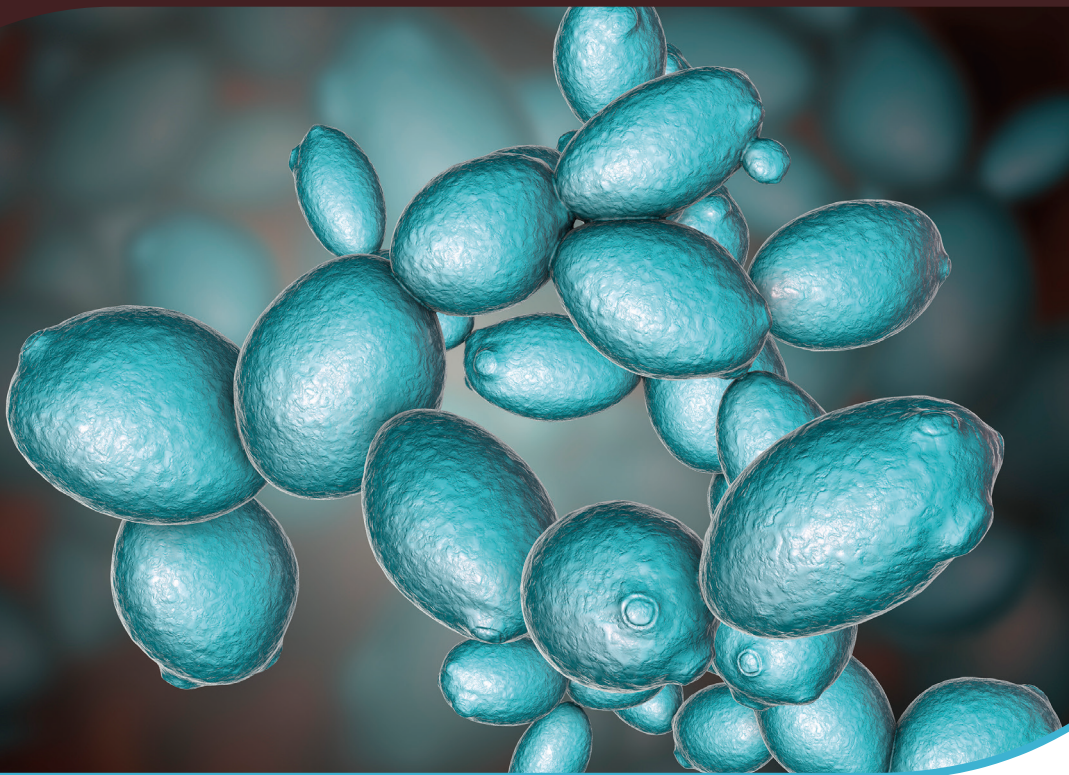


MICHELE VITOLO

BIOTECNOLOGIA APLICADA

Enzimas na tecnologia de alimentos



Blucher

Michele Vitolo

BIOTECNOLOGIA APLICADA
Enzimas na tecnologia de alimentos

Biotecnologia aplicada: enzimas na tecnologia de alimentos

© 2024 Michele Vitolo

Editora Edgard Blücher Ltda.

Publisher Edgard Blücher

Editores Eduardo Blücher e Jonatas Eliakim

Coordenação editorial Andressa Lira

Produção editorial Ariana Corrêa

Preparação de texto Ana Lúcia dos Santos

Diagramação Guilherme Salvador

Revisão de texto Elaine Cristina Nicolodelli

Capa Laércio Flenic

Imagem da capa iStockphoto

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar

04531-934 – São Paulo – SP – Brasil

Tel.: 55 11 3078-5366

contato@blucher.com.br

www.blucher.com.br

Segundo o Novo Acordo Ortográfico, conforme 6. ed. do *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, Academia Brasileira de Letras, julho de 2021.

É proibida a reprodução total ou parcial por quaisquer meios sem autorização escrita da editora.

Todos os direitos reservados pela Editora Edgard Blücher Ltda.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Angélica Ilacqua CRB-8/7057

Vitolo, Michele

Biotecnologia aplicada : enzimas na tecnologia de alimentos / Michele Vitolo. – São Paulo : Blucher, 2024.

304 p. : il.

Bibliografia

ISBN 978-85-212-2108-1

1. Alimentos – Biotecnologia 2. Tecnologia dos alimentos 3. Enzimas I. Título

23-6378

CDD 660.6

Índice para catálogo sistemático:

1. Alimentos – biotecnologia

Conteúdo

1. BIOTECNOLOGIA: ALIMENTOS E ENZIMAS	13
Resumo	13
1.1 Introdução	14
1.2 Interesse empresarial	28
1.3 Mercado biotecnológico	32
1.4 Alimentos e enzimas	33
1.5 Perspectivas	43
1.6 Conclusão	43
2. FUNDAMENTOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA	45
Resumo	45
2.1 Introdução	45
2.2 Especificidade	46
2.3 Atividade enzimática	47
2.4 Uso industrial de enzimas	57
2.5 Perspectivas	59
2.6 Conclusão	59

3. FUNDAMENTOS DA IMOBILIZAÇÃO	61
Resumo	61
3.1 Introdução	61
3.2 Tipos de imobilização	62
3.3 Suportes	73
3.4 Efeitos causados pela imobilização	74
3.5 Vantagens e desvantagens da técnica de imobilização	78
3.6 Aplicações	78
3.7 Perspectiva	86
3.8 Conclusão	86
4. FONTES E PRODUÇÃO DE ENZIMAS	89
Resumo	89
4.1 Fontes de enzimas	89
4.2 Produção de enzimas	91
4.3 Processos de <i>downstream</i>	93
4.4 Operações Finais	101
4.5 Perspectiva	105
4.6 Conclusão	105
5. MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO AMIDO	109
Resumo	109
5.1 Introdução	110
5.2 Panificação	111
5.3 Produção de xaropes	131
5.4 Perspectivas	146
5.5 Produção do amido	147
5.6 Conclusão	151
6. USO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE SUCOS DE FRUTA	157
Resumo	157
6.1 Introdução	158

6.2 Parede celular e substâncias pécticas	158
6.3 Frutas que fornecem sucos de interesse comercial	159
6.4 Enzimas	160
6.5 Processamento de frutas para obtenção de sucos	165
6.6 Perspectivas	174
6.7 Conclusão	175
7. USO DE ENZIMAS NA INDÚSTRIA DE BEBIDAS	179
Resumo	179
7.1 Introdução	180
7.2 Bebidas alcoólicas destiladas	181
7.3 Perspectivas	205
7.4 Conclusão	206
8. MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS	211
Resumo	211
8.1 Introdução	212
8.2 Proteases	212
8.3. Perspectivas	236
8.4 Conclusão	237
9. USO DE ENZIMAS EM LATICÍNIOS	241
Resumo	241
9.1 Introdução	242
9.2 Queijos	244
9.3 Enzimas	245
9.4 Perspectivas	259
9.5 Conclusão	259
10. APLICAÇÕES DIVERSAS DE ENZIMAS	263
Resumo	263
10.1 Introdução	263

10.2 Solubilização de sólidos do chá	264
10.3 Remoção de tioglicosídeos	264
10.4 Processamento do açúcar de beterraba	264
10.5 <i>Peeling</i> e remoção da carcaça do camarão	265
10.6 Remoção do dextrênio do açúcar de cana	265
10.7 Adocicamento de frutas (<i>candied fruits</i>)	268
10.8 Desengorduramento de ossos	268
10.9 Formação de aroma e sabor por via enzimática	268
10.10 Óleos comestíveis	270
10.11 Ração animal	271
10.12 Hidrólise da sacarose	273
10.13 Glicose oxidases	283
10.14 Perspectivas	299
10.15 Conclusão	299

CAPÍTULO 1

Biotecnologia: alimentos e enzimas

RESUMO

A biotecnologia consiste no uso de seres vivos em processos industriais. É uma área milenar (o início remonta há seis mil anos) que foi desenvolvida empiricamente até o século XIX, quando os mecanismos envolvidos foram identificados com a atividade microbiana (1870). Em consequência, processos fermentativos não assépticos (até 1950) e assépticos (a partir de 1950) foram desenvolvidos, resultando em inúmeros produtos. A partir de 1972 a biotecnologia sofreu grande avanço com a introdução das técnicas de DNA recombinante, fusão celular e edição do DNA (CRISPR-Cas9). Novos produtos então, surgiram, como insulina recombinante, interferon, esteroides, vacinas, enzimas, anticorpos monoclonais, entre outros. A biotecnologia tem despertado intenso interesse empresarial (com um mercado mundial na casa do trilhão de dólares), impactando vários setores produtivos, como o petrolífero, o alimentício, o de geração de energia alternativa, o farmacêutico, o de reciclagem de lixo e o de silvicultura. A área de alimentos, em particular, tem sido impactada pela disponibilidade de cepas microbianas mais produtivas, bem caracterizadas e geneticamente modificadas, além do uso de enzimas mesófilas e extremófilas no processamento de alimentos. A indústria de alimentos, ao longo do tempo, tem se dedicado ao constante melhoramento e/ou à introdução de novos bioprocessos. Contudo, ultimamente o setor produtivo vem sendo pressionado pela crescente conscientização ambiental das pessoas sobre a obrigatoriedade de se dar destino correto aos resíduos gerados, além da consciência de se usarem processos

que requerem menor consumo de energia. Nesse sentido, a criação de conglomerados funcionalmente articulados (biorrefinarias) tem permitido lidar com a destinação dos resíduos de modo economicamente rentável. De maneira geral, a biotecnologia vem contribuindo com o desenvolvimento da tecnologia de alimentos por meio de quatro vertentes, a saber: melhoramento das fontes de matérias-primas, produção de ingredientes específicos para a indústria alimentícia, satisfação de demandas específicas de mercado e melhoramento de processos. É no melhoramento de processos que as enzimas são relevantes no contexto da tecnologia de alimentos. Dentre as enzimas utilizadas, citam-se amilases, proteases, lipases, glicose oxidase, entre outras. A posição destacada das enzimas na área de alimentos deve-se à não toxicidade, a serem substâncias naturais, à especificidade em relação ao substrato, à estereoespecificidade de ação, à atuação em condições brandas de reação (temperatura e pH), à eficiência catalítica em baixa concentração e à fácil inativação. O regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos está descrito na resolução RDC-54 de 07/10/2014, da Anvisa. A produção de alimentos para humanos e *pets* é regida por legislações rigorosas, aplicadas pelos diversos países. A legislação para alimentos procura enquadrar os aspectos relacionados à composição, ao processamento, à embalagem, à rotulagem e ao marketing dos alimentos. A evolução constante da biotecnologia obriga a legislação sobre alimentos a acompanhá-la *pari passu*. As normas introduzidas devem ser práticas e de fácil verificação. No entanto, o legislador deve propor normas que não inibam a indústria de alimentos de promover o melhoramento e/ou o desenvolvimento de novos produtos.

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 DEFINIÇÃO

A biotecnologia consiste no uso de seres vivos (animais, vegetais ou microrganismos) ou de seus componentes (organelas e biomoléculas) em processos industriais, visando a obter produtos de interesse econômico e/ou social.

1.1.2 BREVE HISTÓRICO

A biotecnologia vem sendo usada pelo homem há milênios na fabricação de cerveja (produzida pelos sumérios e babilônios desde 6000 a.C.), pão (produzido pelos egípcios desde 4000 a.C.), vinho e queijo – há registros sobre a fabricação desses produtos desde 3000 a.C. –, dentre outros.

Sucede que esses produtos biotecnológicos eram produzidos por meio de técnicas artesanais desenvolvidas de modo completamente empírico, desconhecendo-se os mecanismos envolvidos nos processos de fabricação. Com a invenção do microscópio

óptico por Antonie van Leeuwenhoek, no século XVII, foi possível se reconhecerem formas de vida invisíveis ao olho humano, as quais foram genericamente alcunhadas de *microrganismos*. O acúmulo de conhecimentos sobre os seres microscópicos levou Pasteur (1822-1895) à conclusão de que eles eram os agentes responsáveis pela ocorrência dos processos fermentativos.

Com a elucidação do mecanismo do processo fermentativo, surgiram – no período entre a segunda metade do século XIX e a primeira metade do século XX – protocolos para a fabricação de uma diversidade de novos produtos, sobretudo solventes orgânicos (butanol, acetona, etanol, entre outros) e para o melhoramento de produtos tradicionais (queijos, cervejas, pães, vinagre, entre outros). Ressalta-se que, nesse período, os processos fermentativos não eram executados em condições assépticas – no sentido em que no meio de fermentação houvesse somente uma espécie microbiana.

A assepsia na fermentação realizada em grande escala proviria do desenvolvimento dos processos de esterilização ocorrido a partir de 1950. Em decorrência, foi possível produzir antibióticos, esteroides, aminoácidos, vacinas, enzimas, entre inúmeros outros produtos.

O grande avanço na tecnologia de fermentação, no primeiro momento, deveu-se à obtenção de cepas microbianas puras altamente produtivas nos produtos de interesse. Isso foi conseguido por meio do melhoramento genético das cepas selvagens, da introdução de mutações aleatórias no DNA com agentes químicos e/ou físicos e da posterior seleção dos mutantes com as características desejadas. O cruzamento seletivo entre cepas aparentadas, sobretudo da mesma espécie, também foi muito usado para o melhoramento celular. No entanto, a grande reviravolta – ocorrida a partir de 1972 – no melhoramento da capacidade produtiva das células (microbianas ou não) foi o desenvolvimento das tecnologias do DNA recombinante, da fusão celular (hibridoma) e da edição do DNA (CRISPR-Cas9, *zinc fingers* e TALENs) –, as quais constituem a chamada engenharia genética, que possibilitou a introdução de mudanças específicas e planejadas diretamente no DNA celular (Vitolo, 2021a; Waltz, 2015).

1.1.3 O CONTEXTO BIOTECNOLÓGICO

O contexto biotecnológico pode ser visto como um conjunto de técnicas que permitem a modificação pontual do DNA de células procarióticas e eucarióticas, centrada na ação de enzimas – proteínas catalisadoras que participam do metabolismo celular, das técnicas biotecnológicas e dos processos biotecnológicos (fermentação e cultura de células não microbianas) (Figura 1.1).

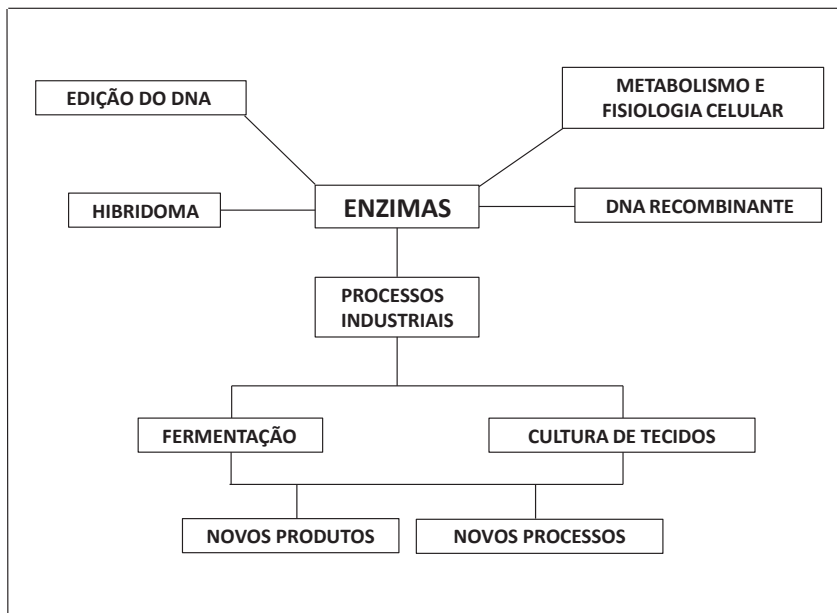


Figura 1.1 – As enzimas no contexto biotecnológico.

1.1.4 PRODUTOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO

Há uma ampla gama de produtos resultantes de processos fermentativos, citando-se, como exemplos antibióticos (penicilina, eritromicina, tetraciclina etc.), proteínas de ação reguladora (insulina, interferon, linfoquinas etc.), esteroides, vacinas, enzimas, ácidos orgânicos (ácido acético, ácido cítrico, ácido glicônico etc.), aminoácidos (lisina, fenilalanina), vitaminas (complexo B), anticorpos monoclonais, entre outros.

Na área alimentícia, os microrganismos são extensivamente usados na produção dos diferentes alimentos fermentados (produtos lácteos, como iogurtes, pré e probióticos; produtos vegetais, como picles, chucrute; e bebidas, como vinho e cerveja). Para esses alimentos, é fundamental dispor-se de culturas microbianas iniciadoras (*starters*) selecionadas, a fim de os produtos se apresentarem isentos de contaminantes microbianos e, sobretudo, possuírem parâmetros organolépticos (sabor, textura, aroma, cor, entre outros) que cativem o gosto do consumidor.

Frente ao exposto, faz-se necessário considerar alguns aspectos relacionados à modificação de microrganismos (bactérias e leveduras), tornando-os mais produtivos nos diferentes processos usados na produção de alimentos.

1.1.5 MODIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DE LEVEDURAS

1.1.5.1 Bactérias

As técnicas de modificação genética visam a obterem-se bactérias melhoradas metabolicamente, objetivando o aumento de rendimento dos processos fermentativos

já existentes ou introduzir neles características inéditas ou, ainda, permitir o desenvolvimento de novos processos.

A escolha da modificação genética a ser empregada está ligada à compreensão das bases bioquímica, metabólica e genética do microrganismo a ser manipulado e ao tipo de produto desejado. Caso o produto seja uma substância química (aminoácido, vitamina, por exemplo) ou enzima, então, faz-se necessária a disponibilidade de uma bactéria que, nas condições ótimas de fermentação (pH, temperatura, agitação, oxigênio dissolvido, composição do meio de cultura etc.), permita obtê-lo em grande quantidade e com alto rendimento. No entanto, se o que interessa é o aprimoramento da atividade metabólica da bactéria como um todo – caso das culturas *starters* –, então, a modificação a ser promovida deve permitir que a célula tenha aprimorada a capacidade de formar um ou mais derivados, os quais possam conferir ao produto qualidades inéditas, capazes de cativar o gosto dos consumidores. Além disso, lembra-se da situação em que uma bactéria deve se desenvolver em um meio inadequado para o seu máximo desempenho metabólico. Por exemplo, um modo de tentar melhorar um alimento probiótico seria o de agregar mais de um microrganismo (caso das chamadas culturas mistas), o qual poderia ter exigências nutricionais ou de cultivo pouco compatíveis com as do outro. Por isso, pelo menos um deles deverá ter seu perfil genético modificado de tal modo a torná-lo adaptado às exigências do meio em que se encontra.

O sucesso do emprego da engenharia genética – quer do tipo aleatório quer não aleatório – para melhorar a fermentação é medido pela aceitação comercial do produto obtido.

A modificação vem sendo tentada por meio da mutação e da seleção de mutantes – caso em que a cepa microbiana é submetida à ação de agente mutagênico físico (radiação UV, por exemplo) e/ou químico (mostarda nitrogenada, por exemplo); ambos agindo aleatoriamente sobre o genoma da célula, favorecendo o aumento da frequência de mutação – ou de técnicas que permitem a troca de material genético (conjugação, transdução, transformação, fusão celular, DNA recombinante e edição de DNA).

1.1.5.1.1 Mutação e seleção de mutantes

Esse procedimento, além de tradicional em microbiologia – usado desde o último quartel do século XIX –, foi o primeiro a fornecer microrganismos com capacidade melhorada na obtenção de metabólitos primários e secundários de interesse comercial.

Comumente, os microrganismos produzem intermediários metabólicos em quantidades suficientes para satisfazer suas necessidades fisiológicas por meio de mecanismos de controle intracelulares rigorosos. Essa situação é inaceitável do ponto de vista de produção em escala industrial, sendo, por isso, necessário eliminar e/ou bloquear vias metabólicas adjacentes àquela que leva ao produto desejado. Como exemplo, pode-se lembrar a produção de lisina por *Brevibacterium lactofermentum*, cujo mutante – desprovido da homoserina desidrogenase (da via de formação da treonina), com o bloqueio simultâneo das enzimas alanina aminotransferase (desvia parte do piruvato

para a formação da alanina) e piruvato descarboxilase (desvia parte do piruvato para formar acetil-CoA, e este composto é consumido no ciclo de Krebs) e com a aspartato kinase não retroinibida por feedback pela treonina (não sintetizada pelo mutante) – passou a produzir cerca de 70 g/L de lisina a partir da glicose usada como fonte de carbono. A cepa selvagem, por sua vez, produzia lisina em quantidade da ordem de miligramas (Tosaka *et al.*, 1983).

Um aspecto pouco lembrado, mas de grande relevância em certos processos alimentícios, seria a maior ou menor resistência de uma cepa bacteriana – por exemplo, cultura *starter* na fabricação de queijos curados – a determinado bacteriófago. Dado que a fabricação de queijos curados é realizada em ambiente limpo, porém, não asséptico, existem no meio, diferentes microrganismos que se desenvolvem junto com a cultura *starter*, podendo gerar e transmitir um bacteriófago inibidor, prejudicando a obtenção do produto. A prática tem demonstrado ser possível isolar mutantes da cepa *starter* resistentes a bacteriófagos a partir do próprio meio. Após o isolamento, os mutantes devem ser avaliados em termos das propriedades inerentes da cultura *starter* (crescimento e multiplicação rápidos, além de alto rendimento fermentativo) e de se a célula mutante descende diretamente da cepa *starter*. Um método conveniente para determinar se um mutante é descendente direto de uma cepa *starter* consiste em se comparar os perfis dos plasmídeos existentes no citoplasma de ambas as células. Culturas starters de queijos curados normalmente possuem de dois a doze plasmídeos, sendo o número e o tamanho médio deles característicos de uma cultura *starter* particular. Assim, um verdadeiro mutante resistente a bacteriófago deve possuir plasmídeos com perfil igual ou muito próximo àquele da cepa original (Coventry *et al.*, 1984).

A obtenção de enzimas de uso industrial, como amilases, proteases e pectinases, naturalmente envolvidas nas vias catabólicas intracelulares, é restrita no caso de a fonte ser uma cepa microbiana selvagem, a qual regula a produção delas, quer por repressão catabólica, quer pela necessidade de uma substância indutora específica, que deve estar presente no meio de cultivo. A mutação, nesses casos, parece ser a única saída plausível para remover a necessidade de um indutor ou desarticular a repressão catabólica. Caso notório é o da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, cuja formação é reprimida pela presença de glicose no meio de cultivo acima de 0,5 g/L (Vitolo, 2019).

A indução e a repressão catabólica podem ser consideradas as duas faces de uma mesma moeda – o controle metabólico intracelular. A indução se caracteriza pelo fato de o gene estrutural, que se expressa em determinada enzima, encontrar-se na forma inativa, quando no meio não houver o substrato da enzima. Exemplos de indutores típicos seriam o amido, a sacarose e a ureia, para, respectivamente, as enzimas amilase, invertase e urease. A repressão, por sua vez, é promovida pela presença de uma dada molécula no meio de cultivo ou que se tenha acumulado no interior da célula por ser um intermediário ou um produto terminal de uma dada via metabólica. Essa substância, geralmente de baixa massa molar – chamada de correpressor –, liga-se a uma proteína intracelular (aporrepressor), gerando um complexo molecular que ao ligar-se ao gene estrutural o desativa.

Ainda com relação às enzimas, lembra-se que muitas delas, para atuarem adequadamente nos processos industriais de alimentos, devem resistir às condições adversas

do meio reacional. Por exemplo, dependendo da modificação desejada da molécula de amido, o processo pode requerer temperatura acima de 70 °C, exigindo a disponibilidade de uma amilase termoestável ou, no caso da modificação de proteína realizada em condições extremas de pH (muito ácido ou alcalino), a qual requer protease estável em uma faixa ampla de pH. Enzimas com características especiais só podem ser obtidas de mutantes microbianos. Atualmente microrganismos extremófilos – naturalmente resistentes a altas temperaturas, altas concentrações salinas e valores extremos de pH – constituem-se em fontes de enzimas resistentes a condições ambientais adversas.

1.1.5.1.2 Intercâmbio genético

A compreensão do intercâmbio genético implica considerarem-se três aspectos complementares, a saber: a organização genética da bactéria, os requisitos necessários para a transferência de genes e as várias opções para executar a transferência.

A maior parte da informação genética da bactéria está codificada no seu cromossomo. No entanto, muitas bactérias possuem em seu citoplasma uma ou mais moléculas de DNA circular independente (plasmídeos) sem homologia com o cromossomo. Os plasmídeos têm as seguintes propriedades: a) replicação independente do cromossomo bacteriano; b) distribuição equitativa entre as células-filhas resultantes da divisão celular; c) mecanismo de funcionamento intracelular ímpar; d) tamanho da ordem de 200 quilobases; e) normalmente conferem à bactéria resistência a antibióticos, íons metálicos e/ou bacteriófagos; fixação do nitrogênio; e controles catabólicos específicos, como a metabolização de açúcares simples (lactose, galactose, entre outros).

Os principais procedimentos de transferência genética em bactérias são:

- a) conjugação – contato intercelular com a troca direta de plasmídeos ou com transferência de DNA cromossômico mediada por plasmídeo. É evidente que só pode ocorrer entre células capazes de reconhecimento mútuo, além de possuírem cromossomos homólogos, ou seja, ambas as células devem ser da mesma espécie, podendo, no máximo, ser cepas distintas. Esse tipo de transferência é útil quando os plasmídeos são transmissíveis *per se* ou os cromossomos das bactérias em interação são sabidamente homólogos;
- b) transdução – a transferência do DNA entre células é mediada por bacteriófago. A quantidade de material genético transferida é limitada pelo tamanho do bacteriófago, resultando, em geral, a transferência de pequenas porções de DNA entre as células;
- c) transformação – a célula hospedeira toma o DNA da célula doadora, o qual será mantido para o processo de recombinação somente se houver homologia entre o DNA de ambas. Se as bactérias interagindo possuírem plasmídeos, eles não participam do processo, ou seja, cada um permanece na célula original. A transformação se constitui em uma etapa importante da técnica do DNA recombinante, justamente aquela na qual a molécula de DNA recombinante é introduzida na célula receptora;

- d) fusão celular – mistura de células de mesma espécie com as paredes celulares previamente removidas e deixadas em condições de se fundirem. Caso as células parentais possuam cromossomos homólogos, então, é esperada uma intensa recombinação entre os dois DNA. No entanto, se os cromossomos forem heterólogos a recombinação não ocorre, e a célula resultante será instável. Esse procedimento permite a redistribuição do material genético entre mutantes da mesma cepa ou entre cepas parentais muito próximas;
- e) técnica do DNA recombinante – consiste na inserção de pedaço de DNA (homólogo ou não) em um plasmídeo ou vírus modificado (vetor de clonagem) *in vitro*, seguida da introdução do vetor em uma célula hospedeira. O pedaço de DNA transferido é mantido sob controle do vetor de clonagem, o qual é herdado pelas células-filha a cada divisão celular. A questão da homologia que afeta as outras técnicas inexiste nesse caso. Em princípio, não há restrição teórica para a transferência de DNA por essa técnica, embora a estabilidade e a expressão do DNA na célula hospedeira se constituem, muitas vezes, problemas a serem enfrentados. Ressalta-se que essa técnica trouxe como grande vantagem a possibilidade de transferir-se um ou um grupo de genes entre células de organismos pertencentes a qualquer nível da escala zoológica.

As técnicas de transferência citadas foram testadas tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Contudo, deve-se ressaltar que os sucessos alcançados para algumas espécies microbianas não permitem generalizar que elas funcionam adequadamente em outras cepas, até mesmo naquelas do mesmo grupo. Digamos que uma nova cepa tenha sido isolada do meio ambiente, apresentando potencialidade comercial por ser capaz de sintetizar um produto de alto valor agregado. Nesse caso, o melhoramento genético da cepa seria quase que uma consequência obrigatória. Por isso, costumam-se aplicar as mesmas técnicas de transferência genética usadas em cepas aparentadas. Contudo, deve-se atentar para o fato que o plasmídeo natural de uma espécie poderá não ser retido no interior da nova célula hospedeira ou, até mesmo, não se expressar. Essa situação é observada quando se tenta transferir um plasmídeo de bactéria gram-positiva para uma gram-negativa, e vice-versa. Um aspecto a ser salientado refere-se à abrangência aplicativa da técnica do DNA recombinante, a qual, em tese, permite transferir material genético de qualquer organismo para uma bactéria e/ou levedura tida como segura para fins industriais e/ou uso em seres vivos superiores (animais e plantas). Quando a célula modificada geneticamente é usada para obterem-se enzimas, proteínas ou substâncias químicas para uso na tecnologia de alimentos, em geral, não sofre restrição por parte das agências reguladoras, como a Anvisa. Isso decorre do fato de que as substâncias citadas podem ser altamente purificadas. No entanto, se o organismo modificado fizer parte da composição do alimento – por exemplo, culturas *starter* para iogurtes, pró e prebióticos –, então, as restrições de uso são severas, e o produto fortemente controlado pelos agentes de saúde. Praticamente, uma situação dessas só tem respaldo legal se a modificação introduzida no DNA tiver envolvido microrganismos do mesmo grupo e que a transferência genética considerada pode ocorrer em condições naturais entre culturas *starter* aparentadas. Em

que pesem os sucessos e os insucessos dos procedimentos de transferência genética, pode-se citar como sucessos pioneiros o emprego da fusão de protoplastos para aumentar a produtividade em lisina do *Brevibacterium lactofermentum* (Tosaka *et al.*, 1983), o uso de genes clonados produtores de treonina em *Escherichia coli* (Tosaka, *et al.*, 1983) e a clonagem e expressão do gene, que, em ruminantes, produz a quimosina – enzima coagulante do leite na fabricação de queijos –, em *E.coli* (Nishimori *et al.*, 1982). Lembra-se que o melhoramento das culturas *starter* de alimentos fermentados lácteos está sendo direcionado para o aumento da estabilidade e resistência das cepas diante de bacteriófagos, do meio do sistema digestivo humano e compostos presentes na formulação do alimento, assim como aprimorar a atividade metabólica.

1.1.5.2 Leveduras

Sem dúvida, pode-se afirmar que as leveduras, mesmo sem serem individualizadas pelo homem até meados do século XIX, convivem com a humanidade desde tempos imemoriais, fornecendo o etanol – componente das bebidas alcoólicas – e o dióxido de carbono para a fabricação do pão fermentado. Atualmente, o parque industrial, que utiliza leveduras como agentes de transformação, é bastante diversificado, lembrando-se a pujança das indústrias de bebidas alcoólicas destiladas (pinga, rum, dentre outras) e não destiladas (vinho e cerveja), panificação, biocombustível (etanol carburante) e de alimentos à base de leveduras.

Sob o ponto de vista comercial é desejável e, de certa forma, necessário adaptar o desempenho do microrganismo às condições dos processos industriais. No caso das leveduras, isso pode ser conseguido por meio do condicionamento de sua fisiologia ao meio de cultivo e/ou de alterações genéticas. A modificação introduzida pode ser de pequena extensão, o suficiente para a célula melhorar seu desempenho em um processo tradicional ou do tipo radical, em que ela passa a ter propriedades não naturais, visando a utilizá-la em processos industriais totalmente novos. Em qualquer caso, o controle das modificações inseridas na levedura implica o profundo conhecimento de sua biologia e sua bioquímica, assim como da sua propensão às modificações genéticas. Inegavelmente, as leveduras mais bem estudadas – e, portanto, muito bem conhecidas em termos de genética e bioquímica, levando à completa compreensão de suas características de crescimento e de fermentação – são as de panificação e de cervejaria, variantes da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Rocha Filho; Vitolo, 2017).

O melhoramento de cepas de leveduras industriais pode ser feito de várias maneiras, a saber:

a) Cruzamento

Sob condições adequadas, a célula de levedura pode ser induzida à meiose, para formar células haploides, as quais são cruzadas com células haploides de outras variantes de levedura, de modo a obter uma célula diploide contendo genes misturados,

que poderá apresentar características melhoradas em relação às células parentais. Esse procedimento foi originalmente descrito por Fowell (1969) (Figura 1.2). O cruzamento *per se* é de fácil realização em condições de laboratório, porém, os híbridos resultantes são de comportamento metabólico imprevisível, além de ser necessária a obtenção de milhares deles para, depois, tentar-se isolar alguns poucos com as características metabólicas desejadas. Isso se deve à combinação randômica dos genes. Salieta-se que as células industriais têm menor propensão a formar células haploides do que as de laboratório. Essas dificuldades têm sido, às vezes, contornadas usando-se o chamado *cruzamento raro*, que consiste na separação de híbridos presentes em uma mistura altamente concentrada de células vegetativas diploides. No entanto, a combinação do cruzamento raro com a mutação tem possibilitado introduzirem-se características de cepas de laboratório em cepas industriais, sem provocar grandes modificações no perfil genético destas últimas.

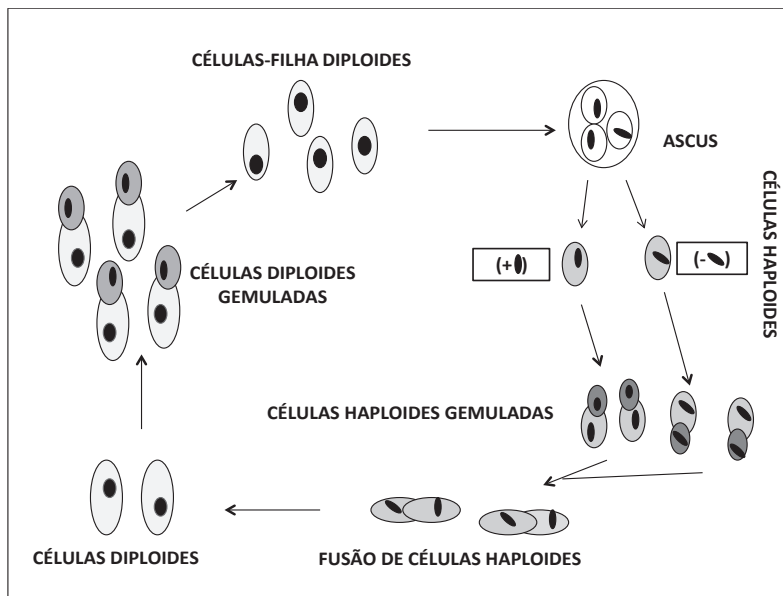


Figura 1.2 – Reproduções sexuada e assexuada de *Saccharomyces cerevisiae*.

b) Fusão de esferoplastos

Essa técnica também permite obterem-se híbridos de levedura com características desejadas, porém, como no caso precedente, a dificuldade da separação de híbridos com as propriedades de interesse também é grande. Associa-se o fato de que os híbridos resultantes da aplicação dessa técnica são muito instáveis – sendo a instabilidade tanto maior quanto menor for o parentesco entre as leveduras fundidas – implicando longas séries de obtenção de subculturas, fazendo com que o tempo de obtenção de uma cepa com reais qualidades para uso em processo industrial seja longo.

c) Mutação seguida de seleção

Essa técnica tem sido pouco usada para o melhoramento de cepas de leveduras industriais, quando comparada ao melhoramento de leveduras de laboratório. Uma razão está na dificuldade de induzirem-se alterações fenotípicas em leveduras industriais, que são, em sua grande maioria, células diploides e/ou poliploides, diferentemente das leveduras de laboratório, em geral, haploides. Para cepas industriais, as condições de mutação a serem usadas são de forte intensidade, o que leva à ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis, como a mutação, ou até mesmo a inativação irreversível, de genes importantes para o metabolismo basal da levedura. A aleatoriedade do processo mutagênico também se constitui em problema grave para a sua plena aplicação. Uma forma de contornarem-se esses problemas seria usar a seleção por meio da pressão ambiental, ou seja, fazer cultivos da levedura em meios adversos, de tal sorte a induzirem-se mutações espontâneas, as quais, por repiques sucessivos em meios de mesma composição, permitem que a população mutante passe a dominar a cultura. Esse procedimento, além de longo, muitas vezes leva a modificações marginais da levedura;

d) Técnica do DNA recombinante

Os princípios da técnica que regem a modificação genética de leveduras são análogos aos aplicados para os organismos em geral. Eles envolvem o isolamento do material genético, sua manipulação *in vitro* e a introdução na célula de levedura de modo que os genes se expressem, dupliquem e se distribuam entre as células-filha durante a divisão celular. O primeiro passo desse procedimento consiste na introdução do fragmento de DNA desejado no interior da levedura hospedeira. Isso pode ser feito, basicamente, por meio de plasmídeos (vetores) ou pela incubação de esferoplastos da levedura a ser modificada (obtidos por remoção da parede celular, por exemplo, usando a lisozima) com solução purificada do DNA em presença de polietilenoglicol (facilita a passagem das moléculas de DNA através da membrana citoplasmática) ou cloreto (ou acetato) de lítio. O uso do sal de lítio permite que o DNA entre na levedura hospedeira sem a necessidade de controlar a pressão osmótica do meio, ao contrário do que sucede com o uso dos esferoplastos.

O vetor – geralmente um plasmídeo bacteriano ou vírus (bacteriófago) – é o veículo que permite introduzir na levedura hospedeira um fragmento de DNA, proveniente de uma célula doadora, o qual, uma vez expresso, gera um produto normalmente de interesse comercial. Há situações, no entanto, em que o objetivo não é o de obter um produto específico, mas o melhoramento de alguma característica da levedura (por exemplo, aumento da tolerância ao etanol durante a fermentação alcoólica) (Fontes; Monteiro, 2021).

A característica comum dos vetores para leveduras é a capacidade de mantê-los ativos, quer na levedura, quer na bactéria *E. coli*. Esse tipo de vetor possui pelo menos duas regiões, uma relacionada à replicação, e outra, à resistência a um determinado antibiótico. Um exemplo desse tipo de vetor é o plasmídeo de *E. coli* pBR322 (Bolivar

et al., 1977), que, além das regiões citadas, possui uma sequência de DNA da levedura. Esse tipo de vetor híbrido possibilita realizar a técnica do DNA recombinante em bactérias, organismos mais simples e mais fáceis de manipular. Por exemplo, enquanto o isolamento e a purificação de plasmídeos a partir de levedura são de difícil execução, os de origem bacteriana são bem mais fáceis de se obter, e em grande quantidade. Associa-se a isso o fato de que o procedimento de transformação é bem mais eficiente em *E. coli*, além de a recombinação homóloga ser muito rara, o que torna a meia-vida do plasmídeo *in vitro* bem longa.

Vários são os tipos de vetores disponíveis para a modificação planejada do DNA de leveduras, citando-se como exemplos: YI_p , YR_p , YE_p , YC_p e YX_p (Evans; Attfield, 1989).

O mais simples dos vetores é o chamado *plasmídeo integrado de levedura* (YI_p , na versão em inglês), que permite a inserção de um dado gene diretamente em um cromossomo específico da levedura. Não tem segmento para a origem autônoma da replicação (replicon), pequeno número de cópias, alta estabilidade, e duplica-se junto com o DNA normal da célula. É útil quando se deseja fazer uma mudança genética específica e duradoura no genoma da levedura.

Vetores mais complexos possuem em sua estrutura pelo menos um replicon e genes selecionados da levedura. Quando um vetor possui um replicon, significa que ele é capaz de multiplicar-se independentemente da replicação do genoma normal da célula. Exemplos desses tipos de vetores são o *plasmídeo replicante de levedura* (YR_p , na versão em inglês) e o *Plasmídeo Epissômico de Levedura* (YE_p , na versão em inglês). O YR_p é um vetor que possui como replicon um fragmento de DNA de levedura denominado sequência autônoma de replicação (ARS, na sigla em inglês) e tem como características estabilidade entre baixa e moderada, encontrado dentro da célula hospedeira em número entre 5 e 10 e com alta frequência de transformação. São normalmente usados para se construírem bancos de genes e em trabalhos de clonagem de células. O YE_p , por sua vez, possui como replicon um plasmídeo extracromossômico denominado 2-micron (Botstein; Davis, 1982). Tem como características estabilidade entre moderada e alta e número intracelular de cópias entre 30 e 100. Usado nos casos em que se deseja obter produtos de alto valor agregado. O maior número de cópias por célula apresentado pelo YE_p torna-o mais estável que o YR_p , uma vez que a probabilidade de sua presença nas gêmulas é aumentada.

Uma alternativa para se manterem genes clonados é o emprego do *plasmídeo posuidor de centrômero* (YC_p , em inglês). Pelo fato de o vetor possuir o centrômero, a segregação dos cromossomos entre as células-filha (gêmulas) é altamente eficiente, em que pese seu pequeno número por célula de levedura. Lembra-se que o YC_p possui como replicon o ARS ou o 2-micron, além de ser um vetor bastante estável.

Embora os vetores citados sejam de grande valia para a técnica do DNA recombinante, os vetores de expressão – mais precisamente os *plasmídeos de expressão de levedura* (YX_p , em inglês) – vêm sendo estudados e empregados com intensidade nos últimos anos. Apresentam capacidades de transformação e autonomia similares às do YR_p e YE_p , porém, permitem a expressão incrementada de genes da própria levedura ou de genes provenientes de outras espécies de seres vivos. Os procedimentos

concernentes aos vetores de expressão são, em linhas gerais, a remoção do fragmento de DNA (gene), que se expressa em um metabólito comum da levedura, porém, mantendo as unidades promotora e finalizadora intactas no plasmídeo de partida e a inserção do gene desejado (proveniente da própria levedura ou de qualquer outra célula) no mesmo espaço do gene original removido. A ideia é a de submeter o gene, cuja expressão em um dado produto é desejada, à regulação de transcrição promovida por um promotor específico e de fácil controle. Dentre os inúmeros promotores disponíveis podem ser citados aqueles que controlam a expressão dos genes da fosfoglicerato cinase (PGK, em inglês) e da galactosidase (GALI). O gene PGK é expresso intensamente quando a levedura é cultivada em meio contendo substratos altamente fermentescíveis (glicose, frutose, sacarose etc.). Assim, quando, por alguma razão, deseja-se aumentar a expressão de um gene da própria levedura, mas que está naturalmente submetido a um promotor de forte ação controladora, basta extraí-lo de seu cromossomo original e introduzi-lo no vetor YX_p entre o promotor e o finalizador do gene PGK. Esse vetor, ao ser introduzido novamente na célula de levedura, fará com que o gene, antes de baixa expressão, passe a expressar-se com maior intensidade. O gene GALI, por sua vez, expressa-se intensamente em galactosidase, quando a célula é cultivada em meio rico em galactose. Por isso, quando um gene qualquer é submetido ao controle do gene promotor da galactosidase, ele terá sua expressão inteiramente controlada pela quantidade de galactose presente no meio de cultivo. Ressalta-se que há vetores tipo YX_p portadores de genes promotores que controlam genes, cujos produtos de expressão são expelidos pela célula para o meio de cultivo. Dois dos mais usados sistemas de excreção são aqueles baseados nos genes promotores, que controlam a expressão do gene para a enzima invertase e para o gene formador do fator- α -bacteriano (estimulador do acasalamento entre microrganismos). É claro que esses tipos de YX_p são de grande utilidade quando se deseja produzir grandes quantidades de produtos extracelulares (enzimas, proteínas ou biofármacos).

Evidentemente, a escolha do vetor será função de sua estabilidade, facilidade de manipulação, do tipo de produto desejado e dos entraves regulatórios referentes aos produtos fabricados. Por exemplo, quando se almeja obter produto de alto valor agregado em escala industrial – situação na qual a quantidade de genes inseridos e seu alto grau de expressão são aspectos bem mais importantes do que, por exemplo, a estabilidade absoluta do plasmídeo na célula hospedeira –, o uso de levedura modificada pela introdução de vetores do tipo YR_p e YE_p – ou por vetor derivado YX_p – é praticamente obrigatório.

Dentro do contexto exposto, adquirem grande importância a clonagem e a identificação dos genes de interesse da levedura.

Para a clonagem, o primeiro passo é o estabelecimento de um banco de genes da levedura a serem usados nos procedimentos da tecnologia do DNA recombinante. Em muitas situações, o YR_p , YE_p ou bacteriófago lambda é usado como vetor para clonagem. Sabendo que o tamanho do genoma da levedura é da ordem de 1.4×10^4 kb, relativamente pequeno quando comparado a outras espécies celulares, um banco constituído por cerca de 4.600 clones independentes com inserção média de 15 kb

seria suficiente para representar, no mínimo, 99% do genoma da levedura (Evans; Attfield, 1989; Petes, 1980).

A questão-chave para se estabelecer um banco de genes confiável seria dispor de maneiras eficientes para se detectar a molécula de DNA recombinada, contendo a sequência de um gene específico e de interesse. A detecção pode ser feita de três modos básicos: a hibridização em colônias (no caso do banco ser constituído por plasmídeos) ou em placas (caso do banco ser formado por fago) – nesse método, utiliza-se sonda de DNA contendo átomos radiativos, a qual tem sequência de bases homóloga à do gene de interesse –; a seleção imunológica (baseia-se na detecção de uma proteína específica codificada por um gene, usando o correspondente anticorpo monoclonal); e o do emprego de célula hospedeira mutante incapaz de produzir um metabólito primário fundamental para o seu crescimento, o qual deve estar presente no meio de cultivo.

Do ponto de vista industrial, a engenharia genética vem chamando a atenção para o fato de novos produtos serem obtidos, ou, pelo menos, de aumentar o rendimento de processos já estabelecidos.

A percepção do impacto da engenharia genética na indústria dependerá do tipo de produto fabricado.

À primeira vista, parece lógico que as indústrias que operam plantas de fermentação tradicionais, dentre elas, as destilarias que produzem o etanol (potável, combustível ou de grau farmacêutico/cosmético) e as que produzem fermento (levedura) para panificação, tenham interesse em dispor de cepas de leveduras melhoradas para aumentar o rendimento do processo e o desempenho geral da planta de produção.

Particularizando para o caso das indústrias de fermento e de bebidas alcoólicas (etanol potável), que operam processos fermentativos muito bem estabelecidos há décadas, a adoção de novas tecnologias, sobretudo as que modificam o agente da transformação – a levedura, no caso – passa a ser arriscada. No entanto, a possibilidade de introduzirem-se modificações pontuais na bioquímica da levedura, de tal sorte a eliminar eventuais traços produtivos indesejados (por exemplo, a levedura tornar-se mais resistente a altas concentrações de etanol ou ter a capacidade de flocular, quando a concentração de um nutriente do meio de cultivo atingir um dado valor mínimo, facilitando a separação das células do meio fermentado), não é uma perspectiva a ser descartada. No caso do fermento de panificação, seria desejável obterem-se cepas de levedura, por meio da engenharia genética, que tivessem vida de prateleira aumentada, quando comercializadas na forma prensada, poder fermentativo melhorado – acelerando o crescimento e o amaciamento da massa para a fabricação de pães – e, finalmente, ser produzidas em maior concentração associada à exaustão completa dos nutrientes constituintes do meio de cultivo (mosto). Para a consecução desses efeitos, a modificação genética introduzida deve envolver alterações no metabolismo central da célula.

Um exemplo importante para o emprego de levedura alterada geneticamente seria em cervejaria, visando-se a produzir cerveja de baixa caloria – entenda-se,

bebida com baixo teor de carboidratos. O mestre cervejeiro, para conseguir esse efeito, procura modificar a constituição do mosto, antes de proceder ao *mashing*, substituindo parte do malte por xarope de açúcar simples (glicose, frutose, dentre outros) ou aumentar a quantidade de enzimas amilolíticas, visando-se a intensificar a hidrólise do amido, sendo os açúcares resultantes fermentados pela levedura não modificada. A modificação genética na levedura consistiria em torná-la capaz de formar a glicoamilase, enzima secretada durante a fermentação para a hidrólise de carboidratos, cujos açúcares redutores resultantes – principalmente glicose – são prontamente metabolizados pela levedura. No entanto, a glicoamilase gerada pela levedura deve ser termolábil, para que possa ser inativada durante a pasteurização do produto, haja vista que sua presença no produto tornará a cerveja mais adocicada do que o desejável. Além disso, o fato de a levedura ter sido modificada geneticamente poderia impedir que recebesse o status GRAS (sigla para o termo anglófilo *generally recognised as safe*), o que tornaria a cerveja não comercializável. De qualquer forma, quaisquer que sejam as modificações introduzidas na levedura cervejeira, elas não podem, em hipótese alguma, perturbar o metabolismo central de carbono e nitrogênio do microrganismo.

Ressalta-se que, no caso da produção de etanol combustível, as modificações genéticas introduzidas na levedura não afrontam a legislação. Por conseguinte, atualmente são disponibilizadas leveduras capazes de sintetizar celulasas e/ou xilose isomerase, permitindo o uso de materiais lignocelulósicos, como mostos para a produção desse tipo de biocombustível – que, inclusive, vem sendo chamado de álcool de 2ª geração, desde que se considere o etanol obtido do melaço e do caldo de cana como sendo de 1ª geração, simplesmente pela sua produção ter sido desenvolvida antes.

Além dos produtos principais citados, há outros que podem ser obtidos da levedura residual de destilarias e que podem ter sua produção melhorada por meio da modificação do seu genoma. Alguns exemplos importantes seriam o aproveitamento dos ácidos nucleicos, a obtenção de enzimas (invertase, lactase, dentre outras) e a obtenção de células ricas em β -glicana – polissacarídeo localizado na parede celular da levedura, perfazendo de 12 a 14% de sua massa seca; homopolímero da glicose, no qual as moléculas da hexose são unidas em cadeias lineares por ligações osídicas $\beta(1-3)$ e que, a espaços regulares, emitem ramificações por meio de ligações osídicas do tipo $\beta(1-6)$, as quais se intercalam entre as cadeias principais, formando ligações cruzadas. A importância de se dispor de β -glicana com diferentes graus de ligações cruzadas reside no fato de que suas propriedades viscoelásticas são diferentes, possibilitando seu uso como suportes para colunas cromatográficas, na confecção de cápsulas para a veiculação de drogas e aromas – inclusive nos casos em que a liberação controlada delas é desejada – e como espessante em formulações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

Enfim, o desempenho do microrganismo geneticamente modificado em um biorreator industrial é função direta do percentual de células modificadas capazes de reter o gene recombinante ao longo da duração do processo. Em outras palavras, o sucesso do emprego do microrganismo modificado depende, em maior ou menor grau, da

estabilidade – entendida em termos de frequência de perda durante a produção da capacidade funcional do DNA incorporado à célula – do material genético introduzido. Assim, uma frequência alta de perda contribuiria para aumentar o custo global do processo, haja vista ser necessária uma renovação mais frequente das células modificadas – implicando muitas vezes a interrupção do processo fermentativo – ou a condução do processo com rendimento inferior ao desejado. Deve-se, no entanto, considerar o propósito de produção da empresa que utiliza a levedura como agente de transformação principal. Caso ela utilize a levedura, por exemplo, para produzir etanol ou cerveja, o interesse mais provável de usar levedura geneticamente modificada é o de tornar a cepa mais produtiva (mais resistente a concentrações de etanol acima de 20% (v/v), por exemplo). Nessa situação, a proteína codificada pelo gene introduzido só é necessária em quantidades metabólicas; por isso pequena quantidade de vetores, contendo o gene de interesse, distribuídos entre as células em fermentação já seriam suficientes. Todavia, se a modificação genética visa a fazer com que a levedura produza um composto que, normalmente, não produz (por exemplo, interferon e interleucina-2 humanas), então, muitos vetores com o gene específico são requeridos. Ou seja, as células devem ter boa capacidade de retenção do DNA estranho durante a fermentação.

1.2 INTERESSE EMPRESARIAL

1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS EMPRESAS BIOTECNOLÓGICAS

As empresas biotecnológicas, em linhas gerais, apresentam várias características notórias, a saber: mão de obra não intensiva, diversificada e intelectualizada, manipulação de materiais renováveis e recicláveis, empresas de porte pequeno ou médio, uso de processos que requerem pouca energia, gerenciamento específico (deve considerar obrigatoriamente: as leis particulares que regem o setor, a reação do consumidor, segurança [riscos à saúde e ao meio ambiente]), risco financeiro alto, produtos de vida média de mercado curta, P&D continuado e capital inicial elevado com perspectivas de retorno a médio ou longo prazo (Vitolo, 2021b).

1.2.2 EXEMPLOS DE SETORES ALTAMENTE IMPACTADOS PELA BIOTECNOLOGIA

Entre os setores industriais que têm sofrido maior impacto com o desenvolvimento da biotecnologia, estão: a produção de alimentos, a substituição de derivados de petróleo, geração de fontes de energia alternativa, reciclagem do lixo, controle da poluição, silvicultura, síntese de fármacos e áreas médica e veterinária.

A título de exemplo, comparam-se o comportamento dos setores químico-farmacêutico e o de alimentos frente às inovações da biotecnologia. O setor de alimentos

considera a biotecnologia como oportunidade para reduzir custos, melhorar processos, não se ater às questões de patenteamento e investir, no máximo, 1% do lucro no desenvolvimento de bioprodutos. Nesse último caso, prefere investir em empresas biotecnológicas emergentes e, somente quando um bioproduto apresentar viabilidade econômica segura, as empresas desse setor envolvem efetivamente na sua produção, venda e/ou utilização. A indústria químico-farmacêutica, por sua vez, compromete-se mais intensamente com os avanços da biotecnologia, despendendo em pesquisa e desenvolvimento, no mínimo, 10% das vendas. O desenvolvimento de tecnologia, a ênfase extremada nas propriedades e qualidades do bioproduto a ser produzido e o grande interesse na valorização e respeito ao patenteamento dos bioprodutos constituem-se, também, objetivos prioritários para esse setor.

A indústria de alimentos ao longo do tempo tem se dedicado ao constante melhoramento e/ou à introdução de novos bioprocessos. Todavia, nos últimos anos, o setor produtivo vem sendo pressionado pela crescente conscientização ambiental das pessoas sobre a obrigatoriedade de dar destino correto aos resíduos gerados, além de usar processos que requerem menor consumo de energia. Como é do conhecimento geral, a geração de energia também implica estresse ambiental.

Por sinal, o destino a ser dado aos resíduos em geral – incluídos, também, aqueles originados no local de produção das matérias-primas (resíduos celulósicos e análogos, colheitas parcialmente perdidas tanto no campo quanto no armazenamento, transporte e comercialização) e as sobras de alimentos não consumidos pelas pessoas, quer no ambiente doméstico, quer em restaurantes – enseja o desenvolvimento de novos processos baseados tanto na tecnologia tradicional, sobretudo química ou físico-química, como na de natureza biotecnológica. Acrescenta-se que o consumo energético para produzir, processar, transportar e comercializar alimentos é significativo e traz custos extras a todas as etapas da cadeia produtiva. Ressalta-se que, até alguns anos atrás, a indústria alimentícia encarava os desperdícios como consequência inevitável do processamento e que os inconvenientes deveriam ser resolvidos ao menor custo possível, o qual passava pelo descarte direto no meio ambiente, sobretudo em cursos de água vizinhos à fábrica.

A indústria alimentícia, assim como os demais ramos produtivos, não pode se furtar à responsabilidade de minimizar a poluição ambiental, o consumo e o desperdício de água – um bem valioso e de disponibilidade finita no planeta (Figura 1.3) – e as falhas na manipulação dos alimentos e de seus ingredientes, sendo relevante, nesse caso, focar na deterioração, no processamento ineficiente da planta industrial e na perda de nutrientes no efluente. Seguramente, a pressão para que os citados desperdícios sejam evitados provirá da necessidade de maior quantidade de alimentos para a nutrição humana, menor consumo de água tratada, menor volume de efluentes descartados para o meio ambiente, redução de custos de produção e comercialização e da adoção de medidas legais rígidas.

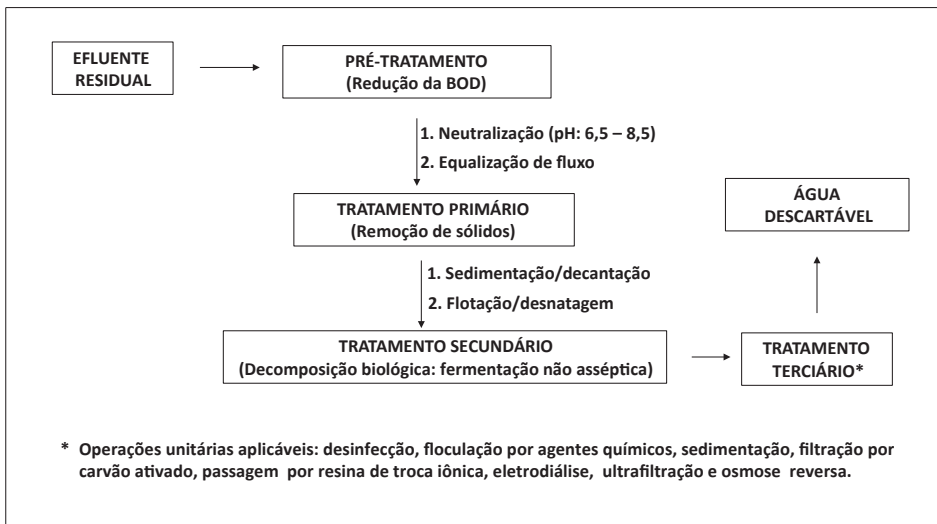


Figura 1.3 – Etapas para o tratamento de efluentes da indústria de alimentos.

Os resíduos (sólidos, pastosos ou líquidos) do processamento de alimentos têm forte influência nos custos de coleta, armazenamento, tratamento e descarte para a empresa, sem contar que o material residual poderá carrear insumos importantes da formulação do alimento processado.

Os resíduos gerados na indústria de alimentos variam tanto na sua natureza quanto nas quantidades geradas, além de variarem em uma mesma planta ou entre plantas similares. A questão fundamental é que os resíduos, muitas vezes, são de geração sazonal, além de altamente perecíveis e, geralmente, inadequados para uso direto na forma em que são gerados. Isso obriga que eles sejam rapidamente tratados e convertidos em materiais ambientalmente inofensivos para descarte ou em subprodutos comercializáveis – por exemplo, a conversão do resíduo em ingrediente para fins de consumo animal. Do ponto de vista do fabricante, o aproveitamento do resíduo só traz interesse quando um subproduto pode ser claramente vislumbrado em termos comerciais ou quando restrições legais severas o obrigam a tomar providências. Nesse último caso, o fabricante dará um jeito de transformar o resíduo em derivado de eventual interesse comercial, mesmo que a custo amortizável, somente dentro do processo produtivo global da planta. Lembra-se que o reaproveitamento eficiente dos resíduos industriais está sendo possível por meio da organização de plantas industriais afins em conglomerados funcionalmente articulados (biorrefinarias).

A importância da recuperação, do tratamento e do emprego de resíduos, particularmente na minimização da sua geração e do seu peso nos custos de produção, envolve o desenvolvimento de tecnologias inovadoras embasadas na biotecnologia – no sentido do melhoramento genético das fontes animal e vegetal e dos microrganismos e enzimas capazes de atuarem na modificação dos resíduos –, na robótica e no emprego de sensores. Os recursos tecnológicos devem propiciar o reaproveitamento do resíduo como

ingrediente do produto ou torná-lo um produto comercializável *per se*. Além disso, melhorias no pré-processamento e/ou no processo em si minimizando, por exemplo, o consumo de água potável, tanto na quantidade total necessária quanto no seu aproveitamento como água de reúso e/ou de reciclo, deve ser perseguido a todo o custo.

Quaisquer processos desenvolvidos para a recuperação ou transformação de resíduos em produtos de interesse comercial devem levar em conta a inconsistência do material em termos de quantidade disponível e natureza de sua composição. Outro aspecto a se considerar refere-se à manipulação do resíduo, a qual poderá ser uma recuperação direta do subproduto desejado (caso da pectina extraída do refugo da maceração da maçã ou da casca de frutos cítricos) ou dever-se-á proceder à conversão de um ou mais ingredientes em subprodutos totalmente diferentes (caso da deslactoseação do soro de leite, na qual a lactose é convertida em glicose e galactose). De qualquer forma, os componentes dos resíduos alimentícios podem ser transformados em proteína unicelular, combustíveis (etanol, metano), produtos químicos entre dezenas de outros.

1.2.3 FATORES QUE AFETAM AS APLICAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA

Caso fosse possível fazer um levantamento global completo dos produtos e processos possíveis de serem comercializados, provavelmente concluir-se-ia que nas gavetas dos grandes laboratórios e empresas de biotecnologia existem muito mais produtos do que aqueles realmente lançados no mercado. A razão para esse freio na biotecnologia comercial proviria de uma série de fatores, a saber: o elevado montante de investimento para desenvolver o bioproduto por parte do setor produtivo, a existência de uma lei de patentes adequada e a seriedade em seu cumprimento (sobretudo em países emergentes), elaboração de estratégias específicas de marketing e comercialização (estritamente dependentes do tipo de bioproduto a ser comercializado), aceitação dos bioprodutos pelos consumidores; e, finalmente, o custo de produção do bioproduto deve ser competitivo diante ao custo de um produto análogo obtido por via não biotecnológica.

1.2.4 SENSIBILIZAÇÃO DO CONSUMIDOR FRENTE AOS AVANÇOS DA BIOTECNOLOGIA

Nos últimos 40 anos, a biotecnologia tem se desenvolvido a passos largos, gerando situações tanto benfazejas quanto alarmantes. Muitas pesquisas de opinião têm sido feitas sobre as grandes questões resultantes do desenvolvimento biotecnológico, a saber: mapeamento do DNA humano, testes genéticos, policiamento por meio da identificação genética, biomedicamentos e eugenia. Concluiu-se que serão necessários muitos e muitos anos para que as opiniões sobre cada uma dessas questões atinjam um grau significativo de consenso.

Apenas pinçando um exemplo atual de exploração dos conhecimentos oriundos do mapeamento do genoma humano, tomemos a chamada nutrigenética, que pretende, por

meio da análise do DNA individual, prognosticar eventuais problemas de saúde e sugerir procedimentos dietéticos para evitar esses problemas ou, na pior das hipóteses, mitigá-los. Por exemplo, há evidências de que a homocisteína estaria relacionada a problemas coronarianos e a derrames; logo, a redução de seu nível corpóreo minimizaria a ocorrência dos citados eventos. A concentração dessa substância no organismo é controlada pela ação da enzima metilenoetetrahidrofolato redutase, que, por sua vez, é codificada por um gene localizado no cromossomo 1. Por conseguinte, pela análise da sequência de bases do gene codificador, segundo algumas empresas de nutrigenética, seria possível prognosticar a probabilidade de a pessoa sofrer derrame ou ser acometida de mau funcionamento das coronárias. Em função do resultado, essas empresas sugerem ao paciente adquirir produtos por elas fabricados, visando-se a evitar as enfermidades citadas.

Na atualidade, tanto o *Food and Drug Administration* (FDA) como os centros para controle e prevenção de doenças enfatizam a ausência de provas científicas cabais para que testes genéticos sejam usados com *segurança* ou *efetivamente* na hora de nortear as escolhas nutricionais. Nos Estados Unidos, o FDA mal regulamenta – quanto à segurança e eficácia – os cerca de mil testes genéticos disponíveis no mercado. Pela lei, o FDA deve aprovar apenas os testes vendidos como kits médicos aos laboratórios clínicos para o diagnóstico, tratamento e prevenção de enfermidades. Os demais testes genéticos, incluindo os nutrigenéticos, são desenvolvidos por laboratórios para uso caseiro e, portanto, dispensam regulamentação oficial. Eles escapam, também, porque desses testes não resultam diagnósticos, mas somente prognósticos.

1.3 MERCADO BIOTECNOLÓGICO

A grande variedade de produtos biotecnológicos (ou simplesmente bioprodutos) pode ser dividida em três categorias, caso seja levado em conta a quantidade comercializada e o valor de mercado, a saber: aqueles vendidos em grande quantidade e a preço baixo (metano, biocombustíveis etc.), em grande quantidade e a preço intermediário (aminoácidos, levedura, enzimas para alimentos, polímeros etc.) e os vendidos em pequenas quantidades, mas a preços elevados (produtos farmacêuticos em geral).

Os bioprodutos podem ser associados aos diferentes segmentos industriais: químico orgânico (metanol, enzimas, ácido cítrico etc.), farmacêutico (vacinas, anticorpos monoclonais, antibióticos, eritropoietina, insulina, hormônios etc.), alimentício (leveduras, enzimas, aminoácidos etc.), agrícola (micorrizas) e de serviços (tratamento de efluentes; equipamentos analíticos, entre outros).

O lançamento comercial de um bioproduto leva, no mínimo, cinco anos, entre a sua concepção e a introdução no mercado. Por exemplo, a produção da insulina de 1978 a 1983, do hormônio humano de crescimento de 1980 a 1990 e da vacina antimalária em estudo desde 1990.

Apesar das dificuldades do desenvolvimento de bioprodutos, a biotecnologia é uma das áreas que mais cresce na atualidade, puxada pelas perspectivas do mercado mundial, que hoje não é inferior a US\$ 3 trilhões.

1.4 ALIMENTOS E ENZIMAS

Focando na tecnologia de alimentos, pode-se dizer que o sucesso dessa área, medido pela enorme variedade de produtos oferecidos nos supermercados, deve-se à convergência perfeita dos aspectos formulação, processamento e embalagem.

O tecnólogo seleciona as matérias-primas adequadas para confeccionar um dado alimento, mistura-as nas quantidades preconizadas na formulação, submete-as a um pré-processamento (lavagem, maceração, cozimento etc.), obtendo, em seguida, uma massa, à qual adiciona os coadjuvantes necessários (acidulante, corante, aromatizante etc.). Após processamento final (cozimento, extrusão, secagem, controle analítico etc.) resulta o produto almejado, o qual é embalado e enviado ao mercado.

A princípio, o setor agropecuário – fonte das matérias-primas alimentícias – recebeu muita atenção no sentido do aumento da produtividade agrônômica em detrimento da melhoria das características da matéria-prima, visando a simplificar o processamento industrial da matéria-prima. Por exemplo, seja o caso do tomateiro, que requer estacas para poder se desenvolver e produzir o tomate, o qual só pode ser colhido manualmente. Para aumentar a produtividade e diminuir o custo da plantação, desenvolveu-se uma variedade de tomateiros baixos, de tal sorte a prescindir do estaqueamento, propiciando colheita mecanizada. Somente nos últimos anos, esforços têm sido direcionados no sentido de obter-se um tomate com maior teor de sólidos solúveis (menos água), visando à economia de energia no processo de produção da massa de tomate para molho.

De um modo geral, pode-se dizer que a biotecnologia vem contribuindo com o desenvolvimento da tecnologia de alimentos mediante quatro vertentes, a saber: melhoramento das fontes de matérias-primas, produção de ingredientes específicos para a indústria alimentícia, satisfação de demandas específicas de mercado e melhoramento de processos.

1.4.1 MELHORAMENTO DAS FONTES DE MATÉRIAS-PRIMAS

Há milhares de anos o homem cultiva plantas e cria animais para a sua alimentação.

Os animais de interesse econômico têm sido aprimorados por meio do acasalamento natural e do uso da biotecnologia. Esta tem permitido o cruzamento planejado pelo transplante de embriões. Os embriões são produzidos *in vitro* pela combinação de espermatozoides e óvulos extraídos dos animais com as qualidades genéticas desejadas, seguida de sua implantação no útero de uma “fêmea de aluguel”. A biotecnologia, por meio da disponibilização de testes de diagnóstico para doenças específicas (kits de anticorpos monoclonais para detectar brucelose, raiva, disenteria bovina, febre aftosa, entre outras) e do aumento da variedade e disponibilidade de vacinas e medicamentos, tem também contribuído na salvaguarda da saúde dos rebanhos (bovino, ovino, suíno, entre outros). A transgenia – introdução, por exemplo, de um gene humano (codificador da proteína do leite humano) em caprinos ou suínos permite que o leite desses animais seja enriquecido com a proteína desejada – está sendo desenvolvida

atualmente, ao contrário da clonagem, cuja factibilidade já foi comprovada, mas que por razões éticas é muito pouco explorada (Vitolo, 2021b).

Os vegetais são matérias-primas para consumo in natura ou após processamento em escala pequena (doméstica e comercial) ou industrial. De qualquer modo, as plantas de interesse econômico têm sido objetos de manipulação ao longo dos milênios.

As modificações introduzidas nas plantas têm como objetivos o melhoramento: a) do cultivar (em termos de rendimento por unidade de área plantada, conseguido pelo aumento da resistência a pragas [soja e milho resistentes a herbicidas] às condições climáticas e ao aprimoramento do processo de colheita [por exemplo, tomateiro de tamanho pequeno que prescinde de estacas de sustentação, permitindo o uso de colheitadeira mecânica]); b) do valor nutritivo e das propriedades organolépticas; c) dos atributos funcionais da matéria-prima (por exemplo, híbridos de milho e trigo com baixo teor de lipoxigenase e distribuição homogênea da amilose no grânulo de amido. Este reduz o “amanhecimento” [amolecimento precoce] do produto de panificação, enquanto aquela dispensa o branqueamento das farinhas).

O melhoramento dos cultivares – que, na prática, pode interferir no valor nutritivo, nas propriedades organolépticas e nos atributos funcionais do vegetal – vem sendo feito por meio de protocolos baseados no cruzamento convencional (realizado desde os primórdios da agricultura) e na modificação gênica – desde 1972 –, usando-se as técnicas do DNA recombinante, hibridoma, dedos de zinco, TALENs (sigla inglesa para transcrição do gene alvo ativador com nucleases efectoras) e CRISPR-Cas9 (sigla inglesa para repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas) (Figuras 1.4 – 1.6) (Voytas; Gao, 2014).

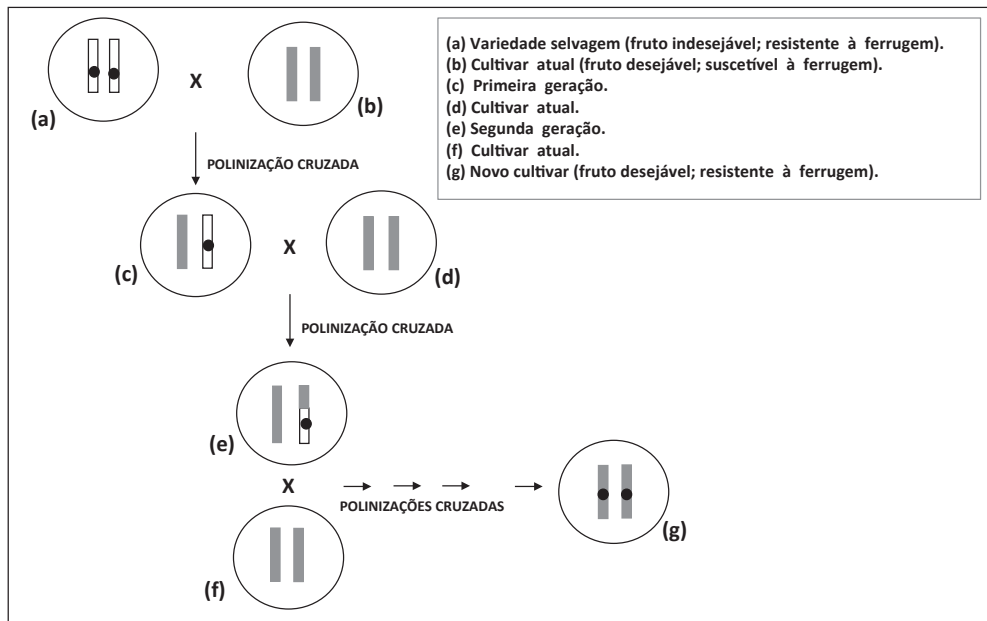


Figura 1.4 – Cruzamento convencional.

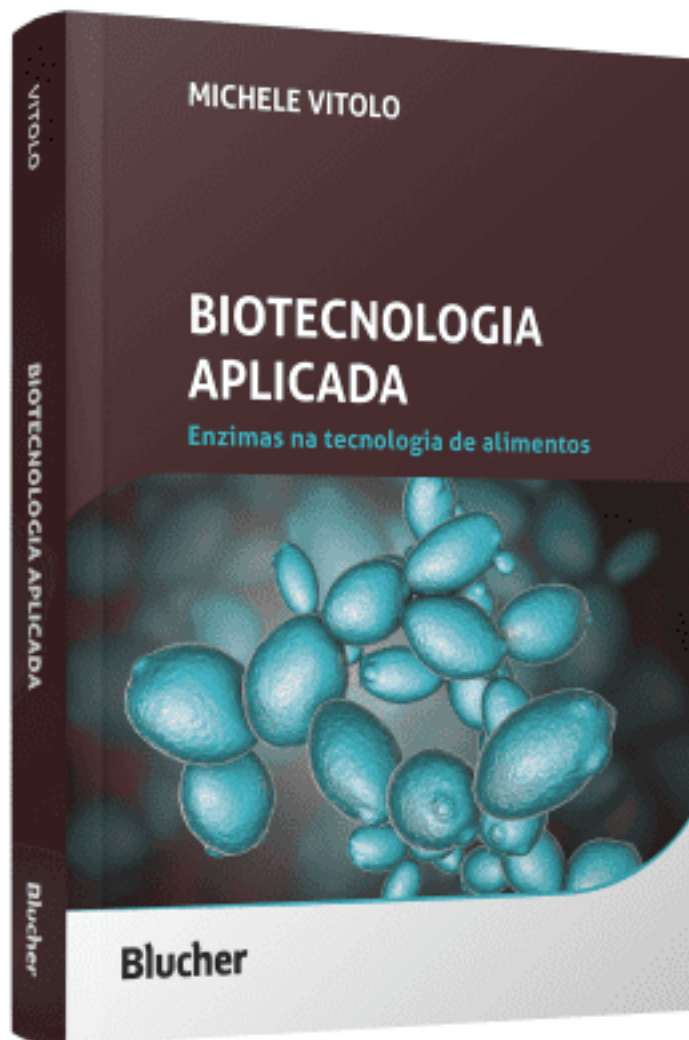
A biotecnologia é uma área do conhecimento que vem sendo desenvolvida ao longo do tempo – dos primórdios da humanidade até a invenção do microscópio óptico (1677), do final do século XVII à década de 1970 (desenvolvimento e controle dos processos fermentativos, invenção das técnicas do DNA recombinante e da fusão celular e aperfeiçoamento do microscópio eletrônico) e dos anos 1970 até hoje (desenvolvimento de equipamentos de imageamento sensíveis, técnicas de corte e reparo do DNA, entre outros eventos). A biotecnologia vem impactando vários setores da atividade tecnológica humana como produção de medicamentos, silvicultura, produção de alimentos, produção de energia e de compostos químicos, entre outros.

Esta obra apresenta o emprego de enzimas nas etapas do processamento de alimentos, nas quais esses catalisadores são indispensáveis ou propiciam ganhos de rendimento de produção. Aborda-se a interação enzima/processamento de alimentos, a qual permite o ensino integrado da enzimologia (básica e aplicada) com a tecnologia de alimentos. Os assuntos são iniciados com uma discussão dos principais aspectos tecnológicos de um dado tipo de alimento (cárneos, bebidas, laticínios etc.), os quais são associados com informações técnicas sobre as enzimas pertinentes a cada caso.

A associação de técnicas de obtenção e uso de enzimas com conceitos básicos de enzimologia, torna este livro uma fonte de estudo acadêmico e/ou de consulta para os diversos profissionais da área (farmacêuticos, engenheiros químicos, engenheiros de alimentos, nutricionistas, tecnólogos de alimentos, entre outros).



Blucher



Clique aqui e:

[VEJA NA LOJA](#)

Biotecnologia aplicada

Enzimas na tecnologia de alimentos

Michele Vitolo

ISBN: 9788521221081

Páginas: 304

Formato: 17 x 24 cm

Ano de Publicação: 2024
