantes clivam as ligações α -1,4 entre os constituintes das substâncias pécnicas, podendo ser hidrolases ou liases.

Enzimas despolimerizantes

Clivam as ligações glicosídicas α -1,4 entre as unidades constituintes das substâncias pécnicas, podendo agir como hidrolases ou como liases (lisando a ligação glicosídica no carbono 4 com a eliminação de um hidrogênio no carbono 5, via β -eliminação, com formação de dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 do uronídeo). Ambas as enzimas podem apresentar modo de ação de endo- ou exocarboidrases.

Quanto ao substrato, as enzimas despolimerizantes são diferenciadas por atacarem preferencialmente as ligações entre ácidos galacturônicos (em pectinas com baixo teor de metoxilação ou ácido pécnico) ou entre ácidos

galacturônicos metoxilados (pectinas de alto teor de metoxilação). No primeiro caso, encontram-se as poligalacturonases e as pectatoliasas, cuja atividade decresce com o aumento no grau de metoxilação do substrato (Figura 2.15). A exceção são as pectatoliasas bacterianas, que apresentam maior atividade sobre pectinas de baixo teor de metoxilação e não sobre o ácido poligalacturônico. No segundo caso são conhecidas apenas pectinaliasas, fortemente ativadas na presença de cálcio e de outros íons divalentes (Figura 2.16). A existência de polimetilgalacturonases ainda não foi demonstrada. No entanto, a hidrólise de pectinas altamente metoxiladas pode ser facilmente alcançada pela ação combinada de pectinaesterases e poligalacturonases e/ou pectatoliasas.

A hidrólise de pectinas altamente metoxiladas pode ser facilmente alcançada pela ação combinada de pectinaesterases e poligalacturonases e/ou pectatoliasas.

Ramnogalacturonases são pectinases capazes de hidrolisar as regiões ramificadas das substâncias pécnicas.

Um terceiro grupo de enzimas pode ser incluído entre as pectinases: são as ramnogalacturonases, capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas entre ramnose e ácidos galacturônicos nas regiões ramificadas das substâncias pécnicas. Sua ação libera oligômeros formados por ácido galacturônico e açúcares neutros como a ramnose, mas também arabinose, galactose e xilose, entre outros. Esse tipo de atividade foi

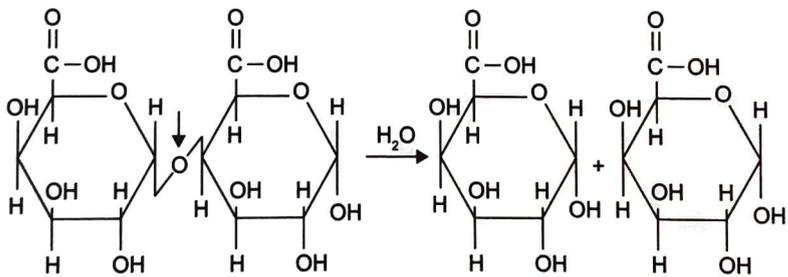


Figura 2.15 Ação das poligalacturonases.

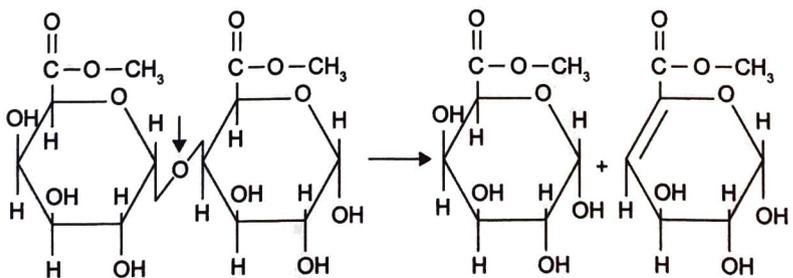


Figura 2.16 Ação das pectinaliasas.

detectado em preparados de pectinases comerciais produzidos por fungos filamentosos.

As enzimas pectinolíticas podem ser obtidas a partir de diferentes microrganismos como leveduras, bactérias, actinomicetos e principalmente fungos filamentosos, que estão entre os mais eficazes produtores de pectinases. *Aspergillus niger* é a espécie mais comum de fungo utilizado para a produção industrial dessas enzimas (Tabela 2.5).

As enzimas microbianas possuem diferentes características com base no mecanismo de ação, propriedades biológicas e físico-químicas. As poligalacturonases possuem o pH e a temperatura ótimos variando de 3,5 a 6,0 e de 30 a 50°C, respectivamente. No entanto, foram encontradas enzimas obtidas de *B. licheniformis* e *Fusarium oxysporum*

As enzimas pectinolíticas podem ser obtidas a partir de diferentes microrganismos, sobretudo fungos filamentosos.

Tabela 2.5 Principais fontes de pectinases.

Enzima	Vegetais	Microrganismos	
Pectinaesterase	Maçã, banana, cítricos, cereja, uva, manga, mamão, maracujá, pera, cenoura, couve-flor, abóbora, cebola, batata, tomate	Fungos: <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Sclerotia</i> sp.	Bactérias: <i>Clostridium</i> sp.
Poligalacturonase	Maçã, ¹ abacate, ² banana, ¹ cereja, ¹ manga, ¹ mamão, ³ maracujá, ³ pêssego, ³ pera, ³ cenoura, ¹ abóbora, ² batata, ¹ tomate ³	Fungos: <i>Aspergillus niger</i> , ³ <i>Penicillium</i> sp., ² <i>Fusarium</i> sp., ² <i>Rhizopus</i> sp., ² <i>Sclerotia</i> sp., ³ <i>Collecotrichum</i> sp. ³	Leveduras: <i>Aureobasidium pullulans</i> , ² <i>Kluyveromyces</i> sp. ² Bactérias: <i>Bacillus</i> sp., ¹ <i>Erwinia</i> sp., ³ <i>Streptomyces</i> sp.
Pectatoliase		Fungos: <i>Fusarium</i> sp. ²	Bactérias: <i>Bacillus polymyxa</i> , ² <i>Erwinia</i> sp., ³ <i>Pseudomonas</i> sp., ² <i>Arthrobacter</i> sp., ² <i>Clostridium</i> sp. ¹
Pectinaliase		Fungos: <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Sclerotia</i> sp.	Leveduras: <i>Aureobasidium pullulans</i> Bactérias: <i>Pseudomonas</i> sp.

¹Exoenzimas, ²endoenzimas, ³endo- e exoenzimas.

Pectinases comerciais são preparados contendo uma variedade de enzimas fúngicas (em geral de *Aspergillus* sp.) que apresentam atividade de pectinaesterase, poligalacturonase e pectinaliase, além de atividade celulolítica e hemicelulolítica.

com pH ótimo de 11. As pectatoliasas possuem pH ótimo entre 8 e 10, mas em alguns casos as obtidas de *Erwinia* sp. são ativas em pH 6, e as de *B. licheniformis*, em pH 11. Pectinaliasas possuem pH ótimo de 4,0 a 5,0. As esterases microbianas apresentam temperatura ótima entre 40°C e 60°C e pH ótimo variando de 4,0 a 8,0.

Pectinases comerciais. São preparados contendo uma variedade de enzimas fúngicas (em geral de *Aspergillus* sp.) que apresentam atividade de pectinaesterase, poligalacturonase e pectinaliase, além de atividade celulolítica (pela presença de β -endoglicanases) e hemicelulolítica, todas enzimas produzidas pelo mesmo microrganismo. Em alguns casos são adicionadas exocelulases de outras fontes microbianas.

► Aplicação industrial de pectinases

Enzimas endógenas

Pectinaesterase. Um problema recorrente na produção de sucos cítricos (de frutos que apresentam alta atividade de pectinaesterase e atividade pouco significativa de enzimas despolimerizantes) é a perda da turbidez e separação de fases no suco. Isso acontece quando pectinaesterases desesterificam a pectina em suspensão no suco, gerando ácido poligalacturônico, que, na presença de cálcio natural dos sucos, precipita, causando clarificação. Em sucos concentrados a formação de géis de pectato de cálcio impede a reconstituição satisfatória do suco.

Esse fenômeno é especialmente importante em suco de laranja, uma vez que este é produzido e comercializado em grande volume, e tem sido bastante estudado. A maior parte das variedades de laranja contém cerca de 12 isoformas de pectinaesterase, em todos os tecidos do fruto. Essas isoenzimas diferem entre si por sua estabilidade térmica, afinidade por pectinas de baixo teor de metoxilação (o que determina o grau de desesterificação que podem provocar) e por sua capacidade de clarificação, que está diretamente ligada ao modo de ação da enzima (unicadeia ou multicadeia). A principal dificuldade no controle do problema reside na existência de uma isoforma termorresistente, que depende

Um problema na produção de sucos cítricos é a separação de fases causada pela ação de pectinaesterases nativas.

Uma possibilidade de se contornar esse problema é a adição de pectinases ou poligalacturonases ao suco. Na presença dessas enzimas, as substâncias pécticas são hidrolisadas e não precipitam.

A atividade de pectinaesterase é explorada para aproveitamento do albedo como ração. A precipitação do pectato de cálcio expulsa a água contida no bagaço, reduzindo custos de secagem.

O mesmo princípio é usado no interior de frutas e vegetais processados, com o objetivo de preservar ou aumentar sua firmeza.

de tratamentos térmicos drásticos para inativação, o que, por sua vez, leva a alterações no sabor do suco obtido.

Uma possibilidade de se contornar esse problema é a adição de pectinases ou poligalacturonases ao suco. Na presença dessas enzimas, a pectina ou ácido poligalacturônico são hidrolisados a oligômeros não sensíveis ao cálcio. Essa hidrólise contribui para a redução da viscosidade do suco e aumenta o teor de sólidos solúveis, proporcionando sucos concentrados com valores de °Brix mais elevados.

Atualmente, a concentração de suco de laranja é feita em evaporadores multiestágio cuja temperatura é suficiente para inativação das pectinaesterases nativas. Alterações de sabor causadas pelo uso de altas temperaturas são contornadas pela recuperação e reincorporação de aromas ao suco concentrado. Desse modo é possível garantir a estabilidade da turbidez do suco sem maiores danos às suas propriedades sensoriais.

A atividade de pectinaesterase é explorada durante a secagem do bagaço (principalmente do albedo) da laranja, para aproveitamento como ração animal. Nestes casos, o bagaço é tratado com uma solução de hidróxido de cálcio, que ativa as enzimas nativas (pelo ajuste do pH e pela adição de cálcio), causando rápida desesterificação e formação de pectato de cálcio. Nesse processo, boa parte da água contida no bagaço é expulsa e pode ser facilmente removida por prensagem, reduzindo a quantidade de água que deverá ser retirada pelo custoso processo de secagem.

Processo semelhante é utilizado para gerar pectato de cálcio no interior de diversas frutas e vegetais processados, com o objetivo de preservar ou aumentar sua firmeza (textura). Em alguns casos a atividade de pectinaesterases nativas não é suficiente para o efeito desejado e pode-se introduzir enzimas exógenas (em geral pectinaesterases purificadas de *Aspergillus niger*) nas frutas íntegras ou em pedaços, por injeção de solução enzimática. A difusão/penetração das enzimas pode ser muito aumentada quando o processo é conduzido sob vácuo. Esse processo já foi aplicado com sucesso em morangos, maçãs e pêssegos em calda (autoclavados e misturados em iogurtes).

Pectinaesterase e poligalacturonase. Entre os produtos de importância comercial, o que apresenta maior atividade de ambas as enzimas combinadas é o tomate. A presença dessas enzimas influencia significativamente a conservação pós-colheita e o processamento do fruto.

No caso do produto *in natura*, a atividade combinada de pectinaesterases e poligalacturonases nativas reduz a vida de prateleira da maior parte das variedades de tomate, por provocar rápido amaciamento do fruto (perda da textura desejável) e aumentar sua suscetibilidade a danos mecânicos durante transporte e comercialização. Uma solução para essa dificuldade foi o desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas de tomate, produtoras de menores teores dessas enzimas, que também sintetizam menos etileno que as variedades não modificadas.

Na obtenção de produtos de tomate são utilizados dois tipos básicos de processamento, de acordo com o efeito a ser provocado sobre a atividade das pectinases nativas.

Hot break (90°C). Processo que promove a inativação térmica das pectinases imediatamente após o despulpamento. Garante a manutenção do conteúdo de pectina da polpa, gerando pastas altamente viscosas, aplicadas na produção de *ketchup*, sopas e molhos.

Cold break (40°C). Processo que promove um período de repouso após o despulpamento, garantindo a atividade das enzimas nativas. Proporciona a obtenção de sucos pouco viscosos. Estes, quando concentrados, são usados como flavorizantes e corantes em produtos cuja consistência é garantida por outro ingrediente (amido, gomas, gelatina etc.). As pastas produzidas por esse processo, quando reconstituídas, não apresentam viscosidade característica de molho de tomate.

Enzimas exógenas

Clarificação de sucos de frutas. É a maior e mais antiga aplicação de pectinases comerciais. Após a extração, a maior parte dos sucos de frutas é turva e apresenta alta viscosidade. Em alguns sucos como os de laranja e de toranja,

A ação de pectinaesterases e poligalacturonases influencia significativamente a conservação pós-colheita de tomate, reduzindo a vida de prateleira pela perda da textura.

O processamento industrial varia de acordo com o efeito sobre as pectinases do tomate: *hot break* promove a inativação térmica das pectinases e *cold break* permite a atividade das enzimas nativas.

A clarificação de sucos de frutas é a maior e mais antiga aplicação de pectinases comerciais.

por exemplo, a turbidez é desejada e deve ser preservada, porém sucos de uva, maçã e pera são comercializados clarificados e devem passar por um processo de filtração ou centrifugação para remoção da turbidez. A adição de pectinases reduz a viscosidade e provoca precipitação das partículas de turvação, facilitando sua remoção pelos processos de filtração e centrifugação, aumentando o rendimento do suco clarificado e a vida útil de equipamentos como filtros e *finishers*.

.....
 A turbidez é causada por proteínas com carga positiva, envoltas por substância pécica de carga negativa. A ação de pectinases expõe o núcleo positivo, que atrai a capa negativa de outras partículas, aglomerando partículas grandes, que precipitam.

.....
 A viscosidade do suco é causada por pectina e hemicelulose dissolvidas. A despolimerização por pectinases leva à redução da viscosidade.

A turvação em sucos é causada basicamente por proteínas do citoplasma vegetal, carregadas positivamente no pH ácido dos sucos, envoltas por substância pécica de carga negativa. Essas partículas se mantêm em suspensão (Figura 2.17) devido à repulsão de sua carga superficial (negativa). A degradação parcial da pectina dessas partículas permite a exposição do núcleo proteico (carga positiva), possibilitando a atração do núcleo de algumas partículas pela capa de outras, o que acaba por gerar partículas de tamanho muito grande, que precipitam. A viscosidade do suco é causada por pectina e hemicelulose dissolvidas (não comprometidas com as partículas proteicas). Quando estas são hidrolisadas

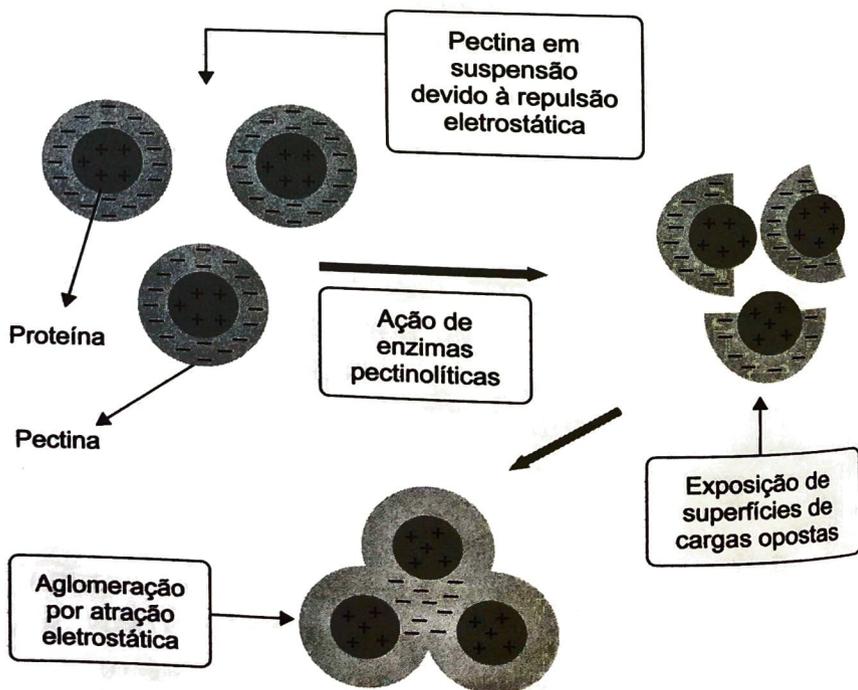


Figura 2.17 Turvação em sucos de frutas e sua clarificação por enzimas.

a cadeias menores (despolimerização), a viscosidade fica significativamente reduzida.

A clarificação e a redução da viscosidade podem ser alcançadas pelo uso combinado de pectinaesterases e poligalacturonases – indicado para todos os sucos e principalmente para suco de uva, cuja pectina tem baixo teor de metoxilação – ou pela adição de pectinaliases – indicado basicamente para maçãs, cuja pectina é altamente esterificada. É importante notar que o pH do suco deve ser tal que as partículas de proteína assumam carga positiva. Em sucos com pH artificialmente elevado, a ação das pectinases não apresenta efeito na remoção da turvação.

Extração de sucos. A obtenção de um suco de fruta consiste na separação da parte líquida da polpa da fruta – formada basicamente pelo conteúdo vacuolar das células – de sua parte sólida insolúvel – os componentes das paredes celulares, principalmente celulose e pectina. Essa separação, em geral, é alcançada por prensagem da polpa da fruta: neste caso, a saída da parte líquida depende do rompimento mecânico das paredes e membranas celulares. O uso de pectinases auxilia nesse processo, facilitando o rompimento das paredes e aumentando o rendimento da extração.

Algumas polpas de frutas, principalmente as com alto conteúdo de pectina solúvel, são especialmente difíceis de prensar, o que ocasiona muito baixo rendimento em suco. Nesses casos, a adição de pectinases à polpa promove a hidrólise da pectina, gerando sucos menos viscosos, mais fáceis de extrair, melhorando as características de prensagem e aumentando em muitas vezes o rendimento.

Em frutas vermelhas a hidrólise de componentes da parede celular auxilia a liberação de pigmentos para o suco. Esse efeito é especialmente desejado na produção de vinho tinto, reduzindo o tempo de maceração da casca no mosto (necessário para a extração das antocianinas).

Nesses procedimentos a combinação de enzimas aplicada pode ser a mesma utilizada para clarificação, devendo, da mesma forma, ser levado em consideração o grau de esterificação da pectina da fruta em questão.

O uso de pectinases auxilia no processo de extração de sucos pelo rompimento das paredes celulares.

Em frutas vermelhas a hidrólise da parede celular libera pigmentos para o suco, o que é desejado na produção de vinho tinto.

Pectinases auxiliam ainda na extração de azeites – óleos obtidos de frutos.

Liquefação é a transformação da polpa em suco, independentemente de prensagem. Ocorre pela hidrólise da parede celular da matéria-prima.

Vantagens da liquefação: aumenta o teor de sólidos do suco, não há bagaço e pode ser aplicada em frutos que não se adaptam ao processo por prensagem.

Maceração é a solubilização da lamela média dos tecidos vegetais que gera polpas contendo células intactas.

Vantagens da maceração: ausência de reações degenerativas e manutenção de alto conteúdo de fibras.

O uso de pectinases tem sido aplicado ainda na extração de azeites de diversos produtos: azeitonas, dendê, babaçu, coco etc.

Liquefação. É o processo que independe de prensagem para a transformação da polpa em suco. Nesse caso, a polpa é toda liquefeita pela hidrólise dos componentes da parede celular dos vegetais. Para que o processo seja eficiente, devem ser usadas, em conjunto, pectinases e celulases que, devido ao efeito sinérgico de suas atividades, são capazes de hidrolisar até 80% dos polissacarídeos presentes na polpa. O grau de hidrólise atingido – produção de sucos límpidos, turvos ou viscosos – é dependente do acesso das enzimas ao substrato e está sobretudo relacionado com a presença e a concentração de lignina no produto. Sucos de mamão assim obtidos são totalmente límpidos, enquanto os de maçã são turvos e os de cenoura são viscosos.

A liquefação é um processo interessante sob diversos aspectos: aumenta o teor de sólidos do suco (que é de interesse para a indústria de sucos concentrados), reduz a produção de resíduos (não há bagaço) e pode ser aplicado com sucesso em frutos que não se adaptam bem ao processo de extração convencional por prensagem (banana, manga, goiaba etc.). No entanto, sua aplicação não é muito difundida principalmente por problemas legais: sucos obtidos desta forma não se encaixam no padrão de identidade da maioria dos países (principalmente na União Europeia, onde o uso de celulases é proibido em produtos de frutas).

Maceração. É o processo de hidrólise e solubilização da lamela média dos tecidos vegetais, gerando polpas de frutas e vegetais contendo células intactas. Essas polpas, aplicadas na produção de alimentos infantis, pudins, iogurtes e purês, apresentam uma série de vantagens sobre os produtos convencionais (polpas homogeneizadas mecanicamente): ausência de reações degenerativas – como escurecimento enzimático e destruição de aromas e vitaminas – causadas pela ação de enzimas endógenas liberadas pelo rompimento celular; manutenção de alto conteúdo de fibras – apenas a lamela média é hidrolisada, as paredes celulares permanecem como parte integrante do produto.

Para obtenção dessas polpas, o vegetal sofre uma desintegração mecânica suave e é adicionado de poligalacturonases ou pectatoliasas purificadas. Na ausência de pectinaesterases, a ação dessas enzimas é bastante limitada, causando apenas a solubilização da lamela média. Ocorre assim a perda de coesão entre as células – formação de polpa, além da geração de oligômeros, que contribuem para dar cremosidade ao produto.

Este processo é aplicado na produção de purê de cenoura para formulação de alimentos infantis e na produção de purê de batata instantâneo. Neste caso, o amido deve ser previamente gelatinizado e o uso de maceração impede que ele vaze das células, evitando a textura grudenta no produto reconstituído.

Descascamento enzimático. Consiste na hidrólise do albedo de frutas cítricas (principalmente laranjas e toranjas) entre a casca e a polpa e entre segmentos da polpa, de modo a separar a fruta em gomos. O processo depende da aplicação de pectinases, sob pressão ou vácuo, nas frutas íntegras. Após o tempo de hidrólise a casca deve ser retirada manualmente. Os gomos da fruta são, então, resfriados e embalados para comercialização como produtos minimamente processados. Esse tipo de produto é bastante difundido nos EUA e no Japão.

Liberação de precursores de aroma em vinhos. Três enzimas exógenas principais, pectinases, β -glicanases e hemicelulases, têm sido amplamente utilizadas para hidrolisar os polissacarídeos na parede celular a fim de melhorar o processo de maceração e extração da cor natural da casca da uva, para otimizar os processos de clarificação e filtração e, finalmente, melhorar a qualidade e a estabilidade do vinho. Alcoóis monoterpênicos são considerados substâncias de extrema importância na formação do aroma de diversos tipos de vinhos. Sua liberação depende da hidrólise dos terpenos glicosilados presentes no mosto fermentado e que é atingida pela ação de β -glicosidases e hemicelulases (arabinosidase, ramnosidase etc.). Essas enzimas devem ser adicionadas ao mosto, logo após a fermentação, para agir de 15 dias a 1 mês. A duração do tratamento deve ser determinada sensorialmente por provador especializado. Uma vez atingido o

.....
Descascamento enzimático é a hidrólise do albedo de frutas cítricas, separando a fruta em gomos.

.....
Liberação de precursores de aroma em vinhos – hidrólise dos terpenos glicosilados por β -glicosidases e hemicelulases.

.....
 A aplicação de pectinases na produção de vinhos melhora a extração dos componentes solúveis das uvas, reduz o tempo e os custos de filtração e aumenta o volume de mosto.

.....
 Eliminação de amargor em sucos cítricos – hidrólise de naringina amarga por naringinases (α -ramnosidase + β -glicosidade). A aglicona não é amarga.

.....
 Eliminação de cristais em sucos concentrados – hidrólise de hesperidina por naringinases. A aglicona é muito mais solúvel.

aroma desejado, o mosto deve ser adicionado de bentonita (auxiliar de clarificação/filtração) que interrompe a atividade de enzimática por precipitação. Atualmente, as pectinases (*Aspergillus niger* e *Penicillium notatum*) estão sendo usadas em 3 etapas durante a preparação do vinho: para melhorar a condição de opacidade e a capacidade de extração dos componentes solúveis das uvas, para reduzir o tempo de filtração e para aumentar o volume de mosto. Consequentemente, a adição de pectinases aumenta a quantidade de componentes fenólicos extraíveis, tais como antocianinas e taninos, que são responsáveis por melhorar o sabor e a intensidade da cor nos vinhos.

Eliminação de amargor em sucos cítricos. O amargor em sucos cítricos se deve sobretudo à presença de naringina, uma flavanona glicosilada por um dissacarídeo composto de uma unidade de ramnose ligada a uma unidade de glicose por uma ligação α -1,2. A liberação da aglicona por carboidrases específicas promove a eliminação do sabor amargo e é alcançada pela remoção sucessiva dos resíduos de L-ramnose e de D-glicose através da ação de um complexo heterodimérico composto de duas subunidades com atividades específicas de α -ramnosidase (EC 3.2.1.40) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21), conforme ilustrado na Figura 2.18. A remoção da ramnose gerando prunina já reduz significativamente o amargor, uma vez que a prunina é cerca de três vezes menos amarga que a naringina. A maioria dos preparados comerciais, geralmente denominados naringinases, apresentam atividade tanto de α -ramnosidase quanto de β -glicosidase e são produzidos principalmente por fungos filamentosos, especialmente do gênero *Aspergillus* (*A. niger* e *A. aculeatus*).

Outra flavanona de importância em sucos cítricos concentrados é a hesperidina. A forma glicosilada (pelo mesmo dissacarídeo da naringina) pode cristalizar em sucos concentrados, sobretudo de tangerina, causando alterações indesejáveis de aparência e sensação bucal. No entanto, a aglicona (hesperetina) é muito mais solúvel e não cristaliza nas condições normais de processamento e armazenamento desses produtos. Naringinases comerciais

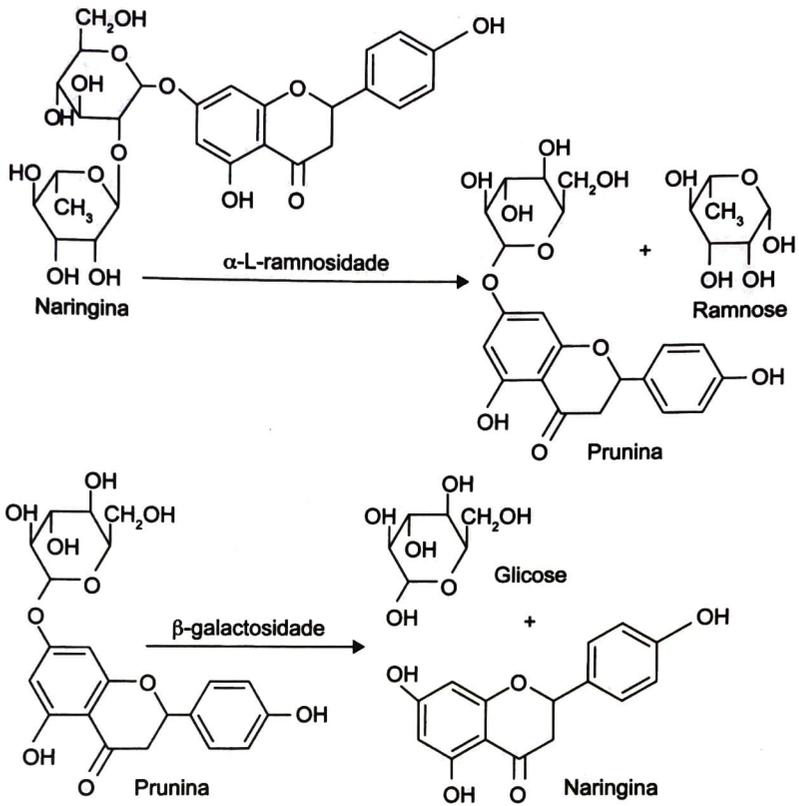


Figura 2.18 Liberação de naringenina pela ação de naringinase.

são eficientemente aplicadas na hidrólise de hesperidina, evitando a ocorrência de cristais.

► Métodos de detecção da atividade

A atividade das pectinases é determinada sobre soluções de ácido poligalacturônico ou pectina, de acordo com a especificidade da enzima em estudo. São parâmetros a serem determinados: a perda de viscosidade da solução e o surgimento de grupos redutores no meio reacional. A combinação desses dois métodos de avaliação permite verificar se a enzima em questão tem padrão endo- ou exo- de atividade.

A atividade de pectinaesterase é geralmente avaliada pela formação de grupamentos ácidos como consequência da desmetoxilação dos resíduos de uronídeos. Isso pode ser avaliado titulometricamente, pela adição estequiométrica de NaOH ao meio reacional, ou espectrofotometricamente, por alteração da coloração de indicadores de pH adicionados ao meio, como azul de bromotimol, por exemplo.

A atividade das pectinases é determinada sobre ácido poligalacturônico ou pectina, de acordo com a enzima em estudo. Por sua vez, a atividade de pectinaesterase é avaliada pela formação de grupamentos ácidos como consequência da desmetoxilação dos uronídeos. A atividade de hidrolases e liases pode ser diferenciada por espectrometria de luz UV, uma vez que os uronídeos insaturados absorvem a 235 nm.

A atividade de hidrolases e liases pode ser diferenciada por espectrometria de luz UV, uma vez que os uronídeos insaturados, formados pela ação de liases, absorvem na faixa entre 220 e 260 nm, com pico em aproximadamente 235 nm, que pode variar de acordo com o pH do meio, entre outros fatores. Por isso, é aconselhável determinar a absorção do produto de reação dentro dessa faixa, para detecção da atividade de liases. Uma metodologia auxiliar é o uso do método periodato-TBA. Nesse método, o produto da reação deve ser oxidado na presença de ácido periódico em ácido sulfúrico. Havendo monouronídeos insaturados na amostra, eles se degradarão, gerando malonaldeído, que reagirá com o ácido tiobarbitúrico para formar uma coloração avermelhada, que absorve a 532 nm. Esse método é aplicável mesmo quando o resultado da reação não absorve a 235 nm, possivelmente porque se apresenta na forma linear (ácido 5-ceto-4-desoxigalacturônico) e não cíclica.

Celulases, hemicelulases e ligninases

► Substrato

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose (35 a 50%), hemicelulose (25 a 30%) e lignina (25 a 30%).

A celulose é um homopolímero linear formado por inúmeras unidades de glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4. A unidade básica de repetição, a celobiose (Figura 2.19), é um dímero de glicose. As cadeias lineares de glicose podem estar ligadas entre si por ligações de hidrogênio, formando regiões cristalinas, ou podem não estar ligadas, formando regiões amorfas (que representam apenas cerca de 15% do total). O conjunto das cadeias de

.....
A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina.

.....
A celulose é um homopolímero linear formado por unidades de glicose, unidas por ligações β -1,4. Para hidrólise da celulose, três grupos de enzimas precisam atuar sinergicamente: exoglicanases, endoglicanases e β -glicosidases.

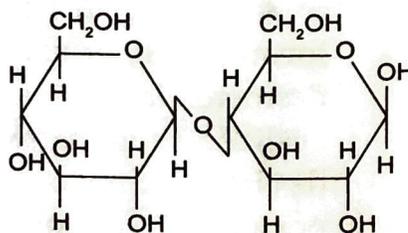


Figura 2.19 Ligação β -1,4. Celobiose.

glicose (regiões cristalinas e amorfas) forma as fibrilas da celulose, que unidas formam as microfibrilas (com diâmetro de aproximadamente 30 Å). Para uma eficiente hidrólise da celulose, três enzimas precisam atuar sinergicamente: exoglicanases, endoglicanases e β -glicosidases.

Nas paredes celulares a celulose se liga às substâncias pécnicas e à lignina por polímeros de hemicelulose (Figura 2.20). O substrato hemicelulósico é uma estrutura amorfa e complexa de carboidratos, consistindo em diferentes polímeros formados por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose). As hemiceluloses possuem ainda cadeias laterais constituídas de ácido acético, pentoses, ácidos hexurônicos e desoxi-hexoses (α -L-raminose, α -L-fucose), que são responsáveis pela solubilidade do polissacarídeo em água e/ou em álcalis. A hemicelulose é uma estrutura mais sensível, térmica e quimicamente, que a celulose, mas confere maior estabilidade mecânica, flexibilidade e elasticidade à estrutura celulose-hemicelulose-lignina. As principais hemicelulases são as xilanases, as glicuronidases, as arabinofuranosidases, as galactosidases e as mananases que hidrolisam ligações glicosídicas, enquanto acetil- ou feruloil-esterases hidrolisam ligações éster de grupos laterais de acetato ou ácido ferúlico na estrutura da parede celular dos vegetais. Hemicelulases são produzidas sobretudo por fungos filamentosos, especialmente por *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp., entre outros.

Hemicelulose é uma estrutura formada por diferentes polímeros de pentoses e hexoses. As principais hemicelulases são as xilanases, as glicuronidases, as arabinofuranosidases, as galactosidases e as mananases.

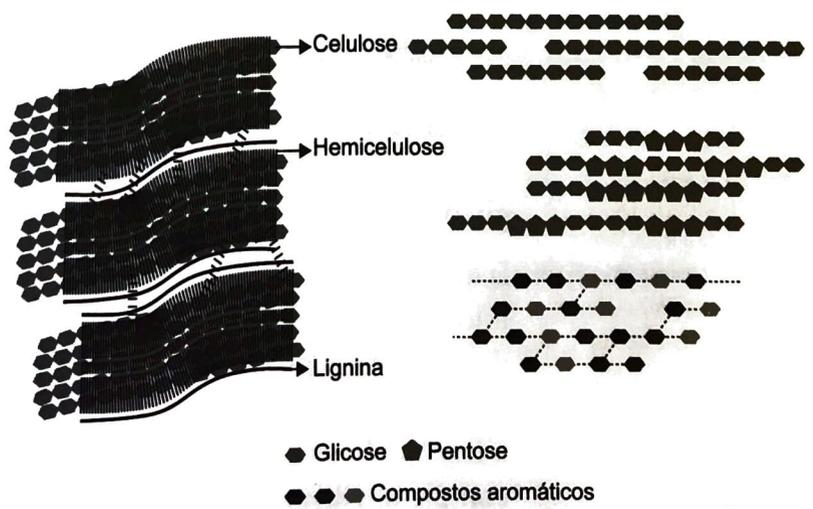


Figura 2.20 Esquema da organização dos diferentes constituintes do complexo lignocelulósico.

A lignina é um polímero aromático heterogêneo, com estrutura tridimensional de unidades de fenilpropano unidas por ligações éter, não hidrolisáveis sob condições biológicas.

A degradação da celulose em matrizes lignocelulósicas depende de: acesso às microfibrilas, teor de umidade e tamanho de partícula, teor de lignina, grau de cristalinidade e de polimerização da celulose e grau de revestimento por hemicelulose.

Celulases são carboidrases que clivam ligações β -1,4 entre unidades de glicose. São elas: Cx celulase (endoenzima que libera oligossacarídeos), celobio-hidrolase (exoenzima que libera glicose e celobiose), celobiase (exoenzima que cliva celobiose) e glico-hidrolase (que remove unidades de glicose das extremidades de polímeros).

A lignina é um polímero aromático heterogêneo, com estrutura tridimensional, composta em grande parte de unidades de fenilpropano (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico) geralmente unidas por ligações éter, que não são hidrolisáveis sob condições biológicas. O acoplamento dessas unidades não ocorre de maneira regular e repetitiva, ao contrário, a união ocorre de forma aleatória por meio de reações radiculares entre os seus três alcoóis precursores. A lignina age como material ligante preenchendo o espaço ao redor e entre a celulose e hemicelulose, complexando-se com os polímeros e conferindo rigidez e proteção à degradação enzimática, microbiana e oxidativa da parede celular.

A degradação da celulose do material lignocelulósico enfrenta muitos obstáculos, atribuídos a fatores morfológicos e físico-químicos, com consequente resistência à hidrólise enzimática. A acessibilidade das microfibrilas internas e a porosidade do material, o teor de umidade e o tamanho de partícula do substrato, assim como o teor de lignina, o grau de cristalinidade e de polimerização das fibras de celulose e o revestimento de hemicelulose estão entre os principais fatores a serem considerados. A hidrólise requer, portanto, múltiplas enzimas com diferentes especificidades (Tabela 2.6) para desconstruir a complexa estrutura lignocelulósica, mais especificamente, uma ação sinérgica de ligninocelulases: celulases, hemicelulases e ligninases.

► Fontes e principais características

Celulases são enzimas hidrolíticas (carboidrases) capazes de romper as ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades de glicose. Existem 4 tipos de celulases:

Endo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.4 – Cx celulase). Rompem a celulose, desordenadamente, no meio da molécula, liberando oligossacarídeos β -1,4. Muitas endoglicanases não são capazes de atacar celulose cristalina, agindo apenas sobre a fração amorfa do polímero e fazendo uma hidrólise incompleta. Glicanases capazes de atacar celulose cristalina são bem raras e, em geral, de ação muito lenta.

Tabela 2.6 Enzimas que agem sobre material lignocelulósico.

Enzima	Substrato preferencial	Resultado da hidrólise	Microorganismos produtores
Celulases			
Endoglicanase EC 3.2.1.4	Região interna amorfa da celulose	Oligossacarídeos	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Trichoderma viride</i>
Exoglicanase (celobio-hidrolase) EC 3.2.1.91	Extremidade da celulose	Glicose e celobiose	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i>
β -glicosidase EC 3.2.1.21	Celobiose	Glicose	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i>
Hemicelulases			
Endo- β -1,4-xilanase EC 3.2.1.8	Região interna da xilana	Oligossacarídeos	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trichoderma viride</i>
β -xilosidase EC 3.2.1.37	Oligossacarídeos de xilana	Monossacarídeos	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus japonicus</i> , <i>Aspergillus awamori</i>

Exo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.91 – Celobio-hidrolase). Rompem a celulose a partir da extremidade, liberando glicose e celobiose (dissacarídeo de glicoses β -1,4).

β -glicosidases (EC 3.2.1.21 – Celobiase). Rompem a celobiose liberando glicoses. Atuam também como exoenzimas sobre oligossacarídeos β -1,4.

Glico-hidrolases (EC 3.2.1.74). Removem unidades de glicose da extremidade de polímeros (celulose) e oligômeros de alta massa molecular.

As celulases são produzidas por diferentes gêneros de microorganismos: bactérias anaeróbias do trato digestivo de ruminantes (*Ruminococcus* sp.) e outros herbívoros; bactérias aeróbias (*Bacillus subtilis*, *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*); fungos filamentosos do solo (*Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*), degradadores de madeira ou fitopatogênicos; e actinomicetos (*Streptomyces* sp.). Os principais microorganismos produtores são os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma reesei*.

Embora, na natureza, esses microorganismos sejam extremamente eficientes na degradação da celulose, os extratos

Celulases são produzidas por microorganismos, sobretudo pelos fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma reesei*.

Para hidrólise de celulose cristalina na matriz ligninocelulósica é indispensável um pré-tratamento, como choque ácido ou alcalino, moagem, explosão de vapor, uso de solventes orgânicos, incubação com fungos ou aplicação de enzimas ligninolíticas.

Celulases são usadas, em conjunto com enzimas pectinolíticas e com hemicelulases, na extração/liquefação de sucos e no tratamento do café.

Hemicelulases são enzimas capazes de hidrolisar os polissacarídeos da hemicelulose. As mais importantes são xilanases e xilosidases.

As hemicelulases são produzidas em conjunto com as pectinases por diversos fungos filamentosos aplicados na sua produção comercial, por exemplo: *Aspergillus niger*.

enzimáticos produzidos por eles não apresentam a mesma eficiência *in vitro*. Para resultados satisfatórios é indispensável um pré-tratamento da celulose, para destruição das porções cristalinas do polímero. Os tratamentos mais testados envolvem choque ácido ou alcalino, moagem, explosão de vapor, uso de solventes orgânicos, incubação com fungos e aplicação de enzimas ligninolíticas. No entanto, em virtude dessas dificuldades, a obtenção de glicose e outros açúcares (xilose, por exemplo) a partir de material ligninocelulósico ainda é um processo comparativamente muito caro.

Celulases são usadas, em conjunto com enzimas pectinolíticas e com hemicelulases, na extração de sucos e no tratamento do café.

Hemicelulases são um grupo de enzimas capazes de hidrolisar os polissacarídeos classificados como hemicelulose. Em razão da complexidade e da heterogeneidade de sua estrutura, a completa degradação da hemicelulose requer a ação de várias hemicelulases. Entre elas as mais importantes são xilanases (endoenzimas) e xilosidases (exoenzimas que hidrolisam ligações do tipo β -1,4 entre unidades de xilose). Existem ainda enzimas acessórias ou desramificantes, que removem grupos laterais ou substituintes, como as α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), as α -D-glicuronidases (EC 3.2.1.139), as acetil-xilana esterases (EC 3.1.1.72) e esterases de ácidos fenólicos (ácido ferúlico – feruloilesterase EC 3.1.1.73 – e ácido *p*-cumárico esterases). As xilanases de origem fúngica são geralmente mais ativas em pH entre 3,5 e 6,5 e entre 40 e 60°C. As xilanases de origem bacteriana são mais ativas em pH entre 5,0 a 8,0 e entre 50 e 80°C. A maioria das xilanosidases de fungos apresenta um pH ótimo de atividade entre 4,0 e 5,0 e uma temperatura ótima que pode variar de 40 a 80°C. As hemicelulases são produzidas em conjunto com as pectinases por diversos fungos filamentosos aplicados na sua produção comercial, por exemplo *Aspergillus niger*.

A biodegradação da lignina é um processo oxidativo que envolve um complexo sistema enzimático de baixa especificidade, geralmente produzido por fungos que vivem

A biodegradação da lignina é um processo oxidativo que envolve um complexo sistema enzimático de baixa especificidade.

As principais enzimas envolvidas são lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase.

madeiras, designados fungos de decomposição (*Phanaerochatae chrysosporium*, por exemplo). As principais enzimas envolvidas são lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase.

► Aplicação de xilanases

Oligossacarídeos obtidos a partir de xilana

Os xiloligossacarídeos, oligômeros formados por unidades de xilose, são utilizados como aditivos em alimentos, principalmente como edulcorantes, e são considerados prebióticos, fornecendo substrato seletivo para o crescimento de probióticos como *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium bifidum* e de inibição à proliferação de bactérias patogênicas no intestino. A obtenção de xiloligossacarídeos a partir de materiais lignocelulósicos pode ser feita diretamente por hidrólise ácida e posterior purificação, ou ainda em duas etapas: extração da hemicelulose do material lignocelulósico por processos de auto-hidrólise, hidrólise ácida e pré-tratamento alcalino; e hidrólise ácida ou tratamento enzimático da hemicelulose pela utilização de xilanases. A endo β -1,4-D-xilanase atua na cadeia principal das xilanas gerando xiloligossacarídeos de baixo grau de polimerização.

A via enzimática, por ação de endoxilanases, é a mais desejável – uma vez que não há subprodutos gerados durante a hidrólise e a formação de monômeros de açúcares é baixa, independe do uso de equipamentos especiais, além de se tratar de um processo limpo que ocorre em condições amenas de pH e temperatura. Além disso, é possível reduzir os custos de produção pelo reúso de enzimas imobilizadas. No entanto, o processo enzimático é facilmente inibido por compostos presentes na biomassa lignocelulósica, o que demanda aplicação de pré-tratamento para a remoção desses compostos geralmente relacionados à defesa das plantas.

Enzimas xilanolíticas na panificação

O trigo tem a capacidade de formar massa viscoelástica, e as proteínas formadoras do glúten, a gliadina (que confere alta extensibilidade e baixa elasticidade da massa) e a

Xiloligossacarídeos são utilizados como edulcorantes e prebióticos em alimentos.

Podem ser obtidos por tratamento enzimático da hemicelulose aplicando endo β -1,4-D-xilanases.

glutenina (que confere baixa extensibilidade e alta elasticidade) são as principais responsáveis pela formação desse filme. A massa, então, retém o gás produzido durante o processo de fermentação, e nos primeiros estágios do cozimento no forno, e o pão é capaz de crescer. A farinha de trigo geralmente contém aproximadamente 80% de amido, 12% de proteínas e 2 a 3% de arabinosilana. A arabinosilana da farinha consiste em uma fração solúvel em água e outra fração não solúvel, formada pela combinação de interações covalentes e não covalentes com outros componentes da parede celular, tais como proteínas ou celulose. A fração não solúvel apresenta efeito negativo na qualidade da massa, interferindo na formação da rede de glúten: essa fração tem grande capacidade de retenção de água, competindo pela umidade com outros componentes da farinha e a deixando indisponível para o desenvolvimento do glúten. Além disso, forma barreiras físicas ao glúten durante o desenvolvimento da massa, o que desestabiliza as bolhas de gás e resulta na diminuição do volume do pão.

Endoxilanases atuam sobre as frações não solúveis de arabinosilana, promovendo sua solubilização. Isso leva à redução da capacidade de retenção de água e ao aumento da viscosidade, da flexibilidade e da estabilidade do sistema da massa. No entanto, o uso de endoxilanases em excesso pode resultar na perda da capacidade de retenção de água da massa e, assim, gerar produtos defeituosos: massas fracas e inconsistentes e pães com estrutura do miolo, distribuição de bolhas de gás e cor da crosta indesejáveis.

► Métodos de detecção da atividade

A capacidade das enzimas de hidrolisar ligações envolvendo diferentes resíduos de monossacarídeos (glicose, xilose, galactose) pode ser avaliada pelo uso de substratos sintéticos específicos. São encontrados substratos do tipo *p*-nitrofenil-glicosídeo que podem apresentar ligações do tipo α ou β . Nesses casos, observa-se a liberação do *p*-nitrofenol a 405 a 410 nm.

A atividade de celulase pode ser determinada sobre celulose insolúvel (utiliza-se um pedaço de papel-filtro como

Endoxilanases atuam sobre a fração insolúvel de arabinosilana da farinha, promovendo sua solubilização com melhoria da qualidade da massa. Em excesso, sua ação pode gerar produtos defeituosos.

A capacidade das enzimas de hidrolisar ligações envolvendo diferentes resíduos de monossacarídeos pode ser avaliada pelo uso de substratos sintéticos específicos do tipo *p*-nitrofenil-glicosídeo.

A atividade de celulase pode ser determinada sobre celulose insolúvel ou sobre celulose modificada: carboximetilcelulose altamente solúvel ou Avicel® de alta cristalinidade.

A atividade de xilanases e xilosidases pode ser determinada sobre xilana extraída de alguns tipos de madeira.

β -galactosidases são enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas do tipo β envolvendo galactoses e arabinoses. Seu principal substrato é a lactose.

substrato) ou sobre celulose modificada: usando carboximetilcelulose altamente solúvel ou Avicel®, marca comercial de um produto de alta cristalinidade. Esse último substrato é hidrolisado particularmente por exocelulases – também conhecidas como avicelases – em virtude da predominância de regiões cristalinas.

A atividade de xilanases e xilosidases pode ser determinada sobre xilana extraída de alguns tipos de madeira (faia e bétula, por exemplo).

Em todos os casos, após a paralisação da reação, o meio deve ser centrifugado para precipitação do material não hidrolisado, e o sobrenadante avaliado quanto ao surgimento de açúcares redutores.

Lactases

Lactases ou β -galactosidases (EC 3.2.1.23) são enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas do tipo β envolvendo galactoses e arabinoses, sendo a reação com esta última bem mais lenta. Seu principal substrato é a lactose (Figura 2.21), açúcar típico do leite, mas também estão envolvidas na modificação de gomas e hemicelulose, o que explica sua produção por diversos vegetais. Industrialmente são aplicadas lactases de origem microbiana para a hidrólise da lactose do leite e do soro, gerando glicose e galactose, e na produção de galactoligossacarídeos.

► Substrato

A lactose é o dissacarídeo formado por uma unidade de glicose e uma unidade de galactose ligadas entre si por ligação glicosídica do tipo β -1,4. É o carboidrato predominante

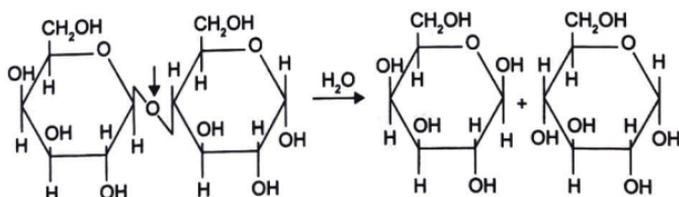


Figura 2.21 Ação da lactase sobre a lactose.

A lactose é o dissacarídeo formado por uma unidade de glicose e uma unidade de galactose unidas por ligação β -1,4. É o carboidrato predominante no leite.

Lactases são produzidas no intestino de mamíferos e atingem sua maior concentração logo após o nascimento.

A intolerância à lactose pode derivar da insuficiente produção de lactase ou da dificuldade de metabolizar a galactose. A lactase humana é secretada pelas células do jejuno e tem ótima atividade em $\text{pH} = 6,0$ e temperatura entre 30 e 40°C .

no leite, representando cerca de 5% do leite bovino e até 7% do leite humano. É um açúcar pouco solúvel, que cristaliza em concentrações superiores a 18% (enquanto a sacarose é solúvel em concentrações até 64%), formando cristais "pontudos" capazes de provocar a sensação bucal de areosidade (quando maiores que 20 mm). A lactose é muito pouco doce (apenas 16% da doçura da sacarose) e altamente higroscópica, logo, pode ser responsável pelo empedramento em produtos lácteos em pó. Por isso, altas concentrações de lactose podem gerar defeitos em produtos desidratados, congelados e concentrados à base de leite.

Fontes e principais características

Lactases são produzidas no intestino de mamíferos e atingem sua maior concentração logo após o nascimento. Na maioria das populações a concentração de lactase cai drasticamente na fase adulta (em geral já após os 3 anos de idade), o que dificulta a hidrólise da lactose ingerida. Apenas certas populações do norte e do leste da Europa e de algumas regiões da África e seus descendentes são capazes de manter produção satisfatória de lactase no intestino na idade adulta. O acúmulo de lactose não digerida no intestino permite a multiplicação de microrganismos e leva à produção de gases e à diarreia (favorecida pela desidratação osmótica no local). Embora esses danos possam ser minimizados pelo consumo constante de pequenas quantidades de lactose, acredita-se que a ingestão de produtos lácteos isentos desse açúcar favoreça a absorção dos demais nutrientes do alimento. É importante ressaltar que uma pequena fração das crianças no mundo nasce com intolerância à lactose. Esta pode vir de uma incapacidade de digerir a lactose (insuficiente produção de lactase) ou da dificuldade de metabolizar a galactose. A lactase humana é secretada pelas células do jejuno (no intestino delgado) e tem ótima atividade em $\text{pH} = 6,0$ e temperatura entre 30 e 40°C .

Vários vegetais são produtores de lactases, entre eles se destacam pêssego, damasco, café e amêndoa. A lactase de amêndoa, conhecida como emulsina, apresenta também atividade de β -glicosidase. Lactases de origem vegetal geralmente não são comercializadas para uso industrial.

Atualmente as lactases de uso comercial são de origem microbiana, sendo as principais fontes os seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Candida pseudotropicalis* e *Kluveromyces lactis*. A lactase microbiana mais conhecida e estudada é produzida por *Escherichia coli*, uma vez que o gene promotor dessa proteína é largamente utilizado em experimentos de clonagem. Entretanto, seu uso em alimentos não é permitido (em virtude da possibilidade de patogenicidade) e seu interesse para a indústria de alimentos se restringe à quantificação enzimática de lactose. De uma forma geral, pode-se dizer que enzimas de origem fúngica têm pH ótimo ácido (entre 2,5 e 4,5), sendo indicadas para hidrólise de lactose do soro, tipicamente um produto ácido; enquanto lactases de origem bacteriana têm pH ótimo em torno de 7,0, e as produzidas por leveduras têm ótima atividade em pH entre 6,0 e 7,0, sendo, portanto, indicadas para uso no leite (pH em torno de 6,7). Lactases de fungos filamentosos apresentam ótima atividade em temperatura em torno de 50°C, enquanto as produzidas por leveduras têm temperatura ótima entre 30 e 40°C.

Lactases apresentam ainda atividade de transferase, podendo ligar uma unidade de galactose a outra unidade de galactose livre por uma ligação β -1,6 (gerando o dissacarídeo lactobiose), a galactose pertencente a uma lactose (gerando o trissacarídeo lactotriose) (Figura 2.22) ou ainda a uma lactobiose (gerando o trissacarídeo galactotriose).

► Aplicação industrial

Produtos para consumidores intolerantes à lactose

Ingestão ou aplicação doméstica da enzima. Existem no mercado cápsulas contendo lactase, para serem ingeridas por

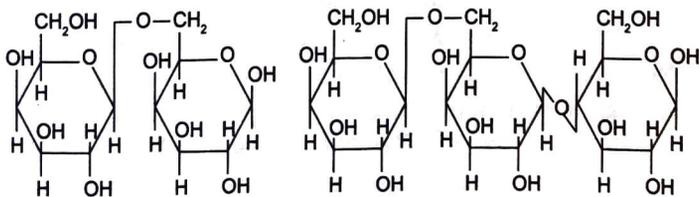


Figura 2.22 Lactobiose e lactotriose.

As principais fontes de lactase são os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *A. oryzae* e as leveduras *Candida pseudotropicalis* e *Kluveromyces lactis*.

Lactases fúngicas têm pH ótimo ácido – usadas para hidrólise de lactose do soro. Lactases bacterianas têm pH ótimo 7,0, e lactases de leveduras têm pH ótimo entre 6,0 e 7,0 – indicadas para uso no leite.

Lactases apresentam atividade de transferase, podendo gerar os oligossacarídeos lactobiose, lactotriose e galactotriose.

Estão disponíveis no mercado lactases para serem ingeridas ou adicionadas aos produtos lácteos, com o objetivo de hidrolisar a lactose e evitar os danos associados à intolerância.

Também são encontrados leites previamente tratados com lactase, destinados a consumidores portadores de intolerância.

Para o tratamento de leites a lactase comercial mais indicada é a de *Kluveromyces lactis*.

A hidrólise da lactose aumenta a doçura do leite e sua susceptibilidade ao escurecimento pela reação de Maillard.

indivíduos intolerantes à lactose, que aumentam a atividade dessa enzima no intestino, aliviando os sintomas causados pelo acúmulo do açúcar. Alternativamente, o consumidor pode adicionar ao leite ou produto lácteo um preparado enzimático em pó ou líquido, antes do consumo, com o objetivo de hidrolisar a lactose e evitar os danos associados à intolerância.

Leites com baixo teor de lactose. São encontrados no mercado leites, principalmente do tipo UHT ou em pó, com reduzido teor de lactose, previamente tratados com lactase, destinados a consumidores portadores de intolerância. Entretanto, esses produtos custam consideravelmente mais que os tradicionais. Como estratégia para redução do preço desse produto, uma empresa na Suécia tem aplicado quantidades extremamente reduzidas de enzima aos produtos longa vida, de modo que, ao longo de extenso período de armazenamento, seja possível atingir alto grau de hidrólise a custo reduzido. Para o tratamento de leites, seja industrial ou doméstico, a lactase comercial mais indicada é produzida por *Kluveromyces lactis*, em virtude de seu pH ótimo de ação.

Vale ressaltar que a hidrólise da lactose aumenta a doçura do leite, uma vez que a mistura de glicose e galactose é cerca de 4 a 5 vezes mais doce que a lactose. Essa mistura é ainda mais reativa que a lactose na reação de Maillard, gerando produtos mais escuros, quando submetidos a tratamentos térmicos.

Uma destinação alternativa para o soro de queijo, em diversos países, é a alimentação animal. No entanto, o alto teor de lactose desse subproduto limita as quantidades de administração sob pena de interferir negativamente no ganho de peso do animal. O tratamento enzimático do soro para esse fim é economicamente inviável, porém uma possibilidade é o uso de leveduras fermentadoras de lactose (p. ex. *Kluveromyces fragilis*). O produto obtido, além de reduzido teor de lactose, apresenta alto teor de proteína microbiana.

Pré-tratamento do leite para obtenção de diversos produtos

A produção de qualquer produto lácteo livre de lactose depende da hidrólise prévia desse dissacarídeo

A produção de qualquer produto lácteo livre de lactose depende da hidrólise prévia desse dissacarídeo da matéria-prima. Produtos livres de lactose não são menos calóricos nem possuem menor teor de carboidratos; o que muda é a forma do carboidrato presente (lactose ou glicose + galactose).

A hidrólise da lactose em leites a serem fermentados pode reduzir o tempo de fermentação, melhorar a textura e reduzir a dessora.

Em panificação, o leite hidrolisado com lactase fornece glicose para fermentação e galactose para a reação de Maillard.

Leites tratados com lactase podem ser congelados com significativa redução de danos à qualidade.

Em doce de leite e sorvete, a lactose tende a cristalizar. O uso de leites tratados com lactase evita a formação de arenosidade.

matéria-prima. Assim, os diversos produtos disponíveis para consumidores com intolerância ou que simplesmente preferem produtos sem lactose (*lacfree*) passa pela etapa de hidrólise enzimática com lactases, para o preparo do leite como matéria-prima. No entanto, em alguns produtos esse tipo de tratamento pode trazer benefícios tecnológicos adicionais.

logurte. A hidrólise da lactose em leites a serem fermentados aumenta a doçura do produto final sem aumentar o valor calórico. Além disso, o uso de leites tratados com lactase pode reduzir o tempo de fermentação, melhorar a textura e reduzir a dessora. Alguns autores relatam o surgimento de *off-flavor* nesses produtos.

Queijo. O pré-tratamento do leite para produção de queijo tipo *cheddar* parece reduzir seu tempo de produção e, principalmente, de maturação. Alguns autores acreditam que esses efeitos se devam não à lactase mas à presença de proteases contaminantes no preparado enzimático comercial.

Produtos de panificação. O leite em pó, previamente hidrolisado, fornece glicose para fermentação de produtos de panificação enquanto a galactose, não fermentável, contribui para formação da cor e do aroma através da reação de Maillard.

Leite congelado. O congelamento não é um método muito aplicado de conservação de leite bovino, pois provoca desestabilização da emulsão (com a destruição das micelas de caseína e rompimento dos glóbulos de gordura). Boa parte desses efeitos é creditada à formação de cristais de lactose durante o congelamento. Portanto, leites tratados com lactase podem ser congelados com significativa redução desses danos.

Doce de leite e sorvete. Nesses produtos, devido à concentração e à temperatura de armazenamento, respectivamente, a lactose tende a cristalizar. A formação destes cristais gera arenosidade, sensação bucal que leva à rejeição do consumidor. O uso de leites tratados com lactase evita a formação de arenosidade. É importante destacar que o controle do processo, na obtenção destes produtos com leite natural, é capaz de evitar a cristalização indesejada da lactose e que

esta ocorre, em geral, como consequência de falha no processamento ou no armazenamento.

Produção de xarope de glicose-galactose

O soro de queijo já foi considerado um resíduo altamente poluente da indústria queijeira. Atualmente, no entanto, sobretudo graças à alta qualidade nutricional das proteínas do soro, boa parte desse coproduto é totalmente aproveitada.

O processo que garante maior aproveitamento comercial do soro envolve uma etapa de ultrafiltração, na qual a maior parte das proteínas presentes é retida e posteriormente transformada em pó (por secagem em *spray-dryer*, por exemplo). Esse produto é utilizado na suplementação de sólidos para produção de iogurte (melhoria da textura e redução da dessora) e como ingrediente em diversos produtos lácteos e de panificação (substituindo os sólidos do leite).

O permeado da ultrafiltração do soro contém principalmente lactose (que corresponde a até 75% dos sólidos do soro) e sais. Esses últimos podem ser removidos por colunas de troca iônica, semelhantes às utilizadas na dessalinização de água. O restante, basicamente lactose, é utilizado na produção de xarope de glicose-galactose. Para tanto, a solução de lactose é tratada com lactase fúngica imobilizada, que pode atingir entre 70 e 90% de hidrólise, gerando uma solução com até 80% da doçura da sacarose. Essa solução é então concentrada, formando uma solução viscosa ou xarope, que pode ser adicionado à formulação de doce de leite, sorvete e sobremesas lácteas congeladas para evitar a cristalização da lactose presente em tais produtos. Além dessa propriedade, a adição do xarope de glicose-galactose reduz a necessidade de adição de sacarose ou de outro edulcorante na formulação.

Uma alternativa mais barata é a dessalinização do soro integral, seu tratamento com lactases e posterior concentração. O produto obtido, rico em proteínas, pode ser utilizado como ingrediente, substituto do leite, em diversas formulações.

.....
O permeado da ultrafiltração do soro pode ser usado para produção de xarope de glicose-galactose por tratamento com lactase fúngica imobilizada.

.....
A adição do xarope de glicose-galactose reduz a necessidade de adição de sacarose ou de outro edulcorante nas formulações.

O poder edulcorante do xarope de glicose-galactose pode ser muito aumentado pela isomerização da glicose em frutose, gerando xarope de frutose-galactose.

O poder edulcorante do xarope de glicose-galactose pode ser muito aumentado pela transformação da glicose em frutose através de isomerização, gerando um xarope de frutose-galactose.

Produção de galactoligossacarídeos

Em geral, a hidrólise completa da lactose utilizando β -galactosidase é conseguida quando a água atua como nucleófilo para as frações galactosil produzidas. A hidrólise produz uma molécula de galactose e uma de glicose para cada molécula de lactose. Durante a hidrólise, no entanto, a própria lactose também pode atuar como um aceptor, produzindo, assim, galactoligossacarídeos. A competição entre água e lactose pode influenciar notavelmente a seletividade da reação: em direção à hidrólise ou à transgalactosilação. A capacidade das enzimas para transferir resíduos de galactosil (transgalactosilação) para outros nucleófilos contendo hidroxila pode ser explorada para produzir galactoligossacarídeos, que podem variar de tri a decassacarídeos, contendo uma unidade de glicose da lactose original, e de duas a nove unidades de galactose, respectivamente. Esses compostos, por não serem digeridos no trato digestivo humano, são capazes de atingir o cólon sem terem sofrido alterações. Nesse local a presença dos galactoligossacarídeos é capaz de favorecer o crescimento de populações microbianas benéficas (como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) em detrimento de bactérias do tipo putrefativo (da família Enterobacteriaceae, por exemplo), o que os caracteriza como substâncias prebióticas. Galactoligossacarídeos são produzidos, por via enzimática, em larga escala, por empresas japonesas e holandesas, com uso de lactases. No Japão e na Europa, esses oligossacarídeos são os principais ingredientes prebióticos utilizados, depois da lactulose (ver tópico adiante).

A conversão da lactose em galactoligossacarídeos por ação da enzima β -galactosidase é uma reação cineticamente controlada e responde a um modelo de competição entre a reação de transgalactosilação e hidrólise. O primeiro passo é a formação de um complexo enzima-galactosil e a simultânea liberação da glicose. Em uma segunda etapa, o

Na produção de galactoligossacarídeos a lactose atua como um aceptor, gerando de tri a decassacarídeos com atividade prebiótica.

A presença de altas concentrações de galactoligossacarídeos em produtos lácteos, como consequência da ação de lactases, pode levar a distúrbios intestinais, como flatulência.

A lactulose é o principal produto de ação prebiótica aplicado em alimentos e comercializado no mundo. É também utilizada em diversos medicamentos contra constipação intestinal encontrados no Brasil.

Vantagens da obtenção de lactulose pelo método enzimático: o produto requer pouca purificação e é classificado como natural. O processo de produção de lactulose usa transgalactosilação com β -galactosidases na presença de lactose e frutose.

complexo enzima-galactosil é transferido para um aceptor que contenha um grupo hidroxila. Em uma solução diluída de lactose, a água é o aceptor mais competitivo, o que leva à liberação de galactose. Se a concentração de lactose no sistema for alta, as moléculas de lactose e demais mono-, di- e oligossacarídeos têm mais chances de atuarem como aceptores do complexo enzima-galactosil, formando os galactoligossacarídeos. Esses prebióticos são produzidos comercialmente por β -galactosidases de *Kluyveromyces lactis*, *Bacillus circulans*, *Bifidobacterium bifidum*, *Aspergillus oryzae* e *Streptococcus thermophilus*.

A presença de altas concentrações de galactoligossacarídeos (derivadas da ação de transferase das lactases) em leites ou produtos lácteos tratados enzimaticamente pode levar a distúrbios intestinais, principalmente flatulência.

Lactulose. Esse dissacarídeo, formado por uma unidade de galactose e uma de frutose, é o principal produto de ação prebiótica aplicado em alimentos e comercializado isoladamente em diversas partes do mundo. Em 2010 foi estimada uma produção mundial de 36.000 a 42.000 toneladas de lactulose, dos quais três quartos da produção foram destinados para a indústria de alimentos e o restante para a indústria farmacêutica, pois, além de ser um ingrediente funcional, a lactulose é utilizada em diversos medicamentos contra constipação intestinal encontrados também no Brasil. Trata-se de um produto obtido sobretudo pelo processo de isomerização alcalina do resíduo de glicose, componente da lactose. A síntese química pode, entretanto, gerar a presença de monossacarídeos e lactose residual, que são indesejáveis para aplicações com fins terapêuticos, e requer etapas adicionais de separação. Como consequência, a gestão dos resíduos e a purificação de produtos dos processos químicos implicam custos relativamente altos.

A produção de lactulose pelo método enzimático, embora ainda significativamente mais cara, apresenta vantagens importantes: o produto obtido praticamente não requer purificação e recebe classificação de produto natural para uso na indústria alimentícia. A síntese enzimática da

lactulose é comumente realizada com β -galactosidases pela transgalactosilação na presença de lactose (como doadora de galactosil) e frutose (como aceptora/nucleófila). No entanto, quando em concentrações muito altas, a lactulose pode sofrer hidrólise pela ação da enzima, resultando na reversão a galactose e frutose, com perda de rendimento.

A lactulose estimula a proliferação de bactérias colônicas desejáveis, como lactobacilos e bifidobactérias, em adultos e lactentes, sendo fermentada por essas bactérias e resultando na formação de ácidos graxos de cadeia curta. Em consequência da redução desejável do pH intestinal, ocorre inibição do crescimento de bactérias potencialmente prejudiciais (bacteroides, *E. coli* e *Clostridia*). Por esse efeito promotor da saúde, a lactulose é um ingrediente prebiótico indicado para o desenvolvimento de diferentes alimentos funcionais: a incorporação de 0,5% de lactulose em fórmulas infantis é considerada adequada para estimular a população de bifidobactérias, enquanto o aumento da concentração para 1% pode fornecer um efeito laxativo parcial.

A lactulose pode, posteriormente, ser hidrolisada a galactose e frutose por lactases de *Kluyveromyces lactis* comerciais (porém não pela lactase humana), o que pode ser uma via alternativa para obtenção do xarope de frutose-galactose.

► Métodos de detecção da atividade

A atividade de β -galactosidase não deve ser avaliada com base em ensaios de geração de açúcares redutores, uma vez que o substrato da enzima – lactose – é um dissacarídeo redutor. Um método possível é o uso de *kits* enzimáticos para determinação da glicose liberada, durante a reação. Uma alternativa bastante interessante é o uso de substratos sintéticos do tipo *orto*- (ou *para*-) nitrofenil-galactose. Esses substratos são prontamente hidrolisados pela enzima (em geral até mais rapidamente que a lactose), liberando galactose e *orto*- (ou *para*-) nitrofenol, compostos com absorção máxima em torno de 400 nm, que podem ser quantificados por espectrofotometria.

Em fórmulas infantis, a adição de 0,5% de lactulose funciona como prebiótico e de 1% tem leve efeito laxativo.

A atividade de β -galactosidase não deve ser avaliada por ensaios que quantifiquem a geração de açúcares redutores. É recomendado o uso de substratos sintéticos do tipo *orto*- (ou *para*-) nitrofenilgalactose.

A atividade de transferase da enzima pode ser avaliada qualitativamente, por cromatografia em papel, do produto de reação.

Invertases

Invertases ou β -frutofuranosidases (EC 3.2.1.26) são enzimas capazes de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose. Seu nome comum – invertase – se deve ao fato de que a hidrólise da sacarose leva à inversão da rotação óptica do meio reacional, basicamente devido ao surgimento de frutose, quando observado em polarímetro (Figura 2.23).

O produto da hidrólise da sacarose, o xarope de glicose-frutose, conhecido como “açúcar invertido”, apresenta diversas características interessantes em relação ao xarope de sacarose – maior poder edulcorante (pela presença da frutose), maior possibilidade de concentração (os monossacarídeos formados são mais solúveis que o dissacarídeo original), ponto de ebulição mais alto e ponto de congelamento mais baixo (em virtude da maior pressão osmótica do produto) – e tem várias aplicações na indústria de alimentos. No entanto, a obtenção de açúcar invertido é mais facilmente alcançada pela aplicação de resinas catalíticas (hidrólise ácida), sendo a hidrólise enzimática pouco utilizada para esse fim. Atualmente, são utilizadas invertases microbianas, em virtude de sua atividade de transferases, na obtenção de oligossacarídeos bifidogênicos.

β -frutofuranosidases são enzimas capazes de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose.

O “açúcar invertido” tem maior poder edulcorante, maior possibilidade de concentração, ponto de ebulição mais alto e ponto de congelamento mais baixo que o xarope de sacarose.

A obtenção de açúcar invertido é facilmente alcançada pela aplicação de resinas catalíticas.

Invertases com atividade de transferases são aplicadas na obtenção de oligossacarídeos bifidogênicos.

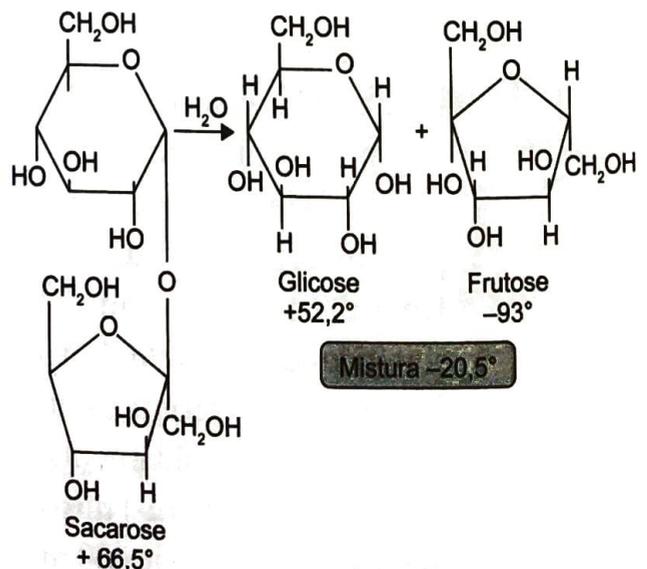


Figura 2.23 Reação de hidrólise da sacarose e rotação óptica de substrato e produtos.

Substrato

A sacarose é um dissacarídeo não redutor formado por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose (frutofuranose) ligadas entre si por uma ligação glicosídica α -1,2 ou β -2,1. É o principal açúcar comercializado no mundo e suas maiores fontes são a cana-de-açúcar e a beterraba. A sacarose é considerada o padrão de doçura na indústria de alimentos, sendo o poder edulcorante de outras substâncias determinado em relação a ela.

► Fontes e principais características

Invertases são enzimas bastante distribuídas na natureza, pois são produzidas por animais, vegetais e microrganismos. Industrialmente as invertases mais importantes são as produzidas por leveduras (*Saccharomyces* sp. e *Kluveromyces* sp., principalmente), embora invertases de fungos filamentosos (*Aspergillus* sp.) e de origem vegetal (aspargo, beterraba, cebola, chicória, entre outras) venham sendo utilizadas na obtenção de frutoligossacarídeos.

Leveduras produzem diferentes tipos de invertases: intracelulares, ligadas à parede, e, mais raramente, extracelulares. As enzimas ligadas à parede apresentam uma grande fração glicosídica através da qual se acredita que se liguem a mananas da parede celular. Apresentam pH ótimo entre 4,0 e 5,5, sendo inativadas em meios com pH superior a 6,0 e inferior a 3,0. Sua temperatura ótima de atuação é 55°C para soluções diluídas de sacarose e entre 65 e 70°C para soluções com concentração superior a 10%. Soluções acima de 20% de sacarose apresentam taxas decrescentes de hidrólise em virtude da reduzida disponibilidade de água no meio reacional.

As invertases bacterianas podem ser intracelulares (*Bacillus cereus*, *Bacillus macerans*, *Bifidobacterium infantis*) ou extracelulares (*Lactobacillus brevis*, *Streptomyces* sp., *Zymomonas mobilis*) e são capazes de atuar em condições de pH ácido, neutro ou alcalino.

Há ainda um segundo tipo de enzima capaz de hidrolisar a sacarose: as α -glicosidases. Elas reconhecem a ligação

A sacarose é um dissacarídeo não redutor formado por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose unidas por ligação α -1,2 ou β -2,1. É considerada o padrão de doçura, e o poder edulcorante de outras substâncias é determinado em relação a ela.

As invertases mais importantes são as produzidas por leveduras *Saccharomyces* sp. e *Kluveromyces* sp. Apresentam pH ótimo entre 4,0 e 5,5 e temperatura ótima de 55°C para soluções diluídas de sacarose e de 70°C para soluções com concentração entre 10 e 20%.

α -glicosidases também são capazes de hidrolisar a sacarose. Elas reconhecem a ligação glicosídica ao se ligarem à glicose, enquanto invertases se ligam à frutose.

Além da atividade hidrolítica, invertases podem apresentar atividade de transfrutossilação, sendo capazes de remover a unidade de frutose do substrato (sacarose) e de a ligar a diferentes aceptores em diferentes posições.

glicosídica ao se ligarem à glicose do substrato, enquanto invertases se ligam à frutose. Essa diferença em seu modo de ação permite verificar a ocorrência de α -glicosidase ou de β -frutofuranosidase pela aplicação de substratos específicos os trissacarídeos rafinose e melezitose. Devido à presença de um terceiro componente na molécula, dependendo da sua localização, uma das duas enzimas é incapaz de promover a reação de hidrólise. Assim, a β -frutofuranosidase é capaz de hidrolisar a rafinose (Figura 2.24) mas não a melezitose (Figura 2.25), e a α -glicosidase é capaz de hidrolisar a melezitose mas não a rafinose.

Além da atividade hidrolítica, invertases podem apresentar atividade de transfrutossilação, sendo capazes de remover a unidade de frutose do substrato (sacarose) e de a ligar a diferentes aceptores em diferentes posições. Os tipos preferenciais de aceptor e de ligação formada são dependentes do meio reacional e, principalmente, da fonte da enzima. A concentração de sacarose na reação também afeta a atividade enzimática, especialmente nos casos em que ambas as atividades, hidrolítica e de transferase, são possíveis para a mesma enzima.

► Aplicação industrial

Como mencionado anteriormente, o uso de invertases na obtenção de açúcar invertido não é muito difundido, uma

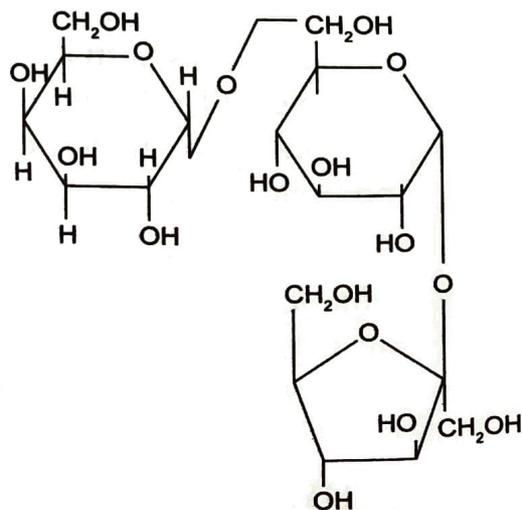


Figura 2.24 Estrutura da rafinose.

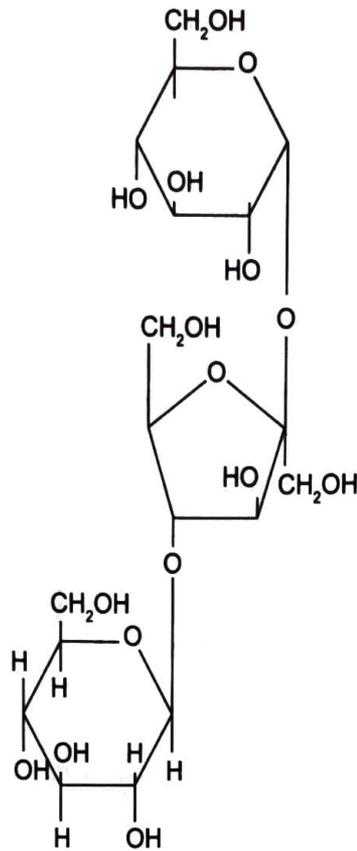


Figura 2.25 Estrutura da melezitose.

vez que é possível obter-se o mesmo resultado com aplicação de resinas catalíticas. É importante observar que a aplicação de tais resinas só é possível uma vez que o substrato (solução de sacarose) é bastante puro. Em casos semelhantes, como na obtenção de xarope de glicose e galactose a partir de lactose do soro, por exemplo, o uso de resinas é muito prejudicado pela presença de outros componentes do soro, tornando necessária a hidrólise enzimática. Embora pouco aplicada, a hidrólise enzimática de sacarose é um processo bastante viável e eficiente, podendo ser utilizadas enzimas imobilizadas ou mesmo células de leveduras.

Obtenção de oligossacarídeos funcionais

A principal aplicação industrial de invertases depende de sua atividade como transferases. Os oligossacarídeos obtidos dessa forma estão entre os principais ingredientes bifidogênicos comercializados.

Lactossacarose. É composto de galactose, glicose e frutose com ligações glicosídicas β -1,4 e α -1,2 (Figura 2.26). O trissacarídeo é sintetizado por reação de transfrutossilacção

A hidrólise enzimática de sacarose é um processo bastante viável e eficiente, podendo ser utilizadas enzimas ou mesmo células imobilizadas de leveduras.

A principal aplicação industrial de invertases depende de sua atividade como transferases. Os oligossacarídeos obtidos dessa forma estão entre os principais ingredientes bifidogênicos comercializados.

A lactossacarose é formada por galactose- β -1,4-glicose- α -1,2-frutose. É obtida pela transfrutossilacção da lactose, usando sacarose como doador de frutose, catalisada por levana-sacarase ou β -frutofuranosidase.

Frutoligosacarídeos são oligômeros prebióticos de frutose encontrados em pequena quantidade em vegetais. Podem ser obtidos por conversão enzimática e adicionados em diferentes formulações.

catalisada pelas enzimas levana-sacarase ou β -frutofuranosidase, utilizando lactose e sacarose como substrato. É obtida pela transferência de uma unidade de frutose para o acceptor lactose (a frutose se liga à glicose da lactose por uma ligação β -1,2), formando um trissacarídeo. A lactossacarose tem sido amplamente utilizada na preparação de alimentos funcionais, principalmente no Japão, onde também foi incluída na lista de alimentos para usos específicos para a saúde (Food for Specified Health Uses – FOSHU), em 2005. A procura pela lactossacarose aumentou desde então, e em 2007 o tamanho do mercado de lactossacarose foi estimado em aproximadamente 3.000 toneladas por ano, com uma taxa de crescimento anual de 10%.

Frutoligosacarídeos. São carboidratos complexos, oligômeros de frutose, considerados prebióticos, pois estimulam o crescimento de bifidobactérias e inibem o crescimento de bactérias nocivas (p. ex., *Clostridium* sp.). Os frutoligosacarídeos não são digeridos no intestino delgado, mas são metabolizados em ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), L-lactato e outras moléculas bioativas benéficas para a saúde humana, pela microbiota intestinal, além de aumentarem a absorção de minerais como Mg^{+2} e Ca^{+2} . São encontrados naturalmente, em pequena quantidade, em vegetais como aspargo, beterraba, cebola, alcachofra, chicória, alho-poró entre outros; no entanto, podem ser obtidos por

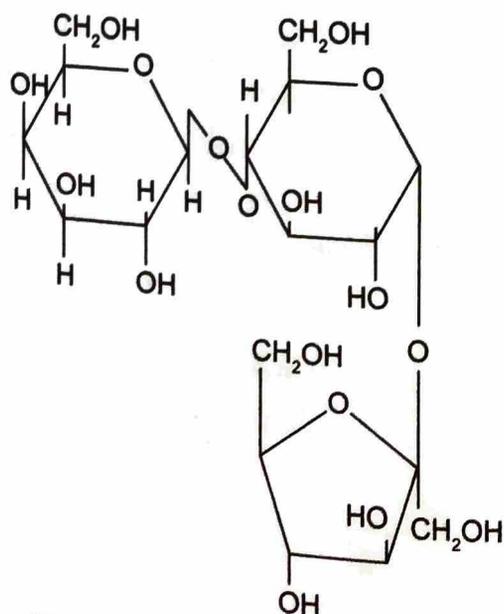


Figura 2.26 Estrutura da lactossacarose.

conversão enzimática e adicionados em diferentes formulações. São produzidos por diversas empresas europeias e japonesas e, em 2015, foi estimada uma produção mundial de 31.000 toneladas desses oligossacarídeos, principalmente utilizados pelas indústrias de alimentos e bebidas. Existem três grupos diferentes de frutoligossacarídeos, sendo dois obtidos por transfrutossilação pela ação de invertases e outro por hidrólise de frutosanas. Por transfrutossilação pela ação de invertases, a obtenção se dá da seguinte maneira:

- A atividade de transfrutossilação ou frutossiltransferase (EC 2.4.1.9) inicia-se com a hidrólise da molécula de sacarose seguida pela transferência da unidade de frutose liberada para uma molécula aceptora, como a sacarose, ou outra molécula, como frutoligossacarídeo. A enzima cliva a ligação α -1,2 na sacarose e transfere a molécula de frutose liberada para a posição β -2,1 da unidade de frutose de outra molécula de sacarose. Muitos fungos (*Aureobasidium* sp., *Aspergillus japonicus*, *Penicillium citrinum*) e bactérias (*Arthrobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus reuteri*) produzem enzimas com atividade de frutossiltransferase, porém sua ação é inibida na presença de glicose, um subproduto. A temperatura ótima relatada para a atividade da enzima varia de 50 a 60°C, enquanto o pH ótimo varia amplamente de 4,5 a 8,0. São formados frutoligossacarídeos de cadeia curta, constituídos por unidades de sacarose, ligadas por ligação β -1,2, a 1, 2 ou 3 unidades de frutose, gerando 1-kestose (trissacarídeo), 1-nistose (tetrassacarídeo) (Figura 2.27) e 1-frutofuranosil nistose (pentassacarídeo). Misturas contendo diferentes proporções desses oligossacarídeos, além de resíduos de sacarose, glicose e frutose (traços), são comercializadas no Japão com o nome comercial de “Neosugar” e “Meioligo”. O processo pode ser conduzido com uso de invertase de *Aspergillus niger* (pH = 5,0, temp. = 40°C, por 72 h) partindo-se de uma solução a 50% de sacarose e gerando cerca de 15% de 1-kestose, 33% de nistose, 7% de frutofuranosil nistose, 30% de glicose e 5% de sacarose
- Em casos mais raros, algumas invertases são capazes de sintetizar 6-kestose (trissacarídeo formado por uma

Existem três grupos diferentes de frutoligossacarídeos: dois obtidos por transfrutossilação e um obtido por hidrólise de frutosanas.

Por transfrutossilação:
1-kestose, nistose,
frutofuranosil nistose com
ligações β -1,2, e 6-kestose
e neokestose com ligações
diferentes de β -1,2.

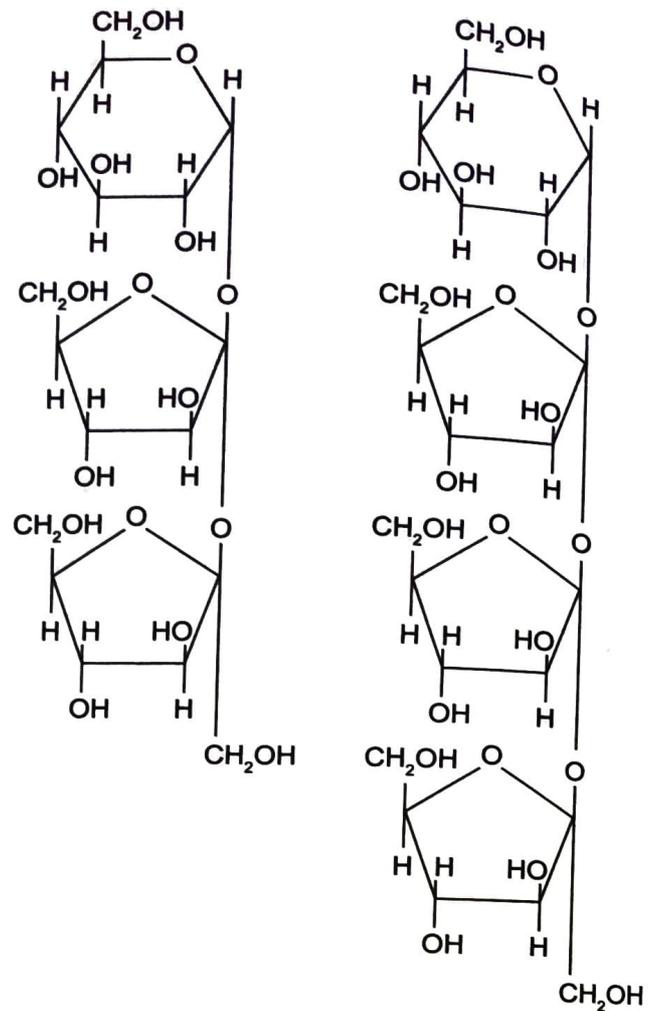


Figura 2.27 Estruturas da 1-kestose e da 1-nistose.

unidade de frutose ligada ao carbono 6 da frutose pertencente a uma sacarose) e neokestose (Figura 2.28). No caso da neokestose, a frutose transferida se liga à glicose da sacarose, ao contrário do que acontece nos outros oligossacarídeos, formando com esta uma ligação β -2,

A obtenção de frutoligossacarídeos por hidrólise de frutanas é feita da seguinte forma: alguns vegetais acumulam um polímero de frutoses unidas por ligações β -2,1 chamado de inulina. Diversas empresas produzem frutoligossacarídeos a partir de inulina, por hidrólise aplicando a enzima específica inulinase. A diferença desses oligossacarídeos para os obtidos por transfrutossilacção de sacarose é que eles não possuem unidades de glicose em sua estrutura.

Com base no padrão de clivagem, as inulinases podem ser divididas em: exoinulinase (EC 3.2.1.80), que libera frutoses;

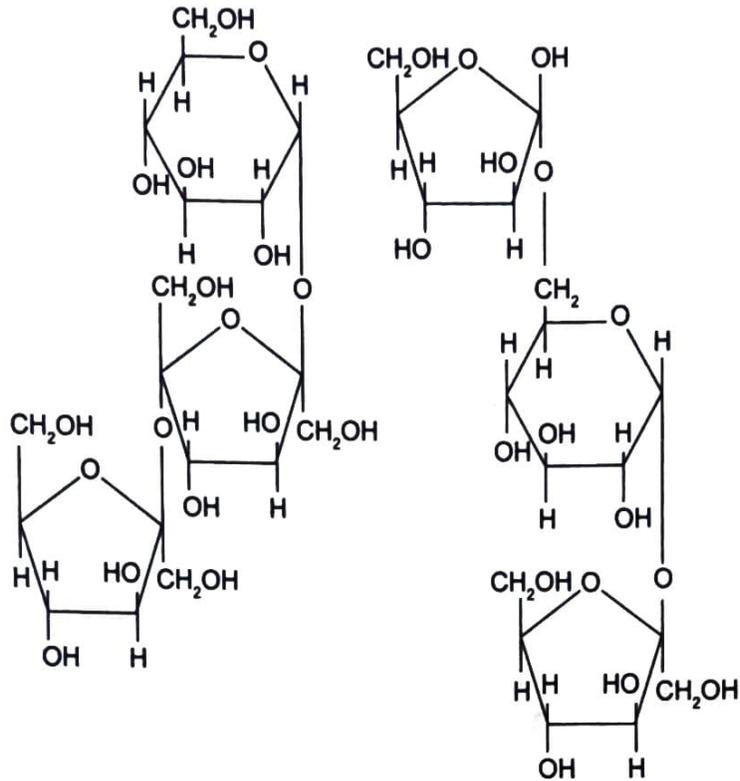


Figura 2.28 Estruturas da 6-kestose e da neokestose.

partir da extremidade da cadeia, e endoinulinase (EC 3.2.1.7), que catalisa a clivagem aleatória de ligações glicosídicas na inulina, gerando assim frutoligossacarídeos de diferentes massas moleculares, por exemplo, inulotriose (F3), inulotetrose (F4) e inulopentose (F5). Embora não sejam aplicáveis à produção de frutoligossacarídeos, as exoinulinases são úteis na produção de xarope de alta concentração de frutose. Inulinases, tanto extracelulares como intracelulares, já foram obtidas a partir de um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras. Industrialmente, a inulina nativa (extraída de raízes de chicória) é processada e transformada em frutoligossacarídeos ou frutanos de cadeia curta com grau de polimerização entre 2 e 10 (normalmente 5), como resultado da hidrólise enzimática parcial com inulinase. Comercialmente são aplicadas inulinases de *Kluyveromyces marxianus* (pH = 5,0, temp. = 50°C).

Métodos de detecção da atividade

A atividade hidrolítica de β -frutofuranosidases pode ser determinada de diversas formas:

- Por acompanhamento da inversão de rotação óptica do meio reacional, em polarímetro

Inulina nativa – extraída de raízes de chicória – é hidrolisada por endoinulinase de *Kluyveromyces marxianus* (pH = 5,0, temp. = 50°C).

Atividade hidrolítica de β -frutofuranosidases pode ser determinada: em polarímetro, por quantificação da glicose liberada e por quantificação dos açúcares redutores formados.

- Por quantificação da glicose liberada durante a reação, utilizando *kits* de determinação de glicose – este método tem a vantagem de detectar toda a atividade hidrolítica, independentemente de haver posterior transferência de unidades de frutose para outros aceptores
- Por quantificação dos açúcares redutores liberados – método bastante prático, uma vez que a sacarose é um açúcar não redutor.

A atividade de transferase deve ser acompanhada através da detecção dos oligossacarídeos formados, o que pode ser facilmente alcançado por cromatografia em papel dos produtos de reação (detecção qualitativa).

Outras carbohidrases de interesse em alimentos

Quitinases, quitosanases e lisozima

Quitinases clivam ligações β -1,4 entre os resíduos de N-acetil-glicosamina de quitina ou quitosana. São conhecidos três tipos de quitinases: quitinase A (endoenzima), quitinase B (exoenzima que gera quitobiose) e N-acetil-glicosaminidase.

As quitinases (EC 3.2.1.14) catalisam a clivagem das ligações β -1,4-glicosídicas entre os resíduos de N-acetil-glicosamina que formam as cadeias de quitina e quitosana. Há 3 tipos diferentes de enzimas quitinolíticas:

- Quitinase A, uma endoquitinase que rompe as ligações entre as unidades de N-acetil-glicosamina de forma desordenada, gerando uma mistura de quitinoligosacarídeos de diferentes massas moleculares
- Quitinase B, uma exoquitinase que age a partir da extremidade não redutora do polissacarídeo, liberando sempre unidades de quitobiose (dissacarídeo de N-acetil-glicosamina)
- N-acetil-glicosaminidase, exoenzima capaz de hidrolisar poli- e oligossacarídeos (inclusive a quitobiose) de quitina, gerando sempre unidades de N-acetil-glicosamina.

Geralmente, microrganismos produtores de quitinase produzem as três variantes da enzima, em diferentes proporções, de acordo com a espécie. Na natureza, quitinases bacterianas desempenham funções relacionadas com parasitismo ou nutrição do organismo, enquanto em fungos, protozoários e invertebrados estão também envolvidas na

morfogênese. Em vegetais e vertebrados, a atividade quitinolítica está relacionada com mecanismos de defesa contra patógenos, atividade também identificada em humanos.

Outra enzima capaz de hidrolisar a quitina é a *lisozima* (EC 3.2.1.17). Essa enzima é específica para peptídeo-glicanos formadores da parede celular de bactérias gram-positivas, cujo esqueleto básico é composto por quitina modificada (contendo peptídeos ligados à posição 3 da N-acetil-glicosamina), e é encontrada na saliva dos mamíferos, na clara de ovo (sua principal fonte comercial) e em sementes (durante o processo de germinação).

Quitosanases (EC 3.2.1.132) são produzidas por microrganismos e vegetais, em menor escala que as quitinases. Há dois tipos de quitosanases, enzimas capazes de hidrolisar as ligações β -1,4 entre unidades de glicosamina, presentes em quitina e quitosana:

- Endoquitosanase: rompe as ligações β -1,4 entre unidades de glicosamina, de forma desordenada dentro do polímero, gerando quitosanoligossacarídeos. Sua atividade é fortemente influenciada pelo grau de desacetilação do polímero
- Exoquitosanase: rompe as ligações β -1,4 de forma organizada, a partir da extremidade da molécula, gerando principalmente quitosanobiose. A extremidade de início pode ser a redutora ou a não redutora, dependendo da fonte da enzima.

Vários microrganismos podem produzir quitinases (tais como *Aeromonas* sp., *Bacillus cereus*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Paenibacillus illinoisensis*) e quitosanases (*Aspergillus* sp., *Bacillus* sp.)

► Substrato

A quitina é um polímero linear constituído por unidades de N-acetil-glicosamina e de glicosamina ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 2.29), que apresenta, em mais de 50% do polímero, unidades de N-acetil-glicosamina. A quitina é, depois da celulose, o polímero mais abundante

A lisozima, enzima específica para peptídeo-glicanos da parede celular de bactérias, também é capaz de hidrolisar quitina e quitosana.

Quitosanases clivam as ligações β -1,4 entre unidades de glicosamina, presentes em quitina e quitosana. São conhecidos dois tipos de quitosanases: endoquitosanases e exoquitosanases.

Quitina é um polímero linear de unidades de N-acetil-glicosamina e glicosamina ligadas por ligações β -1,4 que contém majoritariamente N-acetil-glicosamina. A quitina é o segundo polímero mais abundante do planeta e é encontrada no exoesqueleto de artrópodes.

do planeta. Ela é o constituinte principal do exoesqueleto de todos os artrópodes (crustáceos, insetos, aracnídeos) e está presente na parede celular de fungos e bactérias. A quitina é altamente hidrofóbica, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. Acredita-se que sua solubilidade limitada se deva às fortes ligações de hidrogênio intermoleculares que fazem da quitina um material de alta rigidez.

.....
 Quitosana é um polímero linear de unidades de N-acetilglicosamina e glicosamina ligadas por ligações β -1,4 que contém majoritariamente glicosamina. É obtida por desacetilação da quitina ou produzida por fungos filamentosos.

A quitosana é um polímero linear constituído por unidades de N-acetil-glicosamina e de glicosamina ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 2.30), apresentando, em mais de 50% do polímero, unidades de glicosamina. É obtida por desacetilação da quitina (método químico ou enzimático – uso de quitino-desacetilases), mas é também produzida por algumas espécies de fungos filamentosos, podendo ser comercialmente obtida do micélio. A quitosana é o único polímero catiônico natural comercialmente disponível. Ao contrário da quitina, a quitosana apresenta solubilidade em água devido às cargas positivas presentes em seus grupamentos amino não acetilados.

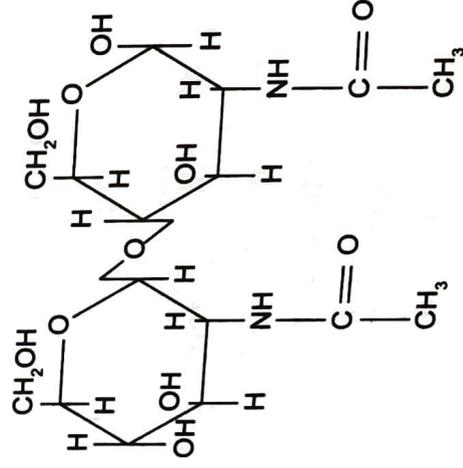


Figura 2.29 Quitobiose.

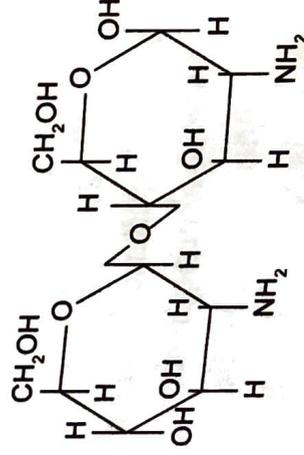


Figura 2.30 Quitosanobiose.

Tanto a quitina quanto a quitosana apresentam menor viscosidade e maior solubilidade em água do que polímeros de monossacarídeos não nitrogenados, devido ao menor comprimento de suas cadeias e pela presença de grupamentos amino livres nas unidades de glicosamina.

► Aplicação industrial

Complexos quitinolíticos ricos em quitinase B e N-acetil-glicosaminidase são utilizados na obtenção de N-acetil-glicosamina, ingrediente ativo em fármacos antiartrite, de administração oral favorecida por seu sabor adocicado. A ação anti-inflamatória desse composto verifica aplicação também em casos de colite ulcerativa e várias outros distúrbios gastrintestinais. A N-acetil-glicosamina pode ainda ser aplicada como fonte de carbono e nitrogênio para fermentações diversas.

Os aminoglicanooligosacarídeos – quitinooligosacarídeos e os quitosanooligosacarídeos – são produzidos por meio da hidrólise das ligações glicosídicas existentes entre as unidades que compõem quitina e quitosana, respectivamente. É importante notar que a produção de N-acetil-glicosamina e mesmo de quitinooligosacarídeos pode ser alcançada por hidrólise ácida, com uso de HCl concentrado. O processo químico é o mais utilizado em escala industrial; entretanto, além de gerar subprodutos indesejados e efluentes de difícil tratamento, apresenta ainda grande dificuldade para ser controlado, de modo a se obter um produto final com as características desejadas para diferentes aplicações.

O uso de quitinase A favorece a obtenção de quitinooligosacarídeos, atualmente comercializados para diversos fins (principalmente nas indústrias farmacêutica e alimentícia) pela Seikagaku Corporation, do Japão. Entre as propriedades funcionais comprovadamente atribuídas aos quitinooligosacarídeos está a ação antitumor (*in vitro*) de compostos com 6 e 7 unidades monoméricas. Segundo estudos realizados, oligossacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 8 apresentaram atividade prebiótica para os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* superior à de frutooligosacarídeos, substâncias com atividade vastamente reconhecida.

.....
Aminoglicanooligosacarídeos
podem ser produzidos por
hidrólise de quitina ou
quitosana.

.....
Quitinooligosacarídeos de massa
molar controlada são obtidos
com uso de quitinase A e
apresentam ação antitumoral e
atividade prebiótica.

A aplicação de quitosanoligossacarídeos como ingredientes funcionais em alimentos tem os mesmos objetivos que a aplicação de derivados de quitina e, em geral, com melhores resultados: a ação prebiótica e antitumoral de oligossacarídeos de quitosana é mais eficiente e comprovada que a da quitina, e esses compostos ainda apresentam ação anticolesterolêmica e de modulação do sistema imunológico.

Mais recentemente, essas enzimas citadas, principalmente quitinases e lisozima, vêm sendo testadas como possíveis conservantes de alimentos. Dada a sua capacidade de romper a parede celular de diversos microorganismos, elas apresentam potencial para impedir o estabelecimento e a multiplicação de microorganismos deteriorantes em produtos alimentícios. As quitinases podem atuar na inibição das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*; da levedura *Saccharomyces cerevisiae*; e dos fungos *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*. Lisozimas são usadas, desde a década de 1970, em queijos, para controlar o crescimento de bactérias propiônicas indesejadas. Atualmente, a maior dificuldade para essa aplicação reside na alta concentração de enzimas necessária para o efeito desejado. Diferentes formas de aplicação, como enzimas imobilizadas em filmes comestíveis, vêm sendo avaliadas para sanar esse problema.

► Métodos de detecção da atividade

Como ocorre com diversas carboidrases, a atividade de quitinases e quitosanas pode ser medida pela liberação de unidades redutoras do substrato polimérico (quitina ou quitosana). Entretanto, os métodos mais aplicados para quantificação de açúcares redutores não são indicados para medida de N-acetil-glicosamina, por não fornecerem respostas lineares. Nestes casos, agentes cromogênicos como dimetil-aminobenzaldeído garantem resultados mais precisos e confiáveis.

Dextrana-sacarase (EC 2.4.1.5) e dextranase (EC 3.2.1.11)

A dextrana é um polissacarídeo, produzido por microorganismos e formado por unidades de glicose unidas entre

.....
Quitosanoligossacarídeos apresentam ainda ação anticolesterolêmica e de modulação do sistema imunológico.

.....
Quitinases e lisozima vêm sendo testadas como possíveis conservantes de alimentos.

.....
A atividade de quitinases e quitosanas pode ser medida pela liberação de unidades redutoras, mas devem ser quantificadas com agentes cromogênicos específicos, para garantir resultados mais confiáveis.

si por ligações glicosídicas α -1,6. Sua produção depende da presença da enzima dextrana-dextransacarase, uma glicosil-transferase capaz de hidrolisar sacarose (seu único substrato) e transferir uma unidade de glicose para diferentes aceptores (glicose, maltose e pequenos oligossacarídeos de dextrana), sintetizando o polímero. Industrialmente a dextrana é produzida por células ou enzimas isoladas da bactéria *Leuconostoc mesenteroides*. Dependendo de sua massa molecular, a dextrana apresenta diferentes aplicações:

- Dextrana de massa molecular abaixo de 25 kDa: encontra diversas aplicações na indústria de alimentos como goma espessante e estabilizante
- Dextrana de massa molecular entre 25 e 75 kDa: uso terapêutico, como substituinte de plasma sanguíneo em transfusões
- Dextrana de massa molecular acima de 75 kDa: usada como auxiliar da extração de petróleo em poços exauridos.

Além disso a dextrana é ainda aplicada na produção de resinas de cromatografia de exclusão (tipo Sephadex®).

A produção de dextranas, entretanto, pode ser considerada prejudicial e indesejada em alguns casos:

- Dextranas produzidas por bactérias da microbiota bucal (*Streptococcus mutans*, por exemplo) são responsáveis pela formação da placa bacteriana, que pode favorecer a formação de cáries
- Em usinas de açúcar e álcool, a contaminação do caldo por bactérias secretoras de dextrana-sacarase (*Leuconostoc mesenteroides* e algumas espécies do gênero *Lactobacillus*) leva à produção de dextranas, que podem interferir com a cristalização da sacarose, causando queda no rendimento e entupimento de filtros.

A hidrólise eficiente de dextranas pode ser alcançada pela aplicação da enzima dextransase. Essa hidrolase, produzida por fungos do gênero *Penicillium*, pode ter atividade de endo- ou exoenzima e é capaz de romper as ligações α -1,6 da dextrana, liberando pequenos oligossacarídeos e glicose, respectivamente.

Dextrana é um polissacarídeo formado por unidades de glicose conectadas entre si, por ligações α -1,6 sintetizado pela enzima dextrana-sacarase.

Dextranas produzidas por microrganismos da microbiota bucal são responsáveis pela formação da placa bacteriana e, em usinas de açúcar, podem interferir com a cristalização da sacarose.

Dextranases são hidrolases produzidas por fungos do gênero *Penicillium* capazes de clivar as ligações α -1,6 presentes em dextranas.

.....
 A levana-sacarase é uma enzima microbiana capaz de transferir unidades de frutose da sacarose e produzir levana.

Alguns microrganismos são ainda capazes de secretar a enzima levana-sacarase (EC 2.4.1.10), de atividade semelhante à dextrana-sacarase, porém que transfere unidades de frutose, produzindo levana – polímero de frutoses ligadas entre si por ligações β -2,6. Exemplos de organismos produtores são as bactérias *Aerobacter levanicum*, algumas espécies do gênero *Bacillus* e a levedura *Zymomonas mobilis*.

Bibliografia

-
 Leitura recomendada: Ali; Hassan, 2016; Chen; Ganzle, 2017; Liaqat; Eltem, 2018; Obeng *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2018; Saqib *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017; Urlaub, 2002; Whitaker, 1994; Yadav *et al.*, 2010.
- ALI, S.; HASSAN, B. A review on biotechnological impact of pectinases in industries. *Journal of Scientific Research in Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*. 1(2): 1-16. 2016.
- BARRET, F. F. Enzyme uses in milling and baking industries. In: REED, G. *Enzymes in Food Processing*, p. 302-331. Academic Press, New York. 1975.
- BASS, E. J.; CAYLE, T. Beer. In: REED, G. *Enzymes in Food Processing* p. 455-472. Academic Press, New York. 1975.
- BELDMAN, G.; ROMBOUTS, F. M.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 6: 503-507. 1984.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15: 583-620. 1997.
- BRANDT, D. A. Distilled alcoholic beverages. In: REED, G. *Enzymes in Food Processing*, p. 443-454. Academic Press, New York. 1975.
- CHEN, X. Y.; GANZLE, M. G. Lactose and lactose-derived oligosaccharides: more than prebiotics? *International Dairy Journal*. 67:61-72. 2017.
- CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties, and application of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*. 7: 353-361. 1996.
- FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York. 1996.
- GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Enzymes in fruit processing. In: WHITEHURST, R. J.; LAW, B. A. *Enzymes in Food Technology*. p. 184-199. Sheffield Academic Press (CRC Press), Sheffield. 2002.
- HAMER, R. J. Enzymes in the baking industry. In: TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. *Enzymes in Food Processing*, p. 191-222. Blackie Academic & Professional (Chapman & Hall) London. 1995.