



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



DEPTO. DE EXAMENES Y
EXAMENES PROPRIOS
FAC. DE QUIMICA

ENZIMAS PARA ALIMENTOS EN MEXICO

TRABAJO MONOGRAFICO

que para obtener el título de:

INGENIERO QUIMICO

presenta:

MIGUEL GONZALEZ ORTIZ



México, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Pág.

INTRODUCCION.	1
CAPITULO I. GENERALIDADES SOBRE ENZIMAS INDUST.	2
I.1 Nomenclatura.	3
I.2 Características.	4
I.3 Acción catalítica.	5
I.4 Especificidad.	6
I.5 Composición.	6
I.6 Cinética.	7
I.7 Fuentes.	10
I.8 Obtención y purificación	12
I.9 Preparación de enzimas para uso indust.	13
CAPITULO II. PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS DE IMPORTANCIA EN LA IND. ALIMENTARIA	14
II.1 Amilases.	15
II.2 Invertasas.	17
II.3 Lactasas.	17
II.4 Celulasas.	18
II.5 Pectinasas.	19
II.6 Papaina.	20
II.7 Bromelina.	20
II.8 Ficina.	21

	Pág.	
II.9	Tripsina.	22
II.10	Quimotripsina.	23
II.11	Pepsina.	24
II.12	Penina.	24
II.13	Lipasas.	25
II.14	Glucosa oxidasa.	26
II.15	Catalasa.	26
II.16	Glucosa isomerasa.	27
CAPITULO III. METODOS GENERALES DE PRODUCCION.		28
III.1	Generalidades en la producción de amilasas.	29
III.1.1	Selección del microorganismo.	29
III.1.2	Medio de cultivo.	30
III.1.3	Tipo de cultivo.	32
III.1.4	Extracción y purificación.	33
III.2	Generalidades en la producción de proteasas.	37
III.2.1	Criterios de selección.	37
III.2.2	Selección de los nutrientes y del medio de cultivo.	39
III.2.3	Métodos de cultivo.	41
III.2.4	Purificación.	43
III.3	Descripción de métodos de producción o purificación.	47

	Pág.	
III.3.1	Preparación de α -amilasa.	47
III.3.2	Purificación de β -amilasa.	48
III.3.3	Preparación de glucoamilasa.	51
III.3.4	Producción de lactasa fungal termofílica.	56
III.3.5	Producción de celulasa.	58
III.3.6	Obtención de pectín transeliminasa.	59
III.3.7.	Obtención de papaína cristalina.	62
III.3.8	Preparación de ficina.	63
III.3.9	Preparación de bromelina.	64
III.3.10	Preparación de ϵ -quimotripsinógeno.	65
III.3.11	Cristalización de tripsinógeno.	66
III.3.12	Penina bacteriana.	67
III.3.13	Lipólisis controlada.	69
III.3.14	Producción de glucosa oxidasa.	72
III.3.15	Producción de xilosa isomerasa.	75

CAPITULO IV. VARIABLES EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS

	MICROBIANAS.	80
IV.1	Variables.	81
IV.1.1	Selección del microorganismo.	81
IV.1.2	Desarrollo del microorganismo.	83
IV.1.3	Inductores.	84
IV.1.4	Pureza y rendimiento de la enzima.	85

	Pág.	
IV.1.5	Actividad.	85
IV.1.6	Control de la actividad.	86
IV.1.7	Estabilidad.	86
CAPITULO V. APLICACIONES.		88
V.1	Aplicaciones de amilasas.	89
V.1.1	Industria de jarabes.	89
V.1.2	Industria de la panificación.	91
V.1.3	Sacarificación de macerados en la industria cervecera y de destilación.	96
V.1.4	Manufactura de dextrosa cristalina.	98
V.1.5	Modificación del almidón en comestibles.	101
V.2	Aplicaciones de invertasas.	103
V.2.1	Técnica de fijación de invertasa.	104
V.3	Aplicación de lactasas.	106
V.3.1	Proceso de hidrólisis de lactosa en la leche.	106
V.4	Aplicación de celulasas.	111
V.4.1	Procesado en jugos cítricos para preservar la turbidez.	112
V.5	Aplicación de papaína.	115
V.5.1	Ablandamiento de carnes.	116

V.6	Aplicación de renina.	117
V.7	Aplicación de proteasa microbiana.	121
V.8	Aplicación de lipasas.	123
V.9	Aplicación de oxidorreductasas.	125
V.10	Aplicación de glucosa isomerasa.	132
CAPITULO VI. ASPECTOS DEL MERCADO.		134
VI.1.1	Amilasas	135
VI.1.2	Producción de glucosa de maíz.	139
VI.2	Consumo de celulasa.	146
VI.3	Consumo de pectinasa.	151
VI.4	Importación de invertasa.	154
VI.5	Consumo de papaína en la elaboración de cerveza.	156
VI.6	Importación de proteasas de origen - animal y otras fuentes.	164
VI.6.1	Importación de bromelina.	164
VI.6.2	Importación de pancreatina.	167
VI.6.3	Importación de pepsina, tripsina y - quimotripsina.	170
VI.6.4	Importación de proteasas de otras fuentes.	174
VI.6.5	Importación de cuajo.	176

VI.7	Producción y comercialización.	178
VI.8	Exportación.	182
VI.9	Precios en el mercado.	183
CONCLUSIONES.		186

I N T R O D U C C I O N .

El uso de las enzimas en el procesamiento de alimentos se ha incrementado y diversificado en los últimos años. En este trabajo se mencionan las enzimas que utiliza la industria alimentaria del país y también aquellas que por su importancia representan aplicaciones novedosas en los procesos alimentarios. Se describen las características generales, métodos de producción, aplicaciones y los aspectos del mercado. Con el objeto de proporcionar elementos que orienten los estudios de producción de las enzimas destinadas a la industria alimentaria.

I

GENERALIDADES SOBRE ENZIMAS INDUSTRIALES

Las enzimas hacen posibles todas las reacciones de síntesis o degradación llevadas a cabo en los seres vivos y extractos de materia viviente. Estas digieren la comida, sintetizan tejido y hacen posibles las reacciones que proporcionan la energía necesaria para el movimiento, el pensamiento y la conservación de la temperatura del cuerpo.

Las enzimas industriales pueden definirse como preparaciones manufacturadas para utilizarse directamente como catalizadores en la producción de alguna mercancía.

I.1 NOMENCLATURA. (1)

A las enzimas de importancia industrial se les conoce por su nombre común que adquirieron a partir de la raíz del nombre de la fuente de obtención agregándole la terminación -ina- por ejemplo; papaína (papaya), pancreatina (pancreas). La nominación puede basarse también en el nombre del substrato sobre el cual actúa agregándose la terminación -asa- como por ejemplo; celulasa, lactasa y glucosa oxidasa, que actúan respectivamente sobre la celulosa, la lactosa y la oxidación de la glucosa.

En 1956, el tercer congreso de la Unión Internacional de Bioquímica (U.U.B.) acordó establecer un sistema de clasificación en el que las enzimas quedaron divididas en 6 clases. El nombre que se da a la enzima se deriva de los nombres del substrato, el producto y el tipo de reacción.

1.- Oxidorreductasas: (1)

Son aquellas que participan en las oxidaciones biológicas como la respiración y procesos de fermentación.

2.- Transferasas.

Son las que catalizan la transferencia de grupos con un solo carbono (metilos, carboxilos, etc.) residuos aldehídicos y cetónicos..

3.- Hidrolasas.

Este grupo incluye las esterases, fosfatasas, glicosidasas, peptidasas y otras.

4.- Liasas.

Quitan grupos unidos a sus substratos (sin hidrólisis) y pueden agregar grupos o dobles ligaduras. Entre estas se encuentran las descarboxilasas, aldolasas, deshidratasas, etc.

5.- Isomerasas.

Son enzimas que actúan sobre los isómeros ópticos. Existen racemasas, epimerasas, cis-trans isomerasas, etc.

6.- Ligasas.

Son aquellas que catalizan la unión de dos moléculas (se les conoce como sintetasas).

La designación de la U.I.B. no establece diferencia entre enzimas provenientes de diversas fuentes que catalizan la misma reacción.

I.2 CARACTERISTICAS DE LAS ENZIMAS. (1)

A diferencia de otras entidades químicas las enzimas se caracterizan principalmente por su aspecto funcional. Una enzima se identifica por lo que hace y no por su composición -

química. La habilidad catalítica y la especificidad son las propiedades principales de una enzima y su naturaleza proteica explica que sean fácilmente afectada por los cambios de temperatura, el pH, la fuerza iónica y variables similares.

La molécula de cualquier enzima consiste de una cadena de aminoácidos conocidos, tiene una configuración geométrica particular y forma puntos que son catalíticamente activos. Puede haber uno o más de estos centros en una molécula de la enzima.

I.3 ACCION CATALITICA. (1)

La mayoría de las reacciones en los sistemas biológicos se desarrollarían sumamente despacio en ausencia de la enzima específica.

Esto sucede hasta en las reacciones más comunes como la formación de ácido carbónico a partir de dióxido de carbono y agua, reacción muy importante en la función respiratoria.

La velocidad durante la fase de la reacción depende de la cantidad de la enzima presente, en tanto que la cantidad de substrato se encuentre en exceso y todas las variables del sistema permanezcan constantes. En estas condiciones la velocidad de la reacción aumenta linealmente con la cantidad de enzima, esto es, en presencia de una cantidad doble de enzima, la misma cantidad de substrato requiere de la mitad del tiempo de reacción.

Si la concentración de la enzima se mantiene constante en el sistema, el tiempo de la reacción se ve influenciado por otros factores incluyendo las concentraciones del substrato y del producto, la presencia de activadores o inhibi-

dores, la temperatura y el pH.

I.4 ESPECIFICIDAD. (1)

La mayoría de las enzimas son altamente específicas y catalizan solo una reacción o actúan sobre el isómero de un compuesto en particular. Otras son menos específicas y pueden catalizar diversas reacciones comúnmente relacionadas.

Por otro lado, la misma reacción puede ser catalizada por un buen número de enzimas, diferentes en sus características específicas y producidas por diferentes tipos de células. Ciertas células destacan en la producción de una o pocas enzimas específicas. Las células de glándulas animales y membranas de mucosas, las de algunos tejidos vegetales, semillas, frutas, hojas y microorganismos específicos biosintetizan una o algunas enzimas en gran abundancia.

Estas son las células utilizadas en la producción industrial de las enzimas, agrupadas conforme al grado de especificidad.

- a).- Enzimas absolutas.
- b).- Enzimas estereoespecíficas.
- c).- Enzimas de hidrolización general.
- d).- Enzimas que atacan ciertos puntos de una molécula.

I.5 COMPOSICION Y NATURALEZA QUIMICA. (1)

Todas las enzimas son proteínas, metaloproteínicas o proteínas conjugadas. La parte no proteica se llama grupo prostético o coenzima; la otra parte es la apoenzima y a la combinación de ambos se denomina holoenzima.

I.6 CINETICA. (2)

Postulados:

a).- Una molécula de enzima y una molécula de sustrato se combinan para formar un complejo o compuesto (en algunas ocasiones se pueden combinar más de una molécula de sustrato con una de enzima).

b).- El complejo se rompe reversiblemente, dando una molécula de producto y la enzima original.

a).- La cantidad de la enzima permanece constante.

d).- La cantidad de sustrato ligado a la enzima es muy pequeña comparada con la cantidad de sustrato total presente en la mezcla.

En la mayoría de las reacciones enzimáticas la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de la enzima, al menos durante las primeras etapas de la reacción.

La formación del complejo enzima-sustrato se puede representar por la ecuación (1) y el rompimiento del compuesto en la enzima libre y el producto final por la ecuación (2).



E.- Concentración de la enzima.

S.- Concentración del sustrato.

P.- Concentración del producto.

ES.- Concentración del complejo Enzima-Substrato.

Estableciendo las condiciones de equilibrio se obtiene:

$$K = \frac{(E - ES)(S - ES)}{(ES)} \quad \text{-----} \quad (3)$$

K.- Constante de equilibrio

La ecuación (3) puede simplificarse cuando la concentración del sustrato es muy grande comparada con la concentración del complejo (ES).

Ecuación resultante:

$$K = \frac{(E - ES)(S)}{(ES)} \quad \text{-----} \quad (4)$$

Se considera a la ecuación (2) como el paso determinante de la reacción.

La ecuación de velocidad para el paso determinante quedaría:

$$v = (k) (ES) \quad \text{-----} \quad (5)$$

K.- Constante de velocidad.

v.- Velocidad de reacción.

Despejando (ES) de (4) y substituyendo en (5) queda la expresión:

$$v = \frac{(k) (E) (S)}{K + S} \quad \text{-----} \quad (6)$$

Cuando la concentración del sustrato es grande se tie-

ne:

$$K = \frac{S}{ES}$$

la ecuación (6) se reduce a:

$$v = (k) (E) = v_m$$

donde v_m Velocidad máxima.

Substituyendo en la ecuación (6) el término (v_m) se obtiene:

$$v = \frac{(v_m) (S)}{K + S} \quad \text{-----} \quad (7)$$

En las primeras etapas de la reacción se puede considerar que la concentración del sustrato es constante si este se encuentra en exceso y por lo tanto la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de la enzima. En estas condiciones la reacción sigue una cinética de orden cero y al disminuir la cantidad de sustrato la cinética se vuelve de primer orden, comportamiento que poseen la mayoría de las reacciones enzimáticas.

Expresado en forma diferencial la ecuación (7):

$$\frac{dS}{dt} = \frac{(v_m) (S)}{K + S} \quad \text{-----} \quad (8)$$

Substituyendo. $S = S_0 - (ES)$

donde S_0 Concentración inicial de la enzima unida al sustrato.

Integrando la ecuación (8) se obtiene:

$$\ln \frac{S_0}{S_0 - (ES)} = \frac{(v_m) (t)}{K} - \frac{(ES)}{K} \quad (9)$$

En el caso particular en que (S) es igual a (K) , la velocidad de la reacción (v) es igual a la mitad de la velocidad máxima (V_m) y la constante puede determinarse evaluando la concentración del sustrato (S) a la mitad de la velocidad máxima, esta constante se conoce como constante de Michaelis (K_m) y es igual a K mientras se mantengan las condiciones antes mencionadas.

A la ecuación (9) se le conoce como la ecuación de Michaelis-Menten al substituir (K) por (K_m) . Esta ecuación presenta desviaciones de un 0.08% para valores de $E/S = 0.01$.

En la figura # 1 se muestran las desviaciones del modelo cinético, con diferentes valores de E/S , en la hidrólisis del acetil, 1-fenil, alarín-éster por la quimotripsina.

En el estudio y diseño de reactores donde se llevan a cabo reacciones entre varios sustratos, o bien, están presentes sistemas con varias enzimas que catalizan reacciones en serie o en paralelo, resulta difícil estimar los mecanismos cinéticos que se llevan a cabo. En el caso de utilizar la técnica de enzimas inmovilizadas, los efectos debidos a la difusión controlan la cinética de la reacción.

1.7 FUENTES DE LAS ENZIMAS. (6)

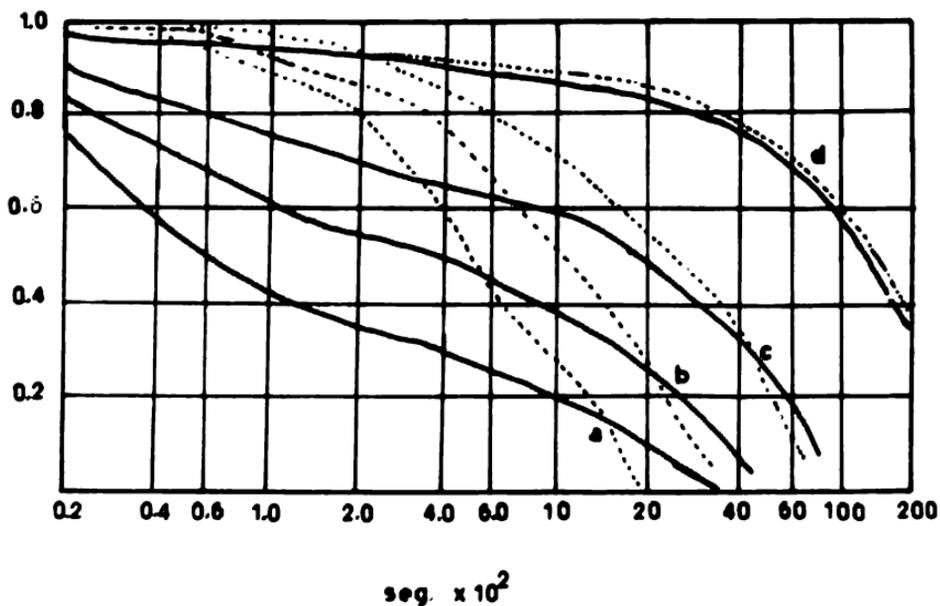
Cualquier organismo vivo es en teoría una fuente potencial para obtener enzimas.

La selección de una fuente barata que contenga suficiente concentración de la enzima de donde puede separarse y purificarse con una pérdida mínima de su actividad es el primer paso importante en su producción. Comúnmente las fuentes bacterianas han resultado ser las más versátiles y de amplia

Fig. 1

Desviaciones del modelo cinético

teórico - - - - -
 experimental ———



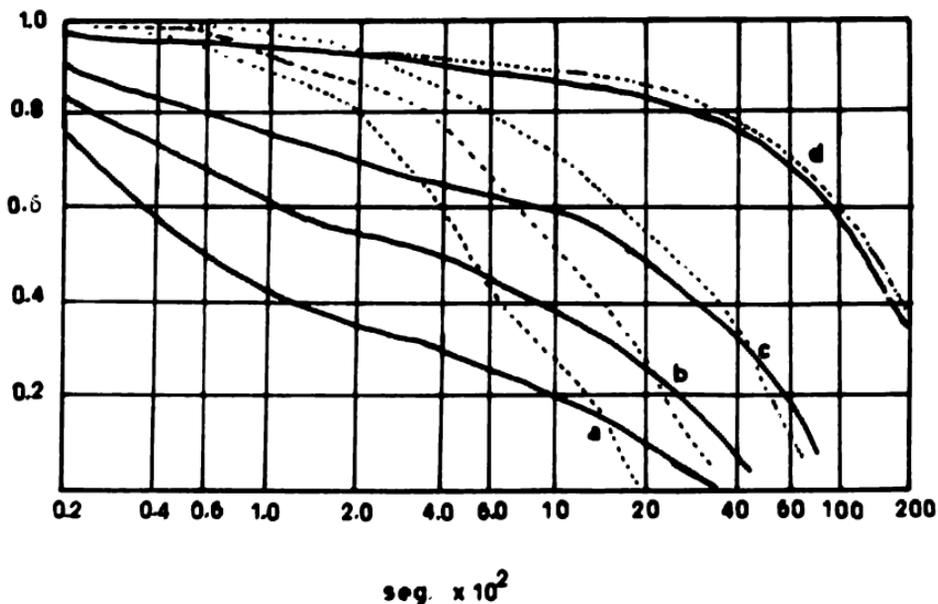
- (a). - $\alpha = 2$
- (b). - $\alpha = 1$
- (c). - $\alpha = 0.5$
- (d). - $\alpha = 0.1$

$$\alpha = \frac{r_p}{r_{p0}}$$

Fig.1

Desviaciones del modelo cinético

teorico - - - - -
 experimental ———



aplicación aunque una buena cantidad de enzimas comerciales se obtienen a partir de tejidos vegetales y animales.

Hasta ahora la única manera de obtener a las enzimas es a través de microorganismos, plantas y animales. Existe la alternativa futura de llegar a sintetizarlas químicamente.

1.8 OBTENCION Y PURIFICACION. (6)

En muchas aplicaciones industriales se utilizan mezclas crudas de enzimas o extractos celulares simples. Ya que el objetivo principal del empleo de procesos enzimáticos radica en el uso de enzimas específicas que catalizan solo las reacciones deseadas son necesarias preparaciones relativamente puras.

Por consiguiente es de especial importancia el empleo de técnicas que permitan la separación y purificación de las enzimas en gran escala, con poca o ninguna pérdida de su actividad.

Los métodos más empleados en las etapas iniciales de separación son: ultrafiltración, extracción, centrifugación, precipitación fraccionada y dialisis. Para lograr la purificación de la enzima los procedimientos subsecuentes pueden ser: técnicas de cromatografía, filtración con gel, intercambio iónico y electroforesis.

El grado de dificultad en el proceso de separación estriba principalmente en el tipo de fuente y en la enzima que se desee aislar.

1.9 PREPARACION DE ENZIMAS PARA USO INDUSTRIAL. (3)

La manufactura de productos comerciales de enzimas es esencialmente la misma, independientemente del origen de éstas (vegetal, animal y microbiano).

El grado de pureza y el uso que se le de al producto de terminan las etapas del proceso de obtención.

Los procedimientos básicamente consisten de:

- a).- Obtener una solución acuosa, por extracción, del material que contiene a la enzima. Algunos productos crudos son estructuras celulares en forma seca o líquida. Ocasionalmente es necesario un tratamiento de activación.
- b).- Eliminar los residuos celulares de la solución por medio de centrifugación, filtración o ambos.
- c).- Precipitar la enzima y secarla con aire o al vacío.

A excepción del secado casi todas las operaciones se llevan a cabo a bajas temperaturas (0-10°C), para disminuir la desnaturalización de la enzima.

Se pueden obtener diferentes variedades del producto, desde mezclas crudas hasta enzimas puras, sacándolas en varios puntos del proceso.

II

PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS DE IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA -
ALIMENTARIA

II.1 AMILASA (4)

Estas enzimas actúan sobre el almidón, glicógeno y poli-sacáridos derivados de estos, hidrolizando los enlaces α -1,4 glucosídicos.

Se conocen tres clases de amilasas: α -amilasas, β -amilasas y glucosidasas.

Las α -amilasas (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa), - se encuentran en plantas, mucosas de mamíferos y microorganismos.

Algunas de las propiedades de las α -amilasas son:

Peso molecular.- 50,000

Coenzima.- Una molécula de Calcio por una de enzima.

pH.- 4.5-7.0

Temperatura de actividad.- 40-50°C.

Las α -amilasas (endoamilasas) rompen los enlaces en el interior de la molécula del sustrato en forma azarosa.

Reacción:

Almidón $\xrightarrow{\alpha\text{-amilasa}}$ maltosa + maltotriosa + dextrinas

Las α -amilasas se ven afectadas en su actividad por - agentes quelatantes del Ca^{++} y metales pesados como; Hg^{++} , - Cu^{++} , Fe^{++} .

- Las β -amilasas (α -1,4-glucan, maltohidrolasa), llamada también amilasa sacarogénica, se encuentra en algunos vegeta

les como en la malta del trigo, cebada, los camotes y el frijol de soya.

Se han cristalizado cuatro β -amilasas, algunas propiedades son:

Peso molecular.- 152,000 (β -amilasas del camote)

pH de actividad óptima.- 5.0-6.0

Temperatura de actividad.- β -amilasa del camote; 60.65°C.

Las β -amilasas hidrolizan al almidón y el glicógeno derivando unidades de maltosa del extremo no reductor de la molécula (exoamilasas). Causando una inversión en la configuración en la posición del carbón anomérico de la glucosa de α a β .

Reacción:

Almidón β -amilasa \rightarrow maltosa + dextrinas

Los grupos sulfhidrilo son esenciales para la actividad de la β -amilasa y los agentes que actúen sobre este grupo inhiben la acción catalítica.

-Glucoamilasa (α -1,4-glucan-glucohidrolasa); esta enzima es diferente de la α y β amilasas porque el producto final de la enzimólisis es la glucosa. Pueden obtenerse de varias especies fungales del grupo *Aspergillus* y *Rhizopus*.

Algunas propiedades de la glucoamilasa son:

Peso molecular.- 68,000 (levadura).

pH de actividad.- 4.0-5.0.

Temperatura de actividad.- 50-60°C.

II.2 INVERTASAS (4)

La hidrólisis de la sacarosa se cataliza por dos tipos de enzimas α -D-glucosidasas y β -D-fructofuranósidasas. A esta última se le han dado los nombres de; invertina, sacara sa y el más común invertasa.

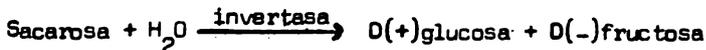
Algunas de sus propiedades son:

Peso molecular.- Intracelular 135,000; extracelular 270,000

pH de actividad.- 3.5-5.5

Temperatura de actividad.- 65-70°C.

Reacción:



Los iones de metales pesados particularmente de Ag^+ - - inactivan reversiblemente a la enzima. También los iones de Zn^{++} surten el mismo efecto formando un dímero

II.3 LACTASAS (4)

Estas enzimas se encuentran en plantas como: almendras, duraznos, chabacanos. También en microorganismos como: el Aspergillus oryzae, Aspergillus foetidus y Saccharomyces fragilis.

Algunas propiedades de las lactasas son:

Peso molecular.- (Escherichia coli) 850,000

pH de actividad.- 7.0 (lactasa bacteriana)

Reacción:



La presencia de iones de metales pesados no parece afectar ni favorecer la actividad de la enzima. Compuestos como el nitrofenil tiogalactósido, galactonolactona inhiben fuertemente a la enzima.

II.4 CELULASAS (4)

Las celulasas (β -1,4-glucan 4-glucanohidrolasas) se han clasificado de tres maneras:

- a).- Las que rompen la celulosa cristalina que algunos autores denominan como factor C_1 .
- b).- β -glucanasas y son de dos tipos exo- β -1,4 y β -1,4-glucanasas; a este factor se le denomina C_x .
- c).- Las β -glucosidasas, que muestran afinidad hacia las porciones moleculares más pequeñas del sustrato.

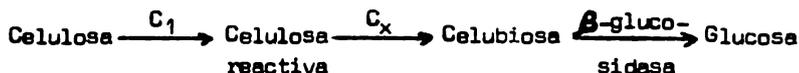
Algunas de sus propiedades físicas son:

Peso molecular.- (Trichoderma viride)	C_1	-----	48,000
	C_x	-----	48,000
	β -glucosidasas	-----	32,000

pH de actividad.- 5.2-5.8

Temperatura de actividad.- 42-47°C.

Reacción:



Las celulasas se inhiben fuertemente por los metales pesados como el Cu^{++} y el Hg^{++} .

II.5 PECTINASAS (4)

Estas enzimas se encuentran en plantas (tomate, frutas, zanahoria, etc.) y hongos (*Saccharomyces fragilis*).

Algunas de sus propiedades son:

Peso molecular.- (tomate) 24,000

pH de actividad.- Poligalacturonasas de plantas --- 4.5-2.5

Metil esterases de plantas ----- 3.3-3.5

Liasas fungales ----- 9.0-9.3

Temperatura de actividad.- Liasas de bacterias --- 35-45°C

Metil esterasa microbiana ~ 50°C

El rompimiento de los enlaces glucosídicos por las polimetilgalacturonasas y poligalacturonasas procede con la adición de agua. Las liasas rompen los enlaces por transeliminación de hidrógeno en la posición del carbón cuatro y cinco.

Algunos cationes como el Ca^{++} , Mg^{++} Y EL NaCl activan a estas enzimas.

II.6 PAPAINA (4)

La papaina, quimopapaina y lisozima son las principales proteasas encontradas en el latex del fruto y árbol del papayo.

Algunas de sus propiedades son:

Peso molecular.-	Papaina -----	21,000
	Quimopapaina ---	36,000
	Lisozima -----	25,000

pH de actividad.- 7.0

Temperatura de actividad.- 70°C.

La papaina es una de las proteasas que poseen un grupo-sulfhidrilo el cual interviene directamente en la acción de la catálisis.

La papaina posee una amplia especificidad, puede hidrolizar pequeños péptidos al igual que proteínas.

La acción de iones pesados o agentes oxidantes inactivan a la enzima.

II.7 BROMELINA (4)

La presencia de una fuerte enzima proteolítica en el jugo fresco de la piña ha sido reconocida desde hace mucho - - tiempo. La enzima se encuentra en el fruto y en el tallo de la planta.

Algunas de las propiedades de la bromelina son:

Peso molecular.- Bromelina del tallo --- 33,200

" " del fruto --- 18,000

pH de actividad.- 6.0-8.0

Temperatura de actividad.- 60°C

La reacción de hidrólisis catalizada por la bromelina - semeja al de la papaína, al igual que en la especificidad - hacia los substratos.

Reacción:



R = Glicina, Lisina, Arginina, Leucina, Tirosina

Siendo una proteasa con grupos sulfhidrilo, la acción de iones de metales pesados y agentes oxidantes inhiben su actividad.

III.8 FICINA (4)

La enzima se obtiene a partir del latex lechoso del higo verde.

Las propiedades de la ficina son:

Peso molecular.- 25,000

pH de actividad.- 3.5-9.0

Temperatura de actividad.- 62.0°C

La forma de la acción hidrolítica de la ficina es semejante a la de la papaína y bromelina. Es una proteasa con -

grupo sulfihidrilo.

II.9 TRIPSINA (4)

La tripsina es una endopeptidasa. Posiblemente es la - proteasa que más se ha estudiado. Se forma en el tracto intestinal por un precursor inactivo denominado tripsinógeno, excretado por el páncreas.

Algunas de sus propiedades son:

Peso molecular.- 23,000

pH de actividad.- 7.0-9.0

Temperatura de actividad.- 37°C

La enzima posee una estrecha especificidad sobre ciertos enlaces péptidos, básicamente los que unen los aminoácidos lisina y arginina.

Consecuentemente la hidrólisis de una proteína da como resultado la formación de fragmentos péptidos relativamente grandes, con terminales carboxílicas de lisina y arginina.

Reacción: (5)



Esta enzima no se inhibe por los reactivos al grupo sulfihidrilo comunes, ni por oxidantes suaves. Se inactiva este químicamente por el diisopropilfosfluorhidrato. También con proteínas naturales como el inhibidor del frijol de

soya, el inhibidor de trigo y el inhibidor del frijol de lima.

II.10 QUIMOTRIPSINA (4)

El jugo pancreático del ganado bovino contiene dos formas distintas de quimotripsina las que se han denominado A y B.

Sus propiedades son:

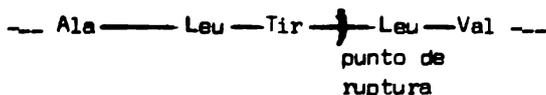
Peso molecular.- 25,300

pH de actividad.- 7.0-9.0

Temperatura de actividad.- 37°C

La quimotripsina actúa preferentemente en los enlaces - cuya parte carboxílica se deriva de aminoácidos que contienen una cadena lateral aromática como la feril alanina y tirosina, o una cadena lateral voluminosa de naturaleza hidrofóbica.

Reacción: (5)



Se inhibe selectivamente con el diisopropilfosfofluorhidrato.

II.11 PEPSINA (4)

La pepsina es una proteasa ácido-gástrica. Se encuentra

en la mucosa estomacal de los animales en forma inactiva a - esta forma se le conoce como pepsinógeno.

Algunas de sus propiedades son:

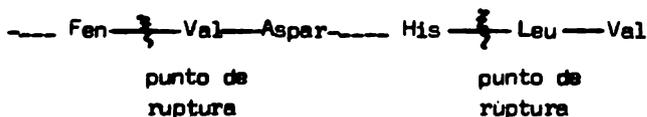
Peso molecular.- 33,000

pH de actividad.- 1.0-4.0

Temperatura de actividad.- 37°C

La acción de la pepsina es de amplia especificidad, actúa preferentemente sobre los enlaces péptidos con cadenas - laterales aromáticas, también hidroliza los enlaces del ácido glutámico, cisteína y sistina.

Reacción:



La polilisina se combina rápidamente con la enzima actuando como inhibidor competitivo.

II.12 RENINA (4)

La renina es una proteasa ácido-gástrica, su utilización en la coagulación de la caseína de la leche para elaborar el queso es de sobra conocida.

La enzima tiene mucha similaridad con la pepsina y se encuentra presente en el cuarto estómago de los becerros.

Las propiedades de la renina son:

Peso molecular.- 31,000

pH de actividad.- 5.0-6.0

Temperatura de actividad.- 40°C

Se supone que la renina convierte a la caseína en p-caseína la cual precipita en presencia de iones de calcio.

El proceso puede separarse en dos etapas, en la primera la caseína se convierte en p-caseína mediante la enzimólisis. En la segunda etapa la p-caseína coagula por la acción del calor en presencia de iones de calcio.

II.13 LIPASAS (4)

Muchos tejidos de órganos y fluidos de mamíferos contienen lipasas. La más conocida de estas enzimas es la lipasa pancreática.

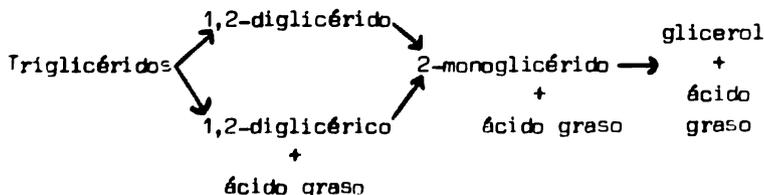
Algunas de las características de la lipasa pancreática son:

Peso molecular.- 48,000

pH de actividad.- 8.0-9.0

Temperatura de actividad.- 30-40°C.

Reacción:



La mayoría de los detergentes aniónicos inhiben la acción de la lipasa pancreática mientras que los catiónicos incrementan la hidrólisis.

II. 14. GLUCOSA OXIDASA (4)

Esta es una de las más importantes oxidoreductasas de origen microbiano en la industria alimentaria.

Algunas de sus propiedades son:

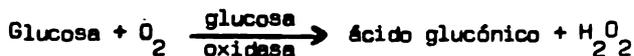
Peso molecular.- 192,000 (*Aspergillus niger*)

pH de actividad.- 4.5-7.0

Temperatura de actividad.- 30-60°C.

Una de las principales características de esta enzima es la estrecha especificidad que muestra sobre la D-glucosa.

Reacción:



Los iones de cobre inactivan a la enzima, también la arabinosa actúa competitivamente como inhibidor.

II. 15 CATALASA (4)

Esta enzima se obtiene de algunos tejidos, de plantas como la hoja de espinaca y algunos microorganismos como el *Aspergillus niger*.

Algunas de sus propiedades son:

pH de actividad.- 7.0 (catalasa del hígado)
 2.0-7.0 (*Aspergillus niger*)
 Temperatura de actividad.- 25°C.

II.16 GLUCOSA ISOMERASA (4)

Muchos organismos han sido identificados como fuentes - de D-xilosa isomerasa conocida también como D-glucosa isomerasa.

Sus propiedades son:

pH de actividad.- 6.5-8.5
 Temperatura de actividad.- 40-85°C.

La glucosa isomerasa requiere de una catión divalente - como Mn, Co, o Mg para manifestar su actividad catalítica.

La isomerización de la D-glucosa a D-fructosa es una - reacción reversible.

Reacción:



La enzima se inactiva con iones de Cu^{++} , Hg^{++} , y Zn^{++} .

III

MÉTODOS GENERALES DE PRODUCCION

III

MÉTODOS GENERALES DE PRODUCCIÓN

III.1 GENERALIDADES EN LA PRODUCCION DE AMILASAS. (4)

En la industria alimentaria, solo unos cuantos microorganismos están considerados como inofensivos por las autoridades sanitarias (no manifestar patogenicidad). Por lo que las empresas fabricantes se han limitado a desarrollar variedades y mutantes de los microorganismos autorizados. Se encuentran patentados cientos de procedimientos por medio de los cuales un cultivo estudiado se llega a modificar de tal manera que logra producir niveles aprovechables de la enzima buscada.

III.1.1 SELECCION DEL MICROORGANISMO (4)

Algunos microorganismos productores de amilasas en forma industrial pueden ser; el *Bacillus subtilis*, *Aspergillus cryzae*, *Aspergillus niger*, *Klebsiella aerogenes*, *Streptomyces*.

Inicialmente se parte de un cultivo crudo donde existe una flora abundante de microorganismos productores de amilasas. De este cultivo se toman varias porciones y se procede a desarrollarlos en diferentes medios (pH y temperatura), abonando los ensayos con nutrientes comunes como el almidón, polisacáridos y sales minerales. Las cepas con mayor rendimiento se apartan y se les sujeta a ciclos reproductivos variando en cada muestra la proporción y composición de los nutrientes, pH y temperatura. El medio de cultivo en esta fase de selección se orienta hacia la identificación de los organismos útiles. El proceso selectivo se continúa, basado en el criterio de rendimiento y estabilidad del cultivo.

Una vez obtenida suficiente información sobre la homogeneidad del inóculo seleccionado y la idea aproximada de la -

combinación de los nutrientes, temperatura y pH. Se procede a obtener la cepa que servirá de pie de cultivo de donde se extraerá la semilla para la fermentación industrial.

Los procedimientos de selección suelen ser enormes inversiones de trabajo y tiempo.

El pié de cultivo debe conservarse y reproducirse en condiciones especiales evitando la contaminación y la degeneración del microorganismo.

Las técnicas de selección de organismos mutantes resultan más laboriosas.

Comúnmente los primeros micelios mutantes producen buenos resultados y se ha observado en los experimentos realizados que en la cuarta o quinta etapa de reproducción solo un pequeño porcentaje de los tamises muestran capacidad sobreproductora de la enzima, por lo que la rutina de selección resulta abrumadora. Sin embargo en microorganismos fungales productores de glucoamilasas mezcladas con transglucosidasas los mutantes derivados mostraron producir solo glucoamilasa lo que resulta muy conveniente en la producción de glucosa.

Las mutaciones se llevan a cabo con radiaciones de luz ultravioleta, rayos X, etc.

Un micelio productor de amilasas se desarrolla en medios que contengan carbohidratos, fuentes de nitrógeno y trazas de sales minerales.

III.1.2 MEDIO DE CULTIVO (4)

Seleccionar el medio de cultivo (sumergido o de super-

ficie) y formular sus condiciones fisicoquímicas, es el aspecto más importante en la producción.

Los nutrientes que debe tener un medio de cultivo en la fabricación de amilasas son:

- Carbohidratos (almidón derivado del maíz, papa, cebada, trigo, soya).
- Nitrógeno, que se proporciona con sales de amonio, proteínas, licor de cocimiento de maíz, extractos de levaduras y residuos de micelios anteriores.
- Sales de fosforo.
- Agentes reguladores del pH como el carbonato de calcio, acetatos, citratos y gluconatos.

Se ha comprobado que la presencia de ciertos compuestos en el medio de cultivo inducen la producción de la enzima de seada. En cultivos de *Aspergillus oryzae* se indujo la producción de isoamilasa.

El medio de cultivo es un sistema complicado y debe modificarse a lo largo de la fermentación altas concentraciones de algunos azúcares (glucosa, maltosa y otros polisacáridos) al inicio del cultivo, perjudican el crecimiento del micelio y disminuyen el rendimiento de la enzima.

En los cultivos sumergidos se recomienda suministrar poco menos de la aereación óptima en las primeras fases de la fermentación.

La regulación del pH en cualquier cultivo se hace con sales de ácidos orgánicos, el control de este factor es determinante para lograr un buen rendimiento de la enzima. Generalmente los valores del pH oscilar entre 6.8-8.3. Aunque-

no existe regla a esta situación. Sin embargo, ya este dentro del rango alcalino o ácido el pH deberá modificarse a lo largo de la fermentación.

III.1.3 TIPO DE CULTIVO. (14)

Los cultivos pueden ser de superficie o sumergidos. Los cultivos de superficie son sólidos, semisólidos o líquidos.- Se efectúan en charolas, platos o tambores rotatorios.

La preparación del medio de cultivo incluye:

- a).- Esterilización del equipo y los componentes del medio - con vapor y sustancias químicas.
- b).- El acondicionamiento de la temperatura (25-35 °c) y de la humedad se hace con aire filtrado, purificado y - humidificado.

Los cultivos sólidos emplean materiales baratos como la cascarilla de maíz, salvado o cebada donde se deposita el inóculo del cultivo. Los períodos de fermentación oscilan entre 30 y 150 horas.

Los cultivos sumergidos son de los más empleados en la producción industrial. Las condiciones favorables en que se lleva a cabo la fermentación da como resultado mayores rendimientos de la enzima.

El tipo de fermentador utilizado es un recipiente cerrado con equipo accesorio de agitación, aereación y enfriamiento. Con la instrumentación adecuada para controlar el pH y el régimen del intercambio de calor.

III.1.4 EXTRACCION Y PURIFICACION (14)

La solución conteniendo a la enzima se filtra del medio de cultivo, prosiguiendo a precipitarla con sustancias como el sulfato de amonio, acetona, caseína o tierras diatomáceas.

El precipitado obtenido se purifica disolviéndose de nuevo, la enzima en solución se recupera mediante procesos de diálisis, ultrafiltración o cromatografía.

Esencialmente todos los procesos de obtención de enzimas semejan en sus procedimientos. La alternativa de la producción microbiana desplaza lentamente a las enzimas extraídas de órganos de animales o vegetales. Las extracciones difieren de los cultivos microbianos, en los inicios del proceso donde se requiere de equipo de maceración y ruptura de paredes celulares (ultrasonido, medios químicos) la etapa de separación y purificación, salvo ligeras variantes, es la misma.

Las fermentaciones microbianas varían en su procedimiento dependiendo del tipo de cultivo o del tipo de enzima (extracelular, intracelular). Aunque el cultivo de superficie es ampliamente utilizado (en especial, en la obtención de amilasas). Los rendimientos logrados en los cultivos sumergidos y la facilidad de controlar a microorganismos contaminantes ha favorecido la preferencia por este proceso.

En el diagrama 2 se muestran las etapas del proceso de obtención, a partir de un cultivo sumergido. (7)

Las esporas o bacterias del cultivo seleccionado provienen de un inóculo (cepas liofilizadas o suspendidas en gel) el cual se nutre previamente en condiciones idénticas a las del tanque de semilla (1).

III.1.4 EXTRACCION Y PURIFICACION (14)

La solución conteniendo a la enzima se filtra del medio de cultivo, prosiguiendo a precipitarla con sustancias como el sulfato de amonio, acetona, caseína o tierras diatomáceas.

El precipitado obtenido se purifica disolviéndose de nuevo, la enzima en solución se recupera mediante procesos de diálisis, ultrafiltración o cromatografía.

Esencialmente todos los procesos de obtención de enzimas semejan en sus procedimientos. La alternativa de la producción microbiana desplaza lentamente a las enzimas extraídas de órganos de animales o vegetales. Las extracciones difieren de los cultivos microbianos, en los inicios del proceso donde se requiere de equipo de maceración y ruptura de paredes celulares (ultrasonido, medios químicos) la etapa de separación y purificación, salvo ligeras variantes, es la misma.

Las fermentaciones microbianas varían en su procedimiento dependiendo del tipo de cultivo o del tipo de enzima (extracelular, intracelular). Aunque el cultivo de superficie es ampliamente utilizado (en especial, en la obtención de amilasas). Los rendimientos logrados en los cultivos sumergidos y la facilidad de controlar a microorganismos contaminantes ha favorecido la preferencia por este proceso.

En el diagrama 2 se muestran las etapas del proceso de obtención, a partir de un cultivo sumergido. (7)

Las esporas o bacterias del cultivo seleccionado provienen de un inóculo (cepas liofilizadas o suspendidas en gel) el cual se nutre previamente en condiciones idénticas a las del tanque de semilla (1).

La cantidad de semilla inoculada al fermentador (III) - influye en el correcto desarrollo de la fermentación, los - cultivos sumergidos requieren de inóculos más pequeños en - comparación con los cultivos sólidos.

La fermentación se efectúa manteniendo siempre los nive - les requeridos de nutrientes, temperatura y pH, y al con- - cluirse se procede a separar el micelio y las partículas en- - suspensión por centrifugación (IV). La solución se bombea a - un tanque de precipitación (V) donde se recupera la enzima - sometiéndola a una segunda centrifugación (VI). En el tanque - mezclador se prepara a la solución enzimática para someterla a los procesos de purificación (VII), (VIII), (IX) (X).

Pueden obtenerse diferentes preparaciones enzimáticas a lo largo del proceso obteniendo formas crudas, puras, concen - tradas o diluídas.

En algunas aplicaciones no se requiere de productos el - borados, y resulta económico el empleo de preparaciones cru - das de la enzima.

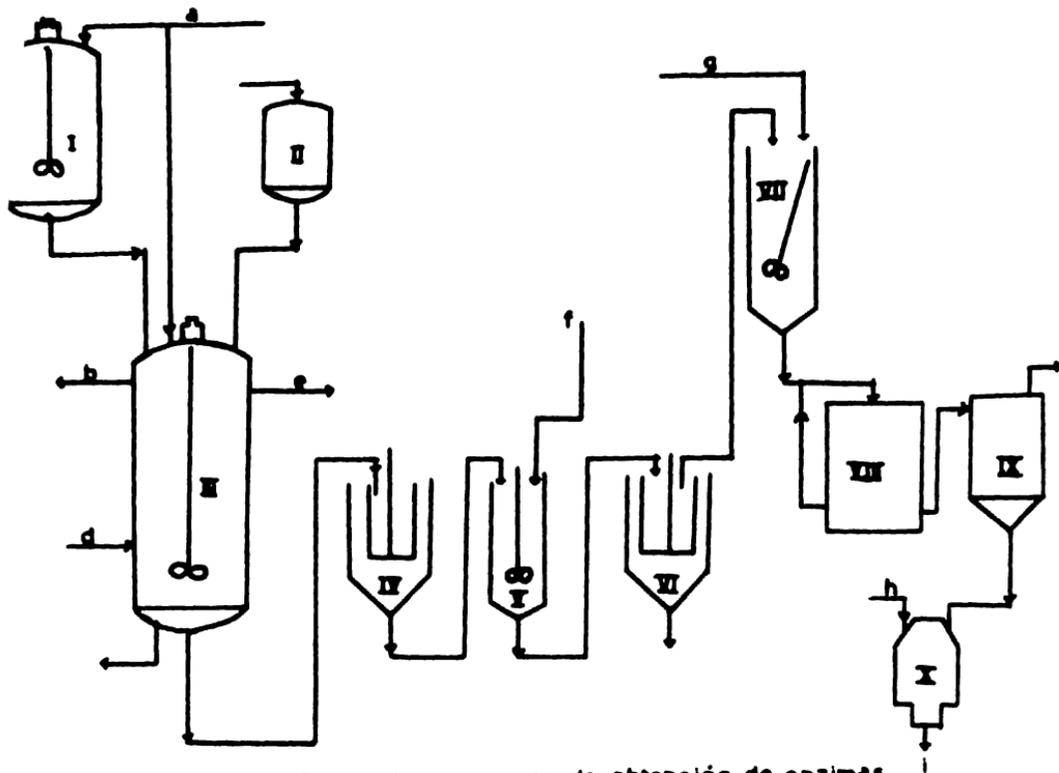
NOMENCLATURA DEL DIAGRAMA DE FLUJO.

- I.- Tanque de semilla.
- II.- Tanque de sustrato.
- III.- Fermentador.
- IV.- Primera centrifuga.
- V.- Tanque de precipitación.
- VII.- Tanque mezclador.
- VIII.- Equipo de purificación (dialización, ultrafiltración - o cromatografía).

IX.- Secador.

X.- Mezclador.

- a).- Entrada de aire purificado.
- b).- Salida de aire.
- c).- Cultivo seleccionado.
- d).- Agua de enfriamiento (entrada)
- e).- Salida del agua de enfriamiento.
- f).- Agentes precipitantes.
- g).- Agua.



Etapas de un proceso de obtención de enzimas a partir de un cultivo sumergido

III.2 GENERALIDADES EN LA PRODUCCION DE PROTEASAS. (4)

III.2.1 CRITERIOS DE SELECCION

En virtud de la baja especificidad de las enzimas proteolíticas, es casi imposible seleccionar organismos que produzcan solo la proteasa deseada, incorporando ciertos compuestos proteicos en el medio de cultivo.

Sin embargo pueden seguirse algunos criterios en la selección de un organismo productor. Por ejemplo; la proteasa ácida, comúnmente producida por hongos, posee un pH óptimo de actividad y estabilidad bajo. Ajustando el medio de cultivo a un pH de 3.0-4.0, las oportunidades de desarrollar solo el organismo productor de la proteasa ácida, se ven favorecidos. Lo mismo puede hacerse en la producción de proteasa alcalina.

El procedimiento de selección puede comenzarse en cultivos de platos, conteniendo proteínas insolubles con poblaciones de microorganismos naturales o con mutantes de alguna cepa en particular.

De acuerdo a Keay y asoc. (1972) la selección de bacilos productores de proteasa alcalina, se hace con cultivos desarrollados en medios diferentes, utilizando como nutrientes mezclas de triptosa-soya-caseínagar, caseínagar sales minerales a diversas temperaturas (25-50°C).

Las rutinas de selección semejan a las mencionadas en la producción de amilasas. Se elige una cepa estandarizada de la cual se conoce; su comportamiento, ingredientes del medio de cultivo, el pH y la temperatura adecuadas. La cepa seleccionada se procede a reproducirla en condiciones donde se conserven sus cualidades de producción y estabilidad.

TABLA 3.1 (4)

RENDIMIENTOS MAXIMOS EN UNIDADES INTERNACIONALES DE PROTEASA

MICROORGANISMO	Temp. (°C)	Proteasa (U/ml)	Tiempo (hr)
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	30	4,150	50
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	30	1,280	48
<i>Bacillus cereus</i> IFO 3215	26	447	69
<i>Bacillus cereus</i> NCTC 945	30	3,580	32
<i>Bacillus polymyxa</i> ATCC 842	30	4,530	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3080	37	4,450	48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 7700	37	1,320	22
<i>Bacillus subtilis</i> SP 491	37	1,110	24.5
<i>Serratia marcescens</i> NCIB 10351	26	1,570	27.5
<i>Aeromonas proteolytica</i> ATCC 15338	26	19,970	12
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 11493	26	1,190	48.5
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 11498	26	1,540	72

Existe una gran cantidad de microorganismos productores de varias clases de proteasas y muchas especies y variedades de estos han sido patentados.

Aunque los organismos que se utilizan en la producción industrial, en especial los que rinden grandes volúmenes, - son pocos.

Probablemente el factor más importante en la selección de un microorganismo, una vez que ha sido aprobado como inofensivo por las autoridades sanitarias, es el rendimiento de la enzima que en un momento pueda proporcionar.

La tabla 3.1 indica los rendimientos máximos en unidades internacionales de proteasa, obtenidas en cultivos agitados de varios microorganismos.

III.2.2 SELECCION DE LOS NUTRIENTES Y DEL MEDIO DE CULTIVO:

(4)

En la producción comercial de proteasas se utilizan nutrientes constituidos principalmente por material proteico.

A continuación se mencionan diferentes materiales crudos que sirven de nutrientes en las fermentaciones industriales.

Proteínas vegetales:	Contenido protéico aproximado (%)
Cocido de semilla de algodón	50
Cocimiento de cacahuete	60
Cocimiento de frijol de soya	50
Maíz	10
Gluten de maíz	50
Licor de cocimiento de maíz	25
Salvado de trigo	15
Salvado de arroz	15

Proteínas animales	Contenido protéico aproximado (%)
Caseína	90
Suero	35
Lactoalbúmina	80
Albúmina de sangre	80
Hidrolizado de carne	50-80
Cocimiento de pescado	70-80

Proteínas microbianas:	Contenido protéico aproximado (%)
Extracto de levadura	50
Desechos solubles de destilados	30-40
Levadura de forraje	50-60
Levadura de petróleo	50-60

Si el cultivo es sólido, el ingrediente principal del medio siempre será salvado de trigo o de arroz. La formulación exacta del medio de cultivo lograda después de larga experimentación (casi siempre de prueba error) por el fabricante es guardada celosamente.

La elección de ciertos tipos de materia prima para el cultivo se hará en función de los costos y del rendimiento de la enzima. Las impurezas del cultivo, en ocasiones no presentan problemas a excepción de los cultivos utilizados en la industria farmacéutica. El evitar los tratamientos de purificación a los materiales crudos que sirven de componentes del medio de cultivo es una cuestión económica a considerar.

III.2.3 MÉTODOS DE CULTIVO (4)

Por razones económicas las proteasas usadas en grandes cantidades deberán producirse mediante cultivos sumergidos.

Las cepas fúngicas producen mejores rendimientos en cultivos de superficie de medio sólido. Este método aún se emplea en la pequeña industria.

La renina microbiana se acostumbra producirla en cultivos de superficie (Arima 1967) en 1973 Aunstrup aisló una ce

pa seleccionada de *Mucor mihei*, logrando propagarlo en fermentaciones sumergidas para producir renina microbiana. La experiencia mostrará en cada caso individual el método de cultivo y la composición del medio, en la preparación de la semilla de inóculo para el proceso industrial.

Los cultivos de bacilos requieren de una temperatura de 37°C. El tiempo de desarrollo de un inóculo liofilizado al nivel de semilla es de uno a dos días. El pié de cultivo se deberá iniciar con una cantidad de aproximadamente 10^6 células por mililitro. Dejando transcurrir 10 generaciones en el fermentador de semilla, esto se lleva a cabo en lapsos de 10-15 horas. Después se hace pasar el contenido del tanque de semilla al fermentador principal, representando el 3-10% del volumen final, el cultivo se continúa por 48-96 horas, esta etapa la concentración celular será de 10^9 a 10^{10} cel./ml.

El régimen de aereación en la mayoría de las fermentaciones es del orden de un volumen de aire por volumen de masa por minuto.

El control del pH no es necesario si se utilizan grandes cantidades de materia protéica en el medio. De hecho, los componentes del medio pueden escogerse de manera que el cambio deseado del pH se lleve a cabo por la acción metabólica del microorganismo, en sus diferentes etapas de propagación, una vez que se conozca el curso de cierto valor de pH necesario para lograr la máxima producción de la enzima.

Las fermentaciones con hongos filiformes se hacen a temperaturas de 30°C o menos. El tiempo requerido dependerá de la clase de enzima que se desee obtener y en la mayoría de los casos es mayor que en los cultivos de bacterias. En lo que respecta a la temperatura óptima, esta debe estar en fun

ción del mayor rendimiento de la enzima y no en el crecimiento del micelio.

III.2.4 PURIFICACION (4)

Los extractos enzimáticos de cultivos sólidos contienen menos impurezas químicas (Aunstrup, 1973). Estas soluciones pueden llevarse a un alto grado de concentración y requieren de volúmenes pequeños de solventes o sales para efectuar la precipitación, facilitando purificaciones subsecuentes.

En las preparaciones de proteasas, el grado de purificación depende del uso al que están destinadas. Por ejemplo, - en la producción de renina microbiana a partir del Mucor pusillus se obtiene también una lipasa junto con la enzima coagulante, en los primeros extractos. La eliminación de la lipasa es necesaria, para evitar el enranciamiento del queso y puede hacerse mediante calentamiento controlado o ajustando el pH en la región ácida.

Las proteasas no específicas en las reninas, pueden adsorberse en aluminosilicatos a un pH de 4.0-6. Algunas bentonitas al igual que la permutita y atapalgitas sirven a este propósito, también se logran efectos semejantes con sílica coloidal, carbonita, kaolina y sílica gel.

La purificación de la enzima coagulante producida por el Baillus subtilis el cual produce también en grandes cantidades peptidasa alcalina (Labatt, Co. LTD, 1966) se realizó en un intercambiador catiónico de carboximetilcelulosa con iones de Ca y Zn, el filtrado del cultivo se ajustó a un pH de 4.9 / a una conductividad de 1800. Al pasar la solución a través del intercambiador la peptidasa alcalina, componentes neutros y componentes cargados negativamente quedan en -

ción del mayor rendimiento de la enzima y no en el crecimiento del micelio.

III.2.4 PURIFICACION (4)

Los extractos enzimáticos de cultivos sólidos contienen menos impurezas químicas (Aunstrup, 1973). Estas soluciones pueden llevarse a un alto grado de concentración y requieren de volúmenes pequeños de solventes o sales para efectuar la precipitación, facilitando purificaciones subsecuentes.

En las preparaciones de proteasas, el grado de purificación depende del uso al que están destinadas. Por ejemplo, - en la producción de renina microbiana a partir del Mucor pusillus se obtiene también una lipasa junto con la enzima coagulante, en los primeros extractos. La eliminación de la lipasa es necesaria, para evitar el enranciamiento del queso y puede hacerse mediante calentamiento controlado o ajustando el pH en la región ácida.

Las proteasas no específicas en las reninas, pueden adsorberse en aluminosilicatos a un pH de 4.0-6. Algunas bentonitas al igual que la permutita y atapalgitas sirven a este propósito, también se logran efectos semejantes con sílica - coloidal, carbonita, kaolina y sílica gel.

La purificación de la enzima coagulante producida por el Baillus subtilis el cual produce también en grandes cantidades peptidasa alcalina (Labatt, Co. LTD, 1966) se realizó en un intercambiador catiónico de carboximetilcelulosa con iones de Ca y Zn, el filtrado del cultivo se ajustó a un pH de 4.9 / a una conductividad de 1800. Al pasar la solución a través del intercambiador la peptidasa alcalina, componentes neutros y componentes cargados negativamente quedan en -

la solución dejando a la renina adsorbida, la cual se recupera por elución con una solución de NaCl al 0.07 M a un pH de 5.8 obteniéndose una solución enzimática que mostró actividad coagulante sobre la leche.

El diagrama (fig. 3) muestra en forma general los procesos que se efectúan en la fabricación industrial de las enzimas. (5)

NOMENCLATURA DEL DIAGRAMA DE FLUJO.

- 1.- Glándulas animales o tejidos vegetales.
- 2.- Exudados vegetales.
- 3.- Cultivo de superficie.
- 4.- Cultivo de tambor rotatorio.
- 5.- Cultivo sumergido.
- 6.- Mezclador.
- 7.- Secador.
- 8.- Productos crudos secos.
- 9.- Tanque de agua.
- 10.- Extractor.
- 11.- Filtro rotatorio al vacío.
- 12.- Filtro prensa.
- 13.- Concentrador al vacío.
- 14.- Refrigerante.
- 15.- Osmosis inversa.
- 16.- Productos líquidos diluidos.

- 17.- Productos líquidos concentrados.
 - 18.- Tolva de agitación.
 - 19.- Secador por aspersión.
 - 20.- Centrifuga.
 - 21.- Secador de charolas.
 - 22.- Molino de martillos o de bolas.
 - 23.- Productos estandarizados secos.
-
- a).- Agua.
 - b).- Acetona, alcohol, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
 - c).- Sales estabilizadoras e ingredientes inertes.
 - d).- Ingredientes inertes.

III.3 DESCRIPCION DE METODOS DE PRODUCCION O PURIFICACION.

PREPARACION DE α AMILASA: III.3.1 (7)

Este método describe la manera de preparar α -amilasa, a partir de una cepa del género bacillus sp. 38-2 o sus mutantes. El microorganismo fué seleccionado en Japón.

El proceso de la producción presenta las siguientes características:

- Adición de carbonato al medio de cultivo.
- La fuente de carbono puede ser almidón soluble o semejantes.
- Extracto de levadura, peptona o licor de cocimiento de maíz, como fuentes de nitrógeno
- Carbonato de potasio, carbonato de sodio o bicarbonato de sodio.
- pH; 10.5.

El cultivo se mantiene en agitación y a 30-37°C dejando la fermentación por un período de 24-64 horas.

El pH inicial se debe ajustar entre 7.0-11 con las sales de carbonato.

En caso de que el medio de cultivo contuviera azúcares el pH óptimo se encontraría entre 8.0-11.

La separación se lleva a cabo en frío neutralizando la solución y precipitando con etanol para secarse posteriormente. La amilasa obtenida mostró actividad óptima a pH de 4.5, 7.0 y 9.0.

Ejemplo:

Composición del medio:

Almidón soluble -----	20 gr
K_2HPO_4 -----	1 gr
Extracto de levadura -----	5 gr
Peptona -----	10 gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -----	0.2 gr

La composición se disuelve en 900 ml de agua y se esteriliza a 115°C durante 15 minutos.

Una solución de Na_2CO_3 en 100 ml de agua esterilizada - por 15 minutos a 115°C se mezcla con la solución del medio - de cultivo. Se toma una porción de 250 ml de la mezcla preparada y se inocula con el *Bacillus* sp. 38.2, preincubado en - el mismo medio durante toda una noche. El pH se ajusta alrededor de 10 y se mantiene la solución en agitación. La fermentación se conduce durante 48 horas a 37°C. Posteriormente se remueven los residuos micelares y se añaden 3 volúmenes - de acetona precipitando a la enzima, el precipitado se lava con acetona cuidadosamente y se seca. De esta manera se obtuvieron 11 gr de un polvo café.

El producto así obtenido tiene un pH óptimo de 9.0 y - una actividad específica de 200,000 u/gr.

PURIFICACION DE β -AMILASA III.3.2 (8)

La β -amilasa se encuentra en la cebada, malta, camote / frijol de soya así como en bacilos y se obtiene por extracción con agua o soluciones amortiguadas. La solución de extracción contiene impurezas de materia orgánica disuelta co-

mo sacáridos y péptidos de proteínas descompuestas. Los tratamientos de purificación suelen llevarse a cabo entre 20 y 30°C evitando la inactivación de la enzima y la putrefacción del medio, pero disminuye la eficiencia en la concentración y en la purificación. Este problema se resolvió, agregando al medio acuoso un ión metálico divalente o trivalente que permite esterilizar la solución conteniendo a la β -amilasa a 40-55°C y la putrefacción se evita ajustando el pH adecuadamente.

Para lograr un producto de alta pureza, se eliminan los materiales de poca solubilidad en condiciones donde la enzima permanezca estable. Las impurezas más comunes son proteínas con puntos isoeléctricos a un pH de 4.0-6.0 y pueden eliminarse mediante procedimientos convencionales como la precipitación con ácidos, deionización a bajos niveles de saturación y agregando tierras alcalinas. Se agrega también un compuesto metálico que pueda liberar un ion trivalente o divalente en medio acuoso. Algunas de estas sales son hidróxido de calcio, magnesio, bario o aluminio.

Estas sales metálicas se mezclan con ácidos como el hidroclorehídrico, fosfórico, láctico, cítrico y tartárico. El compuesto metálico debere estar en proporción no menor de 0.1% en peso en la solución de β -amilasa.

El pH de la solución resultante se ajusta a un valor de 5.0-7.0. Dentro de este rango, los valores bajos son más recomendables para prevenir la putrefacción.

La solución final de β -amilasa es bastante estable a temperaturas de 40-50°C durante un tiempo relativamente largo sin pérdida de la actividad.

El tratamiento más ventajoso en la purificación es el de la separación por membrana. Este es, un procedimiento con

vencional de separación de partículas de bajo peso molecular de las de alto peso molecular, en medio acuoso, utilizando - la permeabilidad selectiva de una membrana de manera de au- mentar la concentración de los compuestos de alto peso mole- cular y elevar el nivel de pureza.

La presencia del ion metálico trivalente o divalente au- menta la eficiencia en la permeabilidad y favorece la deioni- zación.

La temperatura que tolera este sistema enzimático aumen- ta el régimen de permeación, logrando concentración y pureza en una solución esterilizada de β -amilasa. Precipitando una fracción de la enzima con la sal apropiada como el sulfato - de amonio, cloruro de sodio y secando el precipitado se ob- tiene un producto de alta pureza.

Ejemplo:

La β -amilasa se extrajo de camotes, exprimiendoles el- jugo, al cual se le separa del almidón, obteniéndose una so- lución impura, donde se encuentra la enzima.

Se procede a ajustar el pH a 5.2 con ácido clorhídrico, removiendo las proteínas coaguladas y las impurezas, de esta manera se obtuvieron 100 lts. de una solución de β -amilasa- con 300 unidades/ml, a la que se le ajustó el pH a 5.5 y se- le agregó una mezcla de 200 gr de cloruro de aluminio disuel- to en 200 gr de agua.

La mezcla resultante con un pH de 6.8 fue concentrada a 50°C mediante ultrafiltración hasta reducir el volumen a 10- lts.

La actividad de la enzima en la solución concentrada - fue de 2700 u/ml.

Ejemplo:

Fríjol de soya macerado, es tratado con acetato en solución buffer a un pH de 5.4. El filtrado, consistente de 80 - lts de una solución de β -amilasa con una actividad de 160 - u/ml. Se le agregaron 200 gr de hidróxido de calcio y la mezcla se ajusto a un pH de 6.6. La mezcla final se concentró - a 50°C por ósmosis inversa utilizando una membrana AS-197 - hasta reducir el volumen a 8 lts. El tiempo requerido para - la concentración fue de 5 horas y la actividad de la β -ami-
 lasa fue de 1,460 u/ml.

PREPARACION DE GLUCOAMILASA III.3.3 (8)

Muchos microorganismos producen glucoamilasa, como algu-
 nas cepas fungales del grupo Aspergillus. Por ejemplo: el As-
 pergillus niger, Aspergillus swamori, también cepas de la es-
 pecie Rhizopus y Endomices.

La concentración de transglucosidasas y de α -amilasas-
 en las preparaciones de glucoamilasa es importante porque -
 las transglucosidasas catalizan la formación de polímeros de
 dextrosa no fermentables a partir de la maltosa, provocando-
 una disminución en el rendimiento de la glucosa. La α -amila-
 sa en pequeñas cantidades produce sacáridos de bajo peso mo-
 lecular como la maltosa que es fácilmente transformada a glu-
 cosa por la enzima.

En las prácticas comerciales, se recomienda producir -
 a la glucoamilasa en etapas y existen bastantes razones para
 desarrollar a los microorganismos productores de glucoamila-
 sa de esta manera. Los pasos a seguir dependen de las condi-
 ciones necesarias para el desarrollo del microorganismo, los
 nutrientes apropiados, pH, relaciones osmóticas, régimen de-
 aereación, temperatura y la manutención de la pureza del cul-

tivo a lo largo de la fermentación. Para obtener rendimientos máximos de la encima, las condiciones de la fermentación en el estado final deberán cambiarse de cierta manera, que no necesariamente serán las condiciones donde se obtengan el desarrollo óptimo del microorganismo en las etapas de su crecimiento.

La pureza del medio de cultivo es una condición importante, especialmente si la fermentación se realiza en condiciones aeróbicas.

Una vez concluida la fermentación, se remueven las partículas celulares por filtración o centrifugación. La preparación de glucoamilasa puede usarse directamente en la sacarificación del almidón, o bien, concentrarse.

Este proceso se basa en el descubrimiento de que el amoníaco (gas) o el hidróxido de amonio puede proveerse al medio de fermentación durante la producción de la enzima. El descubrimiento mostró las siguientes ventajas importantes: - eliminó del medio de cultivo la utilización de los siguientes compuestos: NaOH, las sales de amonio y parte del licor de cocimiento de maíz. Dando como resultado una solución de glucoamilasa con menos sólidos solubles y consecuentemente - al emplear esta preparación enzimática en la conversión del almidón a dextrose, la contribución al contenido de ceniza - del hidrolizado disminuye considerablemente, por lo que el tiempo de vida de los dispositivos de resina de intercambio iónico para eliminar estas impurezas se prolonga.

Este procedimiento presenta algunas ventajas más; como la recuperación sencilla de la enzima del nutriente y con rendimientos del 70% arriba de los procesos convencionales, - también la actividad de la transglucosidasa disminuye considerablemente.

tivo a lo largo de la fermentación. Para obtener rendimientos máximos de la encima, las condiciones de la fermentación en el estado final deberán cambiarse de cierta manera, que no necesariamente serán las condiciones donde se obtengan el desarrollo óptimo del microorganismo en las etapas de su crecimiento.

La pureza del medio de cultivo es una condición importante, especialmente si la fermentación se realiza en condiciones aeróbicas.

Una vez concluida la fermentación, se remueven las partículas celulares por filtración o centrifugación. La preparación de glucoamilasa puede usarse directamente en la sacarificación del almidón, o bien, concentrarse.

Este proceso se basa en el descubrimiento de que el amoníaco (gas) o el hidróxido de amonio puede proveerse al medio de fermentación durante la producción de la enzima. El descubrimiento mostró las siguientes ventajas importantes: - eliminó del medio de cultivo la utilización de los siguientes compuestos: NaOH, las sales de amonio y parte del licor de cocimiento de maíz. Dando como resultado una solución de glucoamilasa con menos sólidos solubles y consecuentemente - al emplear esta preparación enzimática en la conversión del almidón a dextrose, la contribución al contenido de ceniza - del hidrolizado disminuye considerablemente, por lo que el tiempo de vida de los dispositivos de resina de intercambio iónico para eliminar estas impurezas se prolonga.

Este procedimiento presenta algunas ventajas más; como la recuperación sencilla de la enzima del nutriente y con rendimientos del 70% arriba de los procesos convencionales, también la actividad de la transglucosidasa disminuye considerablemente.

Ejemplo:

En este ejemplo se ilustra la utilización del amoníaco (gas) en la producción de glucoamilasa y se comparan los resultados con los obtenidos por los métodos utilizados comúnmente donde se emplea NaOH como agente neutralizante.

Un fermentador agitado con baffles de 2000 galones, con fuente de aire esterilizado se cargó con un medio preesterilizado conteniendo los siguientes ingredientes:

Almidón de maíz ----- 800 lb

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ----- 15 lb

Licor de cocimiento de maíz ----- 25 galones

y agua suficiente hasta lograr un volumen de 1000 galones.

Un inóculo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 se agrega al medio de cultivo en el fermentador. La temperatura se mantuvo a 100°F y el régimen de aereación a 0.5 vol. de aire por vol. del medio por minuto, dejando transcurrir un lapso de 24 horas.

De la solución fermentada se tomó una porción para inocular un medio de cultivo en un fermentador de 6000 galones con dispositivos de agitación y aereación esterilizada.

La carga preesterilizada depositada en el fermentador - consistió de: (%)

Almidón de maíz ----- 15

Licor de cocimiento de maíz ----- 2

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ----- 1

Durante la fermentación la temperatura se mantuvo a - -

95°F y el régimen de aereación se mantuvo a 0.8 vol. de aire por volumen del medio por minuto.

El tiempo de fermentación fué de 63 horas y el pH se mantuvo dentro del rango 3.8-4.2 agregando una solución de NaOH al 30%. De esta manera se llevaron a cabo cuatro fermentaciones y los resultados obtenidos se muestran en la tabla-3.2.

Otra serie de fermentaciones fueron llevadas a cabo exactamente de la misma manera que las anteriores eliminando el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y el pH del medio fue mantenido dentro del rango de 5.5 ± 0.2 , mediante el suplemento de NH_3 (gas).

De esta manera se llevaron a cabo 3 fermentaciones, y los resultados se muestran en la tabla 3.2.

RESULTADOS DE FERMENTACIONES

TABLA 3.2

Constituyentes del medio	pH	Agente neutra lizante	actividad de la en- zima
Almidón de maíz 15%			
Licor de cocimiento de maíz 2%	3.8-4.2	NaOH	162
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1%			
Almidón de maíz 15%			
Licor de cocimiento de maíz 2%	3.8-4.2	NaOH	152
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1%			
Almidón de maíz 15%			
Licor de cocimiento de maíz 2%	3.8-4.2	NaOH	148
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1%			
Almidón de maíz 15%			
Licor de cocimiento de maíz 2%	3.8-4.2	NaOH	163
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1%			
Almidón de maíz 15%			
Licor de cocimiento de maíz 2%	5.5 ± 0.2	NH_3 (gas)	270
Almidón de maíz 15%			
Licor de cocimiento de maíz 2%	5.5 ± 0.2	NH_3 (gas)	232
Almidón de maíz 15%			
Licor de cocimiento de maíz 2%	5.5 ± 0.2	NH_3 (gas)	278

PRODUCCION DE LACTASA FUNGAL TERMOFILICA III.3.4 (8)

La lactasa extraída de fuentes naturales pueden utilizarse en la hidrólisis de la lactosa a glucosa y galactosa, que son fácilmente asimilables por el organismo humano. Una de las fuentes más conocidas de lactasa es la levadura *Kluyveromices fragilis*, otras fuentes pueden ser diferentes levaduras, bacterias y hongos. Aunque la enzima preparada a partir de estos microorganismos exhibe poca actividad o la pierde fácilmente a temperaturas de 50-60°C.

Otro problema común, es que el organismo fuente no se desarrolla con la rapidez necesaria, dando como resultado rendimientos pobres de la enzima.

A continuación se describe un método de producción de lactosa a partir de hongos termofílicos, a un ritmo comercial aceptable y con propiedades de estabilidad térmica. Esta enzima puede utilizarse en productos lácteos con pH bajo como en el suero de mantequilla, yogurt y la crema agria donde la lactasa se convierte a glucosa y galactosa derivando un producto más dulce sin aumentar el contenido de calorías.

No todas las especies, ni todos los géneros de hongos termofílicos son capaces de producir lactasa de alta actividad termoestable. Dentro de las especies dadas, puede haber variaciones de una cepa a otra, en lo que respecta al rendimiento, desarrollo del microorganismo o la estabilidad térmica. Pero es posible modificar las variedades que no llenen los requisitos de productividad o termoestabilidad, induciendo al microorganismo con una apropiada selección o manipulación del medio de cultivo.

Los organismos con características termofílicas que no prosperen en medios donde la lactosa es la única fuente de carbono, se pueden inducir a desarrollar la habilidad de con

sumir solo lactosa, desarrollandolos en un medio que contenga lactosa y cualquier otra fuente de carbón asimilable como la glucosa. Transfiriendo al microorganismo de un medio a otro, disminuyendo gradualmente la proporción de glucosa y aumentando la cantidad de lactosa hasta que el organismo puede desarrollarse en medios donde la lactosa sea la única fuente de carbono.

Una vez que se ha completado el desarrollo del micelio, este es cosechado. No es necesario utilizar medios drásticos de separación, pueden usarse técnicas convencionales como: - filtración, centrifugación, precipitación con ácido poliacrílico, cromatografía de columna utilizando carboximetilcelulosa, cromatografía con gel utilizando productos Sephadex congelados, al separar y purificar la fracción de lactosa o componentes del micelio, no es necesario obtener un producto puro.

La lactasa producida tiene un alto grado de actividad y la retiene a temperaturas de 60°C o más. Estas propiedades la habilitan para utilizarse en procesos industriales eficientes. Las ventajas obtenidas son las siguientes:

- a).- A elevadas temperaturas, la hidrólisis procede a mayor velocidad.
- b).- Se inhibe el desarrollo de las bacterias que descomponen al producto.
- c).- El pH donde manifiesta máxima actividad la enzima se encuentra en el rango de 4.0-5.0, que en la producción del suero de mantequilla, yogurt y crema agria resulta el más adecuado.

PRODUCCION DE CELULASA III.3.5 (8)

El principal componente de todo el reino vegetal es la celulosa, es el polímero más abundante del planeta. También es el material más abundante en los desperdicios. Por ejemplo: en la agricultura se tiene paja, hojas, cañas, vainas, cáscaras, bayas, etc.; desperdicios de madera en la forma de aserrín, pedacera, corteza, etc. en los desechos urbanos como papel.

La β -glucosa es el constituyente unitario de la celulosa, formando un polímero no soluble, pueden asimilarlo una gran cantidad de organismos y es la fuente principal de energía en plantas y animales.

La utilización de la celulosa como fuente de glucosa o en otros productos utilizables, resulta incosteable pues el polímero es extremadamente resistente a la degradación. Algunos microorganismos tienen la habilidad de hidrolizar enzimáticamente a la celulosa, los rumiantes la convierten en proteínas.

La enzima obtenida en este proceso convirtió celulosa hidratada en glucosa. El organismo utilizado como fuente, fue una variedad mutante de *Trichoderma viride* GM 9123. Esta cepa mutante dobla la actividad de la enzima en la primera descendencia. El organismo se cultiva en un medio mineral conteniendo el 1% de celulosa cristalina o en cultivo sumergido. La fermentación se desarrolla durante 10 ó 14 días a 28-29°C. La solución del cultivo se filtra, removiendo los sólidos residuales. El filtrado contiene de 0.5-0.7 miligramos de proteína/ml. El pH del filtrado se ajusta a 4.8-5.0 con una solución amortiguada de citrato, y merthiolato al 0.005% para impedir el desarrollo de gérmenes. El filtrado del cultivo puede usarse directamente como preparación cruda.

La actividad de la celulasa en solución puede expresarse o medirse por el método de la hidrólisis de carboximetilcelulosa (unidades Cx/ml.) o por el procedimiento de ensayos con Papel Filtro (actividad Pf). La actividad de los filtros frescos se encuentra dentro del rango de 2.0-4.0 en actividad Pf, considerando que los primeros descendientes del organismo mutante doblan la actividad.

Si es necesaria una solución de alta actividad para efectuar hidrólisis más rápidas, se concentra la solución por medio de las técnicas convencionales de ultrafiltración o membranas que puedan retener moléculas del orden de 20,000 a 30,000. Una reducción del 80% del volumen incrementa de tres a cuatro veces la actividad de la enzima.

OBTENCION DE PECTIN TRANSGLUCANASA (PTE) III.3.6 (8)

Es bien conocida la acción de las substancias pécticas en la estabilidad de los sistemas coloidales en los jugos de fruta.

Comúnmente son necesarias dos clases de enzimas con actividades completamente diferentes, las esterases y las glicosidasas, para degradar completamente a la pectina presente en el jugo de la fruta

El primer tratamiento con pectín esterasa (PE) desprende al ester metilo en la molécula de pectina produciendo ácido péctico. Subsecuentemente el tratamiento con poligalacturonasa (PG) rompe los enlaces α -1,4-galacturonicos del ácido péctico.

La pectinasa utilizada en la clarificación del jugo o -

en la proporción correcta. Por ejemplo, la esterificación de la pectina, varía en función de las especies frutales o en el método de la conservación de la fruta.

Por lo tanto es necesario incrementar la actividad de la (PE) cuando se aplica a una fruta con alto grado de esterificación. En el caso de exceder la actividad de la (PE) más de lo necesario, resultará que una gran cantidad de ácido péctico queda sin reaccionar y tiende a coagular fácilmente en la presencia de un ácido a un ion metálico como el Ca o Mg. Por esta razón cuando la (PE) y la (PG) se emplean en un tratamiento de jugos, la determinación de la proporción de (PE) y (PG) de acuerdo a las condiciones de la fruta es de importante consideración.

La Pectín Transeliminasa (PTE) es completamente diferente en su acción y función de las enzimas anteriores (PE Y PG). Actúa sobre la pectina en forma independiente y satisfactoria facilitando el tratamiento al jugo, logrando un buen rendimiento y la clarificación del producto. Esto se debe a que la (PTE) reacciona con los enlaces α -1,4-galacturónicos degradando eficientemente a la pectina. Normalmente la (PTE) muestra actividad catalítica en un rango de pH de 3.0-6.0 y la mayoría de las veces el pH óptimo oscila de 3.5-6.0. La temperatura de actividad es de 30-70°C y el rango óptimo de 45-65°C.

El tratamiento al jugo de fruta con esta enzima consiste en agregar (PTE) al material que va a tratarse; ya sea un producto macerado o el jugo de la fruta presada. Si es necesario, puede agregarse una preparación cruda de la enzima en los diferentes pasos del proceso; macerado, prensado y filtrado, manteniendo en pH de 3.0-6.0 y la temperatura de 45-60°C.

go se filtra o centrifuga removiendo los materiales sólidos, hasta lograr un producto claro.

Algunos microorganismos empleados en la producción industrial de (PTE) pertenecen al grupo *Aspergillus* como; *Aspergillus oryzae* 1773, *Aspergillus sojae* 48-ATCCC202325, *Aspergillus sojae* 22, *Aspergillus saitoi* 1540 y *Aspergillus inui*.

Ejemplo:

Un producto (Koji) obtenido del cultivo sólido de *Aspergillus sojae* 48 ATCC 20235 desarrollado en salvado por dos o tres días fue extraído con un volumen de agua cinco veces mayor que el del cultivo, el extracto fue centrifugado dando una suspensión transparente de la enzima. El precipitado que se formó al agregar sulfato de amonio a la suspensión enzimática, en la cantidad necesaria hasta obtener un 40% de saturación, se colecta y se procede a formar otro precipitado agregando sulfato de amonio hasta un 75% de saturación, separando la enzima por centrifugación.

El precipitado completo se disuelve en pequeñas porciones de agua destilada y la solución obtenida se hace pasar por una columna (2 x 140 cm) de Sephadex G-25 para remover el sulfato de amonio, la enzima se recupera por elución y fue liofilizada hasta lograr un polvo enzimático.

Se continuó la purificación disolviendo el polvo liofilizado de la enzima, en una solución buffer de acetato 0.1 M ajustada a un pH 5.0.

Después de repetidas operaciones, se colectan las fracciones de la enzima y se concentran obteniéndose un gel que se filtra en una columna empacada de Sephadex G-100. De esta manera, ultracentrifugando y electroforéticamente, se ob-

tuvo una preparación de pectín transeliminasa purificada y - homogénea absolutamente libre de cualquier otra enzima.

Un litro de jugo de manzana (variedad: Jonathan) fue -- tratado con (PTE) obtenida de la forma antes mencionada, el- jugo se trató durante 60 minutos y a una temperatura de 40°C. La acción de la enzima fue detenida por calentamiento.

El producto se enfrió y centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos el jugo resultante, extremadamente claro, poseía una transmisión a la luz de 97.00 a 660 $m\mu$.

PREPARACION DE PAPAINA CRISTALINA III.3.7. (9)

Smith y coasociados desarrollaron un método de cris- tali- zación de papaína a partir del latex de papaya comercial y - también obtuvieron un derivado de mercurio cristalino.

Estos investigadores utilizaron α -benzil-L-arginin-ami- da para estudiar la cinética de la enzima.

El latex debe pulverizarse hasta obtener un polvo fino, logrando de esta manera una extracción satisfactoria.

Las etapas del proceso son las siguientes:

- I.- Se agrega 1 lt de NaOH 0.04 M y 100 gr. de tierras diato- maceas a 1kg. de latex húmedo (180 gr. base seca) y se - mezcla durante 1 hora; el pH se ajusta a 6.5-7.0 (utili- zando bromotimol como indicador, virando del verde al - azul). Después de filtrar, el líquido residual se expri- me, combinando las fracciones del líquido.
- II.- La solución filtrada se ajusta a un pH de 9 con NaCN 2 M (25 ml.) y se centrifuga. Al líquido resultante se le

agrega sulfato de amonio sólido hasta una saturación de 0.4 (250 gr./lt.). se enfria y se filtra el precipitado obtenido (73 gr.).

III.- El precipitado se disuelve en 600 ml. de NaCl 0.02 M - (resultando un pH de 8.0-8.5), se filtra para remover impurezas que hallan quedado de la etapa anterior, y se le agregan 60 gr. de NaCl. La suspensión se enfría y centrifuga, enseguida se agrega una solución de NaCN 0.02 M. hasta lograr 400 ml. (ajustando el pH a 6.5 - con HCl 0.1 M.).

IV.- La suspensión se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se enfria a 5°C durante 18 horas. - El precipitado formado se separa por centrifugación. - Los cristales obtenidos se disuelven en 300 ml. de NaCN 0.02 m. neutralizado a temperatura ambiente; después se agregan poco a poco 10 ml. de una solución saturada de NaCl. Pueden hacerse recristalizaciones repitiendo el - tratamiento a la suspensión.

Pueden efectuarse algunas modificaciones:

La extracción de la enzima es llevada a cabo de mejor - manera a un pH de 5.5, en vez de 6.7 en el latex fresco. El NaCN se reemplaza por cisteína para activar a la enzima. En la etapa III los 600 ml. de cisteína 0.02 M. que reemplazan la solución de NaCN, se mantiene a un pH de 7.0-7.5.

Los resultados en las diferentes etapas se muestran en la tabla 3.3.

PREPARACION DE FIGINA III.3.e (9)

Con latex del árbol de la higuera, fue cristalizada ficina, clarificandolo y ajustando el pH a un valor de 5.0, -

manteniendo la solución por varias semanas a 5°C. Formandose cristales hexagonales. La recrystalización se logra redisolviendo a la enzima en HCL 0.02 M; filtrando y reajustando el pH a 5.0. La enzima recrystalizada fue incolora y libre de cenizas.

PREPARACION DE BROMELINA III.3.9 (9)

Esta enzima, presente en las hojas y tallos, así como en la fruta de la planta de piña. La bromelina puede precipitarse del jugo fresco de la fruta con; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una saturación de 0.6; con acetona o alcohol.

El rendimiento es de 2 a 3 gr.lt/. de enzima impura, con el 25 al 100% de la actividad del polvo comercial de la papaína.

TABLA 3.3

CANTIDAD DE PAPAÍNA EXTRAIDA EN LAS ETAPAS DEL PROCESO

Etapa	Volumen ml.	<u>Unidades de actividad</u>	
		mg. de proteína por ml.	Total ₃ x 10
I		17	200
II		15.5	39
III	420	16.5	9.7
IV	310	22.5	4.5

Las unidades de actividad estan dadas en unidades coagulantes de la leche y una unidad coagulante es, la cantidad de papaína que coagula 5 ml. de leche en 1 minuto a 30°C.

PREPARACION DE α -QUIMOTRIPSINOGENO III.3.10 (9)

Se trataron 10 a 15 pancreas de bovino, removidos inmediatamente después de sacrificadas las reses, y sumergidos - en seguida en H_2SO_4 0.25 N a 0°C. Una vez que se retira la - grasa y el tejido conectivo, las glándulas se desmenuzan. - Tres litros de pancreas desmenuzados se suspenden en 6 lts. - de H_2SO_4 0.25 N a 5°C y se mantiene el sistema a esta tempe- ratura por 18 ó 24 horas.

La suspensión se cola en capas de mallas; el tejido se- suspende nuevamente en 3 lts. de H_2SO_4 0.25 N frio e immedia- tamente se cola de nuevo. Los extractos se combinan y el re- siduo celular se desecha.

Por cada litro de extracto se agregan 242 gr. de sulfa- to de amonio sólido hasta obtener una saturación de 0.4. La- mezcla se filtra en frio, se desecha el precipitado y el lí- quido se satura con sulfato de amonio a un valor de 0.6 - - (205 gr.lt.).

El precipitado formado se deja reposar a 5°C y se fil- tra a la misma temperatura en papel filtro suave. Obteniendo un producto húmedo de aproximadamente 100 gr; el filtrado se conserva para preparar posteriormente ribonucleasa.

Cada 100 gr. de precipitado se disuelven en 300 ml. de- agua y 200 ml. de solución saturada de sulfato de amonio (20 a 25°C). El precipitado se forma al agregar 5 gr. de celita- y se desecha. Por cada litro de filtrado, se agregan lenta- mente 205 gr. de sulfato de amonio sólido; el precipitado - formado es de aproximadamente 90 gr. el filtrado se desecha.

Cristalización de α quimotripsinógeno:

Cada 100 gr. de producto obtenido de la última precipi-

PREPARACION DE α -QUIMOTRIPSINOGENO III.3.10 (9)

Se trataron 10 a 15 páncreas de bovino, removidos inmediatamente después de sacrificadas las reses, y sumergidos en seguida en H_2SO_4 0.25 N a 0°C. Una vez que se retira la grasa y el tejido conectivo, las glándulas se desmenuzan. Tres litros de páncreas desmenuzados se suspenden en 6 lts. de H_2SO_4 0.25 N a 5°C y se mantiene el sistema a esta temperatura por 18 ó 24 horas.

La suspensión se cola en capas de mallas; el tejido se suspende nuevamente en 3 lts. de H_2SO_4 0.25 N frío e inmediatamente se cola de nuevo. Los extractos se combinan y el residuo celular se desecha.

Por cada litro de extracto se agregan 242 gr. de sulfato de amonio sólido hasta obtener una saturación de 0.4. La mezcla se filtra en frío, se desecha el precipitado y el líquido se satura con sulfato de amonio a un valor de 0.6 - (205 gr.lt.).

El precipitado formado se deja reposar a 5°C y se filtra a la misma temperatura en papel filtro suave. Obteniendo un producto húmedo de aproximadamente 100 gr; el filtrado se conserva para preparar posteriormente ribonucleasa.

Cada 100 gr. de precipitado se disuelven en 300 ml. de agua y 200 ml. de solución saturada de sulfato de amonio (20 a 25°C). El precipitado se forma al agregar 5 gr. de celitay se desecha. Por cada litro de filtrado, se agregan lentamente 205 gr. de sulfato de amonio sólido; el precipitado formado es de aproximadamente 90 gr. el filtrado se desecha.

Cristalización de α quimotripsinógeno:

Cada 100 gr. de producto obtenido de la última precipi-

tación se disuelven en 150 ml. de agua tratada con 50 ml. de solución saturada de sulfato de amonio y el pH se ajusta a - 5.0 goteando NaOH 5 N. (cerca de 2 ml. por 100 gr. de precipitado). La solución se deja reposar dos días a 20-25°C.

De esta manera se forma gradualmente una gran cantidad de cristales de quimotripsinógeno, que se filtran, obteniéndose 25 gr. de producto.

CRISTALIZACION DE TRIPSINOGENO III.3.11 (9)

Pancreas de bobinos son tratados exactamente de la misma forma descrita anteriormente en la cristalización del quimotripsinógeno. El licor madre y los lavados obtenidos en la cristalización del quimotripsinógeno, se ajustan a un pH de - 3.0 (color rosa, con naranjado de metilo 0.0%) con 1 ml. - (aproximadamente) de H_2SO_4 5 N por cada 100 ml. de filtrado.

En seguida se agrega sulfato de amonio (30.4 gr./100 ml.), el precipitado formado se colecta en papel filtro duro, y el filtrado se desecha. Cada 10 gr. del precipitado se disuelven en 30 ml. de agua y se trata con 20 ml. de solución de sulfato de amonio saturado y 2 gr. de Filtro-Cel. La mezcla se filtra utilizando el vacío, en papel filtro suave y el precipitado se lava con sulfato de amonio a 0.4 de saturación y se desecha. Se mide el volumen del filtrado, y se agrega un volumen igual de una solución de sulfato de amonio saturada. La mezcla se filtra utilizando el vacío. Después se vierte una solución de sulfato de magnesio en H_2SO_4 0.2 N sobre el precipitado formando una capa de 5 mm. y se deja que permanezca en el filtro por uno o dos minutos. Se continúa la filtración hasta que la solución de lavado es removida.

A este precipitado se le conoce como tripsinógeno crudo,

y puede purificarse o activarse a tripsina.

RENINA BACTERIANA III.3.12 (8)

En la producción del queso es necesario coagular la leche para separar la caseína del suero. Usualmente se utiliza una enzima que se obtiene del estómago del becerro. Para poder obtener un buen rendimiento de queso y un proceso adecuado de maduración, es de gran importancia que la actividad proteolítica de la renina sea baja, de manera que la menor cantidad de caseína se disuelva durante la producción y el añejamiento del queso.

La renina del estómago del becerro satisface estos requerimientos. Sin embargo esta visto, que en un futuro próximo el abasto de cuajo de becerro será prácticamente imposible. Por lo que se han efectuado varios intentos de encontrar enzimas coagulantes de la leche que posean las características de baja actividad proteolítica.

Una larga serie de microorganismos producen proteasas que tienen efectos coagulantes sobre la leche, pero la mayoría de estos también poseen un efecto proteolítico considerable, de tal manera que la preparación del queso se vuelve demasiado lenta, formándose otros péptidos, producto de la descomposición de la caseína durante el añejamiento del queso. Esto sucede con enzimas obtenidas del *Bacillus subtilis* y *Aspergillus suitoi*.

Para este fin se descubrió una nueva enzima que se obtiene del *Mucor miehei* Cooney y Emerson CBS 370.65 producida en cultivo sumergido.

A continuación se describe el proceso llevado a cabo en una planta piloto:

En un tanque de inoculación se preparo el siguiente medio de cultivo:

Almidón de papa	2.0 Kg.
Harina de soya	1 5 Kg.
Harina de cebada	5.0 Kg.
Amilasa bacteriana NOVO 5000 SKB	5.0 gr.
CaCO_3	500 gr.
H_2O	40 lts.

La mezcla se calento durante 30 minutos a 70°C, después, se hirvió a 120°C durante 90 minutos, inyectando directamente vapor, al enfriarse la solución el volumen fue de 50 lts. aproximadamente.

Se prosiguió a enfriar el medio de cultivo hasta 34°C, quedando listo para inocularse.

El inóculo se preparo en un matríz Ferhbach conteniendo esporas en agar con la siguiente composición:

Extracto de levadura	4.0 gr.
K_2HPO_4	1.0 gr.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 gr.
Almidón soluble	15 gr.
Agar	20 gr.
Agua	1 lt.

Este medio fue inoculado con la variedad del Mucor miehi Cooney y Emerson CBS 370.65 incubado a 40°C para la esporulación.

Una vez inoculado el medio de cultivo en el tanque de semilla se fijaron las condiciones de agitación a 240 rpm y el régimen de aereación a 60 lts. por minuto. La fermentación se continuo por 48 horas hasta obtener un buen crecimiento de la población celular.

El contenido del tanque de semilla se transfirió al fermentador principal con un medio de cultivo consistente de:

Almidón de papa	8.0 Kg.
Harina de soya	6.0 Kg.
Cebada molida	20.0 Kg.
Amilasa bacteriana NOVO 5000 SKB	25.0 gr.
CaCO ₃	2.0 Kg.

Estos componentes se hirvieron y esterilizaron de la misma manera que la mezcla anterior, obteniendo un volumen de 200 lts.

Una vez inoculado el medio se fijo la agitación a 400 rpm y la aereación a 0.2 mt³/min., se agregó aceite de soya y un agente antiespumante, el pH se mantuvo constante durante la fermentación a 6.5.

Después de 129 horas el contenido de la enzima coagulante en el cultivo líquido fue de 2,500 unidades Kunitz de Rennina por litro.

LIPOLISIS CONTROLADA III.3.13 (9)

La lipólisis espontánea o no controlada ha plagado a la industria alimentaria por muchos años, produciendo sabores indeseables o fuerte rancidés en los productos. Recientemente

te se ha logrado efectuar este tipo de ~~reacción~~ en forma controlada, proporcionando productos alimenticios de buena calidad.

Por lo tanto, es una práctica común en la industria de lacteos, el tratar las grasas de la leche con enzimas lipolíticas para producir ciertos sabores deseados.

La enzima lipolítica actúa sobre los triglicéridos produciendo ácidos grasos libres, los cuales pueden convertirse en otros compuestos. La cantidad y el tipo de ácido graso producido depende de la clase y cantidad de grasa en el producto alimenticio, así como del tipo de enzima que se use y el tiempo que se lleve el tratamiento enzimático.

En virtud de esto se derivó un sistema enzimático saborizante, definido en términos de la actividad de la esterasa (AE) en razón a la actividad lipolítica (AL) o sea $(AE)/(AL)$. La actividad de la esterasa es aquella que ejerce la enzima sobre las grasas solubles en agua, propiamente las grasas con cadenas de cuatro a diez carbonos y la actividad de la lipasa, es la acción de la enzima sobre las grasas no solubles, o sea aquellas con cadenas de 12 carbonos en adelante, particularmente de 12 a 22.

Se ha encontrado que el sistema lipolítico producido por ciertas especies del género *Mucor* y particularmente del *Mucor miehei* que tiene la propiedad de expresar más actividad de esterasa que actividad lipolítica mostrando relaciones $(AE)/(AL)$ mayores de uno.

La actividad de la esterasa se prueba con tributirina y la de la lipasa se mide con aceite de oliva.

El sistema enzimático se recupera separándolo del medio de fermentación de la siguiente manera. El material micelar-

se filtra a un pH ácido (4.0-5.0) y la torta filtrada se somete a extracción cambiando el pH a la región alcalina de 10-12. El extracto se acidula hasta un valor de pH de 7.0 procediendo a concentrarlo por ultrafiltración o evaporación, y puede secarse por aspersion. La preparación del sistema enzimático de esta manera impide que enzimas coagulantes queden en dicho sistema.

La enzima lipolítica recuperada puede utilizarse como saborizante agregándose a la leche, aceite de mantequilla, grasa de la leche, chocolate con leche, aceite de margarina o cualquier triglicérido que se encuentre en los alimentos, produciendo sabores de leche o de mantequilla. Pueden también acelerarse o intensificarse los sabores naturales de estos productos. En triglicéridos vegetales como; aceite de algodón, soya, maíz, cacahuete, girasol, palma, coco. En los quesos imparte sabores de; queso pomano, pizza, mozzarella, cheddar, suizo, blue cheese, parmesano, etc.

Ejemplo:

Se transfirió una variedad de *Mucor michel* NRRL 13042 - cultivado en agar inclinado, en condiciones asépticas, a un matríz. Erlenmeyer de un litro conteniendo 200 ml. de los siguientes componentes:

	<u>%</u>
Harina de soya (esterilizada)	1.5
Suero seco	3.0
Almidón de maíz degradado enzimáticamente	12.0
Agua	83.5

El matríz inoculado se incubó en agitación a 37°C durante 114 horas con un pH inicial de 6.0. El sistema enzimático se recupera de la siguiente manera. El caldo de fermentación se ajusta a un pH de 5.0 y se filtra. Enseguida se efectúa -

una extracción al filtrado con una solución diluida de NaOH. a un pH de 10-11, el extracto se acidula hasta un pH de 7.0. La solución extraída se filtra y evapora hasta obtener una actividad de esterasa (AE) de 25.8 y una relación de (AE)/(AL) de 2.6. La solución puede concentrarse aun más, evaporando y secando, hasta obtener un sólido seco con una relación de (AE)/(AL) de 3.5.

La primera preparación (AE/AL = 2.6) se utilizó para desarrollar un sabor en el queso de la siguiente manera:

Muestras de una libra de queso cheddar de 2 a 4 semanas, con un sabor suave, el queso fue molido en un aparato doméstico y se le adicionó la enzima hasta obtener una mezcla homogénea, con un contenido de 440 mg. de enzima/ lb. de queso. Se tomaron varias porciones de la mezcla y se colocaron en recipientes esterilizados del tipo petri, los cuales se mantuvieron en condiciones anaeróbicas para evitar el desarrollo de mohos durante 4 días a 20°C. Otras muestras se incubaron por 11 días a 20°C.

Después del tratamiento se comprobó que el queso poseía un perfil de sabor similar al producido comercialmente.

PRODUCCION DE GLUCOSA OXIDASA III.3 (14)

La glucosa oxidasa es una enzima altamente específica y puede pensarse que sus aplicaciones son bastante estrechas. Sin embargo, son de hecho numerosas, variadas y en algunos casos increíbles.

Esta enzima puede obtenerse de los siguientes microorganismos: *Aspergillus niger*, *Penicillium amagaskinense* y *Penicillium vitale*.

La enzima del *Aspergillus niger* se considera del tipo - intracelular como corresponde a una oxidorreductasa involucrada en el mecanismo productor de energía en dicho organismo.

La producción de la glucosa oxidasa a partir del *Aspergillus niger* se lleva a cabo en cultivo sumergido.

Una vez concluida la fermentación el micelio se rompe y la enzima se disuelve separándola de las paredes celulares, - los residuos e impurezas son removidos por filtración o centrifugación.

Concluidas las primeras etapas de purificación, la enzima se precipita de la solución agregando solventes miscibles en el agua como la acetona o el etanol. El precipitado se se para por filtración o centrifugación y se procede a secar el producto, del cual puede efectuarse una extracción con soluciones amortiguadas para obtener preparaciones líquidas o - bien expender el producto en forma sólida. Ambas preparaciones se tratan con estabilizadores y conservadores, aunque la preparación en solución es mucho más estable.

Ejemplo:

Se prepara un inóculo en el laboratorio con un número - aproximado de 4×10^8 esporas de *Aspergillus niger* por cada 100 ml. de medio de cultivo y se mantiene en incubación durante 24 horas a 28°C. Antes de llevar a cabo la fermentación principal se hacen dos ampliaciones del cultivo manteniendo la relación de 10 ml. de inóculo por cada 100 ml. del medio a donde se transfiere.

El medio de cultivo esta constituido por los siguientes componentes:

La enzima del *Aspergillus niger* se considera del tipo - intracelular como corresponde a una oxidoreductasa involucrada en el mecanismo productor de energía en dicho organismo.

La producción de la glucosa oxidasa a partir del *Aspergillus niger* se lleva a cabo en cultivo sumergido.

Una vez concluida la fermentación el micelio se rompe y la enzima se disuelve separándola de las paredes celulares, - los residuos e impurezas son removidos por filtración o centrifugación.

Concluidas las primeras etapas de purificación, la enzima se precipita de la solución agregando solventes miscibles en el agua como la acetona o el etanol. El precipitado se se para por filtración o centrifugación y se procede a secar el producto, del cual puede efectuarse una extracción con soluciones amortiguadas para obtener preparaciones líquidas o - bien expender el producto en forma sólida. Ambas preparaciones se tratan con estabilizadores y conservadores, aunque la preparación en solución es mucho más estable.

Ejemplo:

Se prepara un inóculo en el laboratorio con un número - aproximado de 4×10^8 esporas de *Aspergillus niger* por cada - 100 ml. de medio de cultivo y se mantiene en incubación du- - rante 24 horas a 28°C. Antes de llevar a cabo la fermenta- - ción principal se hacen dos ampliaciones del cultivo mante- - niendo la relación de 10 ml. de inóculo por cada 100 ml. del medio a donde se transfiere.

El medio de cultivo esta constituido por los siguientes componentes:

	<u>%</u>
Sacarosa	5.0
Nitrato de calcio	0.2
Acido cítrico	0.75
Fosfato monopotásico	0.025
Cloruro de potasio	0.025
Sulfato de magnesio	0.025
Cloruro férrico	0.001
Licor de cocimiento de maíz	2.0
Agua	91.0

El tanque y el medio de cultivo se esterilizan con va-- por a 15 psig. durante 30 minutos y se procede a efectuar la primera siembra del organismo, la agitación se mantiene alre-- dor de 300 rpm y el régimen de aereación es de un volumen-- de aire por minuto, la temperatura se mantiene a 28°C dejan-- do transcurrir la fermentación durante 16 horas.

Concluida esta etapa, el caldo de fermentación se pasa-- a un segundo tanque con un medio de cultivo igual al ante-- rior y esterilizados en la misma forma, dejando desarrollar-- el micelio durante 16 horas.

La tercera etapa se realiza de la misma manera, y se -- concluye la fermentación en las siguientes 16 horas.

Finalmente, se ajusta el pH a 5.6 con sosa cáustica y -- se agregan CaCl_2 y tierras diatomáceas como agentes autolíti-- cos aumentando la temperatura para acelerar el proceso. El -- producto se lava y se filtra separando los residuos micela-- res, la solución extraída se precipita con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El pro--

ducto se centrifuga y se seca.

PRODUCCION DE XILOSA ISOMERASA (GLUCOSA ISOMERASA) III.3.15
(8)

En este proceso se utiliza un organismo mutante, el -- cual no requiere de xilosa para inducir la producción de la enzima.

Elaboración de la cepa mutante:

Una selección de *Streptomyces olivochromogenes* ATCC -- 21114 se tomó como cultivo madre para generar la cepa mutante, este microorganismo es una buena fuente de xilosa isomerasa.

El microorganismo fue expuesto, en estado de spora, a una dosis de luz ultravioleta, suficiente para matar al 97% de los organismos expuestos. Las esporas sobrevivientes fueron trasladados a platos, y en cada colonia se comprobó la actividad enzimática.

Ya que el medio donde se desarrollaron las colonias micelares carecía de xilosa para inducir la formación de isomerasa, solo se escogieron aquellas que mostraron producir la enzima. Estas colonias fueron aisladas y probadas exhaustivamente, comprobando que la cepa mutante seleccionada de hecho produce cantidades aceptables de xilosa isomerasa sin la necesidad de usar xilosa en el medio de cultivo como inductor.

Los pasos involucrados en este procedimiento fueron los siguientes:

I.- Se desarrollo el microorganismo *Streptomyces olivochrom*

genes en almidón "Difco" y agar, agregando el agar, -
 hasta un 2.0% esperando la esporulación del cultivo. -

- II.- Las esporas fueron cosechadas y suspendidas en 20 ml.-
 de una solución al 0.1% de surfactante "Tween 80" agre-
 gando un agente dispersante "Marasperse C" al 0.1%.
- III.- La suspensión fue sonificada por dos descargas de 15 -
 segundos cada una para romper las cadenas y terrones -
 de esporas.
- IV.- La suspensión de esporas se expuso, en un plato poco -
 profundo, a radiaciones de luz ultravioleta, matando -
 en la exposición al 97% de las esporas.
- V.- La suspensión resultante se diluyó (procurando obtener
 100 colonias por cada plato) y se traslado a recipien-
 tes del tipo Petri, conteniendo el siguiente medio:

	<u>%</u>
Sólidos de melaza de maíz 15 (E0)	1.0
Extracto de levadura "Difco"	0.05
Bacto peptona "Difco"	0.05
Bacto triptona "Difco"	0.05
Agar	1.5

El pH se ajusta con NaOH a 7.5.

- VI.- Se desarrollaron de 40 a 80 colonias por plato y fue--
 ron aisladas subsecuentemente para comprobar su abili-
 dad en producir a la enzima en un medio ausente de xi-
 losa o cualquier material que la supla.

Caracterización de la enzima:

Se determino la constante de Michaelis (K_m) de la reacción enzimática sobre dextrosa y xilosa. Esto fue hecho con el propósito de conocer la afinidad de la enzima por estos - substratos.

Todas las isomerasas examinadas que convierten directamente a la dextrosa en levulosa son xilosas isomerasas. La - determinación fue hecha utilizando un extracto sónico del - cultivo y se encontro que al actuar sobre la xilosa la constante (K_m) fue menor que con la dextrosa. Esto establece que la xilosa es el substrato natural de la isomerasa, y que la enzima era una verdadera xilosa isomerasa.

La capacidad de las xilosas isomerasas (las mutantes) - de aceptar a la dextrosa como substrato se debe a las similitudes estructurales en la xilosa y la dextrosa. Ya que los - mutantes producen lávisomerasa en la presencia de xilosa o - en su ausencia, la enzima es constitutiva y no necesariamente inducida solo por la presencia de la xilosa en el medio - de cultivo.

Ejemplo de isomerización enzimática:

Para demostrar la efectividad de la isomerasa producida por las cepas mutantes en convertir la dextrosa a levulosa, - se hicieron varias conversiones. La preparación enzimática - utilizada, consistía de células enteras congeladas de la cepa mutante del *S. olivochromogenes* CPC 3 o CPC 4. Las conversiones fueron realizadas sobre un hidrolizado del almidón - del maíz 95 (ED) utilizando varias concentraciones de la enzima, la temperatura de la reacción se fijo a 70°C y el pH a 6.25. Se agregó al hidrolizado, sales de sulfato de amonio y substrato seco a un nivel de 0.01 M. y 600 mg./ml. respectivamente.

Durante la isomerización, el hidrolizado se mantuvo bajo una atmósfera de nitrógeno y en agitación, el pH se controló por titulación.

Los resultados fueron:

Dosificación u/gr.	Tiempo de conversión en horas			
	16-18	40-44	64-66	88-90
	Conversión del hidrolizado 95 (ED) a ketosa. (%)			
0.8	17.7	30.2	35.2	38.1
1.0	21.9	35.6	40.4	43.0
1.2	24.7	37.5	41.3	42.0
1.4	26.0	40.1	43.4	—
1.6	28.1	41.0	43.2	—
2.0	33.4	43.2	45.2	—

En la tabla 3.4 se muestran los resultados del mismo proceso conducido a 65°C y a un pH ligeramente más alto.

TABLA 3.4

RESULTADOS DEL MISMO PROCESO CONCLUIDO A 65°C

pH	Oxificación (u./gr.)	Tiempo de conversión en horas			
		22	43	69	88
		Conversión de hidrolizado a ketosa (%)			
6.25	0.7	16.5	24.1	30.0	36.9
6.25	1.0	20.3	30.0	36.6	42.1
6.50	0.7	16.9	25.9	31.9	36.3
6.50	1.0	23.4	33.3	38.8	42.6
6.75	0.7	18.9	28.2	33.6	37.2
6.75	1.0	22.1	30.1	36.0	39.5

IV

VARIABLES EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS MICROBIANAS.

IV

VARIABLES EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS MICROBIANAS.

IV.1

En la producción de enzimas pueden considerarse las siguientes variables:

- I.- Selección del microorganismo.
- II.- Desarrollo del microorganismo.
- III.- Inductores.
- IV.- Pureza y rendimiento de la enzima.
- V.- Actividad.
- VI.- Control de la actividad.
- VII.- Estabilidad.

I.- Selección del microorganismo. (IV.1.1) (11)

La selección del microorganismo es el primer paso importante en el desarrollo de un producto y para hacerlo se deben considerar los factores de seguridad y localización de la enzima.

Hasta ahora solo 3 organismos se consideran completamente inofensivos como fuentes de enzimas para usarse en alimentos. Estos organismos son: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Bacillus subtilis* (reglamento sanitario de E.U.). Las enzimas de otros organismos deben satisfacer los requisitos impuestos por las autoridades sanitarias. Por ejemplo, las carbohidrasas producidas por el *Rhizopus oryzae* o las enzimas coagulantes del *Mucor miehi*, *Mucor pusillus*, *Bacillus cereus* y *Endothia parasitica*.

Normalmente, establecer la seguridad de un organismo y lograr la aprobación de las autoridades sanitarias significa

un considerable desembolso económico en investigación. El costo depende del organismo de donde se derive la enzima y la forma en que se vaya a utilizar. Los organismos nuevos presentan mayores problemas en este aspecto. Son preferibles aquellos que se manejan fácilmente; muestran estabilidad en sus características de rendimiento de la enzima, esporulación y en los requerimientos para su cultivo.

Los organismos nuevos, deben seleccionarse no solo evitando los riesgos de patogenicidad, sino también la variabilidad de la cepa. Siendo un organismo vivo, el cultivo puede cambiar con el tiempo. Se debe estar seguro que el organismo que va a usarse años después no será diferente del organismo (básicamente) que fue estudiado y aprobado.

Las enzimas se producen bajo condiciones estrictamente controladas y generalmente los productos finales deben estar libres del organismo que los produjeron. Esto no es el caso cuando el cultivo entero se usa directamente como la preparación enzimática, o cuando la célula intacta conteniendo a la enzima se utiliza como sistema inmovilizado.

También se consideran los materiales empleados en la concentración y purificación, de manera que los residuos que se encuentren en el producto final no afecten al alimento. En algunos casos el activador puede ser un factor a considerar. Por ejemplo, la glucosa isomerasa requiere de metales pesados para activarse, y estos son utilizados solo en un paso intermedio del proceso para removerse completamente antes de que la enzima reaccione con un producto que será artículo de consumo.

La localización de la enzima es también un factor de selección a considerar. Las enzimas intracelulares tienen la ventaja que se concentran en el tejido celular y pueden separarse fácilmente del caldo de fermentación. Pero estando en-

las paredes celulares, algunas veces la ruptura de las células libera otras sustancias que es difícil separar. Aunque muchas enzimas jamás son excretadas por las células vivas, relativamente muy pocas enzimas comerciales son producidas de esta manera (por ejemplo, la invertasa de la levadura).

Las enzimas secretadas, por otro lado, deben concentrarse de soluciones muy diluidas del filtrado del cultivo, proceso que puede ser costoso. En general, su pureza es apreciablemente mejor que la de las enzimas presentes en extractos celulares, la mayoría de los productos comerciales son de este tipo.

II.- Desarrollo del microorganismo. (IV.1.2) (4)

Industrialmente puede decirse que las enzimas se producen de dos maneras:

- a).- Cultivo de superficie.
- b).- Cultivo sumergido.

a).- Los métodos de superficie consisten en el desarrollo del microorganismo en salvado húmedo acidulado (ya sea trigo o arroz). El salvado es en sí, un buen nutriente en la producción de amilasas, pero puede abonarse con otros nutrientes y sales para mejorar el rendimiento. Puede también hacer se pasar aire sobre la superficie del cultivo.

Este proceso se conoce también como el método koji cuando se utiliza arroz como sustrato, son empleados los términos de: cultivo semisólido o de platos. Normalmente los lechos del cultivo son de una a dos pulgadas de espesor para facilitar el intercambio de calor. Los japoneses han realizado investigaciones sobre lechos de volumen considerable (Te-

rui y Takano, 1960).

Otra modificación al proceso de salvado húmedo, es mantener al sistema en movimiento mediante tambores rotatorios-facilitando la aereación, homogeneización y control del proceso. Este método fue probado extensivamente en el laboratorio en el período de 1930-1940 (Underkofler y asoc. 1939), y aún se utiliza en la actualidad.

b).- En el cultivo sumergido se desarrolla el microorganismo en medio líquido dentro de recipientes profundos, equipados con medios de aereación y agitación. En la actualidad es el método más empleado en la producción de enzimas, porque es más fácil de controlar que los métodos del salvado húmedo, - además el medio de cultivo puede variarse fácilmente. Generalmente el proceso se lleva a cabo en forma "batch", pero - puede modificarse a un proceso continuo.

III.- Inductores. (IV.1.3) (4)

Muchos organismos son estimulados de manera de aumentar la síntesis de determinada enzima, agregando un inductor al medio de cultivo. Originalmente se considero que el mejor inductor era el substrato de la enzima o una modificación de - este.

Recientemente se ha demostrado que productos (o productos modificados) de la conversión enzimática también pueden inducir la formación de la enzima. En algunos casos los ésteres de estos productos producen mejores resultados, por ejemplo, los ésteres de disacáridos inductores, son más potentes que los disacáridos mismos. Posiblemente porque los ésteres no afectan el catabolismo del organismo.

IV.- Pureza y rendimiento de la enzima. (IV.1.4) (4)

La enzima debe estar libre de otras enzimas que manifiesten actividad objetable, y en el caso dado los contaminantes deberán cooperar en la reacción o reacciones a las que se destine el producto. Por ejemplo, las preparaciones de glucoamilasa contienen α y β -amilasa que en los procesos de sacarificación de almidón favorecen la conversión del sustrato a glucosa.

En lo que respecta al rendimiento, se considera como bueno si un 10% de la proteína total, del filtrado del cultivo o de el extracto celular, corresponde a la enzima buscada.

V.- Actividad. (IV.1.5) (4)

La actividad de la enzima se determina tomando en cuenta los cambios que se efectúan cuando actúa sobre algún producto.

Por ejemplo, las proteasas frecuentemente basan su expresión de actividad en términos de unidades coagulantes de la leche, para uso en la prevención del enturbamiento de la cerveza (chillproofing) o en unidades de digestión de la hemoglobina cuando se utilizan como aditivos digestivos.

Frecuentemente, enzimas que están considerados como una sola entidad, contienen varias isoenzimas que de alguna manera tienen propiedades diferentes.

La proporción en que se encuentren estas isoenzimas afectan en forma distinta cada sistema donde actúan. Por ejemplo, la papaína que se aplica en el ablandamiento de la carne, la prueba de la turbidez a la cerveza y como aditivo digestivo.

IV.- Pureza y rendimiento de la enzima. (IV.1.4) (4)

La enzima debe estar libre de otras enzimas que manifiesten actividad objetable, y en el caso dado los contaminantes deberán cooperar en la reacción o reacciones a las que se destine el producto. Por ejemplo, las preparaciones de glucoamilasa contienen α y β -amilasa que en los procesos de sacarificación de almidón favorecen la conversión del sustrato a glucosa.

En lo que respecta al rendimiento, se considera como bueno si un 10% de la proteína total, del filtrado del cultivo o de el extracto celular, corresponde a la enzima buscada.

V.- Actividad. (IV.1.5) (4)

La actividad de la enzima se determina tomando en cuenta los cambios que se efectúan cuando actúa sobre algún producto.

Por ejemplo, las proteasas frecuentemente basan su expresión de actividad en términos de unidades coagulantes de la leche, para uso en la prevención del enturbamiento de la cerveza (chillproofing) o en unidades de digestión de la hemoglobina cuando se utilizan como aditivos digestivos.

Frecuentemente, enzimas que estan considerados como una sola entidad, contienen varias isoenzimas que de alguna manera tienen propiedades diferentes.

La proporción en que se encuentren estas isoenzimas afectan en forma distinta cada sistema donde actúan. Por ejemplo, la papaína que se aplica en el ablandamiento de la carne, la prueba de la turbidez a la cerveza y como aditivo digestivo.

Comúnmente las enzimas comerciales, son mezclas en las cuales solo la actividad de la enzima principal se ha caracterizado y estandarizado.

VI.- Control de la actividad. (IV. 1.6) (3)

El control de la actividad en algunas reacciones es de importancia (como en la coagulación de la leche) y necesario detener el efecto de la enzima una vez que ha cumplido con el efecto deseado. Una enzima comercial debe ser controlable desde el inicio de su acción como hasta el final. En algunos casos el substrato realiza este mecanismo, pues una vez agotado la reacción se detiene.

VII.- Estabilidad. (IV. 1.7) (11)

La preparación de la enzima comercial debe hacerse en un solo lugar, y empacarse de manera que pueda enviarse al usuario, además de poder almacenarse por un período razonable de tiempo sin un cambio significativo de la actividad.

Con este propósito se agrega a la preparación comercial estabilizadores y conservadores, que en el caso de utilizarse en la industria alimentaria deberán ser inofensivos.

Las enzimas derivadas de animales y plantas han sido empleadas en cantidades relativamente grandes por varias décadas. Muchas de estas fuentes probablemente continúen empleándose por muchos años, porque algunas de estas enzimas tienen cualidades específicas para cierto propósito, o son un subproducto barato de otro proceso.

En la medida en que el costo de las fuentes animales o vegetales aumente, la búsqueda de un reemplazo microbiano se

acelerara.

Algunas aplicaciones comerciales, especialmente las que utilizan productos de origen microbiano representan procesos nuevos, rápidos y controlados realizando conversiones que - originalmente eran llevadas a cabo lenta o erráticamente por microorganismos contaminando un producto natural.

Existe un buen número de aplicaciones industriales en - que la célula viva continúa siendo la fuente de la enzima microbiana; la más conocida de estas es la producción de alcohol por medio de levadura.

Los productos microbianos no son la contraparte exacta- de las enzimas de otras fuentes y es usualmente posible; seleccionando el organismo y el proceso de desarrollo, obtener una o varias enzimas que reemplacen a otra dentro de ciertas condiciones.

V

APLICACIONES.

V.1 APLICACIONES DE AMILASAS. (5)

Las amilasas tienen una gran variedad de aplicaciones - en la industria alimentaria:

- Manufactura de jarabes.
- Manufactura de dextrosa.
- Panificación.
- Producción de alcohol.
- Industria cervecera.
- Modificación de almidones.
- Confitería.

INDUSTRIA DE JARABES. V.1.1 (5) (4)

La hidrólisis del almidón para obtener azúcares se ha - practicado desde principios del siglo, esto se lleva a cabo - utilizando ácido clorhídrico. Este proceso presenta proble- - mas si la reacción se lleva más allá de ciertos límites dete- - riorándose el sabor y el color del jarabe.

Debido a la especificidad de la catálisis enzimática y - las bajas temperaturas de operación, se evitan las reaccio- - nes no deseadas. Además de emplear una baja concentración de - la enzima (o enzimas) evitando (o facilitando) la elimina- - ción de esta (o estas) del sistema reaccionante. Ventajas - que no presenta otro tipo de proceso.

El desarrollo reciente de sistemas inmobilizados de en- - zimas donde estas se encuentran adsorbidas o químicamente - unidas a sustancias insolubles en el medio de reacción, in-

crementan las ventajas de su utilización.

Estos sistemas de inmobilizados logran efectos bastante eficientes y hacen posible el volver a utilizarlos. En algunos casos los procesos con sistemas inmobilizados pueden llevarse a cabo en forma continua.

El grado de hidrólisis del almidón se expresa comúnmente en términos del equivalente de dextrosa (ED), que se define como las unidades de masa de glucosa pura requeridos para reducir una cantidad estandarizada de solución del reactivo de Fehling en el mismo grado que es afectada por una sustancia seca de 100 unidades de masa de la sustancia hidrolizada.

En la figura 4 se muestra el comportamiento de amilasas fungales sobre hidrolizados del almidón de maíz preparados - mediante catálisis ácida.

El aspecto más importante de los jarabes producidos enzimáticamente con alto contenido en glucosa-maltosa es que - prácticamente solo manifiestan los sabores de los azúcares. - En cambio los jarabes hechos mediante la catálisis ácida no pueden excederse en un 55% de dextrosa-maltosa sin desarrollar un deterioro en el sabor. De tal manera que a través - del proceso enzimático, los jarabes obtenidos de hidrolizados del almidón se utilizan en la producción de frutas envasadas, bebidas, condimentos y pastelería.

Las curvas representadas en la figura 4 describen las - siguientes reacciones: (4)

-Reacción llevada a cabo por catálisis ácida (curva a-b).

-Composiciones obtenidas por la acción de amilasa fungal sobre hidrolizados catalizados con ácido hasta 50 D.E. (curva

c-d).

-Acción de la β -amilasa sobre hidrolizados con ácido hasta-
20 D.E. (curva e-f).

-La curva g-h muestra la acción de la α -amilasa sobre el -
substrato licuado y la curva h-i la acción adicional debida
a amilasa fungal o mezclas de β -amilasa y glucoamilasa.

En el país se encuentran las siguientes industrias pro-
ductoras de jarabes: (12)

Industria Alimentaria del Suroeste, S.A.

Pájaro Rojo, S.A.

Ambesco de México, S.A.

Carbo Jet Mex, S.A.

Complementos Alimenticios, S.A.

Jarabe Perla

Concentrados Peninsulares, S.A.

Laboratorios Krauss, S.A.

Laboratorios Mixim, S.A.

INDUSTRIA DE LA PANIFICACION. V. 1.2 (4)

En la elaboración del pan se utilizan α -amilasas y -
 β -amilasas. La harina obtenida del trigo contiene cantidades
altas de β -amilasa pero muy poca α -amilasa.

Durante la molienda del trigo una porción de los grán-
ulos del almidón se dañan (aproximadamente del 6.7-10.5% del-
almidón total) afectando la fermentación de la masa al elabo-
rar el pan.

c-d).

-Acción de la β -amilasa sobre hidrolizados con ácido hasta-
20 D.E. (curva e-f).

-La curva g-h muestra la acción de la α -amilasa sobre el -
substrato licuado y la curva h-i la acción adicional debida
a amilasa fungal o mezclas de β amilasa y glucoamilasa.

En el país se encuentran las siguientes industrias pro-
ductoras de jarabes: (12)

Industria Alimentaria del Suroeste, S.A.

Pájaro Rojo, S.A.

Ambesco de México, S.A.

Carbo Jet Mex, S.A.

Complementos Alimenticios, S.A.

Jarabe Perla

Concentrados Peninsulares, S.A.

Laboratorios Krauss, S.A.

Laboratorios Mixim, S.A.

INDUSTRIA DE LA PANIFICACION. V. 1.2 (4)

En la elaboración del pan se utilizan α -amilasas y -
 β amilasas. La harina obtenida del trigo contiene cantidades
altas de β -amilasa pero muy poca α -amilasa.

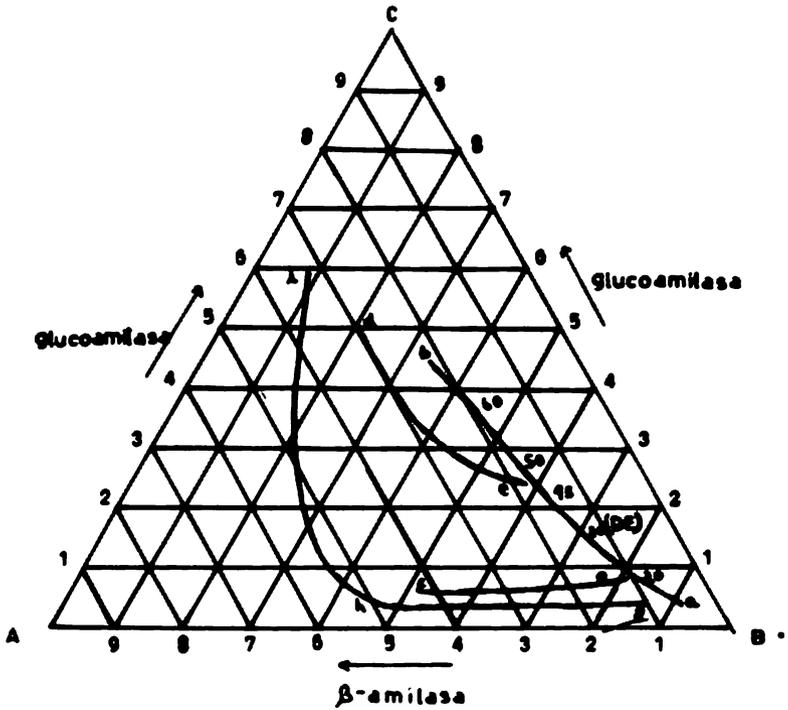
Durante la molienda del trigo una porción de los grán-
ulos del almidón se dañan (aproximadamente del 6.7-10.5% del-
almidón total) afectando la fermentación de la masa al elabo-
rar el pan.

Fig. 4

A= maltosa

B= 100-A-C

C= glucosa



Composici3n de hidrolizados del almid3n de ma3z

La β -amilasa natural en la harina no afecta al almidón dañado ni tampoco al almidón normal, pero la α -amilasa sí, produciendo dextrinas que posteriormente hidroliza la β -amilasa para derivar maltosa la cual sirve de sustrato a la levadura.

Los métodos modernos de elaboración del pan requieren de una fermentación rápida y uniforme. La levadura necesita de azúcares fermentables para establecer su metabolismo, el cual produce; CO_2 , alcohol y otros productos. Usualmente se agrega sacarosa o dextrosa, pero esto no significa que se logre una fermentación adecuada para obtener un producto de calidad.

El adicionar α -amilasas a la harina no solo favorece: una fermentación uniforme y continua si no que además, produce azúcares adicionales al pan ya elaborado. Estos azúcares mejoran el sabor, color y las cualidades del tostado del pan

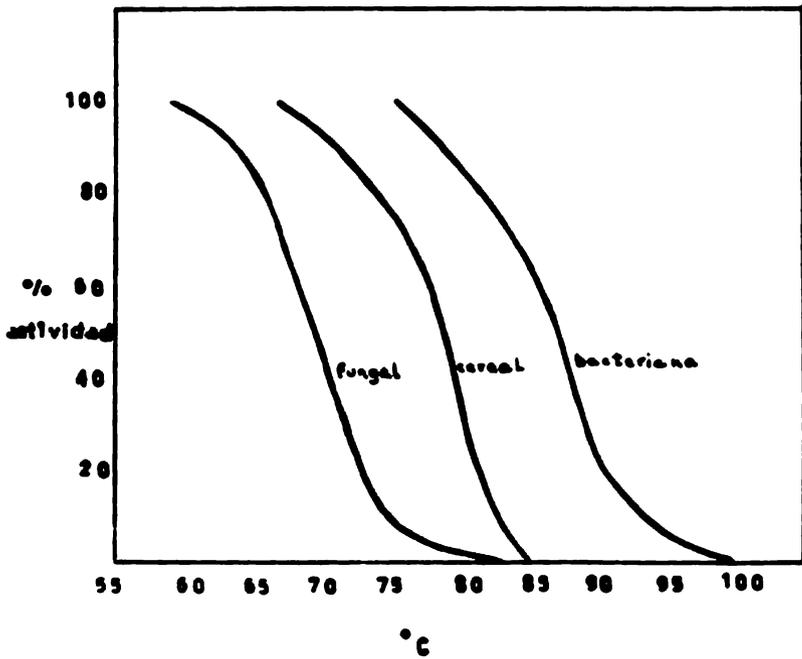
Las posibilidades de producir, enzimáticamente, niveles de azúcares más allá de los requeridos para la fermentación de la masa debe someterse a consideración. En los caso de que no se agreguen azúcares, los resultados del suplemento enzimático son satisfactorios. Se han hecho procesos donde se aplican conjuntamente α -amilasa y glucoamilasa obteniéndose un incremento en el volumen de la hogaza del pan, agregando poca o ninguna azúcar a la masa.

Es importante mencionar que las fuentes de las amilasas influyen en el proceso, ya que estas difieren en su comportamiento en función de la temperatura.

La figura 5 muestra la manera en que tres amilasas de diferentes fuentes se ven afectadas por la temperatura. (5)

La preferencia por cualquier amilasa (fungal, de ce- -

Fig. 5



Efecto de la temperatura sobre la actividad de tres amilasas

real, o bacteriana) depende de las condiciones en que se desee llevar a cabo el proceso, o bien en las características que se le quiera dar al producto.

El suplemento enzimático en la harina se practica tanto en el molino harinero como en el momento de elaborar el pan.

En los molinos se agregan aproximadamente de 10 a 15 - unidades de ~~ex~~-amilasa por cada 100 gr. de harina, en la panificadora se agrega otro tanto dependiendo de la fórmula - que el panadero este aplicando.

A continuación se mencionarán algunas empresas que producen harina de trigo: (12)

Cia. Harineroa de la Laguna, S.A.

Cia. Harineroa Rio Florido, S.A.

El Duero, S.A.

El Ebro, S.A.

El Nervión, S.A.

Empresas Longoria, S.A.

Harinera de Texcoco, S.A.

Harinera de Veracruz, S.A.

Harinera Euskaro, S.A.

Harinera Michoacana, S.A.

Industrial Harinera San Bartolo, S.A.

Negociación Harinera de Saltillo, S.A.

Productos de Harina de Monterrey, S.A.

Molino de Trigo de Guadalajara, S.A.

Industrial Marinera la Asunción, S.A.

V.1.3

SACARIFICACION DE MACERADOS EN LA INDUSTRIA CERVECERA Y DE DESTILACION.

La utilización de la malta para la fermentación alcohólica de granos es antiquísima. La malta se produce mediante la germinación controlada de gramíneas normalmente de cebada. Durante el proceso se forma α -amilasa y se incrementa el contenido de β -amilasa. (5)

La malta contiene además carbohidratos, proteínas y saborizantes que sirven de nutrientes a la levadura, o bien como componentes del producto, como en el caso de la cerveza.

Las amilasas presentes en la malta son solubles en agua y pueden extraerse para obtener productos concentrados.

En la producción de la cerveza se emplea la malta junto con alguna mezcla de almidones derivados del arroz o maíz, esta mezcla se diluye en agua y se lleva a ebullición hasta lograr la gelatinización y licuefacción del almidón, después se enfría y se le agrega otra porción de malta. Se deja reposar y se hierve para inactivar a las enzimas y esterilizar la mezcla, se filtran los sólidos, se agrega la levadura y se deja fermentar. Las operaciones finales incluyen filtración y la adición de proteasas para después envasarse.

En la destilación pueden usarse patatas, maíz, centeno o trigo como fuentes de almidón. El material se muele y se mezcla con agua, se calienta bajo presión gelatinizando al almidón y esterilizándolo. Al enfriarse se agrega la malta o las enzimas encargadas de llevar a cabo la saccharificación que al completarse se procede a fermentar la mezcla inoculan

do levadura de un cultivo puro. Una vez completada la fermentación se procede a destilar el alcohol para uso industrial o como bebida, de esta manera se obtiene whisky, vodka y ginebra.

Debido a su alta estabilidad térmica, las amilasas bacterianas, han encontrado aceptación en este tipo de procesos y se emplean ampliamente; preparaciones de amilasas fungales y glucoamilasa.

Se han efectuado investigaciones sobre la posibilidad de sustituir microbianamente a la malta en sus funciones desaceticación tanto en la fabricación de cerveza como en la destilación de alcohol.

El uso de las enzimas fungales ha contribuido a reducir los costos netos del alcohol producido, en parte por reducir los requerimientos de la malta.

Estableciendo una comparación del proceso realizado con malta y el llevado a cabo con enzimas bacterianas y se ha encontrado que al utilizar productos microbianos se obtiene un rendimiento mayor de alcohol por fanega de grano empleado.

En el país se encuentran las siguientes compañías cerveceras:

Cervecería Cuauhtemoc, S.A.

Cervecería Moctezuma, S.A.

Cervecería Modelc, S.A.

MANUFACTURA DE DEXTROSA CRISTALINA. V. 1.4 (4)

La elaboración de la dextrosa se lleva a cabo mediante la cristalización de los hidrolizados del almidón. La mayor parte de la dextrosa comercial es un monohidrato de la α -D-glucosa. Este compuesto es menos dulce que la sacarosa o la fructosa pero es el único azúcar puro, comercializado, con propiedades dulcificantes.

La dextrosa es un carbohidrato necesario para la nutrición humana; de fácil obtención, alta calidad, fermentable, sabor dulce, alta estabilidad y de un costo relativamente bajo. Estas cualidades han difundido su utilización como ingrediente en los alimentos.

La reacción comercial comúnmente involucra una prehidrólisis del almidón (generalmente procedente del maíz) con ácido o mediante una catálisis con α -amilasas hasta lograr 15 ó 20 (ED) seguido de una sacarificación con glucoamilasa hasta obtener un 90-95% en contenido de dextrosa. El licor sacarificado se filtra, refina, concentra y se procede a cristalizarlo.

La dextrosa cristalina posee un 99.5% de pureza (base seca) se recupera por centrifugación y se seca hasta un 9.0% de humedad. El licor madre recuperado se refina, concentra y se somete a una segunda cristalización; el licor residual se utiliza como materia prima para fermentación industrial o en la elaboración del color de caramelo.

Las ventajas del sistema enzimático sobre la catálisis-ácida son las siguientes:

a).- Se obtienen mayores rendimientos de dextrosa. El contenido de dextrosa en el licor es del 55% aproximadamente sin importar la cantidad de dextrosa del material alimentado en-

la primera cristalización. El rendimiento teórico en dextrosa cristalina puede expresarse de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento} = \frac{D_p - D_f}{D_p - D_i}$$

D_i .- % en dextrosa contenida en el licor sacarificado (base-seca).

D_p .- % en dextrosa contenida en el producto cristalino (base seca).

D_f .- % en dextrosa contenida en la cristalización final.

Por ejemplo, un rendimiento de 99.5% de dextrosa obtenida de un licor sacarificado conteniendo 95% de dextrosa, y el licor de la primera cristalización 55% obteniéndose un rendimiento de 90%. El rendimiento total sería de 86% mientras que el proceso catalizado con ácido proporciona el 70%.

b).- Mejor calidad del producto cristalino, porque las soluciones son más puras y los cristales obtenidos son uniformes en tamaño y forma, favoreciendo la centrifugación.

c).- El alto contenido en dextrosa del licor sacrificado permite cristalizarla más rápido. De manera que se logra obtener más dextrosa por unidad de peso de material introducido en los cristalizadores además de reducir tiempo en el manejo del material.

d).- La hidrólisis enzimática puede llevarse arriba de un 30% en el contenido de dextrosa (base seca) de manera que se necesita evaporar menos agua obteniéndose rápida y económicamente un concentrado listo para cristalizarse.

Los aspectos tecnológicos que son importantes en lograr una eficiente sacarificación enzimática, son los siguientes:

- a).- La preparación de la glucoamilasa debiera tener una alta actividad catalítica, y no debiera estar contaminada con - - transglucosidasas.
- b).- La dispersión molecular del sustrato es necesaria para facilitar la acción de la glucoamilasa.
- c).- La concentración del sustrato tiene gran influencia en el curso de la reacción. El rendimiento de glucosa que puede obtenerse con una cantidad dada de glucoamilasa decrece conforme aumenta la concentración del sustrato.

Este efecto puede contrarrestarse hasta cierto punto aumentando la cantidad de glucoamilasa, pero existe la posibilidad de obtener reacciones de otra índole.

Esta situación fija un límite en el grado de conversión para una concentración dada de sustrato.

Con los avances tecnológicos logrados en la inmovilización de las enzimas este problema ha sido resuelto. La glucoamilasa inmovilizada puede utilizarse en un reactor de flujo continuo logrando efluentes con alto contenido en dextrosa.- En estas condiciones la enzima pierde actividad lentamente - ofreciendo las posibilidades de un proceso continuo y eficiente.

Compañías productoras de dextrosa en el país: (12)

Aranguren y Cía. S.A.

Fervig, S.A.

J.T. Baker, S.A. de C.V.

Polibásicos, S.A. de C.V.

Productos de Maíz, S.A.

MODIFICACION DEL ALMIDON EN COMESTIBLES. V.1.5 (5)

Las modificaciones a la estructura química de la molécula del almidón abarcan un rango bastante amplio; desde productos con alto peso molecular hasta hidrolizaciones completas, dependiendo todo esto del uso que desee darse al producto.

Los productos utilizados en la industria alimentaria - sirven como carbohidratos dulcificantes solubles en agua o - bien impartiendo ciertas características físicas a los comestibles.

En los procesos enzimáticos de este tipo se emplean enzimas con alta estabilidad térmica capaces de actuar a temperaturas elevadas.

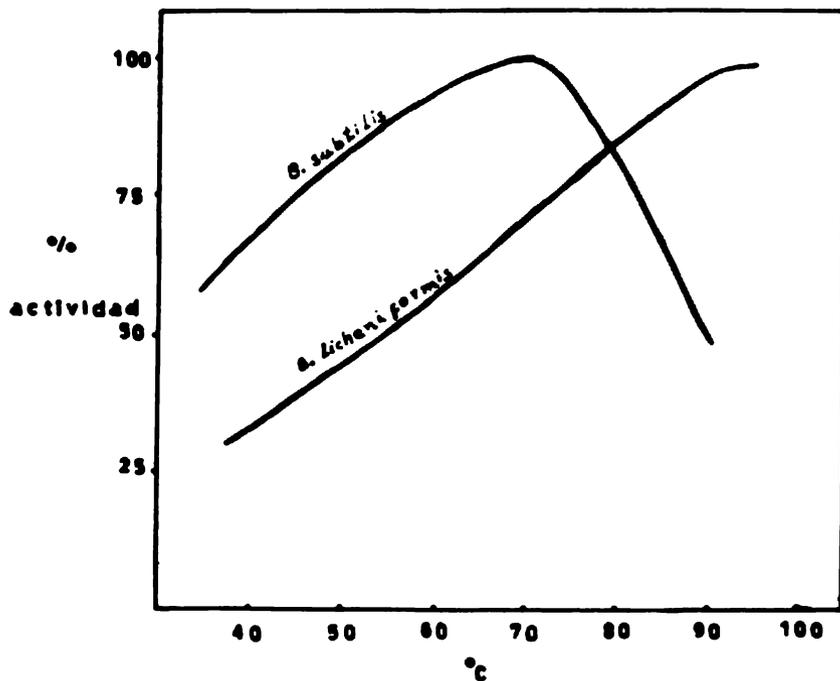
La α -amilasa derivada del *Bacillus subtilis* puede emplearse entre 85-90°C y la α -amilasa preparada del *Bacillus licheniformis* se encuentra activa a temperaturas de 110-115°C. La influencia de la temperatura en ambas enzimas se aprecia en la figura 6.

Por medio de la temperatura y el efecto de las enzimas-termoestables, el almidón se gelatiniza y se adelgaza, sometiendo después al efecto de mezclas de amilasas efectuando la hidrólisis derivando maltodextrinas, dextrosa y jarabes.

En la industria se ha incrementado la variedad y el valor de estos productos derivados del almidón a través del uso de las enzimas.

Compañías que modifican el almidón para usos en comestibles: (12)

Fig. 6



Influencia de la temperatura en la actividad de α -amilasa

Aranguren y Cía., S.A.
Cía. De Comercio Exterior, S.A.
Glucosa y Féculas de México, S.A.
Gluten y Almidones Industriales, S.A.
Industrializadora de Maíz, S.A.
National Starch & Chemical de México
Productos de Maíz, S.A.

V.2 APLICACIONES DE INVERTASAS. (5)

Esta enzima se utiliza en los siguientes procesos:

Elaboración de mieles artificiales.
" " de azúcar invertido.
Preventivo en la cristalización de jarabes.
Repostería.

Las mieles incristalizables se emplean en multitud de productos; desde jarabes medicinales hasta nieves, repostería y en la elaboración de refrescos.

El proceso consiste en la preparación de una solución concentrada de sacarosa que se hidroliza con la enzima, produciendo mieles más dulces debido a la presencia de la fructosa.

Las propiedades físicas de las mieles se ven afectadas favorablemente pues se aumenta el punto de ebullición y disminuye el punto de cristalización. Los monosacáridos obtenidos son más solubles que la sacarosa, permitiendo concentrar

los jarabes.

Esta enzima ha recibido un gran impulso tecnológico en algunos países, desarrollándose técnicas nuevas en su producción y aplicación. El siguiente ejemplo ilustra una técnica de fijación de invertasa en poliacroleína, obteniendo un compuesto que se dispersa en una solución acuosa con el substrato para realizar la conversión.

TECNICA DE FIJACION DE INVERTASA. V.2.1 (8)

Se ha desarrollado la técnica de fijación de enzimas a un aldehído sulfitado o a un polímero cetónico, formando un compuesto insoluble. Esto se efectúa mediante la formación de una red polimérica. Por ejemplo, la poliacroleína o metacroleína, son polímeros insolubles en agua que contienen algunos grupos que reaccionan con varias enzimas; se hacen reaccionar con un sulfito como el bisulfito de sodio, de manera de volverlos solubles en agua y más susceptibles a la reacción con la enzima. Sin embargo es necesario un tratamiento adicional para eslabonar las moléculas del polímero por medio de diaminas como la hexameten-diamina logrando una consistencia gelatinosa de naturaleza hidrofílica facilitando la reacción con la enzima, que de otra manera, el polímero-enzima es prácticamente imposible de recuperar.

El producto obtenido (complejo polímero-enzima) es sustancialmente insoluble en agua y la actividad de la invertasa se mantiene por algunos meses; en algunos casos, después de 150 días solo pierde un 10% de la actividad.

La preparación del complejo polímero-enzima se hace de la siguiente manera:

Cuarenta y cuatro partes de una solución de poliacroleí

na -bisulfito de sodio (PM 80,000) se le mezclan poco a poco 3 partes de agua con 0.82 partes de 1,6 hexametilén-diamina.

La mezcla se calienta durante 40 minutos a 65°C y el producto amarillo de naturaleza hidrofílica formado, se lava con agua destilada hasta que queda neutro.

El producto húmedo obtenido, se suspende en 50 partes de agua y se hace reaccionar con 0.104 partes de invertasa (dos veces recristalizada) que previamente fue disuelta en 4 partes de agua. La mezcla reaccionante (pH 6.8) se agita lentamente por 18 horas a 10°C; finalmente el polímero hidrofílico, con la enzima unida se lava hasta quedar libre de enzima que no reaccionó (aproximadamente el 80% de la enzima cargada).

Una parte de la torta húmeda (5% en peso, 72% de agua) convierte 100 ml. de una solución de sacarosa al 10% a un pH de 4.8, en azúcar invertido el 81% de la sacarosa en 15 minutos a 42°C.

Cinco meses después la actividad de la enzima era del 85% de su valor original.

Compañías que distribuyen Azúcar y Invertido: (12)

Aranguren y Cía. S.A.

Complementos Alimenticios, S.A.

Viramontes, S.A.

Mieles incristalizables:

Cía. Azucarera de los Mochis, S.A.

V.3 APLICACION DE LACTASAS. (5)

Las lactasas se utilizan en los siguientes procesos:

Dulcificación de la leche.

Prevención de la cristalización en la nieve.

Mejoramiento del suero.

La aplicación de la lactasa en la industria lechera es uno de los más promisorios aspectos en el uso de la enzima.- Hasta el presente solo ha sido utilizada en forma experimental o en procesos de menor escala.

La lactosa por sus características de poca solubilidad (15% en agua) y reducido poder edulcorante (16 comparado con la sacarosa de 100) se hidroliza con lactasas obteniendo, mayor solubilidad y sabor dulce.

Existe una cantidad considerable de suero que se desperdicia; derivado de la producción de queso y que contiene bastante lactosa. La mayor parte de estos productos se destinan al consumo animal.

PROCESO DE HIDROLISIS DE LACTOSA EN LA LECHE. V.3.1 (3)

Se desarrolló un proceso para efectuar hidrólisis de lactosa en la leche. El proceso consiste en recombinar fracciones de filtrado, adicionando la enzima en determinadas fracciones. En el proceso se utilizan dos filtros.

El tamaño del poro de los filtros solo afecta la conversión enzimática y la composición del líquido es la misma; al inicio de la operación, y al final de ella.

Este proceso puede utilizarse para efectuar conversiones de sustancias específicas en una solución o suspensión heterogénea con tal que la sustancia pueda reaccionar con una enzima de tamaño molecular más grande que el de la sustancia, y sirve particularmente cuando se desea remover de la solución un compuesto, que no sea el sustrato, que puede ser afectado por la enzima o que la desactivara.

Se ha encontrado que la remoción de las partículas moleculares grandes de la solución, antes de la conversión, incrementa la actividad de la enzima.

Si se desea, la enzima puede adherirse a un sustrato soluble de manera de incrementar su tamaño molecular y por consiguiente la velocidad a la que la solución puede filtrarse. La figura 7 muestra el equipo utilizado en la regulación del contenido de lactosa en la leche descremada, utilizando galactosidasa.

El proceso es el siguiente:

Se alimenta leche descremada en forma intermitente a un tanque (10) a través de la línea (14) y se alimenta en forma continua a lo largo de la línea (15) por medio de la bomba (16) al primer ultrafiltro (11). El primer filtrado consiste de una solución de moléculas más pequeñas que las de la enzima, y un concentrado de moléculas grandes. En la práctica se encontró conveniente operar el ultrafiltro en condiciones donde el 90% de la leche descremada está en el filtrado y el 10% en el concentrado.

El filtrado se pasa por la línea (17) al reactor enzimático (13) mientras el concentrado se pasa a través de la línea (18) a un mezclador (19) para recombinarlo con el filtrado tratado con la enzima. De manera de facilitar el arranque del proceso, la línea recirculante (21) y la bomba (22) se -

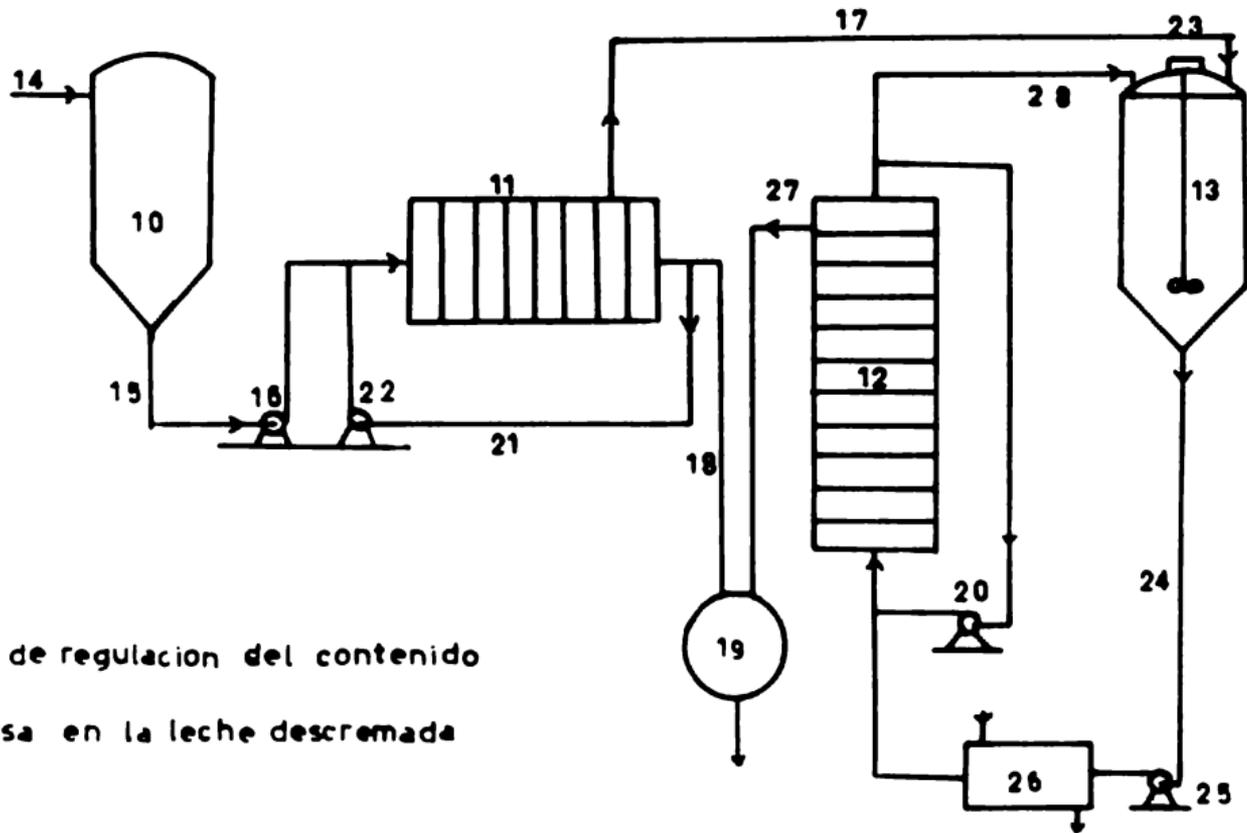
encargan de recibir el concentrado lacteo a través del ultra filtro (11). La β-galactosidasa se agrega al filtrado y convierte a la lactosa en glucosa y galactosa, en tiempos de residencia, en el reactor, relativamente cortos se obtuvieron conversiones del 90%.

La leche tratada se lleva por la línea (24) de un intercambiador (26) a un segundo ultrafiltro (12). El intercambiador de calor se encarga de mantener la temperatura en el - - reactor (13), a la correspondiente de máxima actividad de la enzima.

El ultrafiltro (12) separa la leche tratada en un filtrado que contiene los constituyentes de la leche y un concentrado con la enzima. El filtrado se transporta por la línea (27) al mezclador (19) para recombinarla con los concentrados de la leche producidos en el primer ultrafiltro (11). El concentrado enzimático del segundo ultrafiltro (12) se regresa al reactor (13) a través de la línea (28).

El contenido de lactosa en la leche tratada fue del 19% respecto a la cantidad inicial. El porcentaje residual puede ajustarse variando la relación de separación obtenida en el primer filtro o ajustando el grado de la hidrólisis del filtrado en el reactor.

La leche obtenida puede darse a personas incapacitadas para metabolizar a la lactosa. También puede utilizarse en - la fabricación de nieve; porque la lactosa tiende a precipitar en los productos congelados, la leche tratada elimina este problema además de que reduce la cantidad de azúcar que - se agrega a estos productos por el mayor poder edulcorante - de la glucosa y la galactosa comparado con la lactosa.



Proceso de regulacion del contenido
de lactosa en la leche descremada

DIAGRAMA DE FLUJO (Fig. 7)

- 10.- Tanque de alimentación.
- 11.- Ultrafiltro.
- 12.- Ultrafiltro.
- 13.- Reactor enzimático.
- 14.- Línea de alimentación.
- 15.- Línea de alimentación al ultrafiltro.
- 16.- Bomba
- 17.- Línea de alimentación al reactor.
- 18.- Línea de alimentación al mezclador.
- 19.- Mezclador.
- 20.- Bomba.
- 21.- Línea de recirculación.
- 22.- Bomba de recirculación.
- 23.- Motor de agitación.
- 24.- Línea de alimentación al intercambiador.
- 25.- Bomba.
- 26.- Intercambiador de calor.

V.4 APLICACION DE CELULASAS. (3)

Las cantidades abundantes en que se presenta la materia prima (celulosa) muestran un potencial bastante atractivo para la producción de glucosa.

Es todavía un enigma, la forma en que los microorganismos digieren rápidamente los materiales vegetales. Mientras que los extractos de las enzimas obtenidas de los mismos microorganismos actúan muy despacio.

A continuación se describe un procedimiento para hidrolizar una gran cantidad de materiales con celulosa, a glucosa y otros subproductos. Facilitando la hidrólisis por medio de un tratamiento con etileno.

1.- Se muele el material hasta 100 ó 150 "mesh".

2.- Si el material contiene suficiente lignina, se somete a un tratamiento previo con H_2SO_4 ó NaOH. De esta manera se formula una mezcla de hidrólisis que comprende; celulosa, celulasa y agua. Esta mezcla puede probarse como nutriente en los cultivos para obtener celulasa. Debe procurarse una buena dispersión del material celulósico en la mezcla, esta se trata con suficiente etileno para facilitar la reacción esto puede hacerse antes de la hidrólisis y/o durante la reacción.

De esta manera se continúa la conversión en forma convencional. Para mejores resultados la temperatura de la mezcla se mantiene entre 40 y 50°C, y con ayuda de un regulador adecuado el pH se mantiene cerca del nivel óptimo de la celulasa empleada, regularmente entre 4.0 y 5.5.

Ejemplo:

Se preparan dos suspensiones acuosas de materiales con-

teniendo celulosa; moliendo para cada suspensión, papel filtro No. 114 Watman 0.5 gr., el papel molido se suspende en - 50 ml. de agua destilada conteniendo NaOH suficiente para - que la concentración sea de 2 N. Las suspensiones se hierven por una hora y se enfría hasta 50°C agregando 5 ml. de una - solución reguladora de acetato 0.1 M. (pH 4.5) y 5 mg. de ce- lulasa cruda obtenida del *Rhizopus* tipo III. Ambas mezclas - se incuban a 50°C en un recipiente agitado.

Durante la incubación, una de las mezclas fue esparcida con etileno (gas) a una velocidad de 1 cc/minuto. Se tomaron muestras de cada mezcla en los tres primeros días, y estas - fueron filtradas, congeladas y analizadas en su contenido de glucosa. La mezcla tratada con etileno mostro niveles más al- tos de glucosa en un 9% que la mezcla convencional después - de 24 horas.

PROCESADO EN JUGOS CITRICOS PARA PRESERVAR LA TURBIDEZ. - - V.4.1 (3)

Se ha encontrado que el tratamiento térmico al jugo cí- trico no solo es necesario para la destrucción de microorga- nismos sino también para la inactivación de enzimas responsa- bles de la clarificación del jugo (pectinasas).

La turbidez es causada por materiales que forman un - - agregado coloidal que en los jugos cítricos imparten una apa- riencia turbia que se asocia con el jugo fresco. Si el agre- gado coloidal sedimenta, el suero claro que queda tiene mala apa- riencia y ha perdido el sabor. Se cree que la pectínesta- rasa es la causante de los efectos que conducen a la sedimen- tación del coloide. Posiblemente la enzima que convierte a-- las pectinas solubles del jugo, en ácidos pecticos los cua- les precipitan como pectatos insolubles. Al precipitar estas sales arrastran las partículas finamente divididas del jugo-

y los coprecipita.

Debido al pH de los jugos el tratamiento de calentamiento requerido es más intenso para lograr inactivar a la pectinesterasa, inclusive mayor que el necesitado en la esterilización. Sumado a esto no existe manera rápida y práctica de medir el grado de estabilidad de la apariencia turbia producida. De manera que existe una tendencia a exceder los requerimientos mínimos de temperatura para evitar la clarificación. El resultado del calor excesivo es la pérdida parcial o total del sabor natural y el desarrollo del sabor cocido.

Para resolver este problema se llevo a cabo un procedimiento enzimático. En vez de inactivar a la pectinesterasa, se agregó poligalacturonasa que destruye las pectinas dimetiladas por hidrólisis. Previniendo la formación de un precipitado de pectato de calcio, removiendo por hidrólisis, las pectinas dimetiladas antes que se combinen con los iones de calcio. Por ejemplo, en tres experimentos realizados con jugo fresco agregando pectina comercial con alto contenido de poligalacturonasa en una proporción de 1/200 y almacenado por 24 hr. a 80°F, los niveles de pectinas solubles, pectatos de calcio y protopectina se redujeron a 36, 53, 75% respectivamente.

Ya que es difícil obtener preparaciones puras de poligalacturonasas, deben usarse preparaciones comerciales que son mezclas de enzimas pécticas. Comúnmente contienen pectín esterasa (PE), poligalacturonasa (PG) y polimetilgalacturonasa (PMG). Se prefieren las preparaciones con mayores proporciones de actividad de PG y PE.

Se encontró además, que la actividad de la PMG afecta en forma adversa la función de la pectinasa como estabilizador.

Examinando un buen número de pectinasas comerciales se encontró que las que tenían más actividad de PG en relación a la actividad de PMG fueron las más efectivas en estabilizar la turbidez del jugo. Algunos de estos productos surtieron buenos efectos a concentraciones de una parte de enzima por 500 de jugo.

Puede modificarse el tratamiento agregando una enzima - proteolítica como: ficina, papaína o bromelina además de la poligalacturonasa. El jugo tratado tiene una turbidez mayor que el del jugo recién extractado.

Ejemplo.

Jugo de naranja recién extraído fue tratado con pectinól 41-P en la proporción de 1/5000. Se agregó también ficina en una proporción de 1/10,000. El sistema se almacenó a 40°F.

Después de centrifugar por 10 minutos a 470 g. para remover la pulpa, el jugo fresco poseía una transmisión a la luz de 51.9% medido en un colorímetro equipado con un filtro de 650 m μ . Después de 38 días del almacenaje a 40°F, una muestra de este jugo que no recibió el tratamiento tenía una transmisión a la luz de 92.8% indicando casi una completa clarificación. El jugo tratado tenía una transmisión a la luz de 54.6% después de 38 días.

Empresas fabricantes de jugo de manzana: (12)

Derivados de Manazana, S.A.

Dico Frutas del Centro, S.A.

Fruzana, S.A.

Jugos de Frutas Mundet, S.A.

Concentrados de frutas:

Alimentos de Veracruz, S.A.
 Ambesco de México, S.A. de C.V.
 Citro-México, S.A. de C.V.
 H. Kohnstamm de México, S.A. de C.V.
 Industria Dico, S.A.
 Jugos Concentrados, S.A.
 Jugos Jugosos, S.A.

V.5 APLICACION DE PAPAINA. (3)

La papaína se utiliza principalmente en las industrias-
 de:

Elaboración de cerveza.
 " " ablandadores de carnes.

La papaína es la enzima proteolítica más utilizada en -
 la elaboración de la cerveza para efectuar la prueba de tur-
 bidez.

Antes de llevar a cabo el procedimiento enzimático de-
 ben efectuarse ensayos en la cerveza fresca, estas determina-
 ciones requieren de períodos de varias semanas, hasta cono-
 cer las características de la actividad del producto enzimá-
 tico.

La retención de una parte de la actividad proteolítica-
 es esencial para proveer a la cerveza almacenada del efecto-
 proteolítico hasta su consumo.

Stone y Saletan (1968) determinaron la estabilidad con soluciones diluídas de papaína en agua y en cerveza embotellada, utilizando una muestra proteolítica común en ambos en sayos. (4)

Los resultados pueden resumirse de la siguiente manera:
(4)

1.- Al evaluar las características de estabilidad en soluciones enzimáticas diluídas; es importante medir la capacidad relativa en la prueba de turbidez, así como la actividad proteolítica relativa. La actividad proteolítica en la prueba de turbidez muestra mejor estabilidad en la cerveza almacenada que la actividad correspondiente a las mediciones de la actividad proteolítica.

2.- La cerveza es mejor diluyente que el agua a concentraciones enzimáticas menores al 10%. Aunque a esta concentración la actividad se conserva igual en agua que en cerveza.

3.- La estabilidad de soluciones acuosas altamente diluídas pueden mejorarse utilizando agentes reductores o simplemente agua carbonatada.

4.- La estabilidad de las enzimas para la prueba de turbidez varía inversamente con la dilución. La máxima dilución no debe exceder la proporción de 1:100 y el tiempo de almacenamiento menor de 24 horas a temperaturas de 0-5°C.

Estudios recientes hechos por Posada (1972) Seriban y Stiene (1972) llegaron a las mismas conclusiones

ABLANDAMIENTO DE CARNES. v.5.1 (5)

Desde los tiempos prehispánicos nuestro antepasados tra

taban la carne con jugo y hojas derivados del papayo para -
ablandarla.

La fácil masticación, sin la pérdida de la textura deseada, ha sido una característica buscada en la carne cocinada.

Los factores que influyen en el ablandamiento de la carne son todavía desconocidos. El mecanismo de la acción enzimática en este procedimiento es también desconocido, las investigaciones han demostrado que las enzimas rompen las proteínas del tejido conectivo, así como las de las fibras musculares dando como resultado carnes más blandas.

Industrias cerveceras en el país.

Cervecería Cuauhtemoc, S.A.

Cervecería Moctezuma, S.A.

Cervecería Modelo, S.A.

Empresas fabricantes de ablandadores para carne:

Mc Cormick Mex, S.A.

V.6 APLICACION DE RENINA. (3)

Esta enzima se utiliza en la fabricación de queso.

A continuación se describe un procedimiento de elaboración de queso cheddar utilizando un complejo enzimático microbiano como sustituto de la renina.

Los procesos típicos en la fabricación de queso cheddar involucran los siguientes pasos:

1.- Un lote de leche entera se calienta a 86° ó 90°F. y se inocula con una o más especies de bacterias productoras de ácido láctico como: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*.

Los organismos se desarrollan en la leche por 30 ó 60 minutos y al hacerlo producen un aumento en la acides en un 0.01 a 0.02%.

2.- Después de lograrse la acides, un agente coagulante como el cuajo de becerro se mezcla con la leche y se deja reposar durante 30 minutos a 88°F, obteniéndose una coagulación gelíforme.

3.- Cuando el cuajado adquiere cierto grado de firmeza se corta en cubos de 1/4 a 3/8 de pulgada

4.- El cuajado y el suero se homogenizan y se calientan hasta 102° ó 104°F. Este período de cocción requiere de 30 minutos aproximadamente.

5.- El cuajado y el suero se continúan agitando por unos 40-ó 50 minutos más, manteniendo la temperatura elevada. Durante este período; la temperatura, el aumento de la acides y el agente coagulante se combinan para lograr obtener la textura, firmeza y secado de las partículas del cuajado.

6 - Una vez que los cubos de cuajado han adquirido el grado de firmeza y la acides es de 0.02 a 0.03%, se deja reposar y se drena.

7 - El intervalo total de reposo y drenado es de dos y media horas, posteriormente se prosigue con los procedimientos característicos para obtener el queso cheddar.

En este proceso se utiliza un complejo enzimático como sustituto de la renina y consiste de una peptidasa neutra y otra ácida derivada del *Bacillus subtilis*.

Cuando los quesos cheddar son hechos de acuerdo al proceso convencional utilizando el complejo enzimático como agente coagulante, se encontró que el queso resultante tenía un contenido de humedad de 36.5 a 38.5%. Este factor es importante porque afecta la calidad del queso y debe mantenerse alrededor de 35%. Un nivel alto de humedad tiende a producir un queso sin cuerpo, sin coloración y de mal sabor.

El complejo de peptidasas actúa de la siguiente manera: la peptidasa neutra primeramente acciona la coagulación de la leche mientras que la peptidasa ácida es responsable de la firmeza y secado del cuajado. Se realizaron estudios sobre los factores que afectan las actividades de las peptidasas y se encontró que poseían actividades máximas a diferentes temperaturas. De tal manera que la peptidasa neutra mostró actividad máxima cerca de 115°F (46°C) mientras que la peptidasa ácida a 129°F (54°C). También se encontró que debido a las diferencias en las características de actividad térmica un aumento de 103° a 110°F causaba la activación de la peptidasa ácida en un 30% mientras que la peptidasa neutra (enzima coagulante) era activada menos del 5%.

El proceso requiere de un tratamiento al cuajado, para reducir el nivel de humedad, antes de añejarse y madurarse.

Al elevar la temperatura, debe hacerse rápidamente y mantenerse así por poco tiempo, suficiente para lograr la textura adecuada y dependiendo del organismo utilizado se puede enfriar a la temperatura de cocción.

Los mejores resultados se han logrado a temperaturas de 110°F sostenidas por 3 minutos. El punto más importante a con

siderar, es que la temperatura máxima no debe exceder más de la suficiente para alcanzar la firmeza y apariencia del queso, porque esto minimiza la inactivación de las bacterias productoras del ácido láctico.

El incremento de temperatura se aplica durante los primeros 15 minutos de la cocción, aunque el tiempo de máxima temperatura puede variar, dependiendo del tamaño del equipo y la cantidad de material procesado.

Ejemplo. (Proceso llevado a cabo en planta piloto).

Se pasteurizo leche entera con un contenido de 3.4% de grasa y se enfrió. En un tanque con chaqueta de vapor de 200 lb. de capacidad, se depositan 160 lb. de leche y se ajusta a una temperatura de 88°F. Se agrega 1.5% (en peso) de un cultivo comercial de bacterias productoras de ácido láctico y se deja madurar hasta que aumento la acidez en un 0.01 ó 0.02%, esto se logra en aproximadamente 30 minutos. Después se adiciona a la leche 15 ml. del complejo de peptidasas.

La actividad del complejo enzimático era tal que, 3 onzas fluidas coagulan 1000 lb. de leche. El cuajado obtenido se corto en cubos y se agito lentamente evitando que se desmoronara.

La etapa de cocción se inicio 10 minutos después de cortar la torta del cuajado, calentando hasta 103°F por un período de 30 minutos, la temperatura se mantuvo por 25 minutos más hasta que la acidez fué de 0.01 ó 0.015%.

Una vez lograda la acidez, se hizo pasar más vapor a través de la chaqueta aumentando la temperatura hasta 108°F en 5 minutos y se mantuvo así por 5 minutos. Cuando el cuajado estuvo firme y seco, la acidez se incremento hasta 0.03%.

de humedad del queso fue de 35%.

V.7 APLICACION DE PROTEASA MICROBIANA. (3)

Entre las diversas aplicaciones de las proteasas, tanto animales como microbianas, se encuentra la hidrólisis de - proteínas. A continuación se describe la preparación de una bebida ácida, a partir del frijol de soya desgrasado, la elaboración se hace por medio de una hidrólisis enzimática de - la proteína de este vegetal, formando péptidos o aminoácidos solubles. El proceso puede controlarse en lo que respecta a la cantidad de aminoácidos formados que causen un sabor desagradable.

Se calienta o se cocina a vapor frijol de soya desgrasado, en presencia de agua o de alcoholes de bajo peso molecular, preparando de esta manera al frijol de soya para la acción enzimática. Siendo esencial que el producto de la descomposición del frijol de soya denaturado y desgrasado, sea insaboro e incoloro.

Como resultado de varios estudios; de preparaciones enzimáticas y métodos de descomposición, se encontro que para obtener un buen producto de hidrólisis es necesario que el - frijol de soya este denaturado y desgrasado al reaccionar - con una proteasa ácida producida por microorganismos o una - preparación enzimática conteniendo la proteasa ácida como enzima esencial. La reacción de hidrólisis debe detenerse antes de que la razón de: formol-nitrógeno en el filtrado de - nitrógeno total la mezcla reaccionante alcance el 20%. En este caso, un período de reacción corto disminuye el rendimiento de péptidos, mientras que uno largo contribuye a una descomposición mayor. Por lo tanto es necesario ajustar el período de reacción.

En el caso de emplear otra proteasa (alcalina o neutra) se obtiene un producto con una relación F-N/Nt mayor del 20%.

La desnaturalización se lleva a cabo calentando la proteína del frijol de soya desgrasado en agua o en un solvente orgánico soluble en agua. El sabor del frijol de soya después del tratamiento, es diferente del material crudo perdiendo completamente el llamado "sabor verde".

La proteasa ácida utilizada debe poseer alta estabilidad térmica; como la producida por el *Penicillium duponti* - ATCC 20186. Esta enzima muestra actividad dentro de un rango de pH de 1.5 a 6.5 y la actividad óptima se encuentra entre 2.0 a 3.0. El rango de temperatura es de 20° a 90°C.

La temperatura óptima varía de acuerdo al pH; por ejemplo, a un pH de 2.5 la temperatura óptima es de 60°C, a 3.5 la temperatura aumenta a 75°C y a un pH de 4.5 la temperatura óptima es de 75° a 80°C. La temperatura a la que actúa esta enzima es la más alta de cualquier proteasa conocida.

Ejemplo:

300 kg de frijol de soya fueron mezclados con 2000 lts. de agua, y el procedimiento de desnaturalización se realizó con vapor a 100°C durante 20 minutos. La solución extraída del cocido fue tratada con una enzima de *Aspergilli* amarillo.

Para confirmar la completa desnaturalización; se agrega a una muestra de la solución extraída, una solución de ácido tricloroacético observando que no halla precipitación.

En seguida se agrega a la solución, 30 kg de ácido cítrico ajustando el pH a 3.8 y se adiciona 3 kg de la preparación enzimática con una proteasa ácida obtenida del *Aspergillus inui* ATCC No. 14333, cultivado en salvado de trigo o arroz.

La reacción enzimática se conduce a 50°C durante 6 ho--

ras manteniendo el sistema en agitación. Concluida esta etapa la mezcla se filtra, obteniéndose una solución péptica - (1900 lts.) con un pH de 4.0 y se trata con 5 kg de carbón - activado para decolorarla. El procedimiento de secado se hace por aspersión obteniéndose 200 kgs. de un polvo insaboro- e inodoro, con un contenido de 55% de péptidos en términos - de proteína. La relación de F-N/Nt (formol nitrógeno/nitróge- no total) fue del 16% en base al nitrógeno total. Se mezcla- ron 5 kgs del polvo obtenido con 5 kgs. de glucosa, 0.2 kg- de ácido tartárico, 0.5 kg de bicarbonato de sodio y peque- ñas cantidades de esencia de cola, caramelo y dulcificantes- artificiales. Preparando una bebida de cola conteniendo 2.8% de péptidos en términos de proteína.

Empresas que fabrican hidrolizados de proteínas (vegetales):
(12)

Deshidratadora de México, S.A.

Enmex, S.A. de C.V.

Industrial Deshidratadora, S.A.

Laboratorios Griffith de México, S.A.

Química Hércules, S.A. de C.V.

V.8 APLICACION DE LIPASAS. (8)

Las lipasas se utilizan para impartir sabores caracte- rísticos a ciertos alimentos como el queso roquefort, queso- pamesano, también a la mantequilla y dulces derivados de la leche.

En seguida se hará mención de un tratamiento de lipasas al queso cheddar.

En el proceso que se va a describir se utiliza una mezcla de lipasa, proteasa y sal. La lipasa puede ser de origen animal o microbiano, si es de origen microbiano puede obtenerse del moho *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Penicillium roqueforti*, *P. glaucum* y *Rhizopus oryzae*.

La proteasa neutra se deriva de las especies *Aspergillus*, *Mucor* y *Rhizopus*.

Se deposita leche pasteurizada en un tanque y se mezcla con activador láctico (0.5%), la temperatura se ajusta a 88°F y se agrega colorante de queso (15 ml/1000 lb. de leche). El activador se mantiene en contacto con la leche durante 15 ó 30 minutos.

Coagulación de la leche:

Un extracto de cuajo diluido en agua (en la proporción de 1/40 partes de agua), se agrega a la leche (90 ml./100 lb. de leche) se agita y se dejan transcurrir 25 minutos dando tiempo a que se cuaje la leche.

Cuando se ha logrado la firmeza del cuajado se corta en cubos de 1/4 pulg. y se agita lentamente por 5 minutos.

Cocinado:

El cocimiento se hace gradualmente alcanzando en 30 minutos 100°F manteniendo al mismo tiempo una agitación constante. Se dejan transcurrir 45 minutos agitando en forma intermitente.

Concluido el cocimiento, se deja reposar y se drena el suero.

Procedimiento de saborización:

El cuajado exprimido se reposa por 15 minutos y se corta en cuadros espaciados por 1 pulg., los cubos se voltean - repetidamente cada 15 minutos y al último se apilan.

El proceso de cheddarización se continúa hasta que la - acides del suero drenado es de 0.5 a 0.6%.

Los cubos de cuajado se muelen y se regresan al tanque, luego se agrega, en forma homogénea, la mezcla enzimática y se agita por 30 minutos. La mezcla enzimática consiste de: - 2.3 lb. de NaCl/100 lb. de cuajado, lipasa de origen animal - de 2 a 20 gr/100 kg. de cuajado y una proteasa neutra 5 a 50 gr./100 kg. de cuajado.

Moldeado y comprimido:

El queso se deposita en moldes metálicos y se mantiene - prensado a 20 psig.

Secado y curado del queso:

El queso se deposita en láminas y se seca por 3 ó 4 - días a 60°F y una humedad del 75%. Cada pieza de queso se cu - ro por un mes a 10° ó 25°C. Este período fue suficiente para producir un alto nivel de sabor.

V.9 APLICACION DE OXIDORREDUCTASAS. (5)

La glucosa oxidasa y la catalasa son las oxidoreducta - sas más importantes. Se utilizan principalmente en los si - guientes procesos:

(Glucosa oxidasa)

Eliminación de la glucosa del huevo en polvo.

Eliminación del oxígeno en la mayonesa.

(Catalasa)

Remoción de H_2O_2 .

Conjuntamente con la glucosa oxidasa.

Esterilización de alimentos.

Eliminación de la glucosa del albúmen del huevo: (4)

El primer uso importante que se le dio a la glucosa oxidasa, fue en la prevención de la reacción de Maillard.

La reacción de Maillard ocurre entre un grupo aldehído y un grupo amino. Usualmente los grupos aldehídos que se encuentran en los alimentos son de sacáridos, como la glucosa; los grupos amino se encuentran en la proteína. De tal manera que si un material protéico mezclado con glucosa u otro azúcar reductor se sujeta a condiciones donde se favorezca la reacción de Maillard, se detecta la desaparición de la glucosa y grupos amino. Subsecuentemente se aprecia un cambio en el sabor, olor y la aparición de una coloración café.

La reacción de Maillard en los alimentos no siempre es indeseable. El color y el sabor desarrollados en la corteza de productos horneados (pasteles, pan, etc.) se deben a esta reacción, así como también el color y sabor de los cereales tostados, papas fritas y la cubierta de las cartas rostizadas.

Cuando ocurre en los sólidos del huevo, papa deshidratada, la reacción es definitivamente indeseable. Se han intentado varias maneras de retardar la reacción de Maillard. La mayoría se basa en la modificación de las condiciones del sistema en forma desfavorable para la reacción. La manera -

ideal de evitarlo, desde el punto de vista práctico y teórico, es remover o hacer que uno de los reactantes se inactive. No es práctico ni deseable remover la proteína, pero la conversión del grupo aldehído se ha logrado a través de la preparación enzimática glucosa oxidasa-catalasa.

La acción enzimática convierte a la glucosa en ácido - glucónico. Al tratar cantidades considerables de albúmen - - (clara de huevo), o el huevo entero, el oxígeno necesario no se puede difundir adecuadamente y suministrándolo causaría - la formación de gran cantidad de espuma. Sin embargo es necesario el suplemento de oxígeno en el sistema y la mejor manera de hacerlo fue la de agregar H_2O_2 en solución (35%) - en esta forma la catalasa descompone suficiente peróxido en H_2O y O_2 para la reacción enzimática.

Para lograr un producto estable la concentración final de glucosa libre debe ser de 0.1% (base seca).

La reacción se lleva a cabo en presencia de un exceso - de oxígeno, de manera que la reacción es de primer orden. En estas condiciones se requiere del mismo tiempo en reducir el contenido de glucosa del 3% a 1.5% que de 0.2% a 0.1%. Estos es, el tiempo de reacción es inversamente proporcional a la concentración de la enzima. La alternativa de un período de procesamiento más prolongado es una cuestión económica a considerar y depende de la capacidad del equipo y de la calidad que se le quiera impartir al producto.

Scott (1953); Baldwin y asoc. (1953) desarrollaron un - proceso de eliminación de glucosa el cual se lleva a cabo a 80-100°F y la adición de H_2O_2 se hizo para controlar la espumación del sistema (Scott, 1953), más tarde se descubrió que la solubilidad del oxígeno al aumentar a menor temperatura, - compensaba la disminución de la velocidad de reacción de la enzima. Prácticamente la velocidad era la misma a 90° que a-

50°F (Scott, 1964). Aunque todavía se realizan procesos a 80°-100°F, se prefiere el efectuado en frío. La comparación de los dos métodos puede apreciarse en la figura 9. La eliminación de los sacáridos a temperaturas debajo del punto de fusión de la grasa proporciona ventajas a la conservación de la emulsión.

El albúmen del huevo fresco tiene un pH de 7.0 y aumenta rápidamente al perder CO_2 y al momento de procesarlo el valor es de 9.0. Para ajustar el pH dentro del rango de actividad de la enzima, se agrega por cada 1000 lbs. de albúmen, 1 lb. de ácido cítrico seco (en forma de solución del 5-10%) neutralizando de nuevo la suspensión. En seguida se agregan 600 ml. de H_2O_2 (35%) y la preparación enzimática de glucosa oxidasa-catalasa. Un proceso de 12-16 horas requiere de 75,000 unidades de glucosa oxidasa con la respectiva cantidad de catalasa del sistema se mantiene a 55°F porque facilita la separación de la cascara.

La espuma tenderá a aumentar rápidamente al actuar la preparación enzimática. El grado de espumación debe mantenerse de manera que facilita la flotación de impurezas (yema, bacterias o grasa). El peróxido de hidrógeno se adiciona continuamente hasta la conclusión de la reacción. Tan pronto como la espuma comienza a disminuir o deja de acumularse se adiciona el peróxido (35%) en una proporción de 5 ml./min./1000 lbs. de albúmen.

Después de 2.5 hrs. aproximadamente, aumenta de nuevo la espuma y la proporción del peróxido se divide a la mitad (2.5 ml./min./1000 lb. De igual manera en las próximas 2.5 hrs. se repite el mismo procedimiento y la proporción se reduce a 1.25 ml./min./1000 lb. hasta que concluya la reacción.

El tiempo de reacción esta en función de la regularidad con que se agrega el peróxido y en cierto grado también de -

la temperatura cuando es menor de 55°F. La reacción se considera concluida cuando el nivel de glucosa es de 0.1% (base - seca). Disminuir más el contenido de glucosa requiere de más tiempo o mayor cantidad de enzima. El pH final es de 6.2, y el líquido se puede secar por medio de métodos convencionales.

Empresas fabricantes de huevo en polvo: (12)

Abarrotes Nacional, S.A.

Deshidratadora de México, S.A.

Fervig, S.A.

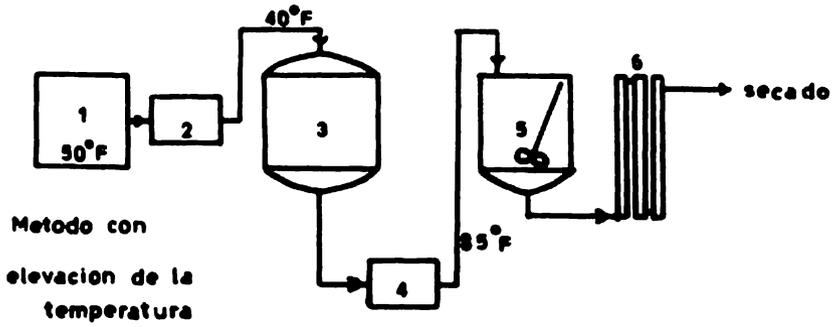
Industrial Deshidratadora, S.A.

Química Interamericana, S.A.

Fabricantes de mayonesa:

Herdez, S.A. (12)

Fig. 8



Proceso de eliminacion de glucosa en el huevo

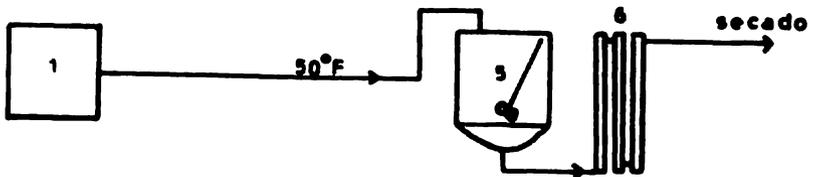


DIAGRAMA DE FLUJO (fig. 19) (4)

- 1.- Cuarto de separación de la cáscara y yema.
- 2.- Enfriador.
- 3.- Tanque de almacenamiento.
- 4.- Calentador.
- 5.- Tanque de reacción.
- 6.- Pasteurizador.

V. 10 APLICACION DE GLUCOSA ISOMERASA. (4)

Esta enzima es una de las que ha recibido mayor impulso en su aplicación.

Manufactura de Fructosa:

El impulso tecnológico que se la ha dado a la glucosa - isomerasa ha permitido desarrollar procesos nuevos y sofisticados. Se llevan a cabo en forma continua, hidrolizados del almidón con la enzima inmovilizada.

Existen métodos donde se emplean membranas semipermeables en reactores de agitación continua. El licor isomerizado se extrae en la misma proporción en que se alimenta el - sustrato logrando un proceso estacionario.

La enzima se retiene en la zona de reacción por la membrana, y en la medida en que pierda la actividad catalítica es sustituida; de esta manera se mantiene la concentración - de la enzima constante, lo que permite un efluente del producto en forma constante.

Takasaki (1972) formuló un proceso con glucosa isomerasa fija en las paredes celulares, las cuales suspendidas en una solución con el sustrato se bombean a través de un filtro, formando una capa con las partículas celulares. La solución pasando a través de la capa celular se isomeriza al grado deseado controlando el flujo a través del sistema.

La actividad de estos procesos depende de muchos factores; como el pH, la temperatura y la concentración de glucosa de los hidrolizados del almidón alimentados al sistema.

La adición de pequeñas concentraciones de sales de magnesio y bisulfito a la solución del sustrato favorecen la -

actividad y estabilidad de la enzima.

Las ventajas del sistema inmobilizado resultan en una alta actividad por unidad de masa, dando como resultado que una gran cantidad de enzima puede empacarse en un reactor relativamente pequeño, logrando procesar grandes cantidades de sustrato.

El proceso se vuelve continuo colocando reactores en paralelo o en serie. La reacción se controla mediante un polarímetro, ya que la conversión causa una disminución en la rotación específica.

VI

ASPECTOS DEL MERCADO.

En México se comercializan varias enzimas y la industria alimentaria emplea algunas de ellas. La mayor parte de los productos enzimáticos son importados, sin embargo, se producen y exportan amilasas y proteasas (las enzimas de mayor consumo).

Por medio de la información estadística disponible se tratará de mostrar las tendencias aparentes al consumo de algunas enzimas comerciales.

VI.1.1 Amilasas.

La industria de la panificación utiliza gran cantidad de amilasas. La enzima (o enzimas) se agrega a la harina en el molino o bien, al elaborar el pan. La tabla 6.1 muestra los datos de producción de harina de trigo de primera.

TABLA 6.1 (16)

PRODUCCION DE HARINA DE TRIGO DE PRIMERA

	Toneladas
1975	1,438,403
1976	1,501,209
1977	1,601,496
1978	1,679,339
1979	1,845,622
1980	1,881,096

Los datos se ajustan a una línea recta por medio del método de mínimos cuadrados proyectando una producción aparente de harina de trigo de primera clase (figura 9).

La determinación de las constantes "m" y "b" se hace con las siguientes ecuaciones:

$$y = m(x) + b$$

$$m = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{N}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}} \quad (10) \quad (15)$$

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{N} \quad (11) \quad (15)$$

m.- Pendiente de la recta.

b.- Intersección en el eje de las ordenadas.

Aunque no toda la harina es suplementada con enzimas, - la cantidad que si lo es, puede considerarse que aumenta en la misma proporción que la producción de harina, manteniendo una demanda creciente de amilasas en la industria panificadora.

En los procedimientos de panadería se utilizan de 10 a- 15 unidades de actividad de amilasa por cada 100 gr. de harina. Existen preparaciones desde 200,000 Unidades/gr. hasta - 160 U./gr., según la aplicación que se desee.

TABULACION. (datos de la tabla 6. 1)

x	y
1	1,438,403
2	1,501,209
3	1,601,496
4	1,679,339
5	1,845,622
6	1,881,096

$$\sum xy = 36,477,351$$

$$\frac{\sum x \cdot \sum y}{N} = 34,815,077.5 \quad \sum y = 9,947,166$$

$$\sum x^2 = 91 \quad \sum x = 21$$

$$\frac{(\sum x)^2}{N} = 73.5 \quad N = 6$$

Substituyendo en las ecuaciones (10) y (11):

$$m = 94,987$$

$$b = 1,325,406$$

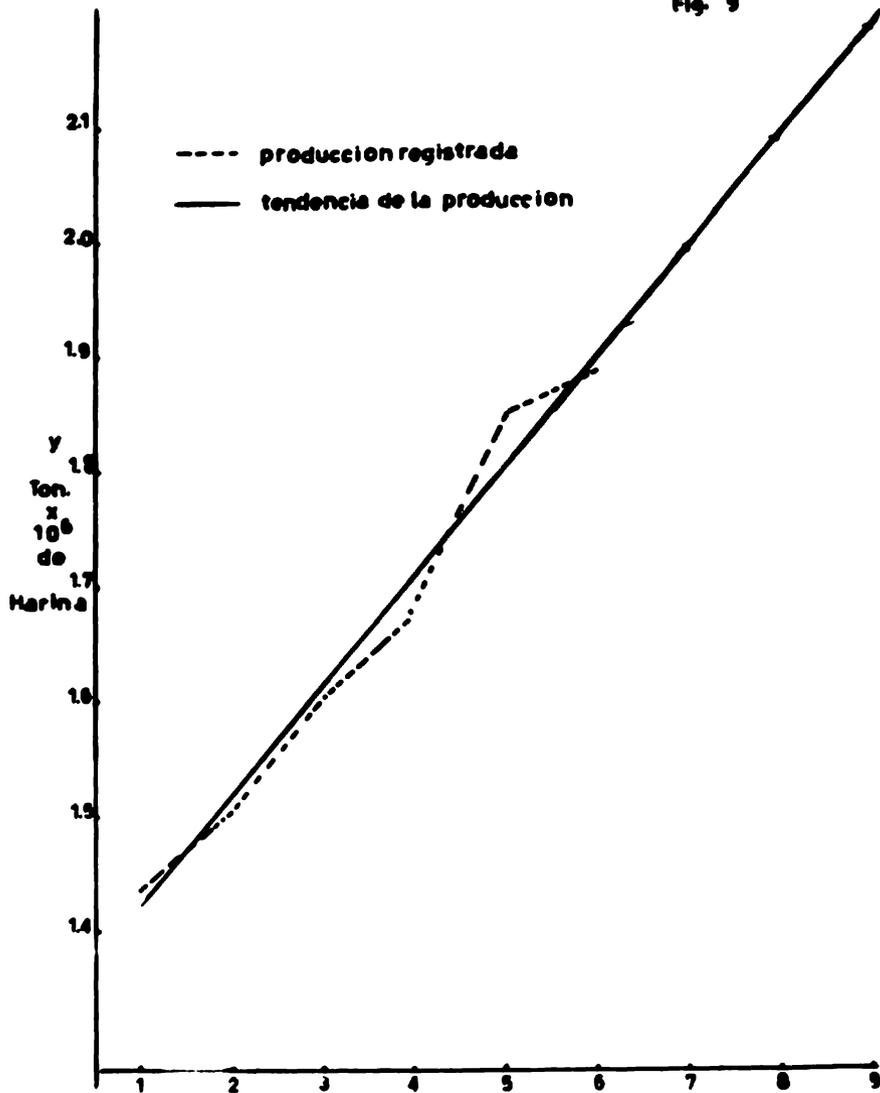
Resultando la ecuación:

$$y_c = 94,987(x) + 1,325,406 \quad (12)$$

y_c .- valor de producción ajustado.

Proyección de la producción de
harina de trigo de 1era

Fig. 9



Producción de glucosa de maíz: VI.1.2

La elaboración de glucosa, representa un amplio mercado para la glucoamilasa y en ocasiones su utilización va acompañada de tratamientos con α y β amilasas.

Se procederá a efectuar el mismo procedimiento anterior de proyección de la producción de glucosa (figura 10).

TABLA 6.2 (16)

PRODUCCION DE GLUCOSA	
Años	Toneladas.
1975	41,769
1976	48,562
1977	50,241
1978	50,488
1979	54,856
1980	56,729

TABULACION

x	y
1	41,769
2	48,562
3	50,241
4	50,488
5	54,856

$$\Sigma xy = 1,106,202$$

$$\Sigma y = 302,635$$

$$\frac{\Sigma x \Sigma y}{N} = 1,059,222.5$$

$$\Sigma x = 21$$

$$\Sigma x^2 = 91$$

$$N = 6$$

$$\frac{(\Sigma x)^2}{N} = 73.5$$

Substituyendo los valores en las ecuaciones (10) y (11) se obtienen los parámetros de la ecuación "m" y "b".

$$m. = 2,684.5$$

$$b = 41,043.3$$

$$y_c = 2,684.5(x) + 41,043.3 \quad (13)$$

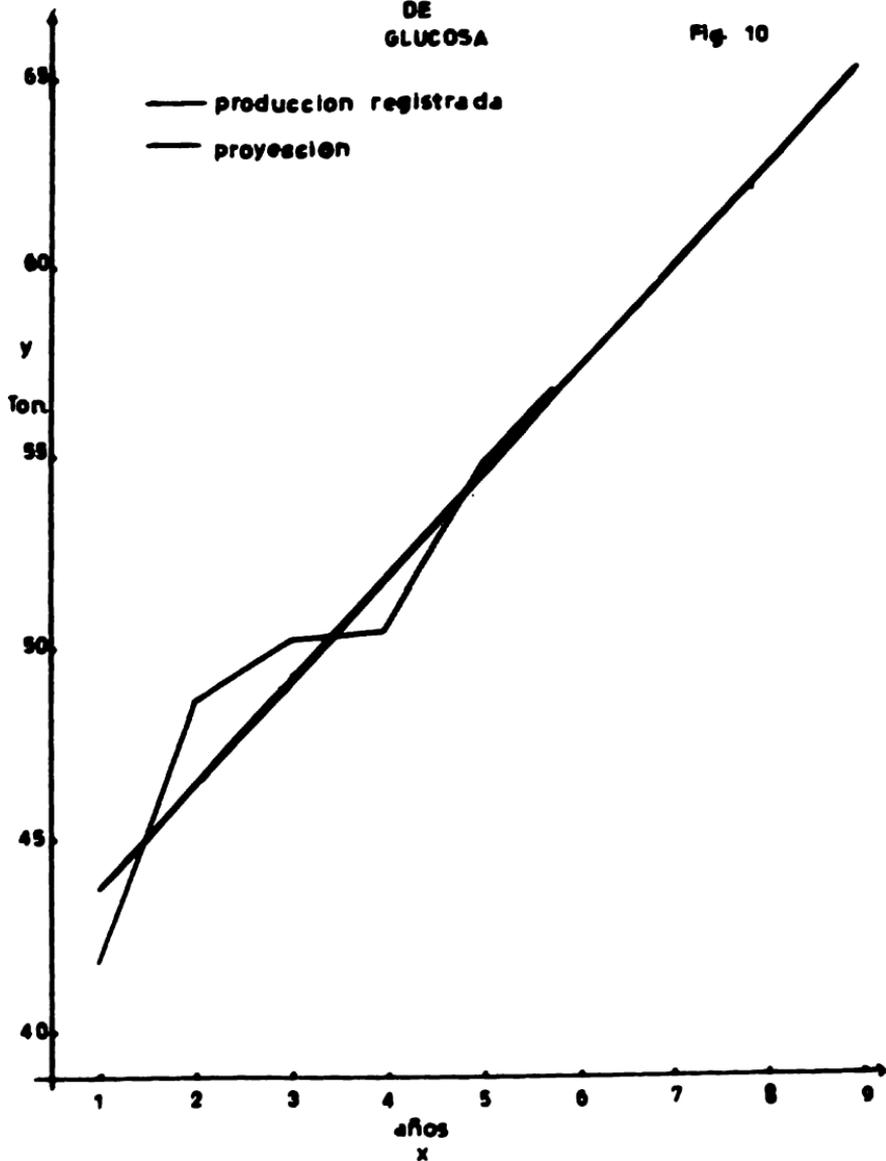
La representación gráfica se muestra en la figura 10.

Se utilizan aproximadamente 200 unidades de glucoamilasa por Kilogramo de almidón seco.

A continuación se muestran los datos estadísticos de la importación de diastasa de *Aspergillus oryzae* (mezcla de α - y β amilasas se emplea ampliamente en la industria cervecera y panificadora), amilasa bacteriana y amilasa (de otras fuentes). Figuras 11, 12 y 13. (14)

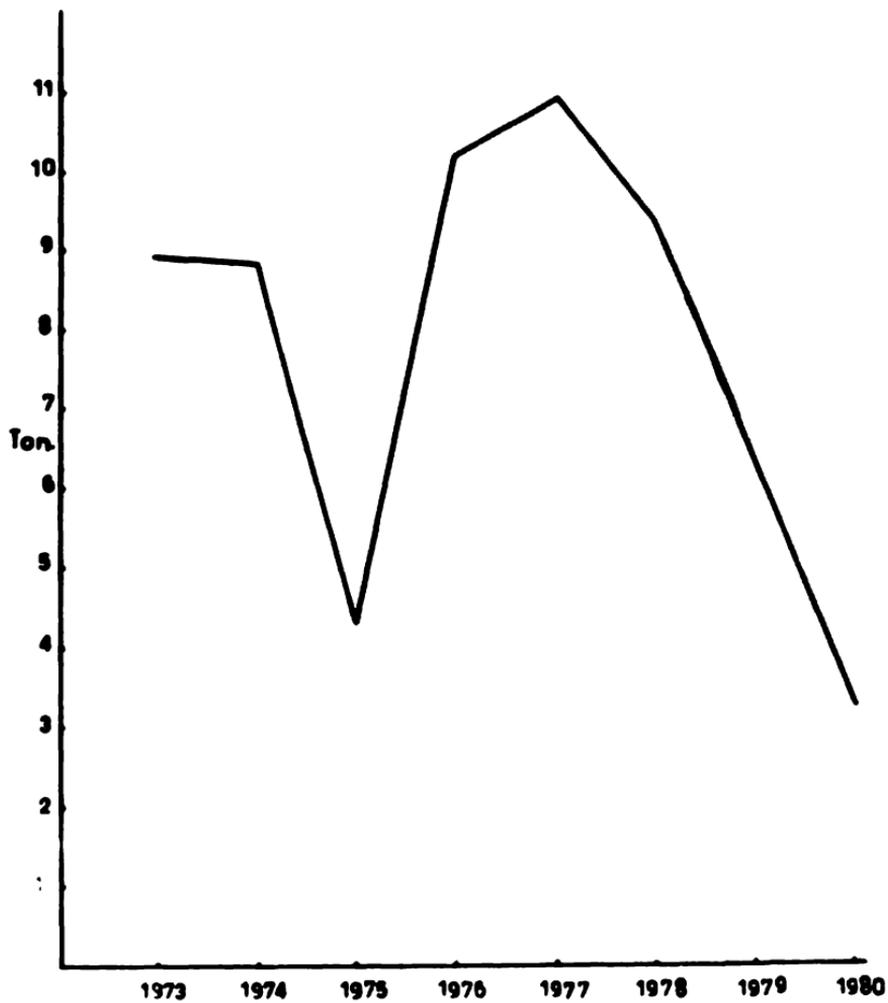
PRODUCCION
DE
GLUCOSA

Fig. 10



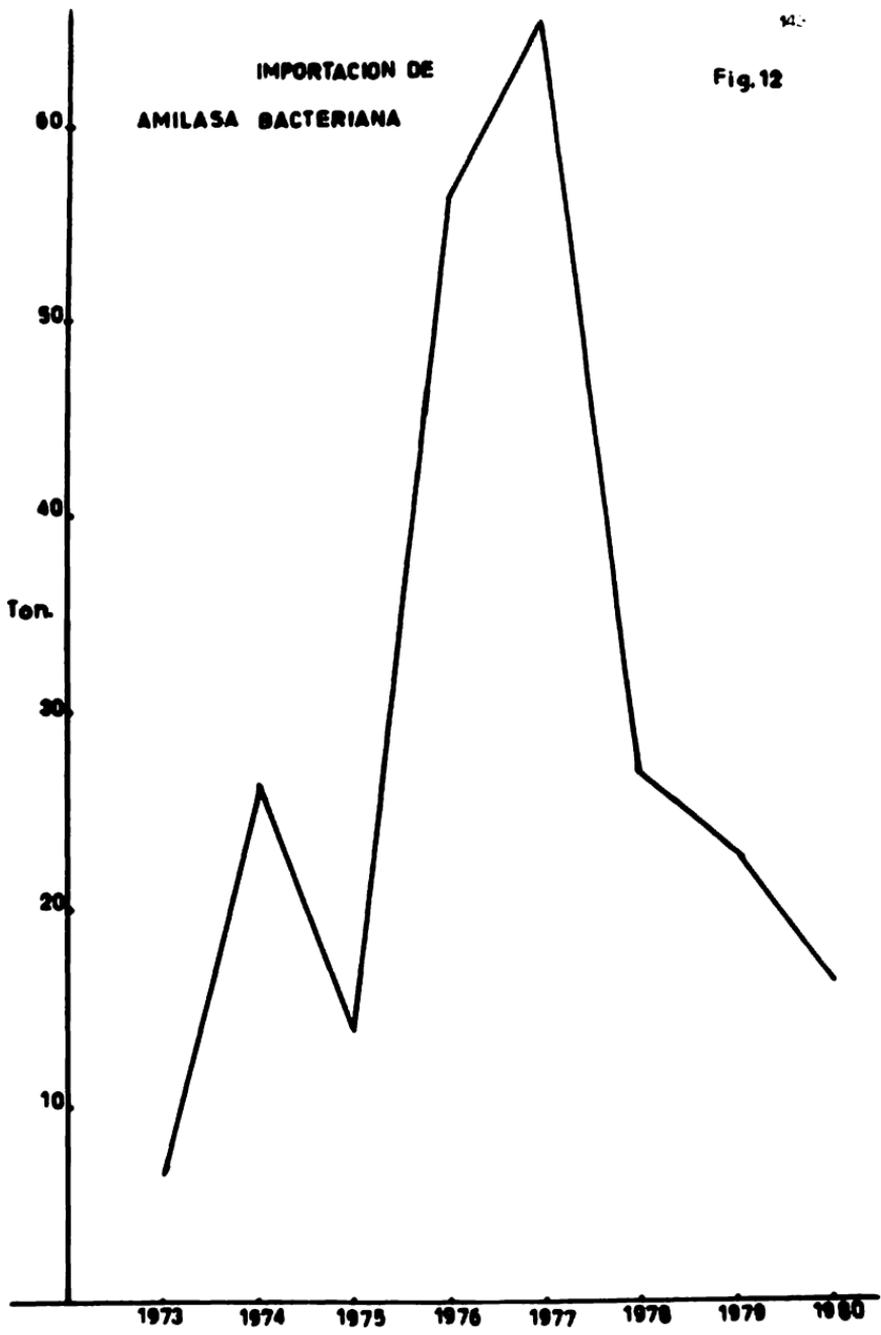
**IMPORTACION
DE
DIASTASA**

Fig. 11



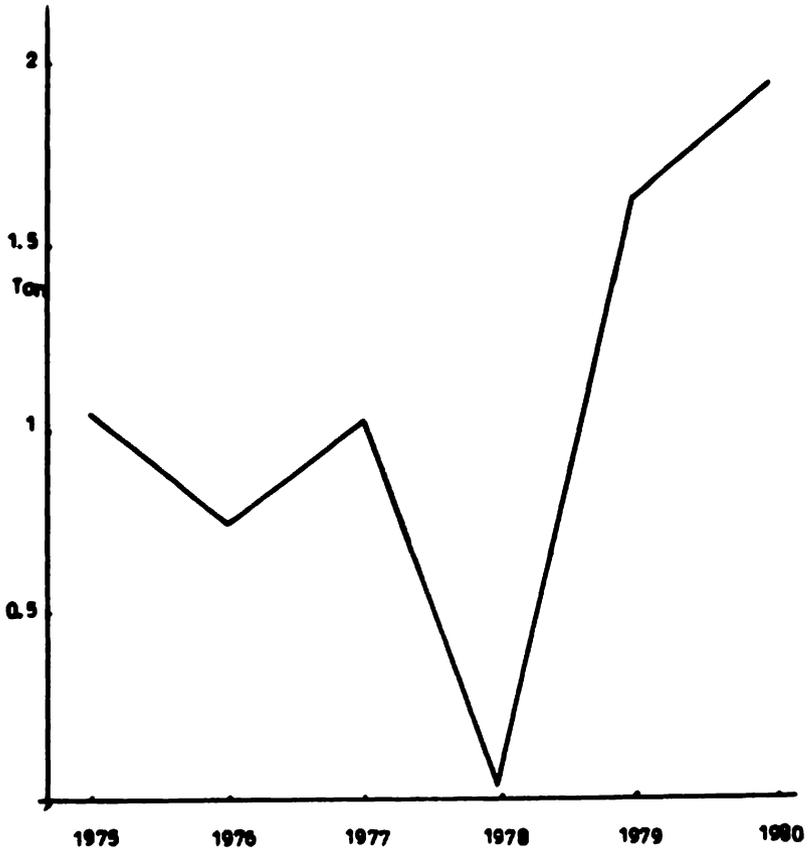
**IMPORTACION DE
AMILASA BACTERIANA**

Fig. 12



**IMPORTACION
DE
AMILASA**

Fig. 13



EMPRESAS IMPORTADORAS DE AMILASAS. (14)

Diastasa de *Aspergillus oryzae*:

PROBST, S.A.

C. CAZENAVE TAPIE DELECOSE

ENMEX, S.A.

ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS, S.A.

Amilasa bacteriana:

CERVECERIA CLAUHTEMOC, S.A.

CYANAMID MEX. S.A. DE C.V.

J.T. BAKER, S.A. DE C.V.

CERVECERIA MOCTEZUMA, S.A.

ENMEX, S.A.

OSO NEGRO, S.A.

CERVECERIA MODELO, S.A.

Amilasa (otras fuentes):

MERCK MEX. S.A.

RECORDATI MEX. S.A.

CONSUMO DE CELULASA. VI.2 (14)

Aparentemente toda la celulasa utilizada en el país es de importación. Se procederá, con la información estadística, a efectuar una proyección del consumo de la enzima por el método de mínimos cuadrados.

La tabla 6.3 muestra la importación en los últimos años.

TABLA 6.3

Años	Kilogramos.
1975	151
1976	1,683
1977	1, 183
1978	1, 111
1979	2,312
1980	2,659

TABULACION

x	y
1	151
2	1,683
3	1, 183
4	1, 111
5	2,312
6	2,659

Substituyendo en las ecuaciones (10) y (11) los siguientes valores:

$$\sum xy = 39,024$$

$$\frac{\sum x \sum y}{N} = 31,846.5$$

$$\sum y = 9,099$$

$$\sum x^2 = 91$$

$$\sum x = 21$$

$$\frac{(\sum x)^2}{N} = 73.5$$

$$N = 6$$

Se obtiene:

$$m = 410.14$$

$$b = 81$$

Quedando la ecuación

$$y_c = 410.14(x) + 81 \quad (14)$$

y_c - Importación corregida

Las gráficas (figuras 14 y 15) muestran la tendencia al consumo y la importación de celulosa.

Proyección del consumo de celulosa

Fig. 14

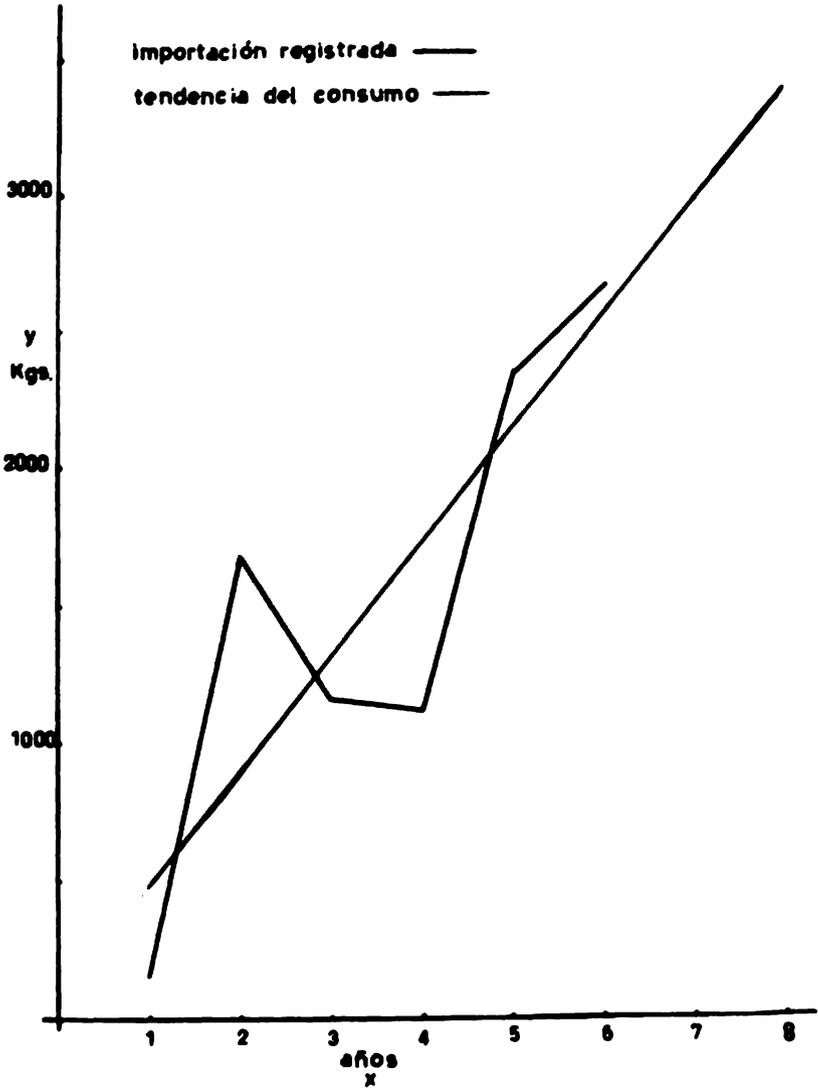


Fig. 19

IMPORTACION
DE
CELULOSA



EMPRESAS QUE IMPORTAN CELULOSA. (14)

CERVECERIA MOCTEZUMA, S.A.

RECORDATI, S.A.

ALIMENTOS VERACRUZ, S.A.

C. CAZENAVE TAPIE DELECOSE

CERVECERIA CUAUHEMOC, S.A.

CERVECERIA MODELO, S.A.

ENMEX, S.A.

ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS, S.A.

OFTASA, S.A. DE C.V.

OSO NEGRO, S.A.

SYDNEY ROSS CO. S.A.

CONSUMO DE PECTINASA. VI.3 (16)

Los datos estadísticos sobre la importación de pectinasa no se encuentran descritos; por lo que la tendencia a su consumo, se puede explorar a través de la producción de jugo de fruta.

Por medio del método de mínimos se ajustará una tendencia lineal de la producción.

TABLA 6.4
PRODUCCION DE JUGO DE FRUTA

Años	Toneladas
1975	55,003
1976	61,642
1977	58,385
1978	56,995
1979	67,415
1980	65,524

TABULACION

x	y
1	55,003
2	61,642
3	58,385
4	56,995
5	67,415
6	65,524

Procediendo a calcular los términos de las ecuaciones - (10) y (11) se obtiene:

$$\Sigma xy = 1,311,641$$

$$\frac{\Sigma x \Sigma y}{N} = 1,277,374 \qquad \Sigma y = 364,964$$

$$\Sigma x^2 = 91 \qquad \Sigma x = 21$$

$$\frac{(\Sigma x)^2}{N} = 73.5 \qquad N = 6$$

Calculando las constantes de la ecuación:

$$m = 1,958.1$$

$$b = 53,973.9$$

Resultando la ecuación:

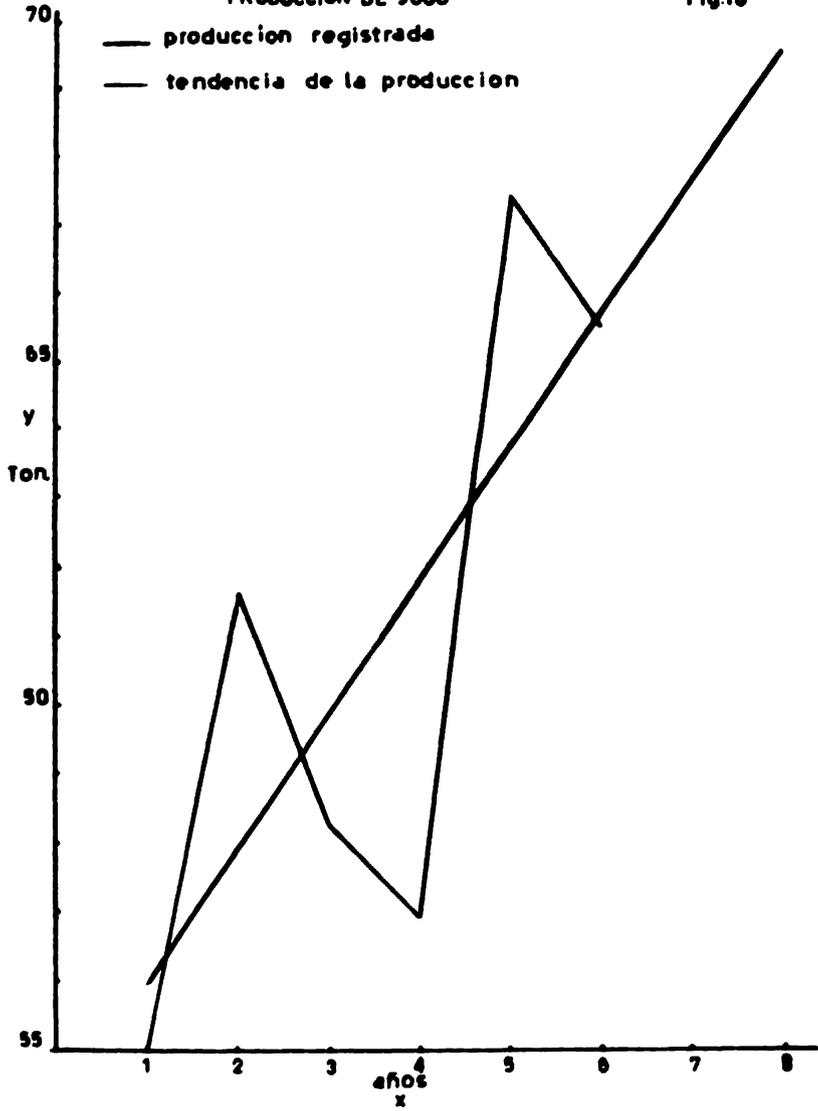
$$y_c = 1,950.7 (x) + 54,042.5 \qquad (15)$$

y_c .- producción corregida.

La representación gráfica se muestra en la figura 16.

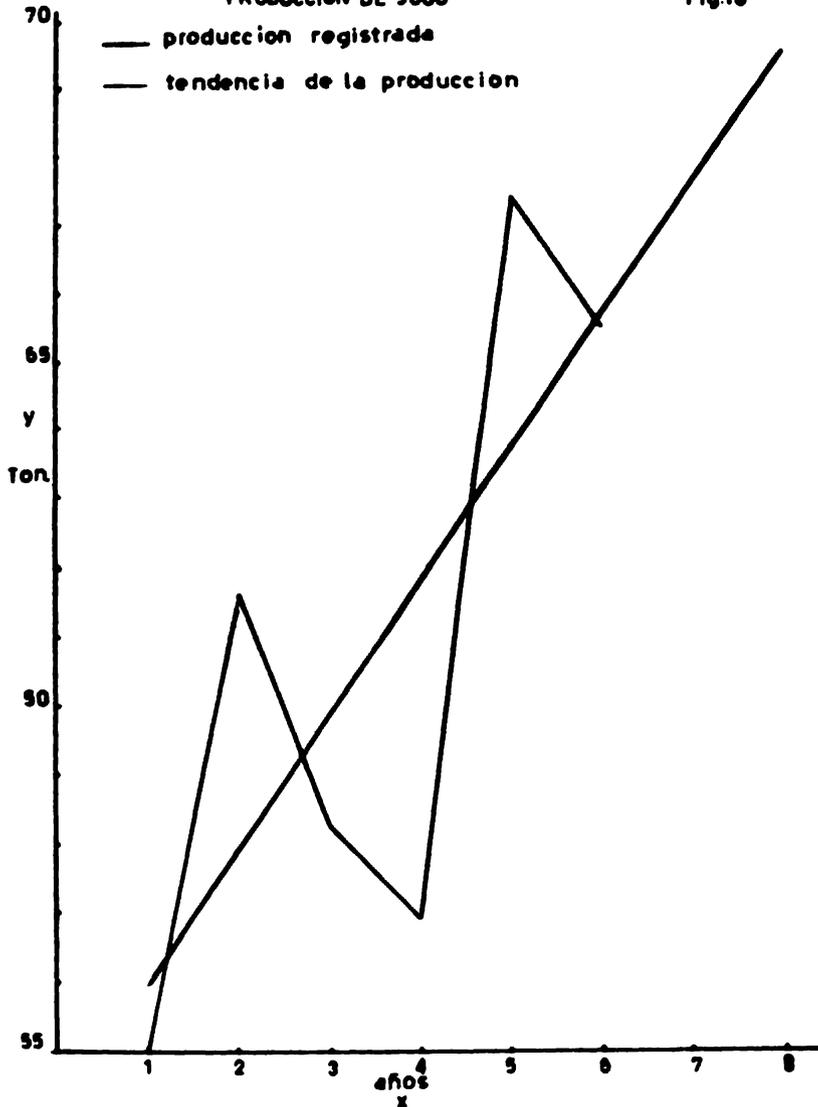
PRODUCCION DE JUGO

Fig.16



PRODUCCION DE JUGO

Fig.16



IMPORTACION DE INVERTASA. VI.4 (14)

El consumo aparente de invertasa puede apreciarse con los datos estadísticos de importación (tabla 6.5) representados también gráficamente (figura 17).

El mercado de esta enzima tiende a disminuir, o a mantenerse constante. En otros países ha sido desplazada por la glucosa isomerasa, en algunos procesos.

TABLA 6.5
IMPORTACION DE INVERTASA

Años	Kilogramos
1975	1,425
1976	4,628
1977	4,332
1978	3,061
1979	1,822
1980	2,131

Empresas que importan invertasas:

MERCK MEX, S.A.

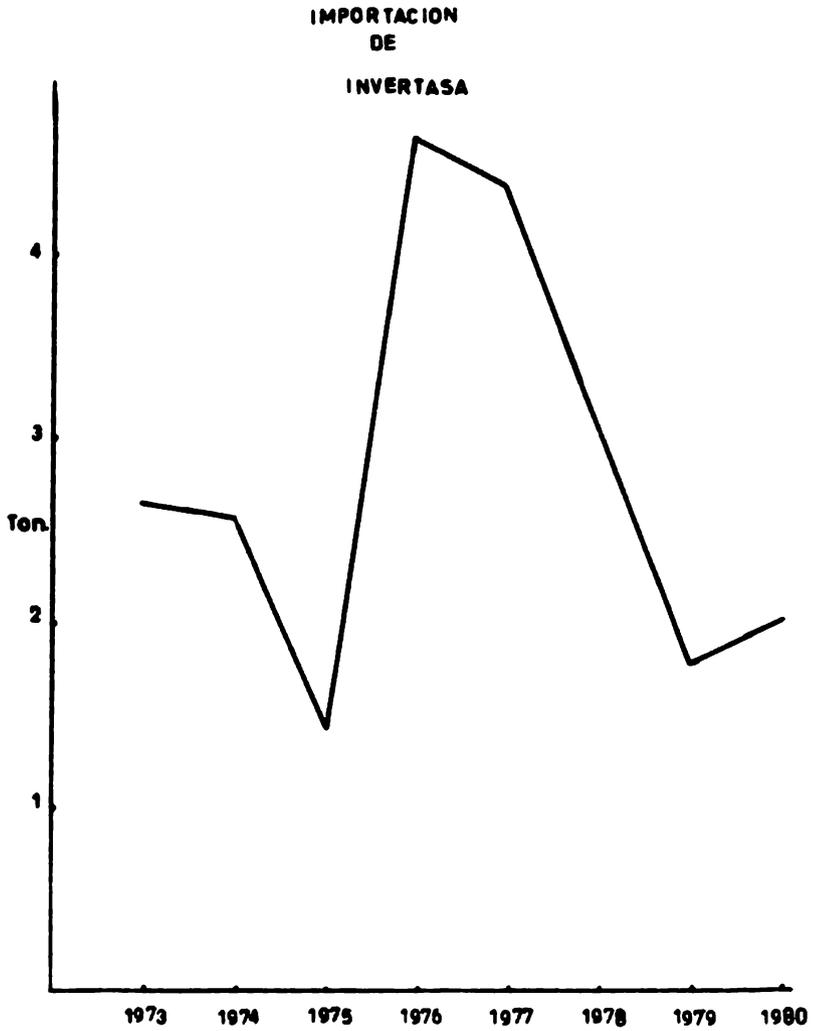
ANACHEM, S.A.

PRODUCTOS HARINA, S.A.

PROVEEDOR CIENTIFICO, S.A.

NAARDEN O.D.P. FRAGRANCES, S.A. DE C.V.

Fig.17



CONSUMO DE PAPAÑA EN LA ELABORACION DE CERVEZA. VI.5 (16)

La papaína es la proteasa más utilizada en la elaboración de la cerveza. Aproximadamente se emplean 8 ppm de papaína comercial en los procedimientos de prevención de la turbidez (chillproofing) significando una creciente demanda de la enzima.

Ajustando los datos de producción de cerveza (Tabla 6.6) por medio del método de mínimos cuadrados se obtiene:

TABLA 6.6
PRODUCCION DE CERVEZA

Años	M ³
1975	1,951,893
1976	1,937,732
1977	2,160,551
1978	2,263,323
1979	2,546,355
1980	2,655,275

TABULACION (tabla 6.6)

x	y
1	1,951,893
2	1,937,732
3	2,160,551
4	2,263,323
5	2,546,355
6	2,655,275

$$\Sigma xy = 50,025,727$$

$$\frac{\Sigma x \cdot \Sigma y}{N} = 47,302,951.5$$

$$\Sigma y = 13,515,129$$

$$\Sigma x^2 = 91$$

$$\Sigma x = 21$$

$$\frac{(\Sigma x)^2}{N} = 73.5$$

$$N = 6$$

Substituyendo estos valores en las ecuaciones (10) y - (11) se obtienen los parámetros "m" y "b".

$$m = 155,587.17$$

$$b = 1,707,966.4$$

La ecuación de la recta es:

$$y_c = 155,587(x) + 1,707,966 \quad (16)$$

y_c .- valor de producción corregido.

Aproximado un consumo de papaína de 8 ppm se puede estimar en base a los datos de producción de cerveza, el consumo aparente de papaína por la industria cervecera (Tabla 6.7).

TABLA 6.7

Años	Kg de papaína
1975	15,615
1976	15,501
1977	17,284
1978	18,106
1979	20,370
1980	21,242

TABLACION

x	y
1	15,615
2	15,501
3	17,284
4	18,106
5	20,370
6	21,242

Desarrollando el mismo método:

$$\sum xy = 400,195$$

$$\frac{\sum x \sum y}{N} = 37,813$$

$$\sum y = 108,118$$

$$\sum x = 91$$

$$\sum x = 21$$

$$\frac{(\sum x)^2}{N} = 73.5$$

$$N = 6$$

Substituyendo en las ecuaciones (10) y (11):

$$m = 1,244$$

$$b = 13,663$$

Quedando la ecuación que marca la tendencia al consumo:

$$y_c = 1,244(x) + 13,633 \quad (17)$$

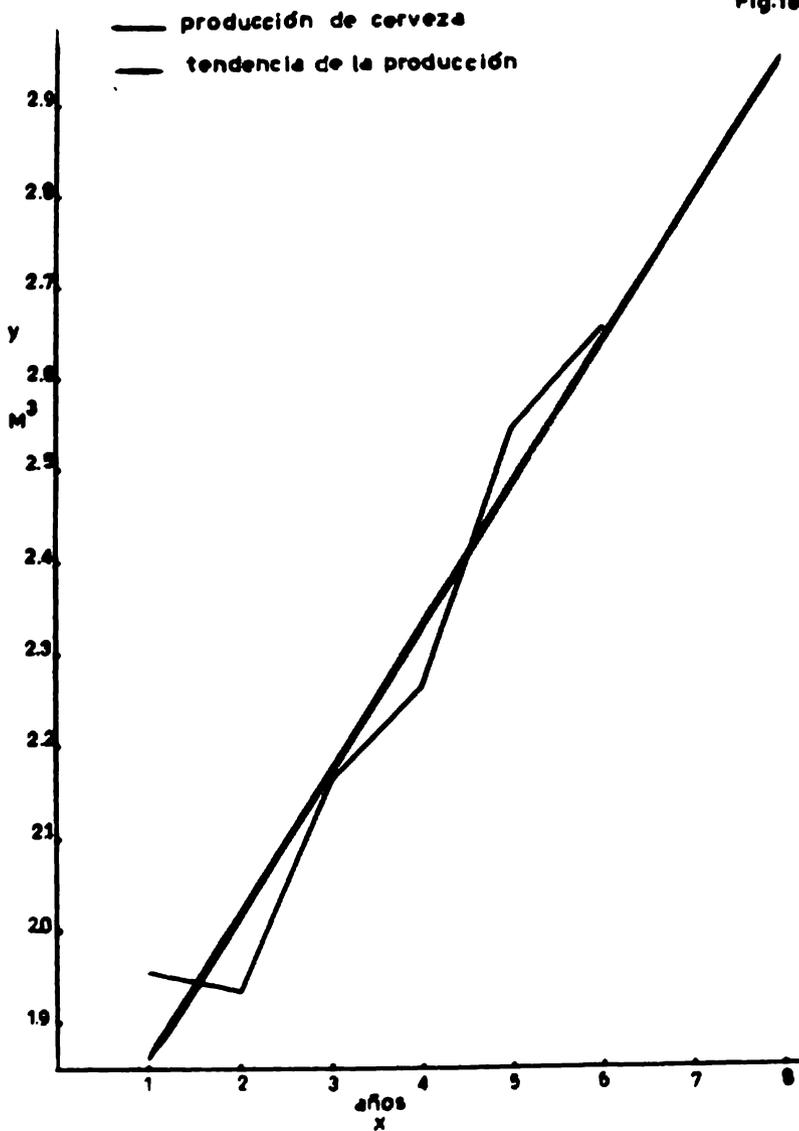
y_c .- Consumo corregido de papaina.

Las figuras: 18, 19 y 20 muestran la tendencia a la producción de cerveza, consumo de papaina y la importación de la enzima respectivamente

EMPRESAS QUE IMPORTAN PAPAINA. (14)

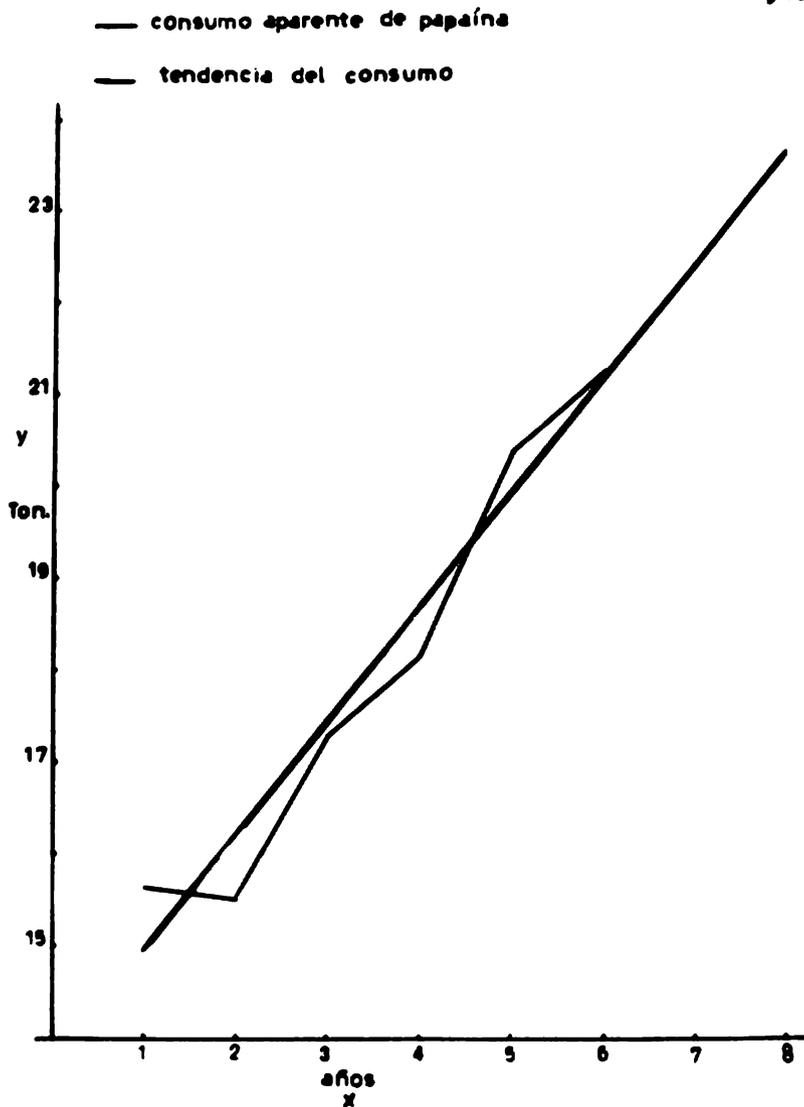
CENTRAL DROGAS, S.A.
CIA. MEDICINAL LA CAMPANA
Mc. CORMICK MEX. S.A.
MERCK MEX. S.A.
QUIMICA FARMACEUTICA LATINA
LAB. MIXIM, S.A.
ALFONSO MARX, S.A.
C. CAZENAVE TAPIE DELECOSE
CERVECERIA CUAUHEMOC, S.A.
CERVECERIA MOCTEZUMA, S.A.
ENMEX, S.A.
GLUCOSA, S.A.
QUIMORGAN, S.A.
SIGMA MEX. S.A.
SIGNA, S.A.
TRAVENOL, S.A.
MYCOFRAM MEX. S.A.

Proyección de la producción de cerveza



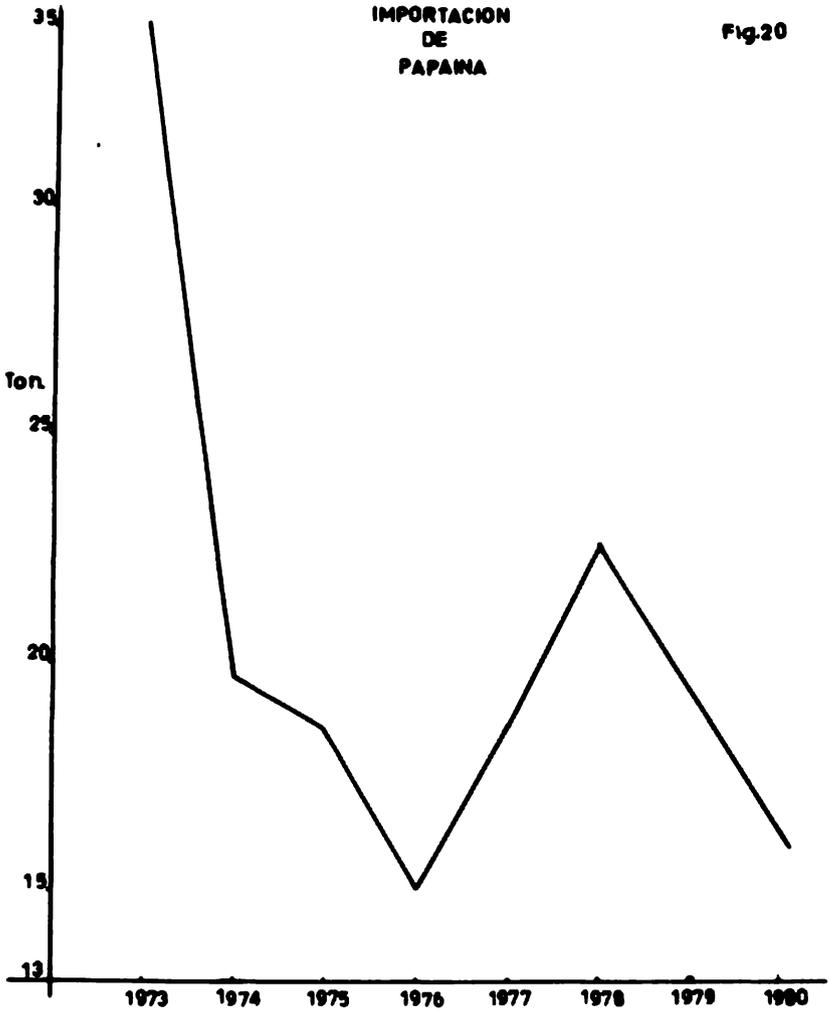
Proyección del consumo de papaína

Fig.19



**IMPORTACION
DE
PAPANA**

Fig.20



IMPORTACION DE PROTEASAS DE ORIGEN ANIMAL Y OTRAS FUENTES. -
VI.6 (14)

Los gráficas que se presentan a continuación, representan la información estadística de la importación de: bromelina, pancreatina, pepsina, tripsina, quimotripsina, proteasas y cuajo. También se menciona en cada caso las empresas que importan estas enzimas.

Los datos graficados se muestran en las tablas 6.8 hasta 6.13.

IMPORTACION DE BROMELINA. VI.6.1 (14)

TABLA 6.8

Años	Kgs.
1975	467
1976	1,404
1977	1,858
1978	1,254
1979	2,114
1980	1,187

Los datos anteriores se graficaran en la figura 21.

EMPRESAS IMPORTADORAS (14)

LAB. LEPETIT, S.A.

MERCK MEX. S.A.

ENMEX, S.A.

SICA, S.A.

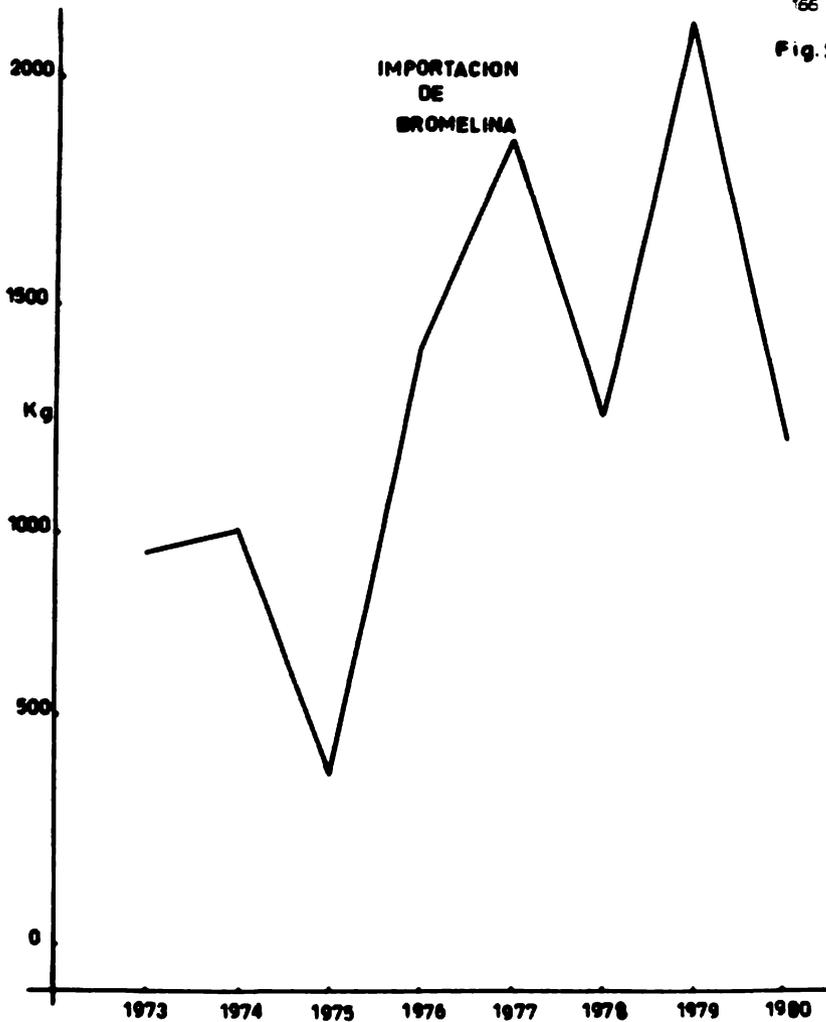
SIGMA MEX. S.A.

SIGNA, S.A.

CIBA GEIGY MEX. S.A.

Fig. 21

**IMPORTACION
DE
BROMELINA**



IMPORTACION DE PANCREATINA. VI.6.2 (14)

TABLA 6.9

Años	Toneladas
1975	11.21
1976	12.35
1977	18.932
1978	14.307
1979	19.396
1980	19.125

Los datos se encuentran tabulados en la gráfica 22.

EMPRESAS IMPORTADORAS. (14)

I.C.N. FARMACEUTICA, S.A.

IND. MEDICINAL AMERICANA, S.A.

LAB. KRIYA, S.A.

QUIMICA FARMACEUTICA LATINA, S.A.

QUIMICA KNOLL MEX. S.A.

REPRESENTACIONES UNIVERSALES ESPECIALIDADES
FARMACEUTICAS.

QUIMICA FARMACEUTICA LATINA, S.A.

RECORDATI MEX. S.A.

LAB. A. H. ROBINS MEX. S.A. DE C.V.

ALFONSO MARIN, S.A.

CIA. MEDICINAL LA CAMPANA, S.A. DE C.V.

Empresas importadoras de pancreatina.....

ENMEX, S.A.

GLUCOSA, S.A.

LAB. CARNOT, S.A.

LAB. LIOMONT, S.A.

LAB. QERALT MIR, S.A.

NORWICH PHARMACAL CO. MEX. S.A.

PROVEEDOR CIENTIFICO

SIGLO XXI EDITORES, S.A.

SIGMA MEX. S.A.

SYDNEY ROSS CO. S.A.

COSBEL, S.A. DE C.V.

CIBA GEIGY MEX. S.A. DE C.V.

MERCK MEX. S.A. DE C.V.

ORGANON MEX. S.A.

CENTRAL DE DROGAS, S.A.

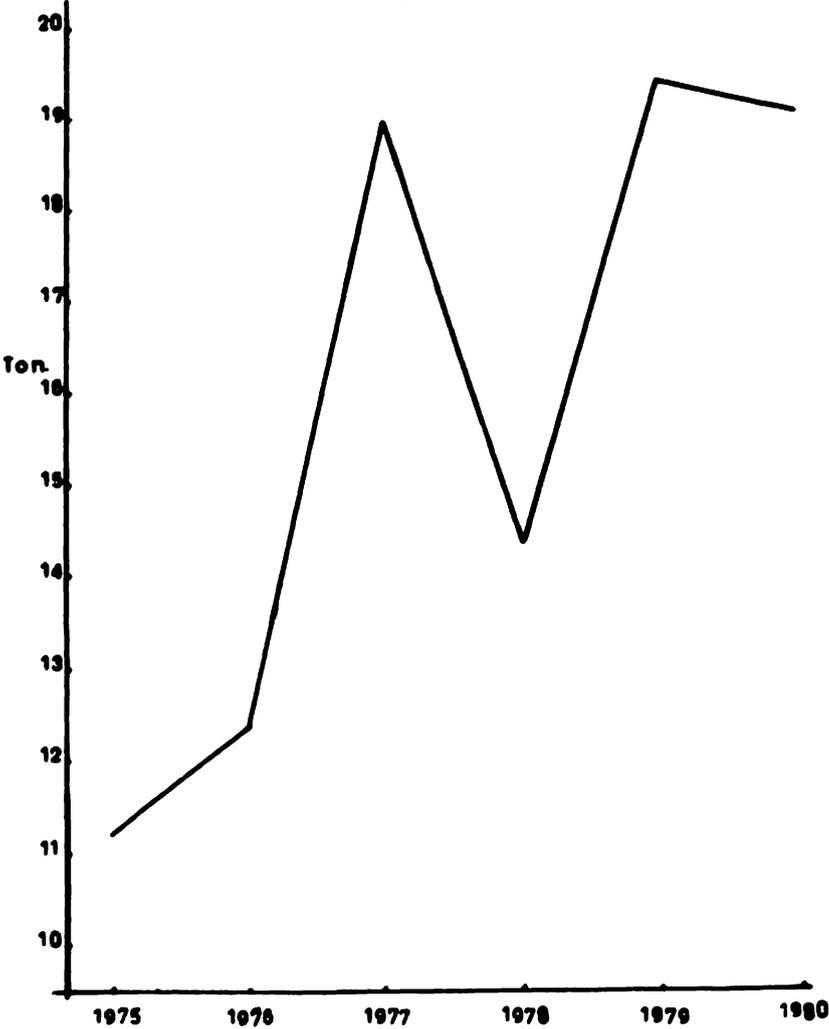
DROMEX, S.A.

LAB. LEPETIT MEX. S.A.

RECORDATI MEX. S.A.

Fig. 22

**IMPORTACION
DE
PANCREATINA**



IMPORTACION DE PEPSINA, TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA VI.6.3 (14)

Los datos de la tabla 6.10 representan las cantidades - de pepsina, tripsina y quimotripsina importadas, donde la - tripsina y quimotripsina representan una pequeña porción del total.

**TABLA 6.10
IMPORTACION DE PEPSINA**

Años	Toneladas
1975	0.667
1976	0.746
1977	0.860
1978	1.098
1979	2.964
1980	2.667

EMPRESAS IMPORTADORAS DE PEPSINA. (14)

MERCK MEX. S.A.

A.H. ROBINS MEX. S.A.

RECORDATI MEX. S.A.

QUIMICA FARMACEUTICA LATINA

ALFONSO MARX, S.A.

CASA ROCAS, S.A.

ENMEX, S.A.

EQUIPAR GUADALAJARA, S.A.

LAB. WEINER, S.R.L.
PROVEEDOR CIENTIFICO, S.A.

Empresas importadoras.....

SIGMA, MEX. S.A.
VIDES GUADALUPE
VINICOLA CETTO, S.A. DE C.V.
CENTRAL DE DROGAS, S.A.

EMPRESAS IMPORTADORAS DE TRIPSINA. (14)
LYMANOL, S.A.
MERCK MEX. S.A.
PROD. GEDEON RICHTER, S.A.
SICA, S.A.
ALFONSO MARX, S.A.
C.Y.D. CONTINENTAL, S.A.
IND. NIZA, S.A.
J.T. BAKER, S.A. DE C.V.
PROVEEDOR CIENTIFICO
ITALOMEX, S.A.
LAB. TORNEL, S.A.
CICA, S.A.

EMPRESAS IMPORTADORAS DE QUIMOTRIPSINA. (14)
PROD. GEDEON RICHTER, S.A.
ALFONSO MARX, S.A.

LAB. WEINER, S.R.L.

PROVEEDOR CIENTIFICO, S.A.

Empresas importadoras.....

SIGMA, MEX. S.A.

VIDES GUADALUPE

VINICOLA CETTO, S.A. DE C.V.

CENTRAL DE DROGAS, S.A.

EMPRESAS IMPORTADORAS DE TRIPSINA. (14)

LYMANDL, S.A.

MERCK MEX. S.A.

PROD. GEDEON RICHTER, S.A.

SICA, S.A.

ALFONSO MARX, S.A.

C.Y.O. CONTINENTAL, S.A.

IND. NIZA, S.A.

J.T. BAKER, S.A. DE C.V.

PROVEEDOR CIENTIFICO

ITALOMEX, S.A.

LAB. TORNEL, S.A.

CICA, S.A.

EMPRESAS IMPORTADORAS DE QUIMOTRIPSINA. (14)

PROD. GEDEON RICHTER, S.A.

ALFONSO MARX, S.A.

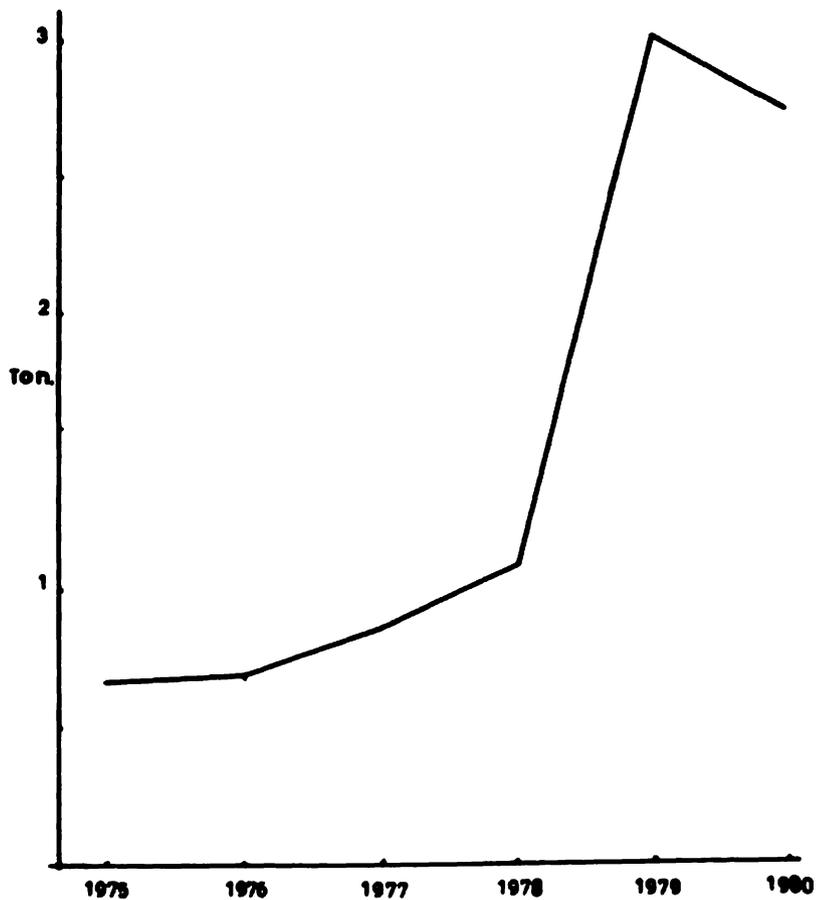
C.Y. D. CONTINENTAL S.R.L.

J.T. BAKER, S.A. DE C.V.

C.Y. D. CONTINENTAL S.R.L.

J.T. BAKER, S.A. DE C.V.

IMPORTACION
DE
PEPSINA, TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA



IMPORTACION DE PROTEASAS DE OTRAS FUENTES. VI.6.4 (14)

La tabla 6.11 muestra los datos de importación de proteasas de origen microbiano, graficados en la figura 24.

**TABLA 6.11
IMPORTACION DE PROTEASAS**

Años	Toneladas
1975	6.712
1976	3.196
1977	5.287
1978	5.684
1979	6.703
1980	6.874

EMPRESAS IMPORTADORAS. (14)

BAYER MEX. S.A.

LIMANOL, S.A.

ENMEX, S.A.

PROBST, S.A.

GLUCOSA, S.A.

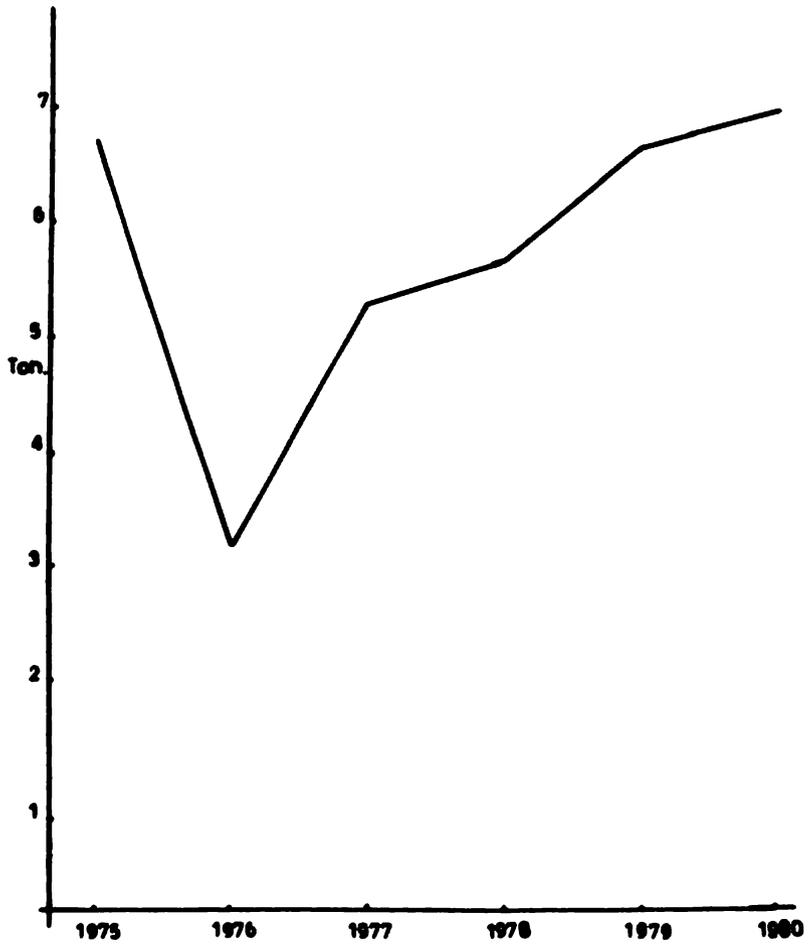
CERVECERIA CUAUHTEMOC, S.A.

CERVECERIA MOCTEZUMA, S.A.

**IMPORTACION
DE
PROTEASAS**

175

Fig. 24



IMPORTACION DE CUALD. VI.6.5 (14)

TABLA 6.12

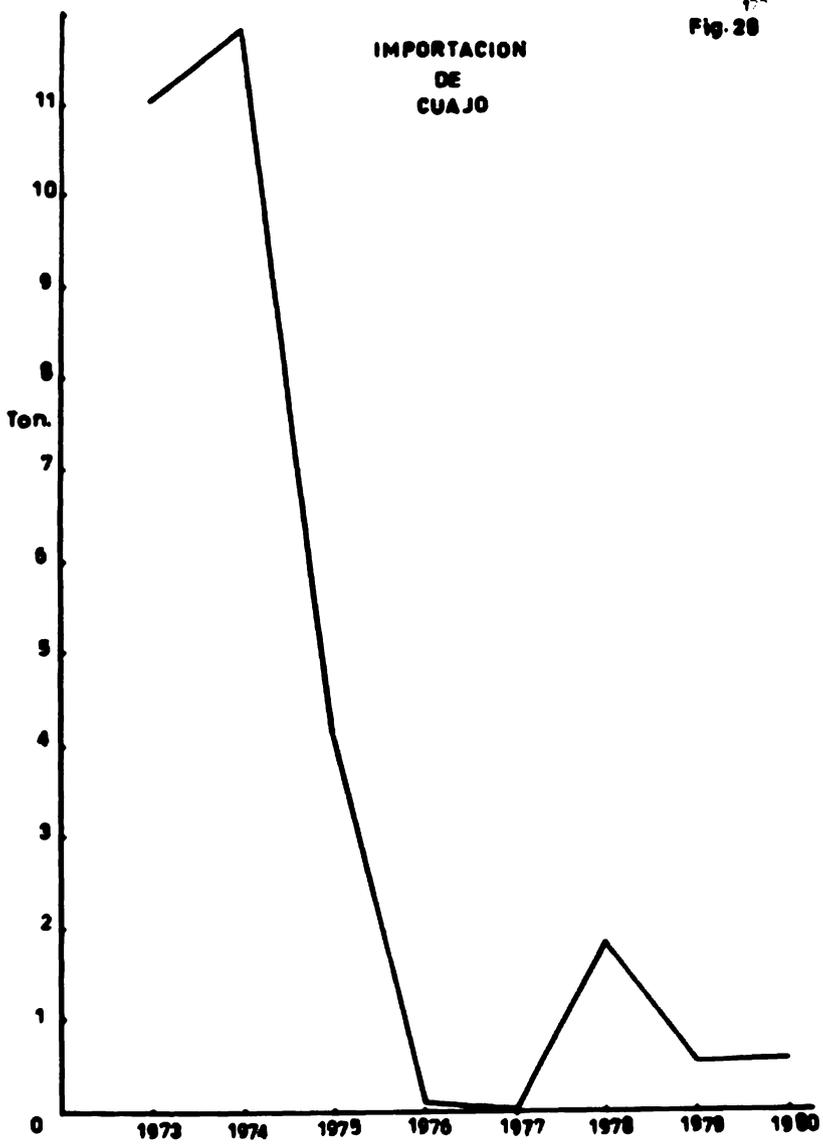
Años	Toneladas
1975	4.133
1976	0.111
1977	0.019
1978	
1979	0.522
1980	0.5

En la figura 25 se incluyen además los datos de 1973 y-1974.

EMPRESAS IMPORTADORAS.**I.C.N. FARMACEUTICA****SANBORN HERMANOS, S.A.**

127
Fig. 28

IMPORTACION
DE
CUAJO



VI.7 PRODUCCION Y COMERCIALIZACION

En México se producen amilasas, proteasas y cuajo, las demás enzimas que se aplican en la industria alimentaria son importadas por las empresas que las utilizan o bien, se importan para su venta.

Empresas que fabrican amilasas:

ENMEX, S.A. DE C.V. (amilasa bacteriana)

PFISER, S.A. DE C.V.

TRAVENOL, S.A.

Empresas que comercializan amilasas:

CIBA GEIGY MEX. S.A. DE C.V.

ENMEX, S.A. DE C.V.

(Amilasa fungal)

ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS, S.A.

PROBST, S.A.

(Amiloglucosidasa)

ENMEX, S.A. DE C.V.

ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS, S.A.

(diastasa de malta pura)

DROGAS TACUBA, S.A.

ROHM & HAAS MEX. S.A. DE C.V.

Comercialización de invertasa.**Empresa.****ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS, S.A.****Comercialización de celulasa.****Empresas.****ENMEX, S.A. DE C.V.****Comercialización de pectinasa.****Empresas.****ENMEX, S.A. DE C.V.****ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS, S.A.****CIBA GEIGY MEX. S.A. DE C.V.****PFISER, S.A. DE C.V.****Comercialización de papaína.****Empresas.****ENMEX, S.A. DE C.V.****ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS, S.A.****LAB. MIXIM, S.A.****PRODUCTOS NUTRICIONALES, S.A. DE C.V.****SIGNA, S.A.**

Comercialización de Bromelina.**Empresas****ENMEX, S.A. DE C.V.****ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS, S.A.****Producción de proteasas.****Empresas productoras.****CUAMEX, S.A. DE C.V.****VELFER, S.A.****PFISER, S.A.****LAB. WILSON, S.A.****Producción de enzimas pancreáticas.****Empresas productoras.****BIOQUIMICA NARVEL, S.A.****ENMEX, S.A. DE C.V.****CANAFARMA, S.A. DE C.V.****Producción de cuajo.****Empresa productora.****CUAMEX, S.A.**

Comercialización de lipasa.

Empresas.

ENMEX, S.A. DE C.V.

PRODUCTOS NUTRICIONALES, S.A. DE C.V.

Comercialización de catalasa.

Empresas.

ENMEX, S.A. DE C.V.

FERVIG, S.A.

INDUSTRIAS QUIMICAS DEL CENTRO, S.A.

QUIMICA INTERAMERICANA, S.A.

Comercialización de glucosa oxidasa.

Empresa.

ENMEX, S.A. DE C.V.

VI.8 EXPORTACION (14)

Empresas exportadoras:

CIBA GEIGY, S.A.

CYNAMID, S.A.

PFISER, S.A. DE C.V.

CANAFARMA, S.A. DE C.V.

En la tabla 6.13 se muestran las cantidades (dls) de exportaciones en los últimos años.

TABLA 6.13
EXPORTACIONES

	1975	1976	1977	1978	1979
PROTEASAS	27,230	135,124	882	197	4,613
AMILASAS	---	9,641	56,320	54,981	32,450

PRECIOS EN EL MERCADO VI.9

El precio de cualquier enzima depende de la potencia de esta. Existe gran variedad de concentraciones de actividad - enzimática, en ocasiones la enzima va acompañada de otras. - Por ejemplo, la preparación enzimática utilizada en la indus- tria cervecera donde la papaína se mezcla con otras protea- sas (bromelina), también la amilasa utilizada en la panifica- ción se mezcla con proteasas.

Los precios internacionales corresponden a los pagados- por algunas empresas al importar el producto.

Precios de algunas enzimas en el mercado nacional:

ENZIMAS (1 Kg)	\$ PESOS
Amilasa	166
Glucamilasa (lt)	230 (100 U/ml)
Celulasa	950
Pectinasa	500 (1500 U/gr)
Papaína	290 (80 U/gr)
Bromelina	500 (720 U/gr)
Proteasa	50 (60,000 U/gr)
Pancreatina	71 (640 U/gr)
Cuaajo microbiano (lt)	205 (10,000 U/gr)
Glucosa oxidasa	11,000 (1500/gr)

Precios en el mercado internacional:

ENZIMA (KG)	\$ dls
Amilasa (bacteriana)	2.84
Celulasa	8.75
	57.51
	86.2
Papaina	7.16
	12.6
	16.52
	15.78
Bromelina	4.68
	45.57
Proteasas	19.56
	20.94
	3.3
Pancreatina	34.82
	19.87
	27.40
Invertasa	7.51

CONCLUSIONS

La industria alimentaria confronta actualmente, la necesidad de proporcionar mayor cantidad, mejor contenido nutricional y una presentación aceptable de sus productos. Esta situación abre la posibilidad a los procesos enzimáticos.

El éxito comercial de cualquier enzima, supone anticipadamente la necesidad de su aplicación. Por ejemplo, la demanda de productos derivados de la soya se incrementó al aumentar el precio de la carne.

El ambiente social, legislativo y tecnológico ha creado circunstancias que favorecen la aplicación de enzimas no utilizadas a escala comercial como; los cientos de toneladas de desechos celulósicos que un proceso enzimático resolvería satisfactoriamente; la producción de grandes volúmenes de alimentos preprocesados que necesitan conservarse en buenas condiciones, por largos períodos (congelados, enlatados o en el medio ambiente), hasta su consumo; los desechos de suero, - representan la potencialidad de aprovecharlos mediante el uso de lactasa; la remoción de la cáscara de frutas y legumbres enzimáticamente. Situaciones como esta surgen a cada día y la investigación de las propiedades, condiciones y manera de obtener enzimas a escala comercial preparan el camino de nuevas aplicaciones de procesos enzimáticos conforme surge la necesidad de utilizarlos.

En México se encuentran latentes las aplicaciones de algunas enzimas que en otros países representan actualmente un mercado de considerable importancia; como es el uso de la glucosa isomerasa. En lo que respecta a la producción; puede mencionarse el caso de la papaína y la bromelina, ya que existe en el país el cultivo tradicional del papayo y de la piña. Sin embargo no parece haber indicios o intentos de producir papaína en gran escala a pesar de existir una creciente demanda de la enzima, tanto en el mercado internacional como en el nacional. También existen casos como el de la gly

cosa oxidasa cuyas aplicaciones son numerosas y en extremo - ventajosas (por las características de la reacción que cataliza la enzima).

Establecer un panorama real del mercado de las enzimas en la industria alimentaria nacional requiere de información que las empresas consideran como confidencial.

Las estadísticas de importación se limitan a las enzimas tradicionales que se han venido importando por los últimos 10 años o más. Los demás productos enzimáticos se importan sin descripción arancelaria, ya sea por la novedad el producto o por transacciones convenientes con las autoridades que reglamentan estas situaciones, que normalmente desconocen la trascendencia de impulsar el uso de productos enzimáticos en la elaboración de alimentos.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Kirk Othmer.
Encyclopedia of chemical technology. Vol. 9.
Edit. John Wiley & Sons, 1978.
- 2.- John M. Reiner.
Behavior of enzyme systems.
Edit. Burgess Publishing Co. 1959.
- 3.- W.T. Faith, C.E. Neubeck, Et. Reese.
Advances in Biochemical Engineering, vol. 1.
Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1972.
- 4.- Geral Reed.
Enzymes in food processing.
Edit. Academic Press Inc. 1975
- 5.- L.A. Underkofler.
C.R.C. Handbook of food aditives.
Edit. Academic Press Inc. 1979.
- 6.- Lemuel B Wingard Jr.
Advances in Biochemical Engineering, vol. 2.
Edit. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin,
1972.
- 7.- Hermelinda Carbajal C.
Producción Ind. de Enzimas, 1976.
U.A.M.I.
- 8.- Nicholas D. Pintauro.
Food Processing Enzymes, Recent Developments.
Edit. Nages Data Corporation, 1979.

- 9.- M. Laskowski
Methods in enzymology vol. II
Edit. Academic Press Inc. 1975.
- 10.- J. Santos García C. H. Luis González R.
Tesis
U.N.A.M. 1980.
- 11.- John R. Whitaker
Food Related Enzymes.
American Chemical Society, 1974.
- 12.- Guía de la Industria Alimentaria
Edit. Publicaciones Cosmos-Méx. 1979.
- 13.- James E. Bailey, David F. Ollis.
Biochemical Engineering Fundamentals
Mc. Graw Hill Book Co. 1977.
- 14.- Anuario de importaciones (microfichas) del I.M.C.E.
- 15.- Programing Manual (Texas Instruments) 1977.
- 16.- Anuario Estadístico de la S.P.P. 1979.

errata.- pag. 43; reng. 27 : 1800 $\mu\Omega$

Impresoras

eries al instante. s.a. de c.v

REP. DE COLOMBIA No. 8. Ter. PISO

(CASI ISO 07% BRASL)

MEXICO 1, D. F.

526-04-72

528-11-19