

SP 05456

DOC Nº

CV12013

**Coleção Ciência, Tecnologia,  
Engenharia de Alimentos e Nutrição  
BIOTECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Volume 12**



**Editores**

**Gláucia Maria Pastore**

**Juliano Lemos Bicas**

**Mário Roberto Maróstica Junior**

 **Atheneu**

**EDITORA ATHENEU**

**São Paulo — Rua Jesuino Pascoal, 30**  
**Tel.: (11) 2858-8750**  
**Fax: (11) 2858-8766**  
**E-mail: atheneu@atheneu.com.br**

**Rio de Janeiro — Rua Bambina, 74**  
**Tel.: (21)3094-1295**  
**Fax: (21)3094-1284**  
**E-mail: atheneu@atheneu.com.br**

**Belo Horizonte — Rua Domingos Vieira, 319 — conj. 1.104**

*CAPA: produzida pela Equipe Atheneu*

*PRODUÇÃO EDITORIAL: Equipe Atheneu*

*PROJETO GRÁFICO/DIAGRAMAÇÃO: Triall Composição Editorial Ltda.*

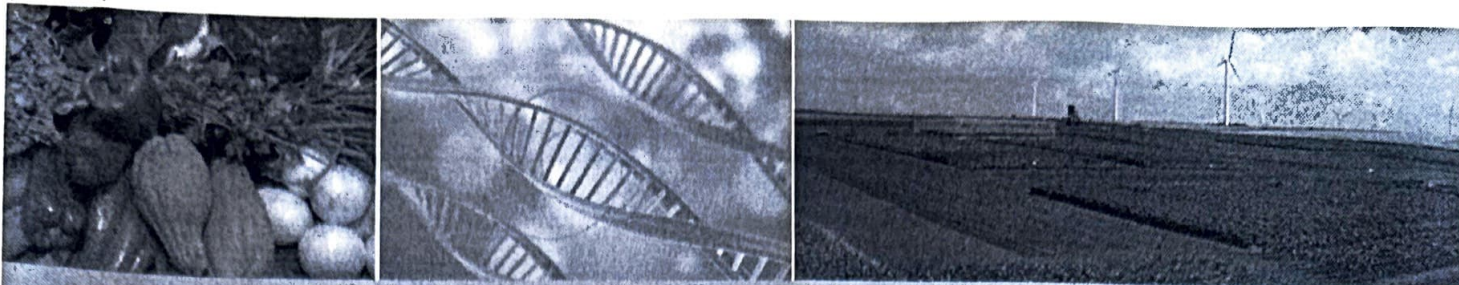
CDD-  
-616.1205  
NLM-WG

**Índices para catálogo sistemático:**

PASTORE, **GLÁUCIA** MARIA, BICAS, JULIANO LEMOS, MARÓSTICA, MÁRIO ROBERTO JUNIOR  
*Coleção Ciência, Tecnologia, Engenharia de Alimentos e Nutrição – Volume 12 – Biotecnologia de Alimentos*

© EDITORA ATHENEU

São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2012



## Obtenção de Enzimas para a Indústria de Alimentos

- Gustavo Molina • Franciele Maria Pelissari
- Ana Paula Dionísio • Gláucia Maria Pastore

### Neste capítulo apresentaremos

Este capítulo pretende estimular o aprendizado e compreensão de questões relacionadas à obtenção de enzimas de interesse industrial, em especial:

1. Diversidade de enzimas e a importância de sua obtenção.
2. Fontes vegetais, animais e microbianas para obtenção de enzimas.
3. Mecanismos e etapas envolvidas no processo industrial da produção de enzimas.
4. Engenharia genética e biotecnologia moderna como ferramentas para melhorias no processo de obtenção de biocatalisadores.

### Introdução

#### **Biотecnologia: fonte de enzimas para a indústria de alimentos**

A indústria de alimentos emprega uma grande diversidade de produtos derivados de plantas e animais como base de seus processos, levando a uma grande variedade de produtos disponíveis ao consumidor. A biotecnologia, que tem sido usada no processamento de produtos alimentícios há mais de 8.000 anos, oferece diversas ferramentas para melhorar a transformação de matérias-primas em produtos finais e colabora diretamente para o aumento desta diversidade e disponibilidade.

Atualmente, esta técnica afeta a indústria de alimentos na diminuição de custos, otimização de processos e na melhoria de produtos e ingredientes, bem como em sua funcionalidade, valor nutricional e propriedades sensoriais. Muitos destes benefícios estão diretamente associados ao emprego de enzimas (que possuem uma grande diversidade de ação catalítica e podem ser específicas para cada aplicação), ao desenvolvimento de culturas *starter* e novos biocatalisadores melhorados geneticamente.

O envolvimento de enzimas no processamento de alimentos é considerado tão antigo quanto a própria história da humanidade; elas têm sido empregadas há muitos séculos para a produção de uma grande variedade de produtos, como a cerveja e o queijo. Os primeiros

relatos deste tipo de produção estão relacionados às enzimas naturalmente presentes nos substratos, como as  $\alpha$ -amilases presentes nos próprios grãos empregados na produção de cerveja, por exemplo.

Em contrapartida, atualmente, sabe-se que as enzimas podem ser obtidas de uma grande diversidade de fontes vegetais, animais e microbianas (este tópico será desenvolvido no decorrer do capítulo). Em consequência desta grande diversidade nas formas de obtenção, as enzimas passaram a ser muito difundidas na fabricação e processamento de diversos produtos; apenas a indústria de alimentos utiliza mais de 55 diferentes produtos enzimáticos. Este número tende a aumentar conforme as descobertas da diversidade dos micro-organismos e a possibilidade de obtenção de novas enzimas, responsáveis pelo incremento no processamento de alimentos.

Desta forma, ressalta-se a importância da produção e obtenção de enzimas para a área de processamento alimentos, bem como para a indústria de uma forma geral.

## Enzimas microbianas Industriais

### Histórico

A utilização de enzimas microbianas no processamento de alimentos não é um tema recente, visto que processos tradicionais foram o ponto de partida para o desenvolvimento de processos industriais de produção de enzimas com base em fermentações de volumes elevados.

O primeiro relato de produção industrial de enzimas utilizando micro-organismos ocorreu no século XIX, mas apenas após a Segunda Guerra Mundial estes processos tornaram-se significantes.

Os estudos pioneiros envolviam micro-organismos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Bacillus licheniformis*, capazes de produzir quantidades significativas de enzimas que eram aplicáveis a uma grande variedade de produtos e, aparentemente, demonstravam ser seguras.

No Japão, por exemplo, missô e saquê têm sido produzidos por muitos séculos utilizando *Aspergillus oryzae*, enquanto *Aspergillus sake* era empregado na degradação de arroz para produção de *koji*. Neste último alimento, um grande número de enzimas era importante para a sua produção, incluindo amilases, proteases e fitases.

Os processos de fermentação microbiana foram também desenvolvidos para a produção de ácido cítrico e aminoácidos (ver Capítulo 10), ainda antes do mercado de enzimas industriais realmente amadurecer.

A introdução de linhagens geneticamente modificadas só aconteceu por volta de 1980, e foi responsável por ditar um novo panorama na produção de enzimas. A partir destes avanços, foi possível transferir genes de um organismo que não era adequado a um determinado processamento industrial para um hospedeiro (ver Capítulo 19), permitindo a produção de grandes quantidades de enzima de uma forma segura. Em paralelo, as tecnologias de engenharia de proteínas desenvolviam novas rotas e possibilidades para obtenção e expressão de enzimas de importância industrial.

As vantagens associadas à produção industrial de enzimas microbianas ficaram evidentes, pois criaram soluções efetivas e ecologicamente mais favoráveis, quando comparada às demais formas de produção. Por isso, com o passar do tempo, as enzimas passaram a ser a chave para o sucesso de muitos processos industriais, o que aumentou ainda mais o rigor na pesquisa e no desenvolvimento de processos industriais para obtenção de enzimas.

### Panorama e aplicações

A partir de uma constante evolução da produção e aplicação de enzimas, marcada pelo desenvolvimento de novos processos e aplicação de novos biocatalisadores, o sucesso industrial proporcionado pelas enzimas pode ser atribuído a alguns benefícios-chave oferecidos pela sua aplicação. A combinação de sua função catalítica, especificidade e habilidade de trabalhar sob condições razoavelmente brandas (diminuindo as perdas de atributos dos alimentos) as tornam o catalisador ideal para uma grande variedade de aplicações.

As enzimas são utilizadas como alternativas às tecnologias tradicionais, ou seja, substituem com frequência os agentes químicos, por apresentarem menos reações paralelas e produtos intermediários, e contribuem para a redução do impacto ambiental, poluição, utilização de água, matéria-prima e energia usada na fabricação de produtos alimentícios e outros.

Atualmente, a produção de enzimas pode ser considerada como o ponto central da indústria biotecnológica moderna. O mercado das tradicionais enzimas continua em ascensão enquanto as novas descobertas nesta área impulsionam o aumento de produção e utilização de novos biocatalisadores.

Os produtores industriais de enzimas vendem estes catalisadores para as mais diversas aplicações. O valor estimado do mercado mundial no ano de 2009 foi de aproximadamente US\$2,2 bilhões. Deste montante, os principais setores são: detergentes (30%), têxteis (12%), amido (12%), panificação (11%), biocombustíveis (9%) e ração animal (8%). De fato, estas são consideradas as principais aplicações industriais das enzimas, responsáveis pela utilização de aproximadamente 80% de toda a produção industrial.

As enzimas industriais são preparadas e comercializadas em sua forma bruta, como parcialmente purificadas ou altamente purificadas, para fins analíticos ou de diagnósticos. As enzimas empregadas industrialmente podem ser derivadas de uma grande variedade de fontes de plantas, de animais ou microbianas.

As enzimas microbianas podem ser extracelulares, como as proteases, que respondem por uma grande parcela do montante de vendas deste mercado, ou intracelulares, como a glicose oxidase. Usualmente, as enzimas intracelulares permanecem associadas às células e por isso têm que ser liberadas, a menos que o próprio micro-organismo seja usado como catalisador.

Apesar das dificuldades relacionadas às enzimas de caráter intracelular e dos maiores custos associados a este processo, a indústria demonstra grande capacidade para contornar estas dificuldades, tendo em vista que um grande número de enzimas intracelulares é utilizado nos processamentos de alimentos. Um exemplo característico é a glicose isomerase, catalisadora da produção de xarope com alto teor de frutose (HFCS, do inglês *high fructose corn syrups*).

Estes biocatalisadores podem não apenas ser utilizados em processos químicos, mas também em processos físicos e mecânicos. Um exemplo clássico da utilização de enzimas em reações químicas é o emprego de amilases na substituição de ácidos durante a hidrólise do amido. Além disso, o uso de enzimas capazes de degradar celulose ao invés de pedra-pomes, tradicionalmente utilizada para desbotar e desgastar o *denim* (matéria-prima para a fabricação de jeans), é um exemplo perfeito da utilização de enzimas em substituição a processos mecânicos. O emprego de alguns tipos de proteases termorresistentes permite ainda a execução de processos físicos mais drásticos, pois esta classe pode suportar condições extremas de temperatura e pressão.

Com os recentes avanços na biotecnologia, a gama de aplicações de enzimas torna-se maior a cada dia. Um dos progressos mais consideráveis é que já podem ser aplicadas em processos que antigamente eram considerados comercialmente inviáveis e que tornaram-se competitivos com os processos sintéticos. Por exemplo, diversas companhias têm desenvolvido enzimas capazes de realizar a conversão de material celulósico em etanol, que podem ser misturados aos combustíveis. Outros exemplos incluem o uso de tecnologias enzimáticas na produção de açúcares a partir do amido, que colaborou com a produção de xaropes de milho com alto teor de frutose e impulsionou a expansão de um mercado altamente rentável.

Os avanços na biotecnologia e na genômica têm colaborado para a descoberta de novas fontes de enzimas e com a produção de novas linhagens para comercialização. A maioria das enzimas industriais é produzida por micro-organismos modificados (por técnicas de DNA recombinante) devido às seguintes razões:

1. Maiores níveis de expressão.
2. Maior grau de pureza (% de proteína enzimática x% outros componentes).
3. Técnicas de DNA recombinante foram responsáveis por uma abertura para a engenharia de proteínas enzimáticas.
4. Produção mais barata (em razão dos fatores acima citados).
5. Enzimas podem contornar alguns problemas envolvidos com a utilização de micro-organismos como catalisadores, baixos níveis de expressão ou possível patogenicidade.

A engenharia pode incrementar as propriedades das enzimas no que diz respeito a, por exemplo, resistência à oxidação, maior tolerância aos tratamentos e processamentos, diferenciação na especificidade ao substrato, aumento na estabilidade ao armazenamento.

As técnicas de DNA recombinante também podem colaborar com as pesquisas que visam à aplicação das enzimas obtidas dos micro-organismos conhecidos como extremófilos. Estes micro-organismos são capazes de crescer e se desenvolver sob condições extremas, em contraste com os mesófilos. Imagina-se que estes micro-organismos são capazes de produzir enzimas em condições diferentes dos demais grupos, ou mesmo produzirem enzimas com diferentes propriedades, capazes de manter estabilidade a elevadas temperaturas e atividade a valores extremos de pH.

Na sequência, este capítulo visa abranger e discutir as etapas e princípios envolvidos na produção destas enzimas, de acordo com a sua origem, abordando principalmente a sua obtenção pela fermentação microbiana.

### Enzimas microbianas Industriais

- **Histórico:** a utilização de enzimas é considerada tão antiga quanto a história da humanidade, mas o primeiro relato da produção industrial utilizando micro-organismos ocorreu no século XIX.
- **Micro-organismos pioneiros:** *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Bacillus licheniformis*.
- **Engenharia genética:** a introdução de linhagens geneticamente modificadas só aconteceu por volta de 1980 e mudou o panorama da obtenção de enzimas.
- **Importância de sua obtenção:** visto que as enzimas são utilizadas como alternativas às tecnologias tradicionais e possuem uma grande diversidade de aplicações, a produção destes biocatalisadores pode ser considerada como o ponto central da indústria biotecnológica moderna.

## Obtenção de enzimas

A seguir, as principais formas de obtenção de enzimas industriais serão estudadas em maiores detalhes. Foram divididas a partir de suas fontes vegetais, animais ou de fermentações microbianas.

### Fontes tradicionais e processos para produção industrial de enzimas

Tradicionalmente, as enzimas empregadas na área de alimentos têm sido obtidas através de um grande número de fontes naturais, como as provenientes da extração de vegetais e animais. A Tabela 15.1 compreende uma série de enzimas de importância industrial, sua fonte de obtenção e aplicação em alimentos.

A papaína, proveniente de materiais vegetais, é uma protease amplamente empregada no processamento de carne. Esta enzima tem sido extraída do mamoeiro em sua forma bruta, mas cada vez mais está disponível com qualidade e pureza superior.

De modo similar, mas extraída de fontes animais, a quimosina bovina foi amplamente empregada na fabricação de queijo. Esta enzima tem sido extraída do estômago de bezerros na forma bruta e há muito tempo é produzida em escala industrial. Esta enzima pode ser considerada como um exemplo da evolução desta área, pois constantemente o processo de sua obtenção passou por desenvolvimentos que alcançaram a obtenção de um produto mais puro e, com o advento do DNA recombinante, foi uma das proteases que passou a ser produzida por micro-organismos.

Entretanto, a produção de enzimas baseadas na extração de fontes animais e vegetais está relacionada a uma série de inconvenientes, pois geralmente as matérias-primas utilizadas são limitadas, o conteúdo de enzimas disponível é consideravelmente baixo e estes fatores limitam sua expansão. Desta forma, para o processamento das fontes animais e/ou vegetais, haveria necessidade de uma quantidade substancial disponível para se obter o conteúdo e pureza necessários ao produto enzimático final. Em muitos casos, as próprias matérias-primas ocasionam sérias preocupações sobre a segurança do produto enzimático e, além disso, a qualidade e composição destes materiais podem ser muito variáveis, aumentando a complexidade do processo de extração enzimática.

Todas estas limitações aos processos de produção de enzimas, principalmente aos que se baseiam em extração, tornaram necessários processos de produção enzimática alternativos. Desta forma, a obtenção pela fermentação microbiana começou a ganhar destaque, até tornar-se um padrão industrial.

**Tabela 15.1** Enzimas provenientes de animais e plantas, empregadas nas tecnologias de fabricação de alimentos.

Enzima	Fonte	Ação no alimento	Aplicações em alimento
$\alpha$ -amilase	Sementes de cereais, como trigo e cevada	Hidrólise de amido para oligossacarídeos	Panificação, fabricação de cerveja
$\beta$ -amilase	Batata doce	Hidrólise de amido para maltose	Produção de xarope de malte
Papaína	Látex de mamão verde	Hidrólise de proteínas em alimentos e bebidas	Amaciamento da carne, prevenção da turvação a frio na fabricação de cerveja
Bromelina	Suco de abacaxi e do caule	Hidrólise de proteínas em músculos e tecido conjuntivo	Amaciamento da carne
Ficina	Látex de frutos de figo	Hidrólise de proteínas em músculos e tecido conjuntivo	Semelhante a bromelina e papaína, mas não é amplamente usada devido ao custo
Tripsina	Pâncreas de bovinos/suínos	Hidrólise de proteínas em alimentos	Produção de hidrolisados de aromas alimentares (substituído por proteínases microbianas)
Quimosina (coalho)	Abomaso de bezerros	Hidrólise de caseína	Coagulação do leite na fabricação de queijo
Pepsina	Abomaso de bovinos	Hidrólise de caseína e hidrólise da caseína em queijos	Usualmente presente com quimosina como parte do coalho
Lipase	Esôfago de caprinos e ovinos, abomaso de bezerro, pâncreas de porco	Hidrólise de triglicérides (gordura)	Realce de sabor em queijos; modificação da função de gordura por interesterificação
Lipo-oxigenase	Soja	Oxidação de ácidos graxos insaturados em farinhas	Melhorias da massa do pão
Lisozima	Clara de ovo	Hidrólise de polissacarídeos das paredes celulares bacterianas	Prevenção do estufamento tardio em queijos causado por bactérias esporuladas
Lactoperoxidase	Soro de queijo, colostro de bovino	Oxidação do íon tiocianato em hipotiocianato bactericida	Esterilização a frio de leite

A Tabela 15.2 representa a grande diversidade de enzimas microbianas empregadas na área de alimentos, bem como sua fonte de obtenção e aplicação.

O processo industrial para obtenção de enzimas microbianas, de forma geral, pode ser mais bem controlado e padronizado quando comparado aos casos de utilização de matérias-primas sazonais. Além disso, o processo industrial para obtenção de enzimas microbianas permite o emprego de matérias-primas baratas e acessíveis, como amido, xarope de glicose, glicerol, extrato de levedura e uma variedade de sais inorgânicos. Outra consideração é que as questões de segurança, relativas às enzimas de origem animal, não estão presentes em processos microbianos, a menos que os componentes do meio não sejam de origem animal. Entretanto, um grande número de considerações relacionadas à segurança deve ser considerado no processo de fermentação microbiana.

A Figura 15.1 representa um fluxograma comparativo, exemplificando as diferenças majoritárias entre as várias formas de obtenção de enzimas, a partir de fontes vegetais, animais e microbianas.

Tabela 15.2 Fontes para obtenção e aplicação de enzimas microbianas na indústria de alimentos. (Continuação)

Enzima	Fonte	Ação no alimento	Aplicação em tecnologia de alimentos
$\alpha$ -amilase	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Microbacterium imperiale</i>	Hidrólise do amido de trigo	Amolecimento da massa, aumento do volume do pão, ajuda na produção de açúcares para fermentação de leveduras
$\alpha$ -acetolactato	<i>Bacillus subtilis</i>	Converte acetolactato em acetoína	Redução do tempo de maturação do vinho, contornando a necessidade da descarboxilase de fermentação secundária do diacetil para acetoína
Amiloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus</i> spp.	Hidrolisa dextrina de amido em glicose (sacarificação)	Uma fase de produção do xarope de milho de alto teor de frutose, produção de cervejas light
Aminopeptidase	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Rhizopus oryzae</i>	Libera aminoácidos livres a partir do N-terminal de proteínas e peptídeos	Hidrólise de proteínas para acelerar a maturação do queijo
Catalase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Decompõe peróxido de hidrogênio em água e oxigênio	Tecnologia para remoção de oxigênio, combinado com glicose oxidase
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma</i> spp.	Hidrólise da celulose	Liquefação de frutas na produção de sucos
Ciclodextrina glucanotransferase	<i>Bacillus</i> spp.	Sintetiza ciclodextrinas a partir de amido liquefeito	Ciclodextrinas são microencapsulantes comestíveis de cores, sabores e vitaminas
$\beta$ -galactosidase (lactase)	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Kluyveromyces</i> spp.	Hidrólise da lactose do leite em glicose e galactose	Formulação de produtos para indivíduos intolerantes à lactose, redução da cristalização em sorvetes, fabricação de lactulose
$\beta$ -glucanase	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólise de $\beta$ -glucanos em malte de cerveja	Auxiliares de filtração, prevenção da turvação na produção de cerveja
Glicose isomerase	<i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Streptomyces lividans</i> <i>Streptomyces rubiginosus</i>	Converte glicose em frutose	Produção de xarope de milho rico em frutose (adoçante de bebidas)
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Oxida glicose em ácido glucônico	Remoção de oxigênio de embalagens de alimentos, remoção de glicose da clara de ovo para evitar o escurecimento
Hemicelulase e xilanase	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Hidrólise de hemicelulose (polissacarídeo não amiláceo insolúvel presente em farinhas)	Melhoria do pão através da melhora da estrutura do miolo

**Tabela 15.2** Fontes para obtenção e aplicação de enzimas microbianas na indústria de alimentos. (Continuação)

Enzima	Fonte	Ação no alimento	Aplicação em tecnologia de alimentos
Lipase e esterase	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Rhizopus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol; hidrólise de alquil éster em ácidos graxos e álcool	Aprimoramento do sabor de produtos de queijo; modificação da função de gordura por interesterificação; síntese de ésteres de aroma
Pectinase (poligalacturonase)	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium funiculosum</i>	Hidrólise da pectina	Clarificação de sucos de frutas por despectinização
Pectinase	<i>Aspergillus</i> spp.	Remove grupos metílicos das unidades de galactose da pectina	Tecnologia de despectinização usando pectinase
Pentosanase	<i>Humicola insolens</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Hidrólise de pentosanas (polissacarídeo não amiláceo solúvel presente na farinha de trigo)	Melhoria da massa de pão
Pululanase	<i>Bacillus</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.	Hidrólise das ligações 1-6 das ramificações na estrutura do amido	Sacarificação do amido (melhora da eficiência)
Protease (proteínase)	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Cryphonectria parasitica</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Bacillus</i> spp.	Hidrólise da $\kappa$ -caseína; hidrólise de proteínas alimentares de origem animal e vegetal; hidrólise do glúten de trigo	Coagulação do leite para fazer queijo; produção de hidrolisados para sopas e alimentos salgados; melhora da massa do pão
Quimosina	<i>Aspergillus awamori</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	Hidrólise da $\kappa$ -caseína	Coagulação do leite para preparo de queijo

Na sequência, serão abordados alguns detalhes sobre as formas de obtenção de enzimas e as etapas envolvidas nos processos específicos, e o principal alvo será discutir a produção por fermentações microbianas.

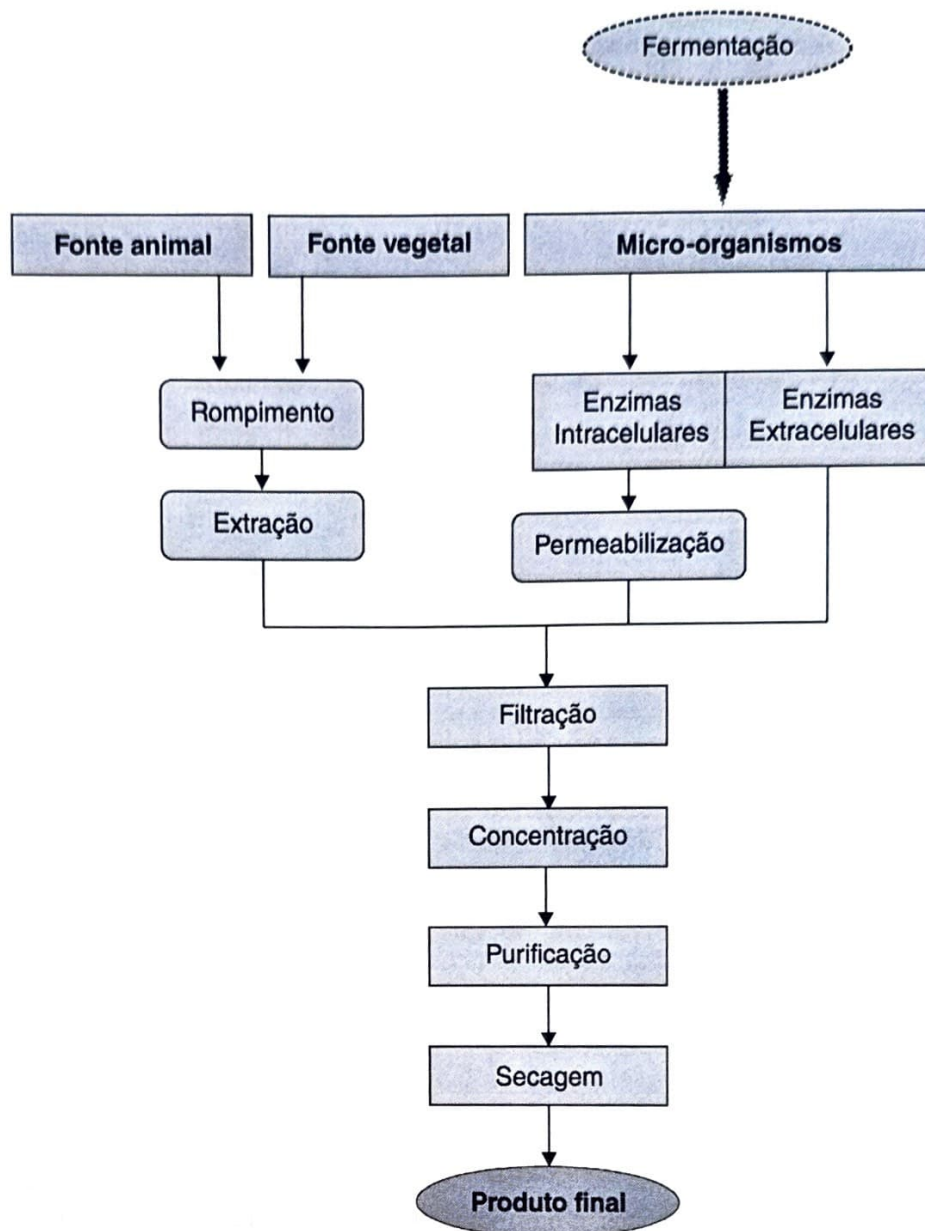
### Enzimas obtidas a partir de fontes animais

As enzimas provenientes de fontes animais de importância comercial são quase exclusivamente proteínases, extraídas de tecidos intestinais ou glândulas, como as do pâncreas. Apesar de atualmente sua aplicação ser restrita, alguns processos de larga escala ainda a mantêm como preferência, como as obtidas a partir do estômago de bezerras e empregadas na coagulação do leite. Até o ano de 1998, estas enzimas representavam cerca de 10% da venda global deste mercado.

### Fontes para extração e obtenção de enzimas

Geralmente, o tecido apropriado para a extração de enzimas é imediatamente extraído após o abate de animais saudáveis, apto para o consumo humano e com certificado veterinário, a seguir é rapidamente congelado e transportado à planta de processamento. Durante o descongelamento, o material é picado grosseiramente e, depois de descongelado, é submetido à moagem ou fragmentação completa enquanto ainda está completamente gelado.

Usualmente, o material é extraído com água ou solução tampão adequada, enquanto os resíduos insolúveis são extraídos por filtração ou centrifugação.



**Figura 15.1** Sequência de etapas envolvidas no isolamento de enzimas.

No caso da obtenção de enzimas pancreáticas, como pepsina e renina puras, a extração requer a utilização de um tampão diluído para manter a máxima atividade enzimática e limitar a solubilização de outros componentes teciduais. A primeira fração separada dos tecidos é tratada de forma a se obter as enzimas desejadas ou para precipitar os demais componentes, permitindo a manutenção das enzimas na solução. Neste estágio podem ser empregados alguns sais, como sulfato de amônio ou sódio, em concentrações específicas. Uma purificação maior pode ser conseguida repetindo-se o processo de adição de sais, ou pela adição de solventes como etanol e acetona. Após estes tratamentos, o precipitado de enzimas pode ser seco sob vácuo (ver Capítulo 7).

Durante todo o processo de extração, deve-se cuidar para manter o extrato enzimático sob baixas temperaturas e evitar mudanças drásticas de pH ou a concentração dos reagentes adicionados. Isto pode ser conseguido utilizando líquidos gelados e sob constante homogeneização.

Finalmente, é essencial assegurar que as preparações sejam mediadas nos valores ótimos de pH que assegurem a estabilidade enzimática durante toda a cadeia de processamento e armazenamento.

## Enzimas obtidas a partir de fontes vegetais

As enzimas obtidas a partir de fontes vegetais são de grande importância para o processamento de alimentos, entretanto a sua obtenção na quantidade e qualidade necessárias pode ser dificultada por diversas razões. As limitações impostas pelos ciclos da agricultura, as perdas relacionadas a doenças, pragas ou condições climáticas desfavoráveis, são alguns dos exemplos que dificultam a expansão dos processos existentes, e principalmente o desenvolvimento de novos processos que dependem, sobretudo, destas fontes.

Bromelina, ficina e papaína são enzimas de plantas com aplicações clássicas para a indústria (Tabela 15.1). O processo geral de obtenção de enzimas vegetais será estudado na sequência.

### Fontes para extração e obtenção de enzimas

Diversos vegetais podem ser fontes para a extração de enzimas. Alguns cereais maltados são fontes de carboidrases importantes, sendo as mais comuns as  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases obtidas de grãos de soja.

Estas enzimas podem ser extraídas de cereais pela aplicação de um sistema de maceração eficiente na indústria de bebidas fermentadas, devendo-se tomar cuidado para reduzir a temperatura a um limite que garanta a minimização de sua inativação enzimática. Os cereais são moídos e misturados em água quente, entre 40 e 50 °C. Depois de um período de tempo nesta faixa de temperatura, o líquido é drenado e concentrado por evaporação a vácuo ou ultrafiltração por membranas. A separação e purificação das duas amilases podem ser conseguidas com a elevação de temperatura a 60 °C, faixa na qual a  $\beta$ -amilase é mais facilmente inativada, ou com abaixamento no valor de pH, inferior a 4, responsável pela inativação de  $\alpha$ -amilase.

Alguns cereais também podem ser fontes de lipo-oxigenases, utilizadas na panificação. Apesar de sua importância reconhecida, sua aplicação industrial não se mostrou muito vantajosa em razão dos altos custos de extração e purificação da enzima.

Uma enzima notável obtida a partir de plantas é conhecida como rábano-de-cavalo, um catalisador-chave em muitos sistemas de diagnóstico e testes de monitoramento, empregado tanto em alimentos quanto em setores médicos.

Um grande número de enzimas com aplicações mais específicas podem ser extraídas de tecidos de plantas, inclusive enzimas obtidas a partir de frutas cítricas capazes de degradar a pectina, alguns tipos de lipase de sementes e  $\alpha$ -galactosidase obtida por meio da extração de grãos de café.

## Principais etapas envolvidas na extração de enzimas a partir de tecidos animais e vegetais

Para a coleta de material, deve-se ter em consideração a identificação precisa das espécies de plantas ou a seleção da parte adequada do animal, e este deve estar seguro para o consumo humano.

O transporte e armazenamento, antes da extração, devem prevenir o crescimento de contaminantes, proliferação de micro-organismos e minimizar a perda das enzimas de interesse. A secagem cuidadosa dos tecidos vegetais permite que o material seja acondicionado por diversos meses. Entretanto, o congelamento do material animal é o mais apropriado.

A preparação do material para ser submetido à extração requer que o material seja moído e triturado em uma solução tampão aquosa adequada e, geralmente, mantido sob baixas temperaturas, ao redor de 0 a 4 °C. Os equipamentos variam conforme o método escolhido e podem ser desenvolvidos com pequenas modificações nas plantas tradicionais de processamento de alimentos.

A extração de enzimas consiste na principal etapa do processo. As purificações primárias envolvem a adição de diversos sais ou solventes responsáveis pela precipitação. A etapa de purificação mais refinada envolve sucessivas precipitações, com possível utilização de técnicas para remover as impurezas.

Para a comercialização do produto é necessária a concentração e padronização da enzima. A padronização por ser conduzida pela diluição do concentrado com produtos adequados como sais, lactose, amido, maltodextrina ou açúcares. Produtos líquidos devem ser concentrados rigorosamente por ultrafiltração seguida da padronização do material, permitindo a preservação e aumento na concentração de sólidos e diminuindo a atividade de água do sistema, além de prevenir contra a proliferação microbiana.

## **Produção industrial de enzimas a partir de fontes microbianas**

Na seqüência, serão descritas algumas etapas dos processos envolvidos na produção industrial de enzimas. Entretanto, muitos princípios envolvidos são pouco detalhados e específicos, visto que este mercado é altamente competitivo e todos os fatores relacionados à natureza da produção enzimática tornam-se altamente confidenciais.

### **Desenvolvimento de processo de fermentação microbiana**

As enzimas alimentares são produzidas por meio do mesmo processo empregado para a obtenção de enzimas para outras finalidades. Em síntese, o processo consiste no tratamento da matéria-prima, fermentação de linhagem selecionada, recuperação da enzima, purificação e formulação final, como observado na Figura 15.2, que representa um esquema simplificado da produção de enzimas microbianas<sup>1</sup>. Em teoria estas são etapas independentes, mas são vistas como altamente interdependentes pelos produtores de enzimas.

A fermentação é considerada como a principal etapa da produção. Neste passo, empregam-se culturas microbianas visando à geração das enzimas desejadas. Inicialmente, esta cultura deve ser propagada, em um meio de cultura apropriado e em condições específicas, para gerar a quantidade suficiente da enzima de interesse. Esta enzima pode ser produzida em conjunto com o crescimento do micro-organismo ou, em outros casos, em uma fase diferente, onde o crescimento microbiano já esteja retardado ou mesmo finalizado.

O grande objetivo de qualquer cientista/profissional da área é desenvolver um processo que possa aliar a alta produtividade a um pequeno tempo de reação, mas na prática diversas nuances influenciam e tornam os processos muito complexos e custosos. Caso o produto submetido ao processo de recuperação seja viscoso, contenha grande número de partículas em suspensão e/ou possua atividade proteolítica alta, este produto dificultará o processo a jusante (também denominado de *downstream*), fazendo com que o processo global não opere nas condições ótimas.

Nesta perspectiva, pode-se notar o grau de complexidade de um processo industrial de produção enzimática, causado pelo grande número de variáveis que influenciam no tempo, custo e rendimento.

### **Etapas iniciais da produção industrial de enzimas**

O design industrial implica no desenvolvimento de um processo que ofereça alto desempenho e rendimento. Apesar destes requisitos geralmente estarem associados à etapa da fermentação, a elaboração de um processo industrial ainda é dependente de diversos outros fatores relevantes, devendo levar em consideração desde as etapas iniciais do processo até as operações a jusante, como separação celular, isolamento do produto, purificação enzimática e formulação do produto final. A interação entre todas estas etapas pode resultar em efeitos significativos no desempenho do processo<sup>2</sup>.

### **Seleção, manutenção e armazenamento da cultura**

Antes da possibilidade de realizar modificações genéticas nas linhagens utilizadas, só era possível utilizar micro-organismos encontrados na natureza. Assim, os trabalhos relacionados à produção de enzimas se focavam em extensivos trabalhos de isolamento de micro-organismos com potencial produtor de enzimas. Entretanto, do ponto de vista tecnológico, esta estratégia estava distante do ideal, pois, embora a produção de enzimas de interesse pudesse ser obtida em pequena escala, muitos micro-organismos falhavam no crescimento e produção em grandes volumes. Além disso, nas configurações industriais só é viável e prudente utilizar micro-organismos seguros, que não produzem toxinas e não têm potencial patogênico contra humanos, animais e plantas.

A seleção da linhagem e o conhecimento de sua atividade são cruciais, pois, além da atividade enzimática requerida, geralmente há produção de outras enzimas, que podem interferir na aplicação do produto enzimático ou reduzir a sua estabilidade. As lipases, por exemplo, são indesejáveis no processamento de produtos lácteos, pois são responsáveis pela hidrólise de triglicerídeos de ácidos graxos e pela subsequente liberação de ácidos graxos como o butírico, que confere alterações indesejáveis ao sabor e odor do produto. Algumas proteases ainda podem ser

responsáveis pela degradação enzimática do produto, levando a uma redução dramática na estabilidade final do produto.

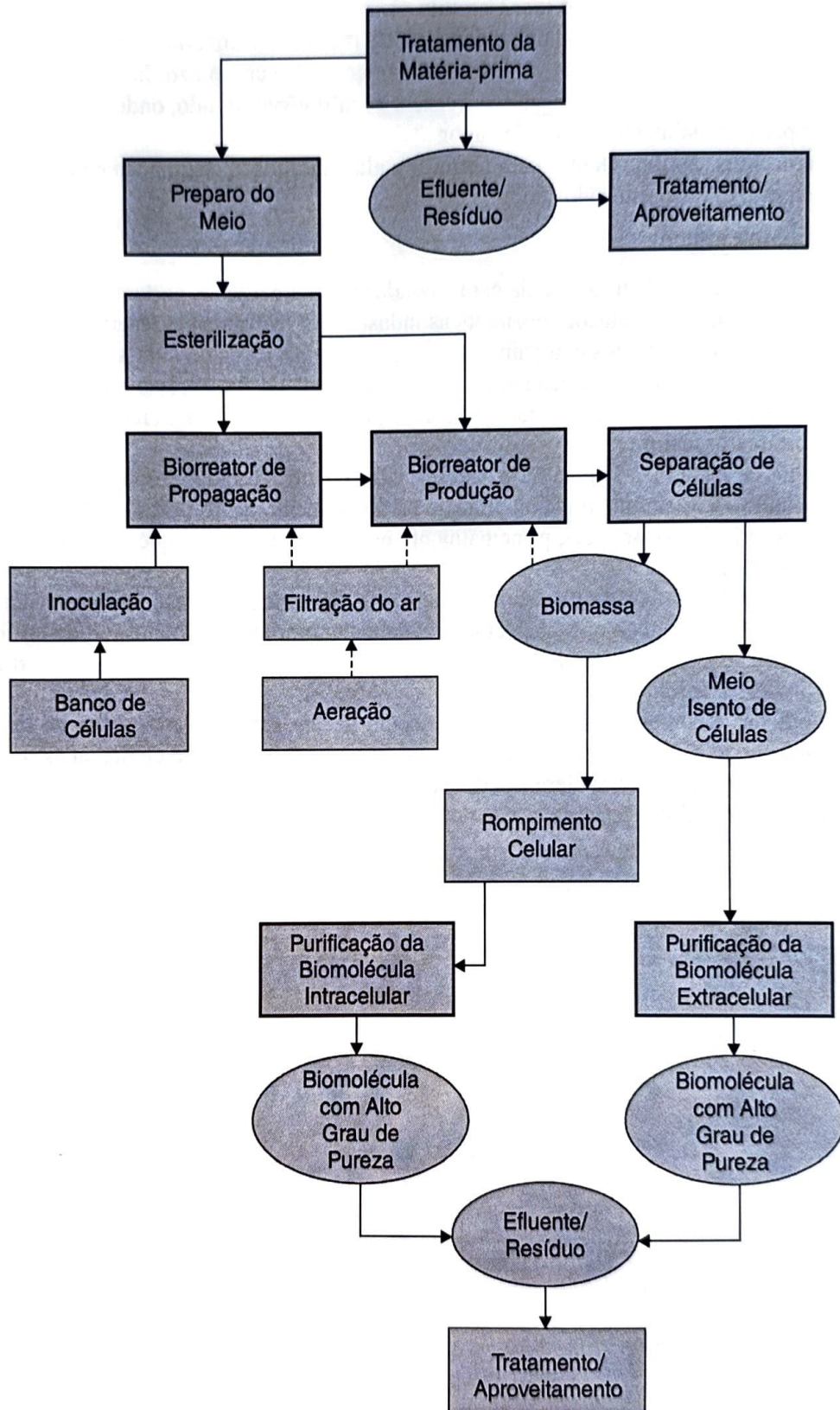


Figura 15.2 Etapas envolvidas na produção de enzimas microbianas<sup>1</sup>.

O processo de fermentação tem início com a seleção e armazenamento da cultura. O método mais comum é por congelamento. As células podem ser armazenadas de diversas maneiras para posterior utilização, incluindo culturas congeladas em meio líquido, com adição de crioprotetores apropriados (como glicerol e dimetilsulfóxido), ou em meios sólidos como ágar, em suspensões liofilizadas e suspensão de esporos (ver Capítulo 4).

Nesta fase são tradicionalmente utilizados freezers mecânicos, em uma faixa de temperatura que pode variar de  $-20$  a  $-70$  °C, nos casos de armazenamentos de curto prazo. Já para armazenamentos por maior período de tempo, empregam-se freezers de nitrogênio líquido, onde os frascos são acondicionados preferencialmente na fase de vapor.

Estes processos são importantes para permitir a alta viabilidade enzimática e para manter o seu fenótipo, mesmo quando estocados durante anos<sup>3</sup>.

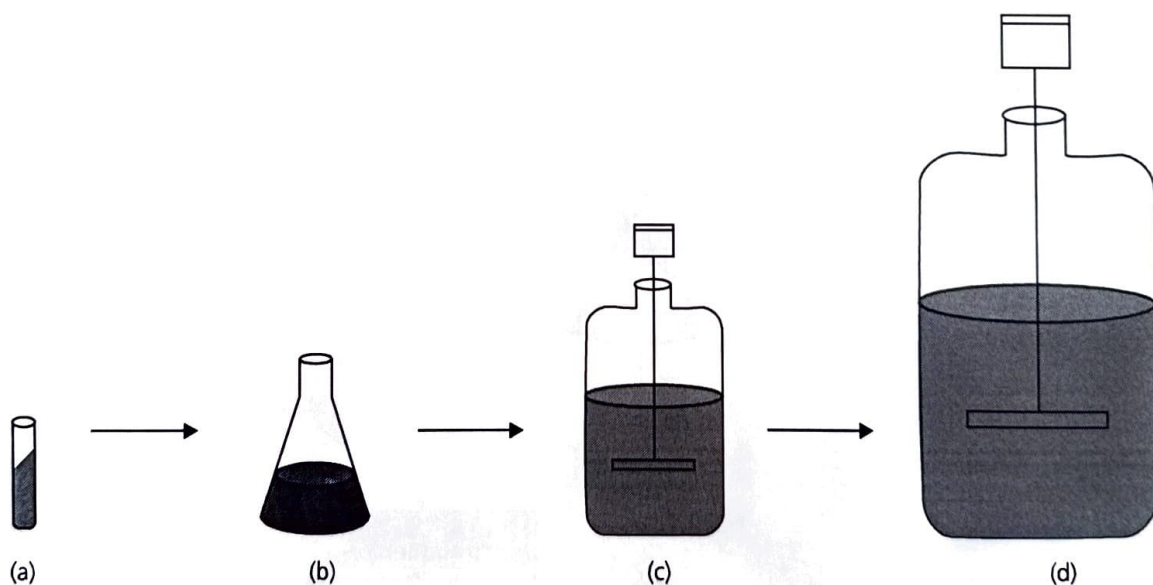
### Preparo do Inóculo

Esta é uma etapa de grande importância para a condução do processo e, portanto, devemos considerar que a maioria das fermentações enzimáticas industriais é realizada em reservatórios que variam de 30 a 300 m<sup>3</sup>. Esta parte dos equipamentos é uma das mais caras de toda a planta de produção. Desta forma, para otimizar a produção no biorreator principal, ocorre a prévia preparação do inóculo em recipientes intermediários de menor capacidade para redução do tempo requerido para o crescimento no biorreator maior.

Em alguns casos, utiliza-se uma série de reservatórios com capacidade crescente, como exemplificado na Figura 15.3, em que tradicionalmente há um aumento de 10 vezes em cada estágio. Este processo é de grande importância, principalmente no caso de linhagens que têm muitos requisitos para seu crescimento.

A estrutura é adaptada para transferir as linhagens diretamente dos recipientes menores para a fermentação. Entretanto, como estabelecido previamente, o processo é planejado de tal forma que minimize os custos, o que pode implicar até mesmo na utilização de um único intermediário até o início do processo de fermentação.

As condições empregadas no preparo do inóculo devem ser planejadas a fim de se obter um crescimento rápido e eficiente. Estas mesmas condições são usualmente empregadas no início do processo de fermentação. A transferência do material do fermentador intermediário para o principal ocorre enquanto as células estão na fase exponencial de crescimento.



**Figura 15.3** (a) cultura estoque; (b) reativação da linhagem em escala de bancada; (c) reservatório ou série de reservatórios com capacidade crescente; (d) fermentador principal.

## Fermentação

O resultado desejado em um processo de fermentação é muitas vezes maximizar a taxa de síntese enzimática ou a chamada produção volumétrica, sendo que ambos os fatores são altamente influenciados pela planta do processo. A seguir, algumas etapas importantes para o processo de fermentação, que devem ser rigorosamente consideradas<sup>2,3</sup>.

## Esterilização

A esterilização pode ser considerada como um dos requisitos básicos do processo de fermentação (quando se trabalha com culturas puras). Os micro-organismos estão presentes em todos os tipos de ambiente (no ar, solo e água) e, como o objetivo principal é proporcionar o desenvolvimento de um único micro-organismo (cultura pura, responsável pela produção da enzima de interesse), todos os micro-organismos contaminantes devem ser mortos ou removidos antes que se inicie o processo de produção enzimática. Isto pode ser conseguido por inativação pelo calor ou filtração. No caso de utilização do calor, a esterilização pode ser alcançada pelo emprego de altas temperaturas (próximas a 150 °C) por um curto espaço de tempo (3 a 4 minutos) em uma operação contínua, ou pelo uso de temperaturas mais baixas (por volta de 121 °C) com um contato maior de tempo (20 a 60 minutos) em operações de batelada. Meios que contêm componentes insolúveis geralmente requerem esterilização em batelada, enquanto os meios solúveis podem ser mais adaptados à esterilização contínua.

## Transferência de massa e calor

A maioria dos processos de fermentação industrial para a produção de enzimas são processos aeróbicos, ou seja, requerem oxigênio como aceptor de elétrons para o fornecimento de energia à cultura. Esta necessidade de oxigênio resulta em duas questões específicas para os equipamentos empregados: transferência de massa de oxigênio e remoção de calor.

Nos processos aeróbicos de fermentação, o calor é gerado através da transferência de força do motor agitador ao líquido, o que caracteriza um aquecimento mecânico. Além disso, o calor também é gerado pelo micro-organismo durante o processo de respiração do oxigênio (calor metabólico); este processo geralmente prevalece em fermentações aeróbicas.

De maneira geral, todos os requisitos (pressão, fluxo de ar e potência) aumentam a complexidade do equipamento, e este deve contemplar uma série de requisitos, para fazer com que o processo opere em suas condições ótimas para a produção enzimática.

## Crescimento do micro-organismo

A linhagem microbiana necessita se multiplicar até ter concentração suficiente para atingir a máxima produção enzimática. Para os processos industriais, é desejável que a linhagem tenha uma taxa de crescimento acelerada para maximizar a produção da enzima.

## Produção enzimática

A produção de enzimas por micro-organismos pode ocorrer basicamente de três formas:

- **Produção de enzima associada ao crescimento celular:** quando a cultura está em crescimento ativo; seu crescimento rápido resulta em rápida produção de enzimas. Exemplo: enzimas metabólicas.
- **Produção de enzima não associada ao crescimento celular:** quando as enzimas são produzidas como metabólitos secundários, gerados em grande parte durante a taxa de crescimento do micro-organismo, ou mesmo em condições onde seu crescimento já não está mais ativo. Exemplo: enzimas hidrolíticas.
- **Produção mista de enzima:** alcança a produção de enzimas das duas formas. A maioria das enzimas industriais produzidas atualmente ocorre desta forma.

Além disso, alguns micro-organismos são desenvolvidos especificamente para produção de enzimas através de indução sob condições não associadas ao crescimento. Um exemplo é a protease alcalina produzida por *Bacillus subtilis*,  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis* e a celobio-hidrolase de *Trichoderma reesei*.

### Operação do sistema

Conforme visto no Capítulo 4, a fermentação pode ser operada de três modos básicos:

- Batelada
- Batelada alimentada
- Modo contínuo

### Processos envolvidos na fermentação

A produção industrial de enzimas pode empregar processos de fermentação submersa ou semissólida. Em alguns casos, o próprio catalisador ditará qual a melhor opção quanto ao tipo de fermentação a ser utilizado, devido à produção ineficaz e baixos rendimentos em alguma das rotas. Entretanto, geralmente a natureza final do produto enzimático e o desempenho visado determinam o método<sup>4</sup>.

As enzimas obtidas a partir de culturas semissólidas são frequentemente consideradas misturas complexas, muitas vezes incluindo amilase, proteinase e lipase em proporções reguladas de acordo com as condições de cultivo. Caso seja necessário obter a atividade de uma única enzima, comumente emprega-se a fermentação submersa.

Atualmente, a maioria dos processos industriais de obtenção de enzimas emprega a fermentação submersa, tendo em vista que esta apresenta algumas vantagens sobre a fermentação semissólida, que oferece mais riscos de contaminação, maior necessidade de espaço e menores rendimentos.

A introdução de micro-organismos geneticamente modificados tem alterado as maneiras tradicionais de escolha do método de fermentação. No caso de linhagens modificadas contendo grande número de genes codificados para a enzima requerida, ou com genes de enzimas indesejadas excluídos, podem ser usados em qualquer sistema de fermentação. A escolha destes deverá ser uma das práticas da indústria, ou em casos onde os dois sistemas sejam aplicáveis, deverá se basear em questões econômicas, facilidade de isolamento e purificação do produto enzimático, bem como na produtividade final.

### Fermentação semissólida

A fermentação semissólida é um exemplo do refinamento da produção original da produção do alimento oriental *koji*. Originalmente é empregada para produção de enzimas fúngicas e tipicamente usadas para produção de carboidrases não amiláceas (como celulasas, lactases e pectinases), proteínases, lipases e alguns tipos de enzimas degradadoras de amido, como  $\alpha$ -amilases e gluco-amilases.

As principais características deste sistema são a grande flexibilidade de escala e a simplicidade da planta básica de produção. O cultivo do micro-organismo é feito em bandejas rasas, contendo até 10 cm de profundidade de substrato, que podem ser materiais úmidos como soja e arroz. Os recipientes são empilhados em caixas ou salas apropriadas, que permitam o ar úmido circular ao longo do material. Além das técnicas básicas, diversos avanços na produtividade foram alcançados empregando aeração forçada, que utiliza camadas mais profundas de meio, chegando a 2 metros de profundidade<sup>2</sup>.

É importante ressaltar que cada micro-organismo utilizado na produção de enzimas requer a devida otimização na composição do meio e condições precisas de cultivo. A quantidade de ar e a temperatura de alimentação nas câmaras devem ser reguladas de forma a manter os níveis de umidade e remover o excesso de calor produzido ao longo da fermentação. Nos casos onde a fermentação se processa rapidamente, é necessário empregar um sistema de refrigeração na estrutura da câmara.

O meio de cultura ideal deve ser preparado levando-se em consideração quantidades adequadas das fontes de carboidratos e proteínas. Na maioria dos casos, o rendimento de uma enzima particular pode ser aumentado apenas pela adição de uma substância específica, capaz de agir como estimulante da produção. Em geral, estes substratos não são induzíveis para a enzima, desde que a linhagem produtora seja selecionada pela produção da enzima necessária e específica.

A esterilização do meio antes do inóculo é geralmente realizada pela injeção de vapor. Após esta etapa, o inóculo é realizado pela introdução da suspensão de esporos no meio, disposto nas bandejas ou no fermentador.

Para maiores detalhes sobre sistemas de fermentação em estado sólido, veja o Capítulo 5.

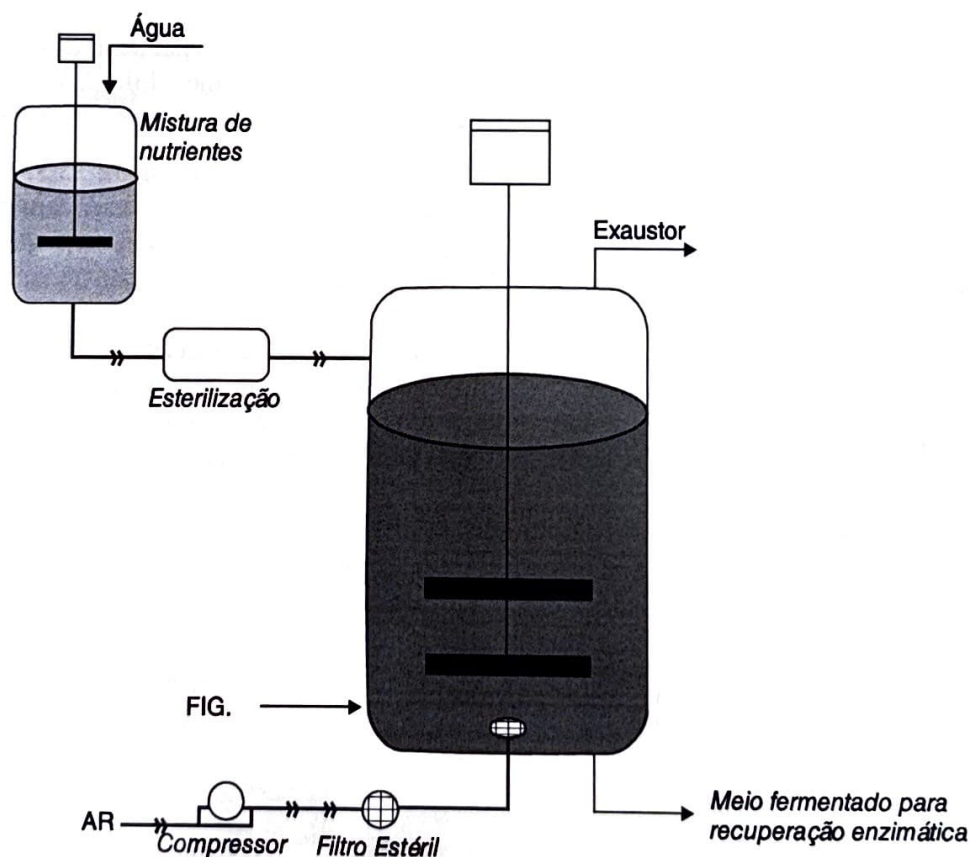
### Fermentação submersa

A fermentação submersa tem sido muito empregada principalmente por causa dos menores custos envolvidos na produção de grandes volumes de enzimas. Neste caso, a fermentação ocorre em fermentadores de grande volume, chegando a 150 m<sup>3</sup>.

O meio de cultivo é composto por nutrientes e fontes baratas de nitrogênio, fosfato e elementos-traço (ver Extra 1 para mais informações sobre o meio de cultivo no final deste tópico). Considerando-se as questões econômicas, este meio ainda deve ser selecionado de forma a manter o crescimento satisfatório da linhagem, ser de fácil padronização e não dificultar a separação do produto. A lista de ingredientes é diversa; como exemplo pode-se citar o amido e seus hidrolisados, xarope de milho e hidrolisados de levedura. Além disso, o desempenho da fermentação é estimulado pela adição de componentes particulares a cada micro-organismo.

Como na fermentação semissólida, a seleção dos componentes do meio de cultivo tem significativa importância, principalmente na recuperação enzimática por processos *downstream*. Ensaios preliminares são recomendados para ajudar na seleção dos meios, para garantir a viscosidade, sólidos totais, massa celular, conversão eficiente e balanço de gases e espuma, selecionando os parâmetros de forma a manter o processo com máxima eficiência possível. Em muitas fermentações, o micro-organismo produz a enzima de interesse ao final da fase log, também conhecida como fase de crescimento exponencial.

A Figura 15.4 esquematiza o processo global da fermentação submersa. Este processo tem início com o inóculo da linhagem em um frasco contendo um meio de cultivo, sólido ou líquido. Após seu crescimento, há a transferência deste material para um fermentador de pequena capacidade, onde a biomassa necessária para o fermentador principal será gerada. Nesta etapa ocorre a adaptação das células ao meio e a utilização dos nutrientes ao longo do processo.



**Figura 15.4** Esquema simplificado de fermentação submersa. A configuração ilustrada permite fermentação contínua, batelada e batelada alimentada.

Após esta etapa, as células são transferidas para o fermentador principal, onde temperatura, pH e oxigênio dissolvido são controlados para otimizar a produção enzimática. Conforme citado, a fermentação pode ser feita por batelada, batelada alimentada ou processo contínuo e, após seu término, a mistura entre células, nutrientes e enzimas pode ser encaminhada ao processo a jusante da fermentação, para purificação e recuperação dos produtos.

#### Extra I: Importância do meio de cultivo<sup>1</sup>

- **Características físico-químicas do meio fermentativo:** grande importância para o crescimento do micro-organismo e para o rendimento do produto.
- **Meios de composição quimicamente definida:** Meios com componentes quali e quantitativamente conhecidos; elevado custo. Exemplo: produção de enzimas terapêuticas.
- **Meios de composição complexa:** Utilizados na maioria dos processos, empregam matérias-primas industriais, como melaço, açúcar não refinado e materiais amiláceos.
- A matéria-prima pode representar até 75% do custo total de produção, sendo considerada como um dos componentes mais importantes do processo. Desta forma, há um grande interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais como: bagaço da cana-de-açúcar, sabugo de milho, palha de arroz, farelo de trigo etc.

### Processos a montante (*upstream*) e a jusante (*downstream*) de fermentação

Nesta seção, será discutida a importância de um processo a jusante, ou *downstream*, após a fermentação, para permitir a recuperação da enzima e preparo com finalidades comerciais. É importante lembrar que os processos a montante (*upstream*) já foram abordados neste capítulo, (ver Etapas iniciais da produção industrial de enzimas) na forma das seguintes etapas:

- Estoque da cultura microbiana (ver Seleção, manutenção e armazenamento da cultura)
- Crescimento da linhagem e preparo do inóculo (ver Preparo do inóculo)
- Fermentação e produção enzimática (ver Fermentação)

O processo a jusante pode ser definido pelas etapas apresentadas na Figura 15.5, necessárias para a obtenção das enzimas comerciais na forma de um produto final que possa ser comercializado.

Depois de finalizada a fermentação, o meio obtido ainda não está pronto para ser comercializado como produto, pois contém diversos materiais como células vivas de micro-organismos, DNA e, por causa da presença de proteases e peptidases, as enzimas produzidas estão sujeitas à degradação. Desta forma, a concentração de enzimas pode estar abaixo do necessário para sua aplicação por conter possíveis interferentes. Por estas razões, o meio fermentativo necessita ser processado visando à purificação do produto enzimático, de tal forma que se torne resistente às condições de armazenamento não controladas, seguro durante sua aplicação e que possa trazer benefícios aos consumidores até mesmo na relação custo-benefício.

Muitas técnicas são empregadas para recuperação das enzimas na forma de um produto final. A escolha das operações específicas a serem utilizadas é ditada não apenas pela natureza do meio fermentativo, propriedades bioquímicas e biofísicas da enzima e grau de necessidade de refinamento dos produtos, mas também por considerações práticas, como a disponibilidade de algumas operações e equipamentos necessários no local da fábrica, possibilidade de reciclagem do material e opção de eliminação de produtos indesejáveis.

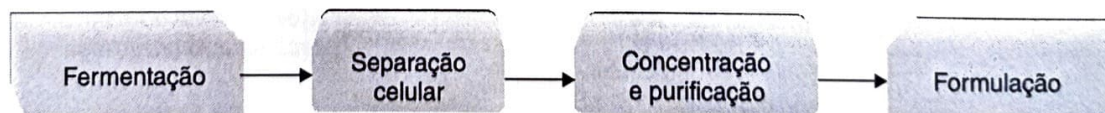


Figura 15.5 Processo a jusante básico para recuperação de enzimas do meio fermentativo.

Em seu nível mais básico, o processo a jusante apenas necessita da remoção de células do meio fermentativo e concentração do filtrado, o suficiente para facilitar a formulação do produto final.

Considerando que o método mais utilizado para a produção enzimática é a batelada alimentada, que geralmente apresenta um tempo de processo total de 2 a 10 dias (variando de acordo com as condições de processo e produto visado), os equipamentos empregados no processo a jusante têm o tamanho ajustado de tal forma que todo o meio de cultura possa ser processado em 1 ou 2 dias. Para que o processo tenha um ciclo de operação curto, a separação celular e a concentração (em alguns casos até mesmo a formulação) são realizadas simultaneamente. Como consequência, os equipamentos empregados no processo a jusante operam em modo constante ou com um ciclo rápido de utilização.

### **Separação celular**

A recuperação da enzima do sistema de cultura é necessária para assegurar que a preparação final alcance os requisitos de pureza e estabilidade. Desta forma, o número de estágios e perda de atividade no decorrer do processo são minimizados. A atenção durante todo o processo de recuperação enzimática deve ser máxima, para evitar a contaminação por micro-organismos prejudiciais ou por substâncias químicas indesejáveis.

Como visto no capítulo 7, neste processo, podem ser empregadas uma série de operações distintas, que devem ser escolhidas de acordo com o tempo total do processo e com as características para obtenção do produto enzimático. Como exemplo, a separação celular contínua pode ser feita por centrifugação em decantadores, por microfiltração etc. Enquanto isso, filtros de tambor rotativo a vácuo proporcionam filtração semicontínua. A centrifugação tem opções mais limitadas, usualmente é realizada por ultrafiltração, com utilização de membranas sintéticas de peso molecular suficiente para reter todas as enzimas de interesse. Em alguns casos, até mesmo a evaporação pode ser uma opção, apesar de ser um processo caro e incapaz de remover alguns sais dissolvidos ou impurezas de baixo peso molecular.

No caso de separação celular por filtração, para facilitar o processo, são adicionados materiais auxiliares como floculantes, sais com capacidade de atuação como tampão, ácidos e bases para o ajuste do pH. Estes materiais devem atender a todos os padrões de segurança alimentar estipulados por órgãos reguladores e governamentais. Além disso, devem contemplar requisitos diversos como restrições alimentares, caso da religião *kosher*, entre outros. De certa forma, todos os requisitos envolvidos diminuem as possíveis fontes de matéria-prima e principalmente a flexibilidade de mudança de materiais quando o produto já foi aceito para fins alimentícios.

O produto resultante de um processo a jusante básico pode ser considerado um concentrado enzimático bruto. Além da enzima de interesse, este concentrado contém componentes residuais solúveis e coloidais, provenientes da fermentação, e outros produtos resultantes da atividade metabólica microbiana etc. Desta forma, dependendo do produto desejado, etapas posteriores de purificação podem ser realizadas.

### **Purificação**

Caso a especificação do produto enzimático requeira baixas concentrações de componentes não enzimáticos, torna-se necessário empregar uma ou mais técnicas de purificação. Este processo pode ser simples, como alguns tipos de filtração para remoção de partículas coloidais, quanto caro e complexo como outras técnicas mais refinadas, por exemplo, a cromatografia.

A remoção de sais e outros sólidos permeáveis pode ser realizada pela adição de uma etapa de diafiltração ao processo de ultrafiltração. Algumas impurezas, como biopolímeros, podem ser reduzidas pela seleção cuidadosa das condições empregadas durante o processo de separação celular: pH, conteúdo de sais, tipo de floculante e meios de adição ao processo podem ter efeito significativo.

Caso estas alternativas não sejam o suficiente para a obtenção do produto de interesse, etapas de purificação específicas são necessárias ao processo. A primeira opção de purificação é a precipitação de impurezas. Caso estas possam ser induzidas a formar uma fase sólida, podem então ser simplesmente removidas por filtração. Entretanto, a precipitação da enzima desejada está relacionada a

técnicas específicas, pois requer o envolvimento de pelo menos duas operações, uma para coleta do precipitado e outra capaz de dissolvê-lo novamente e clarificá-lo. Os produtos enzimáticos mais limpos são obtidos pela cristalização da enzima. Por causa da alta seletividade na formação de cristal, os sólidos formados neste processo chegam a um elevado grau de pureza.

A cromatografia é outra opção para produção de produtos enzimáticos purificados. Entretanto, esta é uma das opções mais caras para este processo, mas pode ser economicamente viável para um número reduzido e específico de produtos enzimáticos.

Para maiores detalhes sobre processos de purificação, veja o Capítulo 7.

### **Formulação do produto enzimático**

O último estágio da produção de enzimas via fermentação é a formulação do produto final. A enzima resultante da concentração, obtida a partir da fermentação e do processo a jusante, normalmente não pode ser utilizada para aplicações alimentícias. As enzimas devem ser fornecidas de forma que sejam aplicáveis para cada tipo de produto final desejado. Na verdade, as enzimas não necessitam apenas da formulação para permitir sua aplicação em alimentos, mas também para fornecer a vida de prateleira desejada durante o armazenamento das enzimas, antes de sua aplicação. É importante ressaltar que todos compostos utilizados para a formulação do produto enzimático, como os diluentes e excipientes, devem ser também aceitáveis aos produtos alimentares. De modo geral, estas formas podem ser basicamente sólidas ou líquidas.

### **Formulação de produtos sólidos**

Para a obtenção de produtos sólidos, o concentrado enzimático líquido é primeiro misturado a excipientes estabilizantes ou diluentes e, então, submetido à secagem. Este processo pode ser realizado através de secagem por spray ou por encapsulação. Apesar de a primeira técnica de secagem ser mais empregada, outros métodos, como a liofilização, podem ser utilizados e oferecer benefícios adicionais aos produtos. Nesses casos, o custo deve ser sempre considerado.

### **Formulação de produtos líquidos**

As enzimas podem ser utilizadas em sua forma líquida, porém, este tipo de formulação pode ser mais complexo, por tratar-se de sistemas mais dinâmicos quando comparados com produtos sólidos, por causa da presença de alta quantidade de água no meio.

Alguns produtos usados como estabilizantes são carboidratos comuns, como sacarose e dextrose, alcoóis de açúcar e alguns polióis. Estes compostos são responsáveis pela estabilização enzimática, pois são capazes de manter a estrutura da proteína e prevenir sua desnaturação. Além disso, estes materiais colaboram com a manutenção da solubilidade do produto. Quando adicionados em níveis elevados, podem ajudar no controle da atividade de água, que tem um papel importante no controle do crescimento microbiano. Da mesma forma, alguns conservantes também podem ser adicionados nas formulações.

O processo de formulação de produto líquido geralmente está integrado ao processo a jusante. Após a concentração enzimática, os estabilizantes são adicionados e o produto submetido à filtração, com a finalidade de remover sólidos insolúveis e/ou para reduzir a carga microbiana no produto formulado. O processo de filtração pode ser realizado utilizando-se equipamentos específicos para esta finalidade, como filtro de tambor rotativo a vácuo, filtração de profundidade etc.

### **Misturas**

Muitos produtos utilizados para aplicação em alimentos contêm mais de um tipo de atividade enzimática. Os produtores de enzimas podem produzir estas misturas pela combinação de intermediários já formulados, como os sólidos encapsulados ou submetidos à secagem por *spray drying*, ou líquidos em proporções definidas. Para misturas de produtos sólidos, é importante que os produtos intermediários sejam similares em tamanho e densidade. Isto permite uma boa mistura e homogeneidade, ao mesmo tempo que reduz a probabilidade de segregação durante o manuseio. Misturas líquidas também são possíveis de se obter, mas a compatibilidade do produto intermediário é de grande importância para evitar a criação de produtos instáveis.

### Extra 2: Processo a jusante: diferenças na obtenção de enzimas intra e extracelulares

#### 1. Enzimas intracelulares:

- **Processo:** para enzimas intracelulares, apesar do sistema de fermentação ser semelhante ao utilizado em enzimas extracelulares, o processo a jusante é consideravelmente mais complexo. Isto porque a permeabilização celular torna-se importante em alguns, para ocorrer a liberação das enzimas de interesse e sua posterior purificação. A alimentação do sistema com substâncias específicas pode proporcionar um sistema contínuo, com separação de uma parte das células para a extração de enzimas. Em outros casos, as enzimas desejáveis podem estar aderidas à parede celular ou à membrana interna das células, e podem ser diretamente isoladas utilizando-se um sistema de imobilização celular.
- **Importância:** as enzimas intracelulares têm recebido grande atenção nos processos industriais por conta das reações catalisadas serem mais específicas e seletivas.
- **Aplicações:** utilizada em sistemas de diagnóstico, reações de biotransformação altamente específicas, indústrias de química fina e farmacêutica.

#### 2. Enzimas extracelulares:

- **Processo:** a recuperação de enzimas extracelulares está associada a um processo mais geral e menos complexo, sendo bem representada pelas etapas discutidas ao longo do processo a jusante.
- **Importância:** grande parte das enzimas utilizadas na indústria de alimentos é de caráter extracelular.
- **Aplicações:** são importantes para uma grande diversidade de processos e produtos.

### Obtenção de enzimas

- **Fontes de enzimas:** são provenientes de fontes naturais, como extração de vegetais, animais e obtidas pela fermentação microbiana. Porém, a produção de enzimas com base na extração de fontes animais e vegetais é muito limitada, pois está relacionada a uma série de inconvenientes: matérias-primas limitadas, baixo conteúdo de enzimas e custo elevado.
- **Obtenção de enzimas microbianas:** apresenta uma série de vantagens, pois o processo pode ser mais controlado, as matérias-primas serem mais padronizadas e baratas.
- **Processo geral:** isolamento e crescimento da linhagem, fermentação em meio específico, recuperação da enzima, purificação e formulação final.
- **Fermentação:** etapa mais importante para a produção de enzimas.
- **Processos envolvidos:** fermentação semissólida (permite grande flexibilidade de escala e simplicidade da planta básica de produção) e fermentação submersa (mais empregada industrialmente, oferece menor risco de contaminação, menor necessidade de espaço e apresenta maiores rendimentos).
- **Operação do sistema:** sistema contínuo, batelada, batelada alimentada (a forma mais empregada para produção industrial de enzimas).

## Engenharia genética e o impacto na produção de enzimas

Como será estudado no capítulo 19, desde a década de 1980 as empresas produtoras de enzimas têm utilizado a engenharia genética para melhorar a eficiência e qualidade de produção, e no desenvolvimento de novos produtos.

O advento da tecnologia de DNA recombinante abriu um vasto leque de possibilidades para melhorias nos métodos de produção de enzimas empregadas na indústria de alimentos. Conforme veremos no capítulo 18, a vantagem mais evidente desta tecnologia é a possibilidade de transferência de

genes de qualquer micro-organismo, planta ou animal, para um organismo hospedeiro e a melhoria de diversas linhagens produtoras.

Os aspectos de segurança e aprovação relacionados ao desenvolvimento de uma nova linhagem produtora são considerados tão importantes quanto os aspectos técnicos envolvidos no sistema de expressão. Diversas questões relacionadas a um sistema de expressão, entre outras, podem ser abordadas do ponto de vista regulatório, como:

- A linhagem hospedeira tem um histórico seguro de uso?
- O hospedeiro é capaz de produzir metabólitos tóxicos?
- O sistema é baseado na secreção de enzimas extracelulares ou acumulação intracelular?
- A linhagem é esporulada e isto deve ser considerado?

Estas considerações são de grande importância para a elaboração de um processo completo de produção de enzimas. O histórico de uso seguro e sua capacidade ou não de produzir metabólitos tóxicos são cruciais para que o produto possa ser reconhecido como GRAS (*generally regarded as safe*), ou seja, como seguro, segundo a FDA.

No panorama atual, a engenharia genética tem contribuído e facilitado consideravelmente a produção de enzimas em larga escala, podendo suprir as necessidades da indústria. Além de seu emprego propiciar novas tecnologias de produção, é responsável por aumentar o desempenho e melhorar as propriedades dos catalisadores e reduzir seu custo de produção.

## RESUMO DO CAPÍTULO



- Desde a primeira obtenção de enzimas em escala industrial, os especialistas em enzimologia e biotecnologia passaram a aprimorar e desenvolver novos processos para obtenção de enzimas. O envolvimento de técnicas eficientes e sofisticadas proporciona uma grande diversidade de enzimas produzidas, disponíveis para as mais diversas aplicações na área de alimentos.
- Alguns exemplos dos benefícios oferecidos pelas enzimas foram estudados nesta série de biotecnologia, e o desenvolvimento de técnicas eficientes para sua obtenção tornou-se cada vez mais importante, sendo considerado um processo em constante evolução.
- Além disso, devemos lembrar que as técnicas mais recentes de engenharia genética e DNA recombinante, voltadas para a obtenção de enzimas, irão permitir que os cientistas possam manipular estas valiosas ferramentas para o benefício da indústria, produtos e consumidores.

## ? QUESTÕES COMPLEMENTARES

- 15.1. Quando ocorreram os primeiros relatos da produção industrial de enzimas e quais os micro-organismos envolvidos?
- 15.2. Por que a produção de enzimas é de grande importância para a indústria?
- 15.3. Por que diversas enzimas industriais são produzidas por micro-organismos modificados? Cite exemplos.
- 15.4. Quais são as três fontes para obtenção de enzimas? Para cada uma, cite três exemplos de enzimas de importância industrial e de onde são obtidas.
- 15.5. Quais as vantagens apresentadas pela obtenção de enzimas microbianas? Quais as dificuldades da extração de fontes vegetais e animais?
- 15.6. Quais as etapas envolvidas em um processo de fermentação microbiana?
- 15.7. Quais as principais diferenças entre o sistema contínuo de fermentação, batelada e batelada alimentada?

- 15.8. Defina um processo a jusante e as etapas envolvidas.
- 15.9. Qual a importância da engenharia genética para o futuro da biotecnologia e para a produção de novas enzimas?
- 15.10. Quais as principais empresas mundiais produtoras de enzimas?

### Sugestões de leitura

Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W. *Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: E. Blucher; 2002. v. 3.

Rastall RA. *Novel enzyme technology for food applications*. CRC Press & Woodhead Publishing; 2007.

Whitehurst RJ, Van Oort M. *Enzymes in food technology*. Wiley-Blackwell Publishing; 2010.

### Bibliografia



1. Bon EPS, Pereira-Júnior N, Gottschalk LMF, Sá-Pereira P, Roseiro JC, Ferrara MA. *Bio-processos para produção de enzimas*. Em: *Em Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado* (Ed: Bom, EPS), Interciência. Capítulo 5, pag. 95-122.
2. Aehle W. *Enzymes in industry*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
3. Wood BJB. *Microbiology of fermented foods*. Blackie Academic & Professional; 1998.
4. Polaina J, MacCabe AP. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Springer; 2007.