



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"**



**"RECOPILACION DE TECNICAS DE LABORATORIO PARA  
LA DETERMINACION INDIRECTA DE ACTIVIDAD  
ENZIMATICA EN ALIMENTOS PROCESADOS  
INDUSTRIALMENTE"**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INGENIERO EN ALIMENTOS  
P R E S E N T A N  
**MARIA DEL ROSARIO ALVAREZ FIGUEROA  
GRACIELA EVANGELINA ARROYO NAVA**

DIRECTOR DE TESIS:  
**I. B. Q. FRANCISCO MONTIEL SOSA**



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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INDICE

|     |  |    |
|-----|--|----|
| I   | INTRODUCCION .....   | 1  |
| II  | JUSTIFICACION .....  | 5  |
| III | OBJETIVOS .....  | 7  |
| IV  | GENERALIDADES .....  | 8  |
| V   | FUNCIONES GENERALES DE LAS ENZIMAS .....   | 14 |
| VI  | TIPOS DE ENZIMAS USADAS EN LA INDUSTRIA<br>DE ALIMENTOS .....  | 17 |
| VII | DESCRIPCION DE LOS PROCESOS. Diagramas de<br>bloques. Descripción detallada de los<br>puntos donde intervienen la o las enzimas.<br>Acción y cambios que se generan..... | 38 |
|     | INDUSTRIA DE JUGOS .....   | 39 |
|     | - Jugo de manzana .....  | 44 |
|     | - Jugo de toronja .....  | 49 |
|     | - Jugo de zanahoria .....  | 52 |
|     | INDUSTRIA PANADERA .....   | 57 |
|     | - Pan blanco .....   | 58 |
|     | - Galletas .....   | 65 |
|     | INDUSTRIA DE JARABES .....   | 67 |
|     | - Jarabe de glucosa .....  | 67 |
|     | - Jarabe alto en fructosa .....  | 67 |

|  |     |
|--|-----|
| INDUSTRIA LACTEA .....                   | 74  |
| - Queso .....                            | 74  |
| - Queso modificado enzimáticamente ..... | 80  |
| - Leche baja en lactosa .....            | 83  |
| - Leche pasteurizada .....               | 86  |
| INDUSTRIA PROTEICA .....                 | 89  |
| - Proteína vegetal .....                 | 89  |
| - Proteína animal .....                  | 94  |
| INDUSTRIA AZUCARERA .....                | 97  |
| - Azúcar refinado .....                  | 97  |
| INDUSTRIA DE FERMENTACIONES .....        | 100 |
| - Cerveza .....                          | 100 |
| - Vino .....                             | 107 |
| INDUSTRIA DE BEBIDAS ESTIMULANTES .....  | 109 |
| - Café .....                             | 109 |
| - Té .....                               | 112 |
| INDUSTRIA CARNICA .....                  | 115 |
| - Ablandamiento de carne .....           | 115 |
| INDUSTRIA DE HUEVO .....                 | 118 |
| - Huevo en polvo .....                   | 118 |
| INDUSTRIA DE ACEITES .....               | 121 |
| - Aceite de oliva .....                  | 121 |
| VIII TECNICAS DE CONTROL .....           | 123 |
| IX DISCUSION .....                       | 144 |
| X CONCLUSIONES .....                     | 152 |
| XI BIBLIOGRAFIA .....                    | 154 |

## I INTRODUCCION

Los alimentos son mezclas complejas de varias especies químicas cuyos grupos activos pueden participar en complicadas series de reacciones, entre sí y con el medio que rodea al alimento. Muchas de estas reacciones se aceleran por la presencia de catalizadores biológicos, comúnmente conocidos como ENZIMAS. Estos catalizadores biológicos pueden ser endógenos, es decir, propios del alimento; o bien, pueden ser de origen distinto, ya sea animal, vegetal o microbiano. Los cambios que generan las enzimas pueden ser deseables o indeseables y debe ser propósito de los profesionales relacionados con los alimentos el control de estos cambios en uno u otro sentido.

Dentro de los cambios deseables, resaltan aquéllos que se llevan a cabo gracias a la aplicación de enzimas comerciales en los distintos procesos de industrialización de alimentos, esto además, ofrece ventajas con respecto a la versatilidad, precisión, eficiencia y economía del mismo proceso.

El ahorro conseguido al usar enzimas puede lograrse mediante la sustitución de una parte de un proceso o bien mediante el reemplazo total del mismo. Por otro lado, al volverse más eficientes los procesos, también se ahorra dinero en varias maneras; operaciones como el mezclado, la filtración y la evaporación pueden alcanzar rendimientos máximos; esto es, una mayor cantidad de material puede ser

procesado con el mismo equipo, usando menos energía. Los rendimientos de algunas operaciones como la extracción pueden aumentarse considerablemente con el uso adecuado de enzimas añadidas. El conferir propiedades funcionales deseables a una materia prima o a un producto, también representa ventajas desde el punto de vista económico. Las ventajas anteriormente mencionadas se ubican adecuadamente en cada una de las industrias en donde sean aplicables estos conceptos. En otro contexto, existe un número muy grande de enzimas contenidas naturalmente en los alimentos. Una de las aplicaciones prácticas de la detección y/o cuantificación de estas enzimas está enfocada a cubrir un punto en el proceso de lo que implica un control de calidad en la industrialización de alimentos.

Hasta el momento, no se ha encontrado una fuente accesible de información que conjunte los diferentes procesos en que se aplican las enzimas, que a su vez incluya aquellas a utilizar y el seguimiento de las mismas a través de técnicas rápidas de laboratorio.

Cabe mencionar en este punto, que las enzimas de origen microbiano cobran cada día mayor importancia, debido a su alta especificidad en lo que a aplicación se refiere y a la reducción en costos de producción debido al mejoramiento de los procesos de obtención.

El Ingeniero en Alimentos tiene relación con todo lo referente a la industrialización de alimentos; el presente trabajo pretende ser una herramienta útil dentro del

control de calidad en dicha industrialización, ya sea de un producto o proceso dado. Mediante este control se mide y determina el desempeño y productividad actuales del proceso, esto se compara contra un estándar previamente fijado y de ser necesario se corrigen las desviaciones que afecten al proceso. La forma y prontitud con que se responda a dichas variaciones, tendrá un efecto determinante sobre la uniformidad de la calidad producida. Dichas variaciones serán cuantificadas muestreando la materia prima, el producto terminado, o bien algún punto dentro del proceso.

Dentro de la información que se incluye están comprendidos los diagramas de bloques más representativos de cada industria mencionada, describiendo la acción de las enzimas que intervienen en cada uno de los procesos. Asimismo se proponen las técnicas indirectas para evaluar o controlar los puntos en los que intervienen las enzimas.

Cuando se hace mención a técnicas indirectas, se refiere a aquellas técnicas que midan parámetros distintos a la propia actividad enzimática, por ejemplo evaluación de turbidez, color, índice de refracción, etc., y que de esta manera se pueda conocer la presencia o bien los efectos de dicha enzima. La finalidad del uso de técnicas indirectas es ofrecer métodos de análisis sencillos que no requieran de una infraestructura costosa y sofisticada.



Por lo anterior, la mayoría de los laboratorios de control de las diferentes industrias pueden aplicarlas y obtener los beneficios que de esto se deriva.

## II JUSTIFICACION DEL TRABAJO

La industria de alimentos sufre día a día innovaciones tecnológicas que obligan al mejoramiento de los diferentes procesos que en ella se involucran.

El campo de la tecnología de enzimas aporta un gran número de dichas innovaciones, ofreciendo entre sus mayores ventajas, la reducción en los tiempos de transformación de un alimento, bajo condiciones de acción moderadas. Otras ventajas de las enzimas que se deben mencionar, son su alta especificidad, su nula toxicidad y por tanto su seguro y fácil manejo.

Cuando se menciona aplicación de enzimas, se refiere a la utilización de enzimas cuyo origen generalmente es ajeno al alimento; es decir, aquellas producidas principalmente por microorganismos y que son añadidas con un fin específico, en algún punto del proceso de elaboración de dicho producto. Es necesario entonces, llevar un control de dichas enzimas, conociendo ya sea de forma directa o indirecta, su potencia y determinando así las mejores condiciones para su utilización.

Por otro lado, se sabe que los alimentos contienen en forma natural diferentes tipos de enzimas, las cuales pueden favorecer o perjudicar las características finales de los productos. Para este trabajo, las enzimas endógenas

de los alimentos que nos interesan, son únicamente aquellas que sirven como índices de control.

Es así como se justifica la recopilación de técnicas que ayuden a llenar un control sobre los dos puntos donde se ha hecho hincapié anteriormente:

- Enzimas comerciales añadidas.
- Enzimas endógenas como parámetro de control.

El primer punto será el de mayor interés para nosotros por el gran campo de aplicación que actualmente existe en distintas industrias de alimentos.

Esta información pretende ser de utilidad práctica para las industrias que trabajen con enzimas, ofreciendo metodologías sencillas que no requieran de una infraestructura costosa y sofisticada de manera que la mayoría de los laboratorios de control de las diferentes industrias, puedan aplicarlas y obtener los beneficios que de esto se deriva.

De manera paralela, este trabajo ofrece a los estudiantes de carreras relacionadas con los alimentos un panorama de lo que en la práctica se lleva a cabo en los laboratorios de diferentes industrias alimentarias con respecto al manejo y control de enzimas.

### III OBJETIVOS DE LA TESIS

#### Objetivo general:

- Implementación de un manual de técnicas para determinar indirectamente la actividad enzimática en algunos alimentos procesados industrialmente.

#### Objetivos particulares:

- Clasificar los tipos de industrias de alimentos donde se requiera el control de la actividad enzimática en alguno de los alimentos que se manejen.
- Determinar el tipo de enzimas que se manejan en cada industria; distinguiendo las endógenas de las añadidas y anotando su importancia en cada caso.
- Sugerir las técnicas adecuadas que reflejen de manera indirecta la actividad enzimática para cada caso.

#### IV GENERALIDADES

Un catalizador es una sustancia capaz de acelerar una reacción química entre distintos sustratos sin sufrir éste cambios significativos; las enzimas son proteínas capaces de catalizar reacciones bioquímicas específicas. Sus pesos moleculares varían desde 13,000 hasta 1,000,000 (42). Las enzimas debido a su naturaleza proteica, son afectadas por los mismos factores que las proteínas; pudiendo mencionar la temperatura, los disolventes, las sales y el pH. Estos factores pueden modificar su estructura química modificando la actividad catalítica de las enzimas (44). Lo anterior es importante considerarlo ya que esto afecta directamente al desempeño de cualquier enzima aplicada a algún sistema de producción de alimentos.

Algunas enzimas requieren para ejercer su acción catalítica, de otras moléculas de bajo peso molecular y de naturaleza no proteica, para llevar a cabo su función como catalizador biológico. A estas otras moléculas, que juegan un papel importante en la función catalizadora de las enzimas, se les llama coenzimas, o también grupos prostéticos. La diferencia más importante entre una coenzima y un grupo prostético es que la primera está débilmente unida a la proteína, mientras que el segundo está firmemente unido a ella, y que una o el otro

constituyen parte fundamental de la enzima completa, o mejor dicho, de un sistema enzimático completo (27).

La parte proteica del sistema enzimático recibe el nombre de apoenzima. Además de las coenzimas, los grupos prostéticos, muchas enzimas requieren la presencia de activadores, que son iones metálicos, generalmente cationes como el  $Mg^{+2}$ , el  $Ca^{+2}$  o el  $Zn^{+2}$ , que también deben considerarse parte del sistema enzimático. Por otra parte, cuando se habla de reacciones químicas catalizadas por enzimas, el o los reactivos reciben el nombre de sustratos. Así, el sistema enzimático está constituido por la apoenzima, la coenzima o el grupo prostético y en muchas ocasiones por el activador. En su mayor parte, las enzimas son específicas para ciertos sustratos, por lo que suele incluirse el sustrato como parte del sistema enzimático. Al conjunto de la apoenzima más la coenzima se le denomina holoenzima (44).

Una de las propiedades fundamentales de las enzimas en relación con su actividad catalítica es su especificidad. Esta es una consecuencia de la afinidad de la enzima por su sustrato, que resulta en la acomodación del mismo en el sitio activo de la enzima. De lo anterior se deduce que no cualquier substancia que se encuentre en presencia de enzimas va a poder entrar en el sitio activo. Esta propiedad de actuar sólo sobre su sustrato es a la que se refiere cuando se habla de especificidad de las enzimas.

Asimismo se debe decir que la apoenzima es la parte del sistema enzimático responsable de su especificidad (52). Este concepto de especificidad es mencionado en ocasiones durante la revisión de las distintas industrias mencionadas que involucran una enzimas como parte de su proceso de producción.

La especificidad de las enzimas no es absoluta en todos los casos. Mientras existen enzimas que solo aceptan una molécula como sustrato, hay otras que son capaces de catalizar el mismo tipo de reacción con varios sustratos que tienen en común un mismo grupo químico, que es el directamente modificado por la reacción. Existen sustancias que pueden ser muy parecidas a un sustrato, pero que no pueden ser objeto de la acción catalítica de la enzima en cuestión, debido a diferencias estructurales; es decir una sustancia suficientemente parecida al sustrato como para acomodarse en el sitio activo e impedir la entrada del sustrato. Estas sustancias reciben el nombre de inhibidores enzimáticos (52).

De acuerdo con el tipo de reacción que catalizan, las enzimas se clasifican de manera general de la siguiente forma (4):

**OXIDO-REDUCTASAS.** Son enzimas que catalizan la sustracción o adición de hidrógenos o de oxígenos; comprende entonces a las oxigenasas y a las deshidrogenasas.

**TRANSFERASAS.** Son enzimas que catalizan el transporte o transferencia de algún grupo de un sustrato a otro.

**HIDROLASAS.** Son enzimas que catalizan la ruptura de diversas uniones mediante la introducción de los elementos de una molécula de agua, es decir hidrólisis.

**LIASAS.** Son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces por mecanismos no hidrolíticos y que resulta en la separación de diversos grupos de sustratos.

**ISOMERASAS.** Son enzimas que catalizan diferentes tipos de isomerizaciones.

**LIGASAS O SINTETASAS.** Son enzimas que catalizan la formación de enlaces, es decir, participan en reacciones de síntesis. Estas reacciones son casi siempre de naturaleza endergónica, por lo que suelen acoplarse al rompimiento de moléculas que liberan energía, como el ATP.\*

En este punto, cabe señalar que los grupos de enzimas más comúnmente relacionados con alimentos son el de las Oxido-reductasas y el de las Hidrolasas (37).

Las reacciones que proceden con liberación de energía libre se llevan a cabo muy lentamente. Esto es porque los sustratos deben pasar por una serie de estructuras intermedias en su camino de conversión hacia productos y generalmente una cantidad apreciable de energía debe ser



proporcionada para llegar a estas estructuras. La estructura intermedia que es la más desfavorable desde el punto de vista energético se conoce como estado de transición, y es igualmente probable que este estado transicional regrese a formar reactantes o bien se transforme en productos (51).

La diferencia de energía libre entre los reactantes y el estado de transición ( $\Delta G$ ) se relaciona directamente a la velocidad de reacción. De aquí que sea cierto decir que si las enzimas catalizan una reacción, deben disminuir  $\Delta G$ . Esto puede conseguirse disminuyendo la energía del estado de transición, o bien, aumentando las energías de los reactantes y de los productos por una cantidad equivalente.

La enzima puede también proporcionar un camino de reacción completamente distinto al que se podría seguir sin catálisis, con un estado de transición estructuralmente distinto y de menor energía.

La constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , es un índice de la afinidad que tiene la enzima por un determinado sustrato, ya que los valores bajos de ella indican que la enzima requiere de bajas concentraciones de sustrato para alcanzar la mitad de la velocidad máxima; por el contrario los valores altos representan una afinidad baja de la enzima por el sustrato, ya que es necesario una elevada

concentración de éste para lograr la mitad de la velocidad máxima.(6)

#### U FUNCIONES GENERALES DE LAS ENZIMAS

El importante papel que desempeñan las diferentes enzimas en la industria de alimentos, se puede resumir de la siguiente manera:

**REDUCEN LA VISCOSIDAD.** Muchas enzimas pueden lograr una reducción en la viscosidad de varios materiales a través de una hidrólisis. Las enzimas más comúnmente usadas con este propósito son las Pectinasas, Celulasas y Proteasas.

**AUMENTO EN LOS RENDIMIENTOS EN PROCESOS DE EXTRACCION.** Algunas enzimas son utilizadas para degradar la pectina y la celulosa en el procesamiento de jugos de frutas y vegetales. Aquí también se logra una importante reducción en la viscosidad; mejorando así los procesos de filtración a los que se someten los jugos. Con mayor importancia, podemos anotar el aumento en los rendimientos de la extracción; en otras palabras se obtiene mayor cantidad de producto terminado a partir de las misma cantidad de materia prima.

**CONVERSION HACIA PRODUCTOS UNICOS.** Existen productos como el jarabe de maíz rico en fructosa, los cuales pueden ser obtenidos únicamente mediante el uso de enzimas. Se pueden obtener jarabes que contengan fructosa mediante una hidrólisis ácida en caliente, aunque con este método se generan subproductos indeseables. Se puede por otra parte obtener un jarabe rico en fructosa a través del uso de

enzimas, hasta alcanzar los requerimientos que exigen los embotelladores de bebidas o los procesadores de otros tipos de alimentos. La enzima utilizada con este propósito es la Glucosa Isomerasa.

CAUSAN SEPARACIONES. El ejemplo más claro de este fenómeno es la fabricación de queso, donde se consigue una separación de la proteína-grasa del agua y la lactosa de la leche, gracias a la ayuda de una enzima (renina).

CAMBIOS EN PROPIEDADES FUNCIONALES. Mediante el uso de enzimas se pueden conseguir efectos de formación y estabilización de espumas, mejoramiento en las características finales de un producto, como textura, palatabilidad y otras. Los grupos de enzimas utilizados con estos fines son las Proteasas y las Lipasas.

MODIFICACIÓN DE SABOR. Las enzimas pueden ser usadas para modificar el sabor de los alimentos; ya sea acentuándolo, o cambiándolo. Las lipasas, proteasas y carbohidrasas se usan en varias formas para producir compuestos de sabor. Frecuentemente, las enzimas son responsables de la producción del gusto característico de algún alimento tal como el sabor picante del queso italiano. En otras aplicaciones las enzimas pueden ser responsables de la producción de precursores de sabor, tales como los azúcares reductores requeridos para una reacción de Maillard. Muchas proteínas hidrolizadas son conocidas por

ser excelentes potencializadores de sabor, tal es el caso del queso modificado enzimáticamente.

## VI CLASIFICACION DE ENZIMAS APLICADAS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

De acuerdo a lo señalado en el capítulo de generalidades, las enzimas más utilizadas en el procesamiento de alimentos pertenecen al grupo de las Hidrolasas o de las Oxido reductasas. Es necesario aclarar que el origen de la enzima es determinante para las características que ésta presenta. Un ejemplo de lo anterior es la alfa amilasa que puede ser de manera más general de origen fungal o bacteriano, teniendo cada uno de estos grupos características propias; así mismo las propiedades de una alfa amilasa producida por Bacillus subtilis difieren de las propiedades de una alfa amilasa producida por Bacillus stearothermophilus. La primera presenta un rango de actividad óptima entre pH 5 y pH 7 y una tolerancia al calor moderada, mientras que la segunda alfa amilasa trabaja óptimamente sólo a pH 3, teniendo una mayor resistencia al calor (55-70°C). Para cada uno de los múltiples procesos de alimentos que involucran la aplicación de enzimas, se debe seleccionar la que se adapte mejor a las condiciones del proceso.

Dependiendo del tipo de sustrato sobre el cual actúan, dichas enzimas pueden subclasificarse en diversos grupos; a continuación se muestra dicha clasificación, mencionando la acción específica de cada grupo. Esta misma clasificación sirve de base para proponer las técnicas de

monitoreo para las diferentes enzimas utilizadas en las distintas industrias de alimentos.

#### PROTEASAS (1, 20, 25, 32, 34, 40)

Las proteasas son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas, cuyos componentes principales y básicos son los aminoácidos; de los cuales 20 son los de mayor importancia.

Cada aminoácido tiene un grupo amino y un grupo carboxílico. El grupo R llamado grupo funcional representa una estructura más compleja y difiere para cada aminoácido. Químicamente hablando estos grupos puede ser ácidos o básicos, con carga o sin carga, polares o no polares, alifáticos o aromáticos, hidrofílicos o hidrofóbicos. Estas propiedades son determinantes en la estructura y en la función de la proteína.

Las proteasas rompen los enlaces peptídicos en presencia de agua. El ataque a las proteínas puede llevarse a cabo de dos maneras distintas teniendo productos finales diferentes.

Al usar una EXOPROTEASA, se pueden separar aminoácidos de cualquier punta de la cadena peptídica, los productos de esta hidrólisis en las condiciones adecuadas pueden ser aminoácidos libres.

La segunda forma es empleando ENDOPROTEASAS que atacan enlaces peptídicos del interior de la cadena proteica. Los

productos de esta hidrólisis son polipéptidos pequeños y péptidos. De esta manera se produce una cantidad insignificante de aminoácidos libres. La cantidad necesaria de hidrólisis de una proteína varía con el uso final que se desee, ya que el tamaño y composición de los péptidos define las propiedades del alimento del que se trate.

Una clasificación de las proteasas puede ser la siguiente:

#### PROTEASAS ACIDAS:

- RENINA ANIMAL Y SUBSTITUTO DE RENINA (MICROBIANA). Endoproteasa altamente específica usada para la coagulación de leche en la fabricación de queso.
- PEPSINA. Una endoproteasa que hidroliza una gran cantidad de enlaces peptídicos del lado carboxilo de la fenilalanina y de la leucina.
- PROTEASAS FUNGALES. Hidrolizan un amplio rango de enlaces peptídicos, algunas preparaciones poseen actividad endo y exoproteasa.

#### PROTEASAS NEUTRAS:

- TRIPSINA. Es una endoproteasa altamente específica que actúa preferentemente sobre enlaces carboxilo del lado de la arginina y de la lisina.
- PAPAINA. Endoproteasa que hidroliza un rango amplio de enlaces peptídicos.



- BROMELAINA/FICINA. Actúan de manera similar a la papaína y generalmente se venden juntas como un preparado.
- PROTEASAS BACTERIANAS. Actúan sobre un gran número de enlaces peptídicos.

#### PROTEASAS ALCALINAS:

- SUBTILISINA. Hidroliza un gran número de enlaces sin preferencia aparente.

### C A R B O H I D R A S A S

#### A M I L A S A S (4, 7, 25, 30, 33, 43, 47, 56)

Las amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón, y por tanto, para comprender de mejor manera la acción de estas enzimas, se debe discutir la estructura del almidón. El almidón en su forma nativa es un polímero formado a partir de moléculas de glucosa unidas para formar un polímero lineal llamado amilosa y un polímero ramificado llamado amilopectina. Las uniones entre las moléculas de glucosa en el almidón son siempre del tipo alfa, de manera diferente las uniones entre moléculas de glucosa en la celulosa son del tipo beta, resultando en muy diferentes propiedades físicas, químicas y nutricionales.

En la amilopectina, la glucosa también se une por enlaces alfa 1-4 en su sección lineal, adicionalmente, existen puntos de ramificación cada 20-25 unidades de glucosa, donde se une una glucosa adicional al carbono número 6 resultando en uniones alfa 1-6. Estos puntos de

ramificación son resistentes a la hidrólisis por amilasas, algunas amilasas no hidrolizan estos enlaces mientras que otras lo hacen más lentamente que en los enlaces alfa 1-4.

En las plantas el almidón se encuentra en forma de pequeños gránulos de aproximadamente 15 micras. Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría y deben solubilizarse para proceder al ataque enzimático. Para hacer esto, una suspensión de almidón se calienta hasta 62-72°C alcanzando el llamado punto de gelatinización. La temperatura exacta de gelatinización depende del contenido relativo de amilosa y amilopectina que varía según la planta de origen. De aquí que algunos almidones sean más fáciles de gelatinizar (papa) que otros (arroz y maíz). Durante la gelatinización los gránulos se hinchan irreversiblemente hasta alcanzar un tamaño de varias veces su volumen. Cuando esto sucede la viscosidad se eleva al máximo y es aquí también cuando el almidón está más susceptible al ataque enzimático; lo anterior es importante en procesos como la producción de jarabes de glucosa a partir de suspensiones de almidón, para poder lograr una buena conversión enzimática.

A continuación se enlistan las amilasas de mayor importancia comercial:

-ALFA-AMILASA. Se le designa como enzima licuante, ya que al hidrolizar los enlaces químicos del almidón en una forma al azar, reduce rápidamente la viscosidad de las

dispersiones de este polímero; esto lo consigue rompiendo enlaces alfa 1-4 internos de la cadena de almidón, los productos de esta hidrólisis son dextrinas, maltosa y glucosa, por lo que el poder reductor de las dispersiones de almidón aumenta considerablemente.

La termoestabilidad de las alfa amilasas depende principalmente de su origen; y debe ser el fabricante quien indique las condiciones óptimas de trabajo de cada enzima. Por otro lado el pH óptimo de las alfa amilasas se encuentra entre 6-7. Las alfa amilasas son metaloenzimas que requieren iones calcio para ser activas y estables; este es un factor que debe considerarse pues representa un costo adicional al proceso en el cual se apliquen este tipo de enzimas. Asimismo existen amilasas que son estabilizadas por su propio sustrato.

- BETA AMILASAS. Estas enzimas atacan enlaces 1-4 pero lo hacen en una manera exo, es decir desprendiendo disacáridos (maltosas) de los extremos de la cadena de almidón. Este proceso es interrumpido al encontrarse con un enlace de ramificación alfa 1-6. Cuando se desee obtener altos rendimientos de maltosa se deben usar estas enzimas junto con enzimas desramificadoras. Por último se puede decir, que la beta-amilasa reduce la viscosidad de las dispersiones de almidón en forma muy lenta. En base a esta velocidad de reducción de la viscosidad se deberán establecer los intervalos para el monitoreo de la acción enzimática.

- AMILASAS FUNGALES. Estas enzimas tienen un patrón de acción similar al de las alfa amilasas, diferenciándose principalmente en su resistencia a altas temperaturas; ya que éstas son más lábiles al calor que las de origen bacteriano o vegetal. La aplicación de este tipo de enzimas en panificación, está indicada pues las temperaturas que se manejan permiten que ésta funcione adecuadamente.

- AMILOGLUCOSIDASA. Esta enzima también recibe el nombre de glucoamilasa cuya función es catalizar la hidrólisis de los enlaces alfa 1-4 en el almidón. Con esta enzima se van separando moléculas de glucosa de un extremo hacia el otro de la molécula del almidón, siendo esto una forma de ataque exo. Estas enzimas son muy sensibles a la temperatura, ellas son inactivadas por temperaturas arriba de los 60°C. El rango de pH recomendado es de 4-5.

La amiloglucosidasa es capaz de hidrolizar enlaces alfa-D-1,4 y alfa-D-1,6 en oligosacáridos, almidón y glucógeno, aunque la velocidad de degradación de los enlaces alfa-D-1,6 es treinta veces menor. Para obtener una hidrólisis adecuada de los polímeros antes mencionados, es conveniente combinar su acción junto con la de la pululanasa.

- PULULANASA. Esta enzima hidroliza los enlaces alfa 1-6 en moléculas de amilopectina, eliminando así los puntos de ramificación donde se detiene la acción de enzimas como

las beta amilasas, es por ello que se les conoce como enzimas de desramificación.

#### ENZIMAS QUE DEGRADAN FIBRA

(21, 24, 26, 36, 38, 43, 57, 58)

##### - CELULASAS

La celulosa es probablemente el compuesto biológico más abundante sobre la tierra, en su forma lignificada es la madera y en su forma más pura la encontramos en papel, fibras y textiles. La celulosa es un polímero muy largo de glucosa unido por enlaces beta 1-4. Las cadenas de celulosa se unen unas a otras gracias a puentes de hidrógeno que resultan en unidades mayores.

Cuando las fibras de celulosa absorben agua se hinchan, este hinchamiento está limitado a las regiones amorfas de la fibra. El número de enlaces disponibles para la acción de las enzimas dependerá del grado de hinchamiento de la celulosa. Para llevar a cabo una hidrólisis eficiente de celulosa por celulasas se requiere un pretratamiento que favorezca el hinchamiento.

Las celulasas pueden atacar la celulosa principalmente por dos caminos. Las endocelulasas son capaces de hidrolizar los enlaces alfa y beta 1-4 al azar a lo largo de la cadena de celulosa. Las exocelulasas desprenden moléculas de glucosa de los extremos de la cadena de celulosa. El producto de la hidrólisis de la actividad

simultánea de las endo y las exocelulasas es la celobiosa (disacarido).

La importancia de la aplicación de celulasas en el procesamiento de alimentos es para eliminar en frutas y vegetales sometidos a procesamiento la celulosa que interfiere en el rendimiento de la extracción, en la digestibilidad de otros componentes nutritivos y en ocasiones proporciona sabores indeseables.

#### - HEMICELULASAS

Las paredes celulares de las plantas consisten de grandes cantidades de microfibrillas de celulosa formando una fase continua, donde predomina la hemicelulosa. Al igual que la celulosa este compuesto puede interferir en la extracción de jugos y aceites; por otro lado disminuye la digestibilidad de los alimentos donde se encuentre presente e imparte sabores no deseados.

Las hemicelulosas se nombran de acuerdo al azúcar predominante de la cadena, de aquí a que se llamen xilanas, mananos, glucomananos y galactoglucomananos. El enlace beta 1-4 es la unión más común entre estos azúcares. Cadenas secundarias de arabinosa, glucosa, galactosa, o ácido metilglucurónico se unen a través de varios enlaces, esto da lugar a estructuras ramificadas. Existen enzimas endo y exohemicelulasas, que exhiben un alto grado de especificidad por sus sustratos respectivos. Por la variedad de azúcares (hexosas y pentosas), de

enlaces, y de la presencia de cadenas secundarias en las hemicelulasas, existe un número correspondiente de hemicelulasas diferentes. Sin embargo, a nivel comercial existe poca disponibilidad de hemicelulasas, aunque las preparaciones de celulasas y pectinasas presentan cierta actividad de hemicelulasas.

#### - PECTINASAS

Las pectinas son únicas entre los carbohidratos comunes, ya que su componente principal no es un azúcar simple sino un azúcar ácido. Específicamente, la mayor subunidad en la pectina es el ácido galacturónico. Difiere de su azúcar correspondiente, la galactosa, en que en el sexto carbono se encuentra un grupo carboxílico, no un alcohol primario. Las cadenas principales de carbohidratos pécticos, se componen principalmente por polímeros lineales de residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces alfa 1-4. Este polímero se conoce como ácido péctico o ácido poligalacturónico. Algunas veces algunos azúcares de tipo ramosa forman parte de la cadena.

El grado de esterificación varía de una fruta a otra y con la madurez de la fruta. El grado de esterificación usualmente disminuye con el aumento de madurez de la fruta. Además, los grupos hidroxilos libres en las cadenas de ácido péctico pueden ser acetilados. Estos pueden ser los puntos de ramificación de las cadenas laterales de

azúcares neutros como galactosa, arabinosa y xilosa. De aquí que estas pectinas de diferente naturaleza tengan diferentes estructuras y composiciones.

Es posible deducir que la degradación de pectina requiere una variedad de actividades enzimáticas. Los dos grupos principales de enzimas son: Pectinesterasas y Pectindepolimerasas (Poligalacturonasas, Liasa péctica, Liasa péctica ácida).

Este tipo de enzimas tienen especial importancia en industrias como la de jugos y la de aceites, donde se requiere eliminar o bien estabilizar la pectina presente.

= Pectinesterasas. Estas remueven los grupos metilalcohol, cambiando la pectina a ácido péctico. Estas enzimas son sumamente específicas para el éster metílico de los polímeros de ácido galacturónico. El remover los grupos éster metílicos de la pectina modifica la carga de la molécula. Esto es, el grupo éster neutro de la pectina es reemplazado por un grupo ácido ionizable en el ácido péctico. La desesterificación procede linealmente a lo largo de una sola cadena, para producir una sección de grupos carboxílicos libres; es por ello que el ácido péctico puede precipitarse (gelificarse) por iones metálicos divalentes como el calcio. Aparecen en muchas frutas y vegetales, particularmente en cítricos y tomates; comercialmente se producen por *Aspergillus niger*. El pH óptimo de la pectinesterasa fungal es de 4.5.



= Poligalacturonasas (galacturonasas). Rompen los enlaces glucosídicos en la cadena de galacturano por hidrólisis, los pectatos y las pectinas bajas en metoxilos son los substratos preferidos. Existen endo y exo poligalacturonasas. Las enzimas endo rompen las cadenas del substrato más o menos al azar y el incremento de grupos reductores como resultado de la acción de las enzimas, es acompañado por un descenso relativamente rápido en la viscosidad de la solución de substrato. Las enzimas exo desprenden el ácido galacturónico de la cadena del substrato, ya sea del lado reductor o no reductor y llevan a cabo una sacarificación más que una licuefacción. El pH óptimo de estas enzimas está entre 4 y 4.5.

= Liasas de pectatos. Rompe los enlaces glucosídicos en la cadena del galacturano por beta eliminación, los mejores substratos son la pectina baja en metoxilos y pectato. Existen endo y exo enzimas. Su pH óptimo está entre 8 y 9.5. Estas enzimas requieren iones calcio para su actividad.

= Liasas pécticas. Rompen los enlaces glucosídicos en la cadena metilada de galacturano también por beta eliminación, estas enzimas son las únicas despolimerasas que prefieren substratos de pectina altamente metilados. Sólo se han descrito las endo enzimas. Su pH óptimo está entre 5.5 y 6.

## BETA GLUCANASA

Los beta glucanos son similares a la celulosa ya que son polímeros lineales de la glucosa; las moléculas de glucosa están unidas por enlaces beta 1-4. De hecho, la celulosa es un beta glucano y las celulasas son una clase específica de beta glucanasas.

El 70% de las paredes celulares de cereales como la cebada contienen beta glucanos similares al del líquen. La modificación enzimática de las células de cebada es importante en el malteado y en el proceso de elaboración de cerveza.

Las enzimas que degradan los beta glucanos son endoglucanasas o exoglucanasas. La degradación por endoglucanasas resulta en moléculas de oligosacáridos de 5-6 unidades de glucosa.

## ENZIMAS DE OXIDACIÓN - REDUCCIÓN (14, 17, 49)

Este grupo comprende la mayor parte de las enzimas que existen en la naturaleza. Como su nombre lo indica, catalizan reacciones de oxidación y de reducción que se involucran en procesos de síntesis o degradación de muchos compuestos bioquímicos.

La aplicación industrial de estas enzimas es muy reducida, ya que requiere de cofactores para funcionar

adecuadamente. Estos cofactores funcionan como donadores o receptores de energía bioquímica, que es la que hace que la reacción tenga lugar. En una célula viva, cuando el cofactor ha hecho su trabajo, debe ser regenerado y esto se consigue a través de sistemas bioquímicos muy elaborados que proporcionan energía para regenerar dicho cofactor. Desafortunadamente no existen medios económicos que regeneren cofactores en un sistema libre de células vivas. Para llevar a cabo estas reacciones hoy en día se necesitaría añadir cantidades iguales a las del sustrato; lo que representa un costo demasiado alto.

Existen algunos casos donde no es necesario suministrar un cofactor ya que éste es parte integral de la enzima. Por ejemplo el Flavin Adenín Dinucleótido FAD, está unido directamente con la glucosa oxidasa. Asimismo es autoregenerable al donar su energía a una molécula de oxígeno; esto es inusual. Las enzimas con las características antes descritas, son las adecuadas para uso industrial.

#### - GLUCOSA OXIDASA

Esta enzima cataliza la reacción entre la beta-D-glucosa y el oxígeno molecular, formando ac. glucónico y peróxido de hidrógeno; se obtiene principalmente de Penicillium notatum, Penicillium amagasakiense y Aspergillus niger. El uso principal de esta enzima es el de prevenir reacciones indeseables de oscurecimiento (Maillard), que pueden

afectar el sabor y el color de los alimentos. Esto se emplea en la industria de huevo, en la industria de jugos y en papa en polvo (49).

#### - CATALASA

Esta enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno. La aplicación actual de esta enzima es realmente limitada; se usa en combinación con la glucosa oxidasa para eliminar el peróxido de hidrógeno generado por esta última enzima. Otra aplicación es el eliminar peróxido de hidrógeno residual que ha sido utilizado como agente de esterilización, tal y como se menciona en el capítulo de industrialización de huevo. Las fuentes principales de esta enzima son el Aspergillus niger y el hígado de bovino.

La glucosa oxidasa junto con la catalasa pueden ser usadas para la producción de bebidas dietéticas libres de glucosa como jugos de frutas, cerveza y vino.

Su aplicación como antioxidantes se puede ejemplificar de la siguiente manera:

- Incorporación de paquetes semipermeables conteniendo mezclas húmedas de glucosa/glucosa oxidasa/catalasa en alimentos secos como leche en polvo o café tostado.
- Incorporando estos paquetes en latas selladas consiguiendo así bajos niveles residuales de oxígeno aún

menores que con la aplicación de vacío seguido de inyección de nitrógeno (49).

#### - LIPOXIDASA

También se conoce como lipoxigenasa y se usa comúnmente para obtener pan muy blanco. Esta blancura resulta de la oxidación del pigmento natural caroteno, que originalmente posee un color amarillo. Una vez oxidado el caroteno es incoloro.

La lipoxidasa, cataliza la acción de ácidos grasos poliinsaturados hasta hidroperóxidos.

Esta enzima se encuentra naturalmente en la soya, siendo también fuentes de esta enzima el maíz, la alfalfa, los chícharos y el trigo. Existen algunas diferencias entre las enzimas de cada fuente, por ello son llamadas isoenzimas, diferenciando principalmente en su pH óptimo, su capacidad de blanqueo, la especificidad hacia sustratos y los productos obtenidos.

#### I S O M E R A S A S (10, 19, 34, 35)

Las isomerasas son un tipo de enzimas que catalizan las reacciones de isomerización. Estas reacciones son aquellas en donde los átomos de un compuesto orgánico son rearrreglados para formar otro compuesto. La nueva molécula puede presentar propiedades muy distintas a las de la molécula que le dió origen.

Existen muchas reacciones que involucran la isomerización, pero sólo una de ellas es de interés industrial. La reacción en cuestión es la conversión de glucosa a fructosa. Esta puede ser clasificada como una reacción de isomerización aldosa-cetosa.

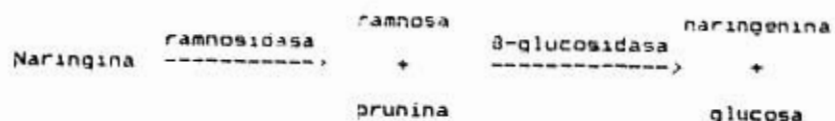
Curiosamente esta enzima es una xilosa isomerasa, es decir, genera la conversión de xilosa a xilulosa más rápidamente que la conversión de glucosa a fructosa. Lo que sucede aparentemente es que esta enzima posee dos sitios activos, uno específico para xilosa y otro específico para glucosa. Esta enzima generalmente se obtiene de fuentes microbianas como Bacillus coagulans, Actinoplanes missouriensis, Flavobacterium arborescens y Streptomyces sp.

La glucosa isomerasa trabaja mejor en un rango de pH entre 7.0 y 8.0 y a temperaturas de 55 a 65°C.

#### NARINGINASA (19, 28, 47)

La preparación enzimática conocida comercialmente como naringinasa se obtiene generalmente de Aspergillus niger cultivado en medio cítrico. Al aplicar esta enzima se obtiene una desaparición rápida del sabor amargo. Las condiciones sugeridas son: pH 3.5-5.0 a una temperatura de 20-50°C., pero estas condiciones varían según la preparación de naringinasa que se esté utilizando.

La acción sucesiva de dos enzimas contenidas en la naringinasa, la ramnosidasa y la beta-glucosidasa permite hidrolizar este compuesto, para eliminar el sabor amargo:



Es importante y necesario el tratamiento con naringinasa en purés de toronja utilizados en otras industrias de alimentos como la de panadería o la de bebidas refrescantes (19,47).

Las preparaciones enzimáticas de naringinasa deben estar libres de contaminaciones de pectinasas, de manera contraria pueden afectar la turbidez del jugo. Un bajo contenido de naringina imparte un amargor deseable a la toronja, pero en las operaciones comerciales comunes, la naringina que se encuentra en el albedo se mezcla inevitablemente con el producto, confiriéndole un sabor amargo intenso. El problema de amargor es más severo cuando se aplica mayor presión para obtener un mejor color en la extracción.

## L I P A S A S (3, 29, 32, 34, 50)

Las enzimas comerciales que hidrolizan a las grasas y a los aceites, lo hacen atacando el enlace éster de estos compuestos. El enlace éster es la unión de un ácido carboxílico y de un alcohol; el tipo de ácido carboxílico y de alcohol involucrados determina las características físicas y químicas de este enlace. Los triglicéridos y los fosfátidos son tipos especiales de ésteres y son los mayores componentes de las grasas y aceites comerciales. El grupo alcohol es un glicerol, que puede ser esterificado hasta tres ácidos grasos, cuando esto sucede se forma un triglicérido. Los fosfátidos también conocidos como fosfolípidos, son similares; se componen de un glicerol esterificado con dos ácidos grasos. El tercer grupo OH del glicerol es esterificado a ácido fosfórico, que puede a su vez esterificarse hasta un alcohol aminado.

Las lipasas y las fosfolipasas son casos especiales de las enzimas estererasas. Las lipasas actúan en los triglicéridos, mientras que las fosfolipasas actúan en los fosfolípidos.

## LIPASAS

Estas enzimas hidrolizan algún tipo específico de ácidos grasos. Algunas lipasas atacan preferentemente cadenas cortas C2-C10 de ácidos grasos, mientras que otras



prefieren cadenas insaturadas y largas como los ácidos oleico y linoleico. En otros casos, las lipasas pueden expresar alguna especificidad posicional. Esto es, muchas lipasas atacan ácidos grasos en el el C1 y/o C3 del triglicérido. Esta es una razón por la cual es muy difícil hidrolizar totalmente los triglicéridos hasta glicerol y ácidos grasos libres. Lo que sucede es que se liberan rápidamente dos ácidos grasos de las posiciones C1 y C3; posteriormente la velocidad de reacción disminuye hacia un proceso llamado migración acil grasa, donde muy raramente el ácido graso esterificado del C2 migra hacia las posiciones C1 o C3 para ser liberado rápidamente por una lipasa.

Las lipasas así como las esterasas en general, funcionan en una interfase agua/aceite, de aquí que el área superficial de la interfase determine la cantidad de sustrato disponible para la lipasa. La actividad de las lipasas puede ser afectada por emulsificantes, agitación y por cualquier otro factor que altere la forma en que se presenta la grasa en el alimento.

Las aplicaciones de la lipasas a nivel industrial son varias. Se usan para desarrollo de sabor en quesos. Esporas de Penicillium roqueforti se usan como fuente de lipasas para impartir sabor al queso roquefort. Lipasas animales son adicionadas a la leche junto con las proteasas (renina)

para asegurar el desarrollo del sabor en queso parmesano y queso romano.

## VII DESCRIPCIÓN DE LOS PROCESOS

El presente capítulo presenta las diversas industrias de alimentos donde se involucran las enzimas exógenas, es decir las que se añaden con un propósito determinado dentro de los procesos de producción. Esta recopilación tiene la finalidad de presentar de una manera ordenada diversos aspectos del uso y aplicación de la tecnología de enzimas. Cada industria representa un punto dentro de este capítulo, en ocasiones subdividiéndose de acuerdo a las características de la misma.

En cada uno de estos puntos se incluye una pequeña introducción, un listado de las enzimas, mencionando el punto del proceso donde intervienen, así como las acciones y cambios que se generan con su aplicación.

De manera complementaria se incluyen los diagramas de bloques necesarios para ubicar el o los puntos de aplicación de las enzimas mencionadas.

El conjunto de estos elementos nos ofrece un panorama claro y concreto de las posibilidades de aplicación de las enzimas añadidas.

## INDUSTRIA DE JUGOS

La industria de jugos abarca la producción de jugos, néctares, purés y papillas a partir de frutas o vegetales. Por la diversidad de productos finales y de materias primas, no es difícil imaginar las múltiples aplicaciones de enzimas exógenas para conseguir las características finales buscadas.

El tipo de enzimas que más se involucran en esta industria son sin duda alguna las PECTINASAS, cuyas aplicaciones generales son las siguientes (48):

- Clarificación de jugos de fruta. El jugo de manzana despectinizado puede ser concentrado sin gelificar y sin desarrollar turbidez.
- Tratamiento enzimático de pulpa. La fruta suave, las uvas, los cítricos, las manzanas pueden ser tratadas para obtener mayores rendimientos en la extracción de jugos.
- Maceración de frutas y vegetales. Se da una desintegración por separación de las células para obtener bases para néctares y alimento infantil.
- Licuefacción de frutas y vegetales. Para obtener productos con un contenido alto de sólidos solubles, se usan junto con celulasas.

- Aplicaciones especiales. Preparación de agentes de turbidez principalmente de cítricos para uso en confitería y producción de mermeladas.

Durante el procesamiento de los alimentos que contienen pectinas pueden suceder muchos cambios causados por varias enzimas naturales que actúan sobre estos polisacáridos. Las enzimas pécticas se encuentran en diferentes plantas y en frutas y además son sintetizadas por varios microorganismos, por lo que las preparaciones de pectinasas comerciales se obtienen de hongos, entre los cuales el Aspergillus niger es el más común. Dichas preparaciones son en realidad mezclas de las diferentes enzimas pécticas (descritas en el capítulo VI), que se encuentran en distintas concentraciones.

La aplicación de enzimas antes del prensado en el procesamiento de uvas, manzanas, peras, fresas, zarzamoras y frambuesa, es hoy en día un proceso estándar en casi todos los países del mundo. La despectinización de jugos después del prensado, se necesita siempre que se deseen jugos clarificados. Si el objetivo es la producción de concentrados de jugos de frutas, la despectinización es necesaria para prevenir la gelificación de los mismos (37).

Las preparaciones de enzimas pectolíticas también son usadas en la industria de cítricos. En el proceso de lavado de la pulpa, las enzimas se añaden para reducir la

viscosidad de manera que se prevenga la gelificación durante la concentración. Estas enzimas también son usadas para la clarificación de jugo de limón y para la producción de extractos altamente turbios de la cáscara de los cítricos. Estos concentrados son usados para la manufactura de bebidas refrescantes (37).

Las frutas como el tomate, la naranja y el durazno, contienen sustancias pécticas nativas que le imparten a sus jugos la viscosidad y turbidez deseadas, características de estas bebidas. Además, las propiedades coloidales de las pectinas permiten tener en suspensión los sólidos de los jugos. La presencia de las enzimas pécticas en estos productos es muy dañina, ya que hidrolizan las pectinas del jugo con la consecuente pérdida de su viscosidad y precipitación de sólidos. Los jugos en estas condiciones no son aceptados por el público consumidor y por tanto durante su obtención es necesario destruir las enzimas con un tratamiento térmico adecuado, como puede ser la pasteurización. En algunos casos puede existir una reactivación de las enzimas de los productos tratados térmicamente, por lo que se debe tener un control estricto del calentamiento. Por otra parte, en ciertos jugos de frutas como el de manzana, uva y otros, se requiere eliminar toda la turbidez del producto, lo cual se consigue con la adición de enzimas pécticas comerciales. A pesar de que las enzimas pécticas se usan para la clarificación industrial de jugos de frutas desde hace

varios años, existe muy poca información concerniente a la cinética y a la actividad de dichas enzimas. Se sabe que existen dos enzimas que actúan en forma secuencial en la clarificación de estos productos: Ellas son la pectinmetilesterasa y la poligalacturonasa (4).

El jugo de piña se obtiene de la pulpa misma, de la pulpa adherida a la cáscara de desecho, así como de las partes superior e inferior cortadas durante el procesamiento de dicha fruta. La aplicación de enzimas antes del prensado se hace para aumentar los rendimientos y para aumentar la intensidad del color y la turbidez deseable en este tipo de productos (38, 58).

El procesamiento de guayabas para obtener jugo es similar al que se realiza con las manzanas. Se trocea, se prensa y se le añaden enzimas ya sea para aumentar los rendimientos en purés, concentrados de guayabas y finalmente en el mismo jugo (58).

La aplicación de enzimas en el procesamiento de diferentes frutas es muy amplia; existen industrias que aún no aprovechan las ventajas que su uso ofrece, sin embargo existen estudios donde se indican las ventajas de su uso en productos tan abundantes en México como los plátanos y el mango (58).

Se han elegido tres procesos representativos de producción de jugos, uno de los cuales utiliza un vegetal como materia prima, y los otros dos a frutas de amplio

consumo en México. Como se ha mencionado, existen diversos procesos para las diferentes variedades de frutas y vegetales; por lo que es importante mencionar que sólo se tratan los procesos de jugo de manzana, jugo de toronja y jugo de zanahoria, ya que ejemplifican de manera adecuada, algunos de los puntos antes mencionados.



## MANZANA

Dentro de la industria de jugos, el de manzana ocupa un lugar importante por su alto volumen de producción y consumo a nivel nacional. En su proceso de fabricación se requiere eliminar pectina y otros polisacáridos (clarificación) para que el aspecto final sea más atractivo, lo que lo hace comercialmente más aceptado. Este proceso se ilustra en el diagrama No. 1.

Los parámetros que afectan la clarificación son el pH, la temperatura, el tiempo de contacto y la concentración de enzimas. Algunas preparaciones enzimáticas contienen ayuda filtros que favorecen la clarificación. La variedad y la madurez de la fruta influyen en el pH del jugo de manzana, un jugo con menor pH clarifica más fácilmente que uno con un pH más alto. El jugo de manzana clarificado puede desarrollar una turbidez durante su almacenamiento, principalmente durante la refrigeración; se genera cuando un jugo ha sido procesado a temperaturas más altas que las de almacenamiento. El uso de gelatina (ayuda filtro) y menores temperaturas de procesamiento pueden eliminar este defecto. Esta turbidez resulta de la polimerización de polifenoles y de la oxidación de proantocianidina. Otro defecto es llamado turbidez de almidón que se desarrolla cuando el jugo es preparado con manzanas inmaduras que contienen hasta un 15% de almidón. Este almidón puede ser removido por amilasas fungales (diastasa) añadidos al jugo con previo calentamiento a 77°C para gelatinizar el

almidón y enfriado a 52°C antes de la adición de la diastasa (26). Todos los tipos de frutas de significancia industrial o nutricional contienen diferentes cantidades de una sustancia de estructura similar al almidón, que es la pectina (ácido polimetil- galacturónico). En la fruta inmadura la pectina está presente en su forma insoluble, algunas veces llamada protopectina que es responsable de la dureza de la fruta. A medida que la fruta va madurando, se lleva a cabo un desdoblamiento hacia formas más solubles y la fruta se torna más suave. Debido a esta solubilidad parcial en esta etapa, parte de la pectina pasa a formar parte del jugo durante el prensado, lo cual conduce a un incremento de la viscosidad y dificulta obtener rendimientos óptimos en la extracción del jugo. El jugo extraído es pobre en color y en componentes de sabor, es difícil de clarificar y filtrar. Las dificultades antes mencionadas pueden superarse tratando la pulpa de fruta con una preparación de enzimas pectolíticas antes del prensado, así se facilita la extracción del jugo aumentando los rendimientos y la capacidad del prensado. Una buena clarificación y filtración del jugo prensado se consigue con una completa despectinización por medio de una preparación de pectinasas.

#### ENZIMAS QUE DESDOBLAN EL ALMIDÓN. AMILOGLUCOSIDASAS

El jugo de manzana, por ejemplo, frecuentemente contiene cantidades considerables de almidón particularmente al principio de la temporada de cosecha. El almidón debe de

ser removido si la intención es producir jugos clarificados o concentrados. La amiloglucosidasa degrada el almidón hasta glucosa (37).

#### CELULASAS

La adición de estas enzimas conduce a altos rendimientos y a mejores colores en la extracción (37).

#### ARABANASA

El polisacárido arabano que es un polímero de la pentosa arabinosa puede causar turbidez en los jugos concentrados. El arabano forma parte natural de la fruta y puede estar presente en los jugos cuando se ha obtenido un rendimiento de jugo elevado. Esto aparece debido a las nuevas tecnologías de extracción que cada día son más eficientes y que llegan a extraer el arabano de las paredes celulares. Esta turbidez aparece después de un tiempo de la extracción (de varios días a varias semanas). Las preparaciones comerciales de pectinasas contienen suficiente actividad de arabanasa para prevenir esta turbidez (36, 37).

#### POLIGALACTURONASA

La acción de una poligalacturonasa de origen fungal (Aspergillus niger), es utilizada comercialmente en la clarificación de jugos, especialmente de manzana. Esta enzima provoca un abatimiento de la viscosidad, además de facilitar el bombeo de la pulpa, lo cual ocasiona que las

gotas asperjadas por el atomizador del secador sean más pequeñas y por lo tanto se presente una mayor superficie de transferencia de calor y masa durante el secado.

#### DIASTASAS

Se han empleado para eliminar el almidón de los jugos de frutas no maduras, con lo cual se elimina la turbidez indeseable (31).

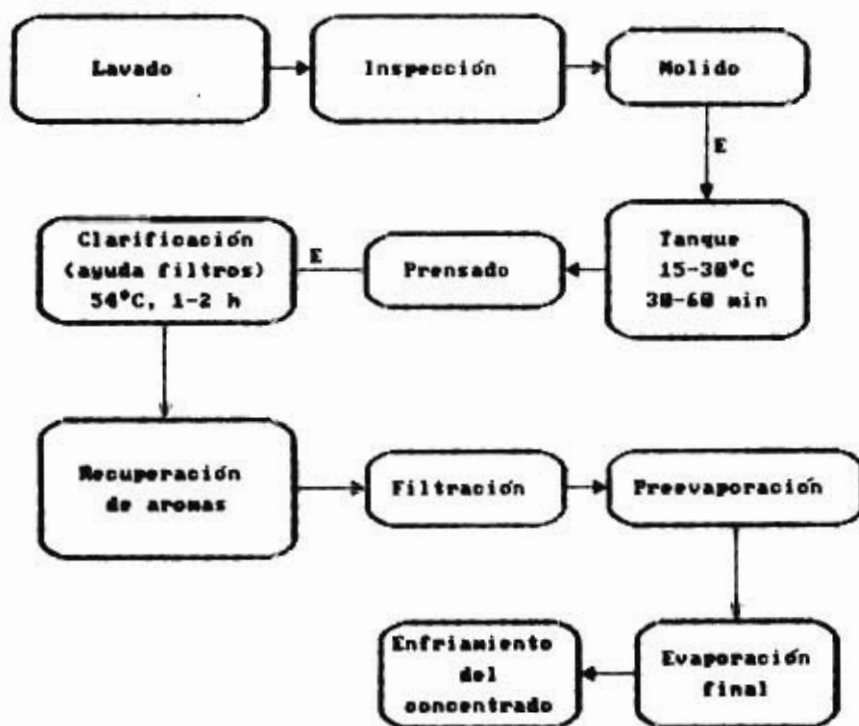


Diagrama N 1 Elaboración de Jugo de Manzana (38, 36, 48)

**TORONJA.**

La mayoría de los jugos de cítricos en el mercado aparecen como jugos turbios o concentrados. La pérdida de esta turbidez es un serio problema atribuido a la desesterificación de la pectina del jugo por una pectinesterasa propia del cítrico, y una precipitación subsecuente de la pectina baja en metoxilo como un pectato de calcio. Existen dos métodos para prevenir esta pérdida de turbidez: Pasteurización del jugo a 90°C para inactivar la pectinesterasa o congelación de la pectinesterasa activa de los concentrados. Ambos métodos alteran el sabor y son difíciles de controlar. Un tercer método de estabilización se puede conseguir añadiendo pectinasas comerciales al jugo para provocar una rápida despolimerización de la pectina baja en metoxilo y del pectato de manera que la coagulación de pectato de calcio no pueda tener lugar. Esta enzima es adicionada en la etapa de la extracción del jugo como se observa en el diagrama No. 2.

Los cítricos contienen dos compuestos distintos químicamente que generan el amargor: Flavonoides y limonoides. Los flavonoides existen en toda la fruta principalmente en la cáscara. Los limonoides se restringen al albedo y a las cubiertas centrales. Estos productos, particularmente de toronjas, pueden tener un sabor extremadamente amargo.

El amargor causado por el limonoide se asocia con las toronjas y algunas variedades de naranjas. Es provocado por la limonina, un tetraterpenocíclico con dos anillos de delta-lactona y un anillo furano. Este compuesto no se encuentra en la fruta intacta, se va desarrollando dentro del jugo ácido por ello se conoce como amargor retardado. Es posible eliminar este sabor con limonato deshidrogenasa, sin embargo se necesitan cofactores muy caros como el NAD y el NAP. Este proceso está todavía en estudio hasta que sea costeable para una aplicación futura (48).

Existe una gran variedad de flavonoides en las frutas cítricas. Generalmente son glucósidos y se distribuyen por todos los tejidos de dichas frutas. La característica más importante de algunos flavonoides cítricos es su amargura característica. Los flavonoides que se encuentran en mayores concentraciones en los cítricos son la naringina (amarga) y la hesperidina (sin sabor). La naringina predomina en toronja y en naranjas dulces y amargas. La naringina es un 7-(2 ramnosido-beta-glucosido) del 4,5,7-trihidroxi-flavona.

**LIMONASA.** Esta enzima también es conocida como limonato deshidrogenasa, la cual reduce la amargura del limonoide en productos de toronja y en algunas naranjas (48).

**NARINGINASA.** Destruye la naringina por tanto, elimina el sabor amargo del jugo de cítricos y de las cáscaras (46).

## ZANAHORIA

El jugo de zanahoria requiere tener, las siguientes características:

- Textura característica de los jugos.
- Turbidez estable, la pulpa no debe sedimentar.
- Color naranja profundo, conseguido por un alto contenido de beta-caroteno.
- Rendimientos tan altos como sea posible.

La zanahoria tiene una estructura muy sólida que debe ablandarse antes de comenzar su procesamiento; esto puede conseguirse hirviendo las mismas, lo cual afecta la calidad y el sabor del producto terminado. Con la aplicación de enzimas, las zanahorias pueden digerirse prácticamente hasta formar un puré. Durante este proceso la protopectina insoluble que conecta la células se convierte en pectina soluble. El producto obtenido puede destinarse para alimento infantil.

Si las zanahorias se exprimen en frío o en caliente sin haber sido tratadas enzimáticamente, el rendimiento de jugo es insatisfactorio y el contenido de beta caroteno es bajo. El color de este jugo puede corregirse añadiendo un 25% de puré, pero esto requiere de una homogenización cuidadosa y un ajuste muy fino de los sólidos para evitar la sedimentación de los mismos.



Para alcanzar consistencia de jugo es necesario disminuir la viscosidad del puré. La pectina soluble formada a partir de la protopectina debe preservarse, ya que esta estabiliza los sólidos en suspensión. Un puré de baja viscosidad puede obtenerse con la aplicación de una celulasa; la cual debilita las estructuras de celulosa e hidroliza parcialmente las paredes celulares sin atacar la pectina esencial. Esto da como resultado un producto de cuerpo delgado pero al que todavía no podemos llamar jugo.

Investigaciones realizadas (16) con respecto al comportamiento de flujo de un puré homogéneo de zanahoria han demostrado que una alta viscosidad es causada sobre todo por la celulosa insoluble y por su tamaño de partícula, donde la pectina de alto peso molecular disuelta en el jugo es de menor importancia en este caso. Una viscosidad elevada dificulta el manejo de dicho puré a través de las redes de flujo.

Las partículas de celulosa y las fibras se combinan con la pectina soluble y con otras sustancias mucosas llamadas hemicelulosas. En el puré, estas partículas a las que se les llama sólidos, se dispersan homogéneamente y soportan unas a otras evitando la sedimentación. Cuando se añade agua o jugo, o bien se altera el valor del pH, las partículas sedimentan rápidamente.

Con lo anterior se explica el porque es conveniente remover las fibras pesadas de celulosa del puré para

mejorar el flujo de la fase acuosa restante y para eliminar partículas que puedan sedimentar. Esta separación no es una operación sencilla. Las hemicelulosas y las pectinas residuales se unen casi a todo el jugo y al beta-caroteno, no hay separación. La separación sólo puede llevarse a cabo si los coloides que se encuentran alrededor de las fibras de celulosa se desdoblan enzimáticamente. Para la hidrólisis de los coloides se requiere de hemicelulasas así como pectinasas. La estabilidad en la turbidez permanece inalterable si se aplica la pectinasa correcta que debe ser una transeliminasa que rompa la cadena de pectina sin liberar ácido péctico. Ya que estos últimos generan la floculación y la sedimentación de pectina hidrolizada junto con la materia suspendida.

Después del tratamiento enzimático de las zanahorias rayadas y después de la extracción, resulta un jugo de cuerpo muy delgado en el cual se encuentran finamente dispersas las partículas de beta-caroteno, por lo cual es un jugo muy rico en color. El color amarillento causado por la celulosa desaparece. El jugo muestra una estabilidad de turbidez excelente y puede ser concentrado cuanto se desee.

Gracias al tratamiento enzimático los rendimientos pueden mejorar un 20-30%, lo cual significa alrededor de un 80% final (16). El proceso antes descrito se muestra en el diagrama No. 3.

La maceración enzimática tiene algunas ventajas potenciales sobre la desintegración mecánica-térmica, en lo que concierne a la calidad de los productos. Es posible obtener productos de turbidez estable con alto contenido de sólidos solubles, pigmentos y vitaminas (beta caroteno) finamente dispersos (48).

**PECTIN-GLUCOSIDASA.** Ataca principalmente la protopectina y ablanda el tejido.

**PECTIN-TRANSELMINASA.** Rompe los residuos de pectina en las fibras de celulosa.

**HEMICELULASA.** Limpia de fibras de celulosa a toda la materia coloidal.

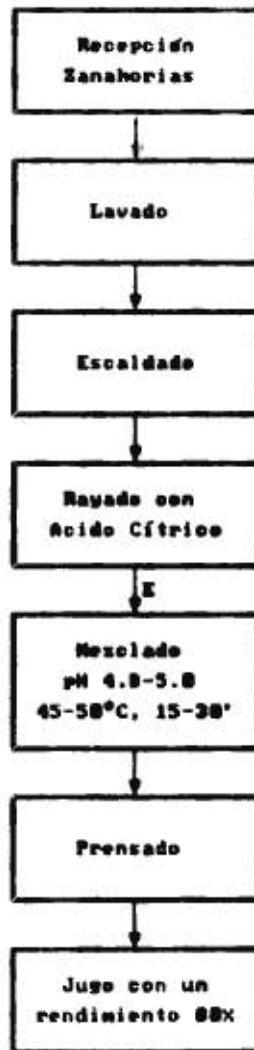


Diagrama # 3 Elaboración de Jugo de Zanahoria (16)

## INDUSTRIA PANADERA

La importancia nutricional de los cereales en la dieta humana siempre ha sido relevante, incluso ha definido a través de la historia, características culturales a diferentes pueblos, según el cereal base de su alimentación.

Las harinas son la materia básica para la preparación del pan, galletas, pastas alimenticias, etc. Se obtienen por molturación del trigo limpio u otros cereales y leguminosas. La harina sin otro calificativo se entiende siempre como procedente del trigo; al mencionar esta industria se estará haciendo referencia en todo momento al trigo y a la harina del trigo.

Como todos los materiales vivientes, las células en los granos que se usan para el consumo humano contienen enzimas. En el interior, la parte que contiene el almidón (endospermo), se transforma en harina durante el proceso de molienda. Dentro del grano existen varias enzimas que pueden desdoblar el almidón hasta azúcares solubles. En el grano seco sin germinar se encuentra principalmente la enzima beta-amilasa. Esta enzima puede desdoblar el almidón con la consiguiente formación de maltosa, pero el proceso se lleva a cabo muy lentamente y, si no existen otras enzimas para ayudar, ésta interrumpe su acción mucho antes de que el almidón sea completamente degradado. Cuando el nivel de humedad en los granos alcanza ciertos

niveles, éste comenzará a germinar, durante este proceso, se sintetizan grandes cantidades de enzima que desdobla el almidón y que se llama alfa-amilasa. Esta enzima desdobla con cierta rapidez al almidón hasta dextrinas, las cuales son moléculas de tamaño mediano y que, como el almidón y la maltosa, consisten de unidades de glucosa unidas en cadenas más largas o más cortas. Cuando el almidón se desdobla hasta dextrinas, la beta-amilasa tiene un papel más sencillo y la subsecuente ruptura hasta maltosa puede llevarse a cabo rápidamente.(37)

#### PAN BLANCO (4, 8, 12, 14, 17, 33, 37, 46)

La masa utilizada para la producción de pan blanco y productos similares comprende: harina, agua, levadura, sal y posiblemente otros ingredientes como azúcar y grasa. Tan rápido como se prepara la masa, la levadura comienza a actuar sobre los azúcares presentes en la masa. Este azúcar se transforma en alcohol y en bióxido de carbono que hace que la masa esponje. Al principio, la fermentación comienza en forma moderada, a partir del azúcar añadido o a partir de los azúcares fermentables que la harina contiene. Cuando estos azúcares han sido consumidos, la fermentación se suspende a menos que se añadan más azúcares. Si la harina es medianamente rica en enzimas, principalmente en alfa-amilasa, ésta comenzará inmediatamente después de preparada la harina, a degradar el almidón hasta maltosa, y si las cantidades de enzima

son lo suficientemente grandes, siempre habrá azúcar para que continúe la fermentación. Consecuentemente no es necesario añadir azúcar, lo anterior se ilustra en el diagrama No. 4. Si la harina ha sido producida a partir de granos cultivados en área de clima húmedo durante el período de maduración y cosecha, el contenido de alfa-amilasa como regla será alto. Si el clima ha sido demasiado húmedo, puede suceder que parte del grano haya germinado y el contenido de alfa-amilasa sea tan alto que la calidad del pan no sea la mejor. La harina que provenga de granos cosechados en un clima cálido y seco, tendrá un contenido muy bajo de enzimas; para tener suficiente azúcar para la fermentación, será necesario añadir azúcar o alfa-amilasa para compensar las deficiencias del grano.

#### VENTAJAS DE LAS ENZIMAS

La adición de enzimas en lugar de azúcar ofrece ciertas ventajas en la industria de la panificación. Es posible en el molino, estandarizar el contenido de enzima en la harina, de manera que estas transformen gradualmente el almidón en azúcares, adaptándose exactamente a las demandas de la levadura. Como suplemento de enzima se puede utilizar harina de malta, pero es mucho mejor usar una amilasa fungal. La razón por la cual este tipo de enzima es mejor que la harina de malta es porque la actividad enzimática está perfectamente estandarizada y porque

contrariamente al alfa-amilasa de la malta, aquella no puede soportar temperaturas mayores de 50°C por mucho tiempo. La enzima entonces trabajará solamente durante el esponjado (la cual es adicionada junto con todos los otros ingredientes como se observa en el diagrama No. 4), de manera que sea destruída durante el horneado, y no dé lugar a una formación mayor de azúcares que puedan afectar la calidad del pan.

#### ENZIMAS EMPLEADAS EN LA INDUSTRIA PANADERA

**AMILASAS.** En la industria de la panificación se emplean amilasas para lograr la hidrólisis parcial o ruptura de los azúcares, amilosa, almidón y otros compuestos, ya que la hidrólisis enzimática es esencial para mejorar el volumen de las hogazas y otras cualidades de los productos horneados.

Uno de los principales usos de las amilasas se encuentra en la industria de la panificación, ya que hidrolizan el almidón y producen los azúcares que sirven de sustrato a los microorganismos durante la fermentación que se presenta en estos alimentos. La actividad conjunta de las dos amilasas forma maltosa, que tiene varias funciones en el pan: a) mejora el color ya que induce más fácilmente las reacciones de Maillard; b) aumenta el volumen debido a la alta producción de anhídrido carbónico proveniente de la utilización de estos



azúcares por las levaduras, y c) mejora la textura del pan al inducir una hidrólisis parcial del almidón.

A diferencia de la beta-amilasa, la alfa-amilasa puede atacar gránulos de almidón no dañados, pero su cantidad en la harina es variable e insuficiente. Cuando se muele la harina, se prueba su actividad de alfa-amilasa (poder gasificador) y se añade la cantidad suficiente de esta enzima, proveniente de grano malteado. La beta-amilasa hidroliza fragmentos de amilopectina, hasta moléculas de maltosa. Entonces, la alfa-amilasa hace más almidón disponible para la fermentación por levaduras. Las amilasas están activadas durante la cocción y hay una conversión rápida de almidón en dextrinas, haciendo la masa más fluida resultando en un mayor esponjamiento.

**LACTASA.** Enzima de origen fungal que rompe la lactosa, por lo que provee de más azúcares fermentables a la levadura de pan a partir de la leche utilizada en la mezcla.

**LIPOXIDASA.** Estas enzimas se usan en la industria de panadería para blanquear los pigmentos naturales de la harina.

El uso de las lipoxigenasas en panadería puede ser dividido en dos grandes categorías. La primera, donde se emplean para modificar el color de la masa y el pan, mediante la oxidación de la grasa. La segunda se refiere al aumento de tolerancia de la masa al mezclado, mejorando en general las propiedades reológicas de la masa.

La decoloración de la masa de trigo con lipoxigenasa se consigue añadiendo 0.5-1% de harina de soya con actividad enzimática. De esta manera, se logra un pan muy blanco con partículas muy finas y con un gran volumen. Otros beneficios incluyen un ligero y agradable sabor a nuez y una mejora en las propiedades reológicas, que incluyen la facilidad de mezclado, la resistencia a la deformación y una mejor palatabilidad del producto terminado.

**PROTEASAS.** En la industria de la panificación, las proteasas se emplean para degradar la proteína del gluten y reducir el tiempo de mezclado de la pasta.

**PROTEASAS FUNGALES.** Este tipo de proteasas actúan en la masa desdoblado las proteínas de la harina, lo cual resulta en un ablandamiento de la masa. Estas enzimas incrementan la extensibilidad de la masa, controlando así la flexibilidad y asegurando un adecuado manejo. El hongo Aspergillus oryzae, se utiliza comúnmente para la producción de proteasas para panadería. La sal inhibe la acción de las enzimas proteolíticas fungales en el gluten, de manera que su efecto en masas fuertes que contengan 2% de sal es imperceptible.

**AMILASAS FUNGALES.** Estas enzimas se adicionan como sustituto de las enzimas amilolíticas de la malta. Proveen la capacidad necesaria de degradación del almidón, sin añadir el sabor y el color de la malta. En general las preparaciones fungales son más baratas por unidad de

actividad. Sin embargo, no tienen la calidad nutritiva de las preparaciones de granos; y en muchos casos el sabor de la malta es necesario.

#### RETARDO DEL ENDURECIMIENTO DE PAN BLANCO

La adición de amilasas de origen bacteriano, produce un pan de partículas más suaves y finas, lo que ayuda a conservar el pan más fresco por períodos más largos de tiempo. Aparte de aumentar la vida de anaquel, ayuda a cortar los gastos referentes a transporte, reparto y rotación de los productos de panadería. El endurecimiento del pan se le atribuye a un cambio en el almidón. El agua (humectante) se desliga del almidón cuando este cambia de su forma soluble a insoluble; generándose la dureza indeseable en el pan. El uso de alfa amilasa aumenta la vida útil de estos productos, hidrolizando algunas fracciones del almidón.

Esta enzima debe ser capaz de actuar durante y después del horneado; por lo tanto debe ser altamente termoestable, característica de algunas enzimas de origen bacteriano. La dosificación debe ser cuidadosamente vigilada pues un exceso de enzima podría dar un pan con textura gomosa indeseable.

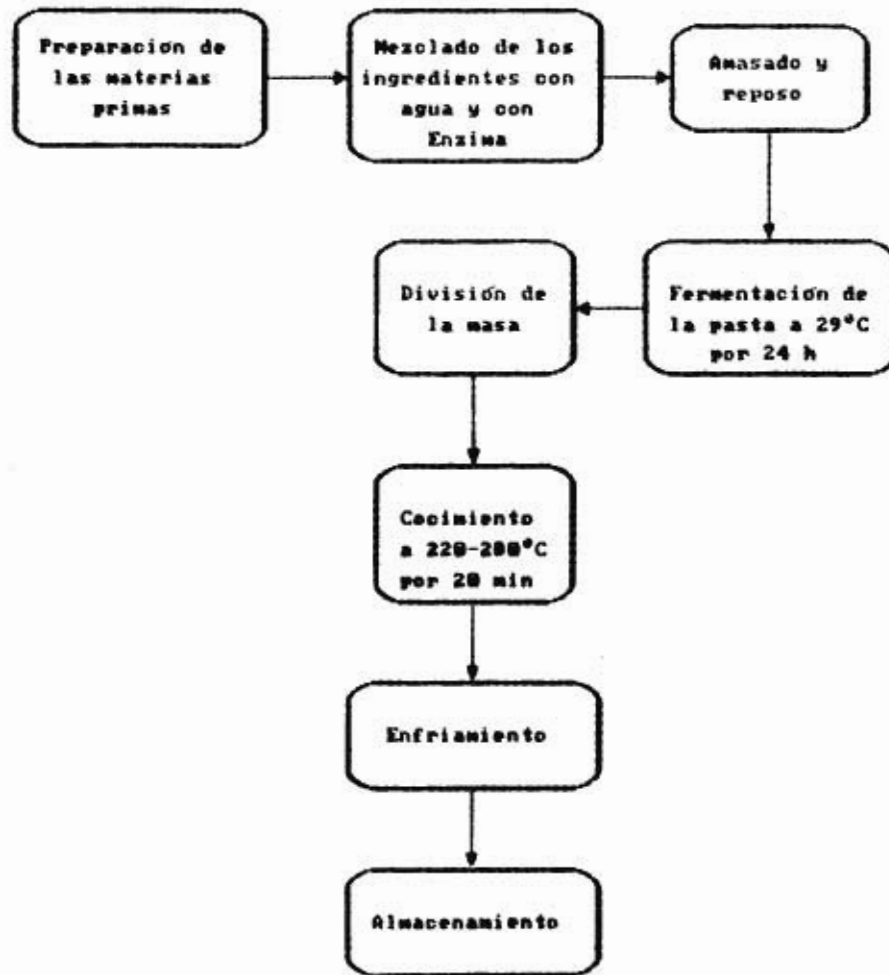
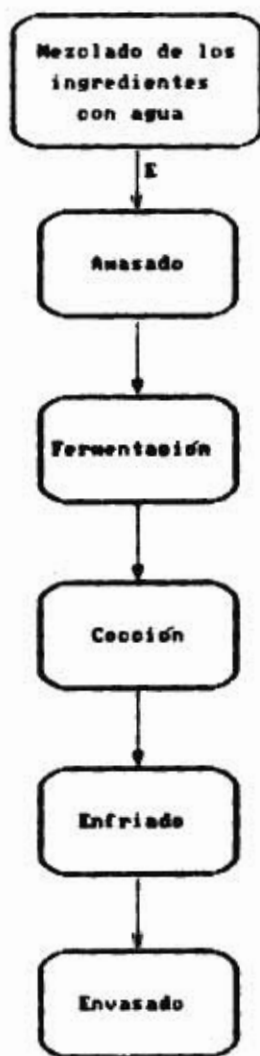


Diagrama # 4 Elaboración de Pan Blanco (41),

## GALLETAS (37)

Una aplicación de las enzimas en la producción de galletas, es el tener una harina con un contenido relativamente bajo de proteína (gluten) y preferentemente un gluten de carácter débil. Algunas veces es difícil poner suficiente cantidad de este tipo de harina, y es por ello necesario cambiar el carácter del gluten mediante la adición de alguna sustancia que lo haga más suave. Para este propósito se han usado los llamados agentes reductores particularmente el bisulfito de sodio. La acción suavizante del bisulfito en el gluten es suficientemente buena, pero desafortunadamente afecta a otras sustancias en la harina incluyendo el contenido de vitamina B1 (tiamina) que es completamente o parcialmente destruída. Por otra parte, los niveles de sulfitos permitidos para su uso en alimentos se encuentra controlado, debido a las evidencias que señalan problemas relacionados con alergias y asma. Es por ello que existe un gran interés en la aplicación de enzimas proteolíticas de manera que ablanden el gluten; este tipo de enzimas pueden ser de origen fungal o bacteriano. La enzima es adicionada antes del amasado, para conseguir un efecto homogéneo de la misma (ver diagrama No. 5).



**Diagrama N 5 Elaboración de Galletas (30)**

## INDUSTRIA DE JARABES

Desde comienzos del siglo XIX, el químico alemán Kirchoff descubrió que el almidón al hervirse junto con un ácido podía ser convertido en una sustancia de sabor dulce que consistía básicamente de glucosa. Kirchoff estaba buscando un sustituto del azúcar de caña que no podía ser suministrada al continente Europeo, debido al bloqueo de las guerras napoleónicas. Sin embargo, el producto de Kirchoff no daba una completa solución a la escasez de azúcar, en parte porque la glucosa tiene solo 0.6-0.7 veces el dulzor del azúcar o la remolacha y en parte porque el método de producción no tenía altos rendimientos. Sin embargo, el ácido ha sido ampliamente usado para la hidrólisis de almidón hasta glucosa y varios jarabes. A pesar de que esto tiene una serie de desventajas como la formación de productos indeseables (colores) y la necesidad de aparatos especiales que puedan soportar el ácido a temperaturas tan elevadas como 140-150°C. Por todos estos aspectos el uso de enzimas es superior al uso de ácido en la hidrólisis de almidón (37). Este proceso se ejemplifica en el diagrama No. 6.

Este es el caso de la bioconversión (conversión por medios biológicos de una sustancia a otra). La conversión de glucosa a fructosa, con altos rendimientos y pocos productos indeseables, es sólo posible con una enzima. Es posible obtener un jarabe conteniendo fructosa,

por medios químicos con ácido y calor; sin embargo el rendimiento es muy bajo y la formación de sustancias indeseables es alta.

En este caso se persigue una bioconversión cuantitativa; esto requiere de un proceso enzimático altamente eficiente de manera que sea costeable el producto final (ver diagrama No. 7).

Para obtener un jarabe rico en fructosa a partir de almidón, es necesario el uso previo de una amilasa para obtener así un jarabe rico en glucosa.

AMILASA BACTERIANA. Usada para el rompimiento parcial de pastas de almidón. Por este proceso, que es llamado licuefacción, las pastas se vuelven más fluidas y más fáciles de manejar. Para obtener una licuefacción completa del almidón usualmente es necesario someterlo a temperaturas muy altas las cuales destruyen la amilasa bacteriana, de ahí que cuando este tipo de amilasas se use se debe aplicar un proceso de tres etapas. En la primera y última etapa se usan temperaturas de aproximadamente 95°C y aquí es en donde se debe de añadir la enzima. Entre estos dos pasos la mezcla es calentada hasta una temperatura de aproximadamente 140°C para obtener una gelatinización completa del almidón (37).

Otro tipo de amilasa bacteriana es también usada para la licuefacción de pastas de almidón. Esta enzima es estable a altas temperaturas, con lo cual el proceso puede



realizarse en un sólo paso, comenzando con un calentamiento hasta 105°C y después de unos 5 minutos hacer un enfriamiento rápido a 95-100°C. Esta temperatura se mantiene durante una o dos horas, donde se consigue el grado de desdoblamiento del almidón que se desea. Este proceso es ampliamente usado, particularmente en la producción de jarabe de fructosa, donde se requieren grados de pureza de la materia prima muy altos. Estas demandas pueden ser satisfechas usando un licuefacción enzimática (37).

La susceptibilidad de los gránulos de almidón a sufrir una degradación enzimática por alfa amilasa depende del origen tanto del almidón como de la enzima (7).

El almidón nativo de trigo puede convertirse hasta en un 98% en oligosacáridos después de 26 horas de hidrólisis con alfa-amilasa en condiciones óptimas de trabajo (7).

ALFA AMILASA FUNGAL. Inicialmente desdobla el almidón hasta dextrinas en forma similar que las amilasas bacterianas. Sin embargo, este tipo de amilasa desdobla el almidón considerablemente más que las enzimas bacterianas, y el producto final contiene una alta proporción de maltosa. Por ello esta enzima es usada para la manufactura de mieles con un alto contenido de maltosa, las cuales tienen una especial aplicación en la industria confitera ya que tienen una baja tendencia a cristalizar y un bajo grado higroscópico.(37)

AMILOGLUCOSIDASA O GLUCOAMILASA.(AMG). El almidón es desdoblado primero hasta dextrinas por una amilasa bacteriana y posteriormente es degradada hasta la glucosa con amiloglucosidasa. Se puede llegar a obtener de 94-96 unidades de dextrosa equivalente (DE) (19).

La amiloglucosidasa se usa sola o junto con otras enzimas, particularmente alfa-amilasas de origen fungal, para la producción de glucosa pura (dextrosa) y varios almidones con alta fermentabilidad y comparativamente un alto poder endulzante (37).

PULULANASA. Trabaja junto con AMG en la producción de jarabes altos en dextrosa. Ofrece posibilidades de reducir el consumo de AMG, incrementando los rendimientos de glucosa y acortando los tiempos de sacarificación evitando por tanto la reversión de glucosa a isomaltosa.

Al ser una enzima que corta las ramificaciones, es también útil para la producción de jarabes altos en maltosa en combinación con beta y alfa amilasas (37).

GLUCOSA ISOMERASA. En este caso la hidrólisis no está involucrada, y no hay entonces competencia del ácido. Esta enzima cataliza la conversión (isomerización) de glucosa (azúcar aldehído) a la correspondiente fructosa (azúcar cetónica), que es aproximadamente dos veces más dulce. El producto, que hasta ahora ha sido el de mayor importancia práctica, contiene aproximadamente 42% de fructosa (53-54% de glucosa) y es conocida como jarabe de maíz alto en

fructosa, isojarabe, isoglucosa, o azúcar de almidón. En base seca este jarabe tiene virtualmente el mismo poder endulzante que el azúcar ordinaria (de caña o remolacha) y tiene el mismo contenido de energía.

Jarabes de fructosa con un porcentaje más alto de fructosa (hasta 90%) y fructosa pura y cristal na que son aproximadamente 40% más dulces que el azúcar, se encuentran disponibles comercialmente (37).

Los iones Calcio inhiben a la enzima glucosa isomerasa, sin embargo estos iones se deben agregar durante el proceso de hidrólisis de almidón por requerirlos la alfa amilasa (19).

Es común hoy en día su utilización como enzima inmovilizada, es decir en su forma insoluble.

**INVERTASA.** La invertasa o beta-fructofuranosidasa cataliza la hidrólisis de la sacarosa en sus constituyentes glucosa y fructosa y se utiliza principalmente en la producción de azúcar invertido que es más dulce que la sacarosa y permite, dada la mayor solubilidad de los productos de hidrólisis, manejar soluciones mas concentradas (19).

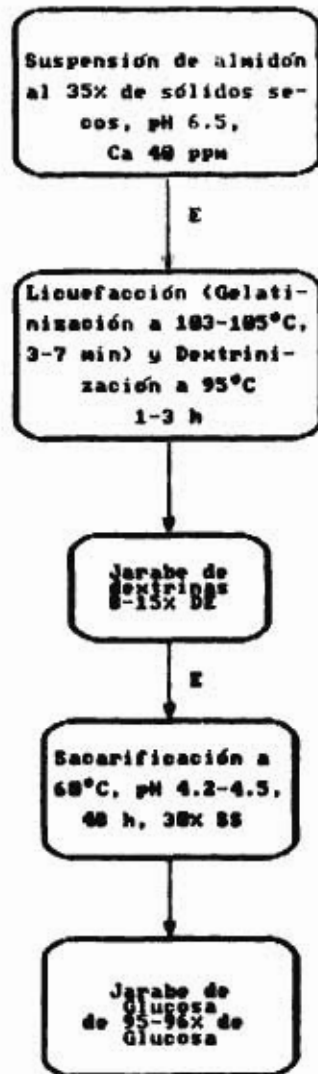


Diagrama N 6 Elaboración de Jarabe de Glucosa (12, 53)

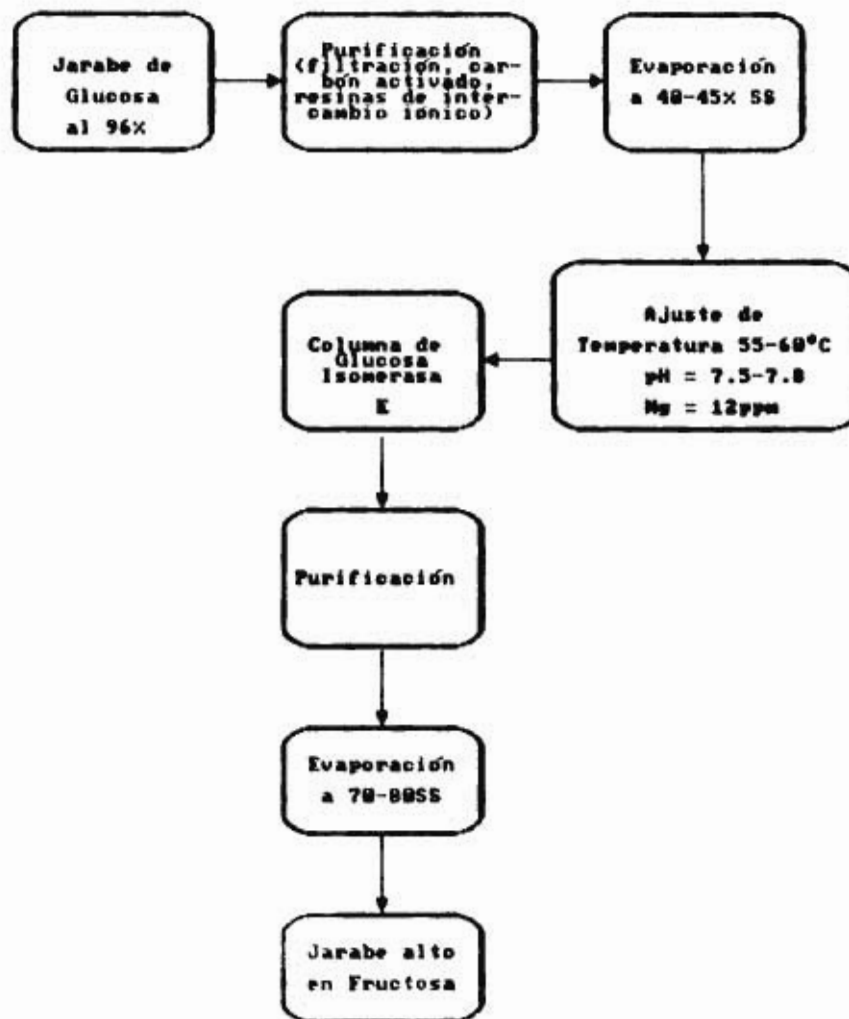


Diagrama N 7 Elaboración de Jarabe Alto en Fructosa (38)

## INDUSTRIA LÁCTEA

Dentro de la industria láctea se ha incluido la elaboración de queso, proceso donde las enzimas tienen un papel fundamental y milenario. Asimismo, se incluye el proceso de obtención de leche baja en lactosa, siendo éste un proceso relativamente nuevo en comparación con el del queso. Ambos procesos utilizan enzimas exógenas, motivo principal de este trabajo.

Por otro lado el proceso de pasteurización de leche se menciona en este capítulo, ya que la forma de evaluación de la pasteurización se realiza con la identificación de una enzima endógena llamada fosfatasa alcalina; actualmente es el método más utilizado para controlar la eficiencia de la pasteurización.

### QUESO (3, 8, 32, 37, 50)

Desde tiempos remotos, el retículo de rumiantes jóvenes ha sido usado para la coagulación de la leche para la manufactura de queso. La substancia activa en los estómagos es una enzima llamada renina que está presente en la membrana mucosa. La producción de renina decrece con la edad de los animales; por otro lado la producción de enzima pepsina aumenta, pero esta enzima no es adecuada para la producción de queso. Aunque la renina es una enzima proteolítica como la pepsina, la renina trabaja en

una forma muy especial ya que sólo rompe unos cuantos enlaces de la caseína, incluyendo aquéllos que son necesarios para que la caseína precipite. Entonces la renina combina una alta capacidad para coagular la caseína con una pobre capacidad de precipitar la misma caseína. Como resultado, la renina no contribuye a una maduración excesivamente rápida de los quesos. La mayoría de las demás enzimas proteolíticas también pueden coagular la leche, pero su efecto continúa después de la coagulación, lo cual puede generar fácilmente una sobremaduración del queso y una producción de un sabor amargo resultado de la degradación de la caseína. Desde el comienzo de los años 60s aumentó la demanda de queso, con lo cual se elevó el requerimiento de renina con la consiguiente alza del precio. Es por ello que comenzaron los estudios para producir un sustituto de la renina producido por microorganismos, tarea nada fácil, considerando las características tan especiales de la renina. Esta enzima, sustituto de la renina animal, se utiliza en el proceso descrito en el diagrama No. 8.

En el futuro se esperan aplicaciones de otro tipo de enzimas en la industria láctea. Un ejemplo interesante es la aplicación de lactasa para desdoblar la lactosa. Las enzimas juegan un papel importante en la maduración de quesos, viéndose involucradas principalmente las proteasas y las lipasas. Los cambios producidos por estas enzimas en los quesos, produce la gran gama de productos que se

encuentran en el mercado con características completamente diferentes, tanto en textura como en aroma y sabor. El estudio de la maduración acelerada de los quesos mediante la adición de enzimas y no la maduración por las enzimas naturales de los microorganismos empleados en su elaboración es un punto muy importante que no debe perderse de vista.

#### MODIFICACION DE GRASAS

Las grasas son ésteres del glicerol alcohol trivalente con varios ácidos grasos como el palmítico, esteárico y el ácido oleico. Las propiedades de las grasas dependen del carácter de los ácidos grasos que contengan. Usando enzimas especiales para el desdoblamiento de grasas es posible transferir ácidos grasos de una grasa a otra (interesterificación) y por ello cambiar sus propiedades significativamente, por ejemplo el punto de fusión. En ciertos casos, el desdoblamiento de la grasa en alimentos que las contengan conduce a cambios deseables en el sabor. Un ejemplo, es el desarrollo de sabor en los quesos tipo italiano.

Dentro de las enzimas que se emplean en la Industria Láctea tenemos a las siguientes:

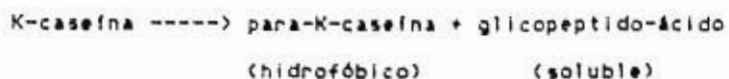


LIPASAS- Son particularmente importantes en la maduración de quesos azules. Las lipasas desarrolladas con este propósito tienden a acelerar el proceso de maduración.

Las lipasas endógenas de la leche son inactivadas por pasteurización lo cual previene el enranciamiento de la leche y el suero.

RENINA- Las micelas de caseína en la leche pueden desestabilizarse por la enzima renina. La renina (quimosín) es el ingrediente activo de las tabletas de renina. Esta enzima es responsable por el primer paso en la coagulación de la leche. Genera una ruptura de una unión específica, la unión peptídica entre los enlaces 105 y 106 (fenilalanina-metionina) de la K-caseína, separando la porción ácida, rica en carbohidratos, de la parte de la molécula que es hidrofóbica.

renina



Con la pérdida de la parte ácida de la molécula, lo restante de la K-caseína no estabiliza más las micelas que ahora pueden aproximarse más a las otras y unirse posiblemente por unión hidrofóbica, para formar una red tridimensional que atrape la fase acuosa de la leche. A diferencia del efecto del ácido, la renina no desplaza al

calcio de la micela, de manera que el "cuajo" formado por la acción de la renina es un fosfocaseinato calcico. El gel formado por la renina es fuerte y plástico comparado con el formado por ácido, que tiende a ser menos elástico y más frágil. La temperatura es crítica si la leche debe coagularse como resultado de la acción de la renina. Si la temperatura de la leche es superior a 50°C, la enzima se inactiva. La caseína alterada por la enzima no se une para formar un gel a menos que la temperatura de la leche sea superior a los 15°C, considerando que existen enlaces hidrofóbicos. La temperatura óptima para la segunda fase de la coagulación es de 40°C. La leche no debe sobrecalentarse aunque se enfríe a 40°C, antes de que la renina se añada, porque entonces el gel formado será muy débil, esto se atribuye principalmente a un complejo inducido por el calor entre la beta-lactoglobulina y la K-caseína que hace a ésta última inmune al ataque de la renina. Se pueden usar otras enzimas proteolíticas.

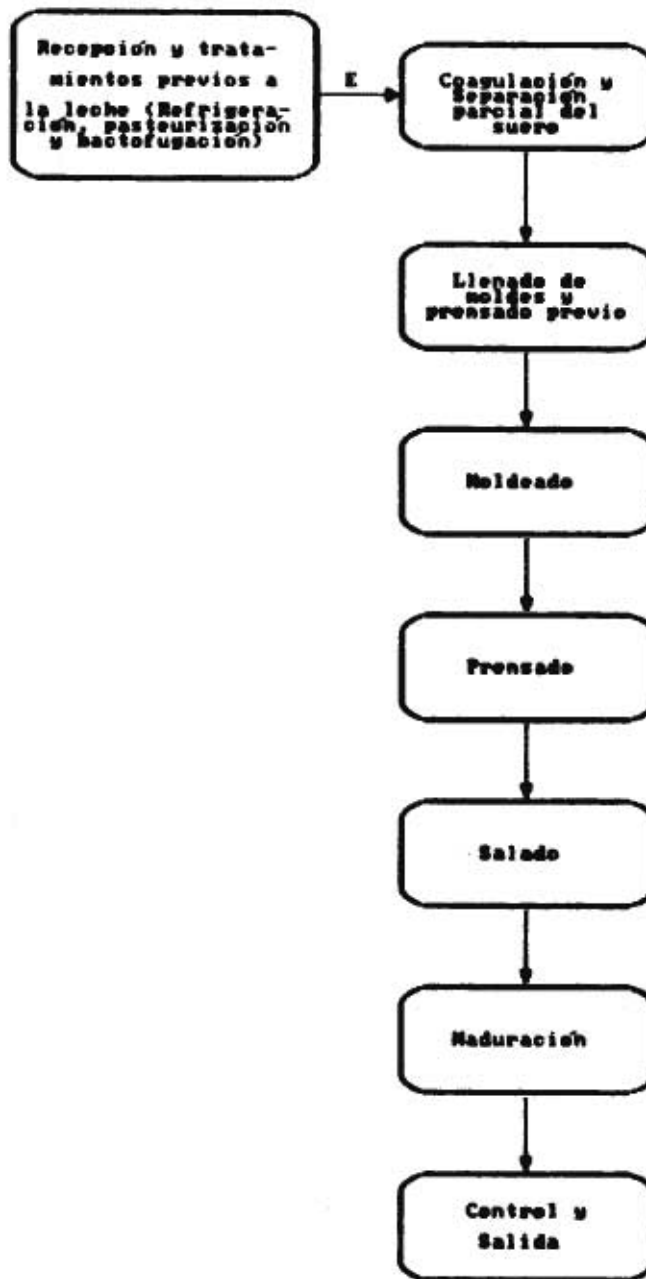


Diagrama 8 8 Elaboración de Queso (38)

### QUESO MODIFICADO ENZIMATICAMENTE (3, 50)

Los principales beneficios del uso de enzimas para desarrollo de sabor incluyen:

- Habilidad para producir sabores únicos.
- Habilidad para producir sabores que sólo pueden ser conseguidos por alternativas más costosas.

La producción de queso modificado enzimáticamente (QME) incluye estos dos beneficios. Dicho proceso de producción se ha esquematizado en el diagrama No. 9.

Durante los meses en que el queso es añejado, las enzimas producidas por las bacterias del cultivo añadido, juegan un papel importante en el desarrollo del sabor. A través de la adición de enzimas a quesos no añejados, crema y leche, es posible reproducir estos sabores de queso en períodos muy cortos. Dependiendo de la dosificación de la enzima se desarrollará un sabor significativo en cuestión de días y semanas en lugar de meses. Esto resulta en ahorros significativos al fabricante, principalmente en costos de inventario y almacenamiento. Las enzimas también permiten una mayor flexibilidad en la manufactura de productos lácteos con sabores únicos e intensos como es el caso del QME.

El QME se usa en muchas aplicaciones donde se desee un sabor a quesos procesados, sopas, dips, aderezos y botanas.

Generalmente se vende como una pasta o en polvo. Cuando se añade a un queso procesado no añejado puede imitar el sabor de un queso añejado. El queso joven se mezcla con agua y con un emulsificador como el fosfato disódico para producir una emulsión. Esta emulsión se pasteuriza para prevenir el crecimiento de organismos indeseables durante el período de incubación. Cuando se usan lipasas, la emulsión debe homogenizarse, lo cual ayuda a conseguir una lipólisis óptima. Después de la pasteurización, la emulsión de queso se enfría y las enzimas se añaden. Se puede usar una combinación de lipasas y proteasas dependiendo de lo que se desea.

Las enzimas ofrecen una gran flexibilidad en la creación de una gran variedad de compuestos de sabor. Las pastas de GME pueden ser hechas teniendo diferentes características dependiendo del sustrato inicial de queso, del tipo y cantidad de enzima, del tiempo de incubación, etc.

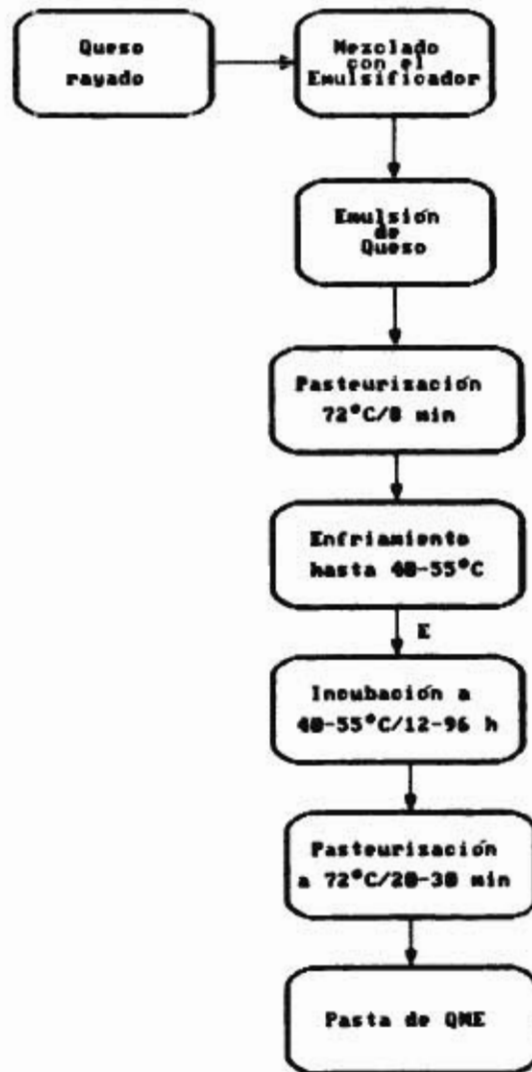


Diagrama 8 9 Elaboración de QNE (3, 50)

## LECHE BAJA EN LACTOSA (5, 19, 23, 35, 37, 52)

El cuerpo humano desdobla la lactosa en sus componentes glucosa y galactosa, los cuales pueden ser fácilmente absorbidos por el intestino, de manera contraria a la lactosa. Para poder hidrolizar la lactosa el cuerpo debe producir la enzima lactasa, presentándose la intolerancia cuando los niveles de dicha enzima se encuentran por debajo de los valores normales. El aumento en dulzor de la leche tratada con lactasa es ventajoso para la manufactura de bebidas de leche con sabor, ya que la adición de azúcar puede ser disminuida; el proceso donde se muestra el tratamiento de leche con lactasa, se puede revisar en el diagrama No. 10. El suero de leche tratado con lactasa puede ser utilizado como endulzante en varios alimentos además de tener un alto contenido de proteínas, este suero ofrece aplicaciones potenciales como sustituto del azúcar en helados, panadería, bebidas y confitería evitando también los problemas asociados con la cristalización; el tratamiento de suero con lactasa se ilustra en el diagrama No. 11. La lactosa hidrolizada es un excelente medio de fermentación y puede tener aplicación en industrias tan importantes como la cervecera. Es importante señalar que el aumento del poder edulcorante no va asociado con un aumento el poder calórico del producto, lo que es importante para productos como el yoghurt

natural, debido a que son consumidos frecuentemente por personas con problemas de sobre peso.

LACTASA - Enzima que degrada la lactosa hasta glucosa y galactosa. La aplicación más importante es el tratamiento de la leche o del suero de leche con lactasa de manera que sea consumible por las personas intolerantes a la lactosa.

BETA GALACTOSIDASA. Un proceso de manufactura de leche baja en lactosa es el que utiliza beta-galactosidasa incluida en una columna (enzima inmovilizada) para una hidrólisis continua. Se ha observado que el empleo de bajas temperaturas para evitar la formación de sabores indeseables afecta en menor grado a la enzima inmovilizada que a la enzima utilizada en su forma libre.



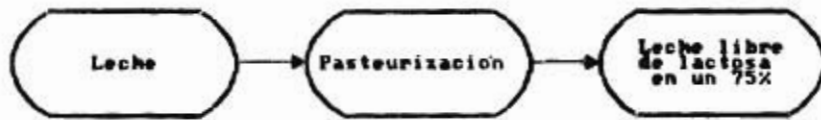


Diagrama # 10 Elaboración de Leche Baja en Lactosa (52)

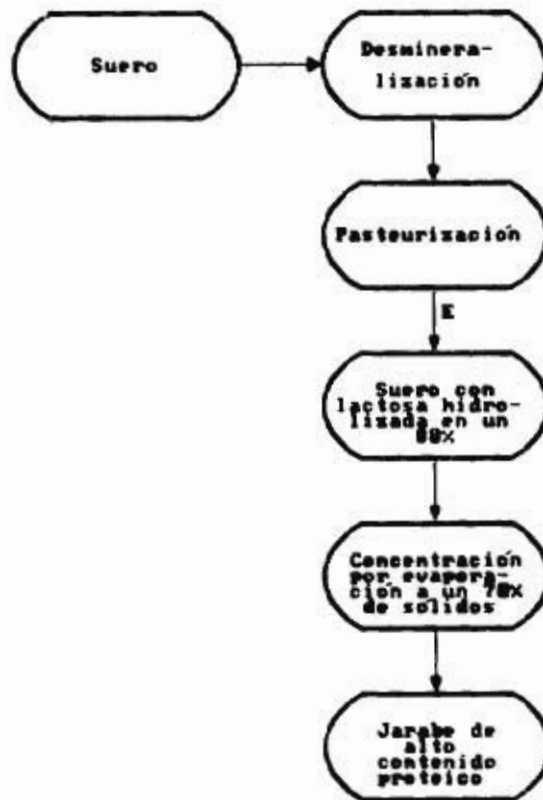


Diagrama # 11 Elaboración de Suero de Leche Bajo en Lactosa (19)

## LECHE PASTEURIZADA (8, 45)

En el caso de la leche, la finalidad de la pasteurización es la eliminación de cualquier organismo generador de enfermedades que pueda contener, además de la reducción considerable de la cuenta bacteriana total, a fin de mejorar su capacidad de conservación. La pasteurización también destruye la lipasa y otras enzimas naturales de la leche.

La leche cruda contiene varias enzimas. Una de éstas, la fosfatasa alcalina, desempeña un papel importante en lo que se refiere a salubridad pública. Esta enzima tiene un grado de susceptibilidad al calor que equivale casi exactamente a las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la pasteurización correcta. Por consiguiente, si se descubre en un lote de leche pasteurizada que la actividad de la fosfatasa alcalina excede a un nivel determinado, esto significará que su procesamiento ha sido inadecuado. El proceso de pasteurización de la leche, no involucra la adición de una enzima, pero es importante ilustrarlo pues incluye una prueba enzimática como parte de un control posterior al enfriado de la leche (ver diagrama No. 12).

FOSFATASA - Es una enzima endógena que se usa como indicador para medir la efectividad de tratamientos térmicos tales como la pasteurización. La prueba es tan

sensible que detecta la presencia de 0.1% de leche cruda  
añadida a la leche pasteurizada, así como el hecho de que  
la temperatura de pasteurización haya sido deficiente en  
10p.

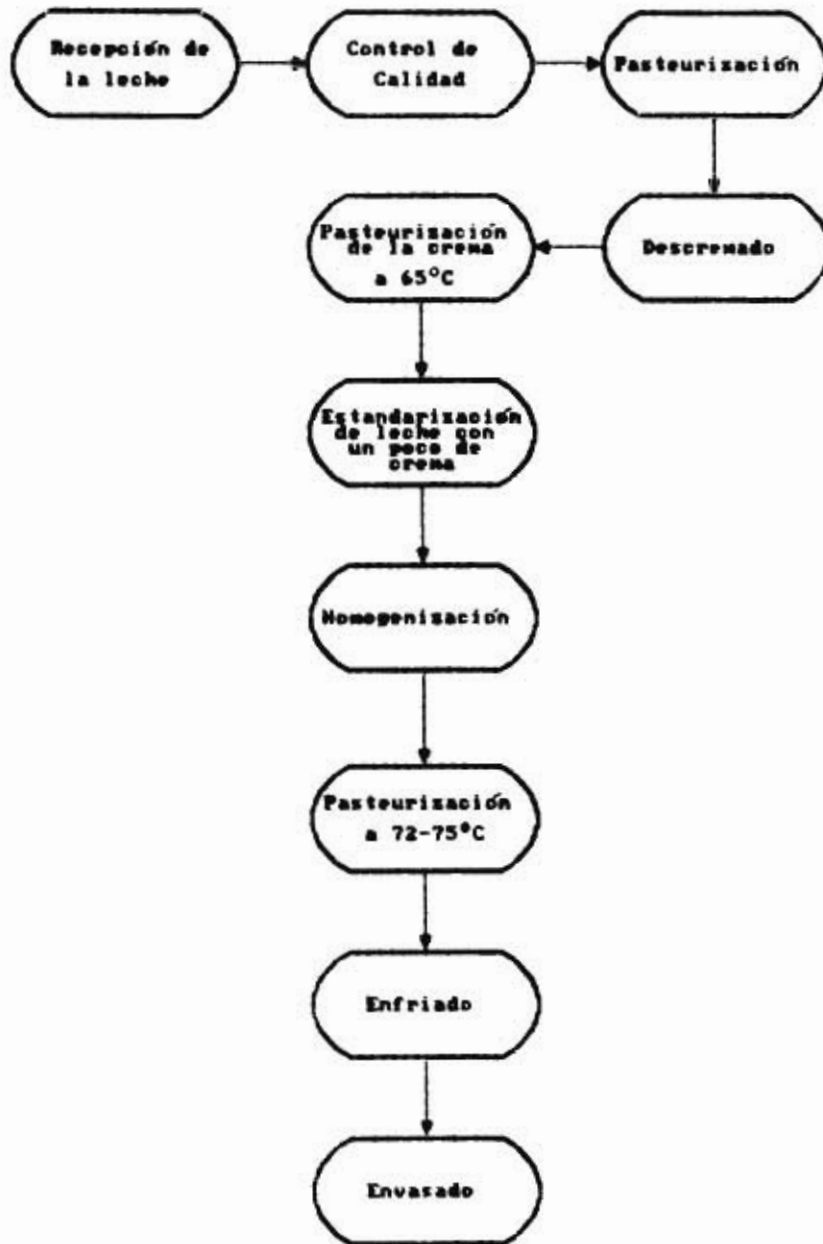


Diagrama N 12 Pasteurización de Leche (38)

## INDUSTRIA PROTEICA

## PROTEINAS VEGETALES (1, 37, 40)

Cada día es más clara la necesidad de incrementar la utilización directa de las proteínas vegetales en la dieta humana, si queremos proporcionar las proteínas necesarias a la cada vez mayor población mundial; aparte de los problemas generados por las tradiciones, el consumo de proteína vegetal se dificulta porque dichas proteínas aparecen junto con sustancias difíciles de digerir, como la celulosa y otros polisacáridos. La presencia de dichos materiales en grandes cantidades conduce a una pobre digestibilidad del alimento en cuestión, y por tanto su contenido proteico no se utiliza al máximo. Frecuentemente hay problemas en el sabor. Tomando el ejemplo de la soya, se pretende resolver estos problemas removiendo la mayor parte de los materiales no proteicos, obteniendo así proteínas en una forma más pura (aislada, concentrada). Estos productos tienen un sabor neutral y pueden ser procesados hasta productos sucedáneos de la carne PVT (proteína vegetal texturizada); este proceso se muestra en el diagrama No. 13. Esta PVT generalmente se obtiene de la semilla de soya, pudiéndose usar otros sustratos como el gluten de maíz, obtenido como subproducto del proceso de molienda húmeda de maíz. Una posible aplicación del gluten de maíz modificado, es su mezcla en una proporción

de 30-70 con proteína de soya texturizada, obteniendo así una composición óptima de aminoácidos.

Las enzimas que ayudan a desdoblar los materiales no proteicos antes mencionados, pueden ser útiles en la manufactura de concentrado proteico, incrementando los rendimientos de proteína y simplificando el proceso. Se ha demostrado que los problemas de sabor pueden ser solucionados usando enzimas especiales que actúan sobre las sustancias que causan los sabores indeseables.

Las enzimas que atacan propiamente a las proteínas, tienen diferentes usos en la producción de alimentos a partir de materiales que contienen proteínas. Esto se debe al hecho de que el desdoblamiento enzimático de las proteínas, genera un cambio significativo en sus propiedades funcionales, haciendo dichas proteínas más apropiadas para ciertos usos. Por ejemplo, podemos mencionar que tratando la proteína de soya con enzimas, puede ser convertida a productos que formen una espuma estable al batirse (sucedáneos de la clara de huevo), o en productos que sean solubles en agua aún con valores bajos de pH, los cuales se encuentran en bebidas refrescantes de frutas. Con estos productos de proteínas, es posible producir este tipo de bebidas que parezcan y sepan como los productos comunes y corrientes de este tipo, pero cuyo contenido proteico sea igual al de la leche. Al parecer cuando se añaden este tipo de proteínas, el contenido de

azúcar de estos productos puede disminuirse haciéndolos más aceptables desde el punto de vista nutricional.

La proteína vegetal hidrolizada (PVH) puede ser definida como una mezcla que contiene aminoácidos y frecuentemente otras sustancias como sales y péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de proteína vegetal.

La mayor parte de la PVH se produce para uso de los fabricantes de sopas, salsas, carnes procesadas y productos de pescado y pollo para botana. Este ingrediente imparte un sabor parecido al de la carne, además de ser un potencializador de sabores, por lo cual es fundamental para el tipo de productos mencionados.

De menor importancia es el uso de PVH como agente de aereación y de formación de espumas, como ingrediente nutritivo que mejora las propiedades en la panificación, en helados, pudines, y productos de confitería.

La fuente principal de proteína vegetal para obtener la PVH es la semilla desgrasada de soya (con un contenido entre 50-80% de proteína), gluten de cereales (contenido de 60-70% de proteína) tales como el maíz, trigo arroz, y productos marinos como las algas.

La hidrólisis de estas proteínas con enzimas proteolíticas aisladas, procede lentamente y da como resultado una hidrólisis parcial; esto le confiere propiedades físicas únicas a las PVH producidas de esta manera.

Es importante mencionar que el valor nutritivo de los alimentos que contienen PUH se incrementa. Además, se han observado propiedades antioxidantes en las PUH.

PROTEASA BACTERIANA ALCALINA. Actúa en todos los tipos de proteínas que comúnmente se encuentran en todos los alimentos, ya sea de origen animal o vegetal. Esta enzima mejora las propiedades funcionales de la proteína de soya y es utilizada para el acondicionamiento de la materia prima usada para la producción de gelatina.

PROTEASA BACTERINA NEUTRA. Actúa en las mismas proteínas que la anterior pero tiene una especificidad distinta, de manera que la acción de ambas enzimas es complementaria.



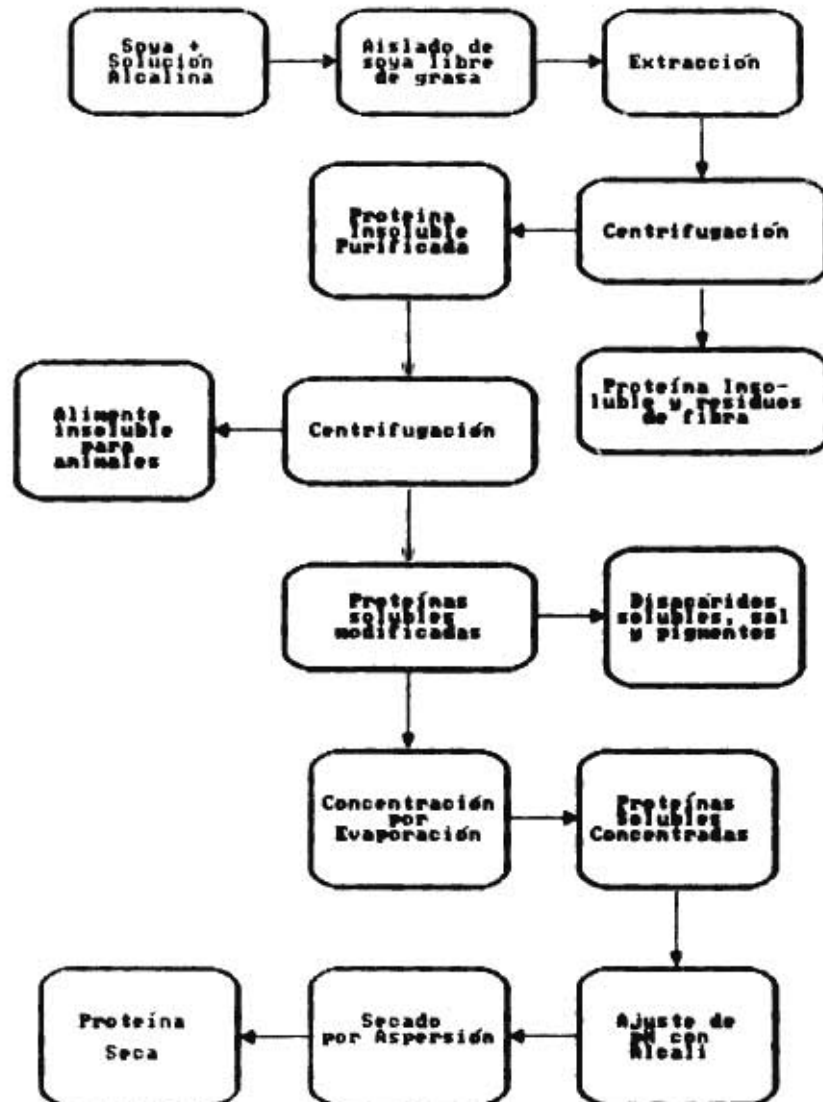


Diagrama # 13 Elaboración de Proteína Vegetal Hidrolizada (20)

## PROTEINAS ANIMALES (25,37)

Las enzimas que desdoblan las proteínas pueden ser útiles en la manufactura de productos proteicos procedentes de animales. Un ejemplo se relaciona con la producción de productos de pescado para consumo humano. En este proceso el pescado es prensado para reducir su contenido de agua. El agua extraída que contiene proteínas valiosas y cuyo valor nutricional es excelente, se evapora en etapas múltiples para su mejor utilización. Una de estas utilidades se refiere a la producción de proteína soluble de pescado, ilustrada en el diagrama No. 14.

El límite a esta forma muy económica de evaporación se alcanza cuando el producto se ha vuelto tan viscoso que impide la transferencia de calor y el producto tiende a pegarse en las paredes del evaporador. De aquí en adelante el agua debe ser removida por secado por aspersion o en tambores de secado, lo que causa un consumo de energía (vapor) muy elevado antes de que este producto pueda ser mezclado con los productos de pescado, o bien, vendido como solubles de pescado seco. Si se añaden proteinasas, la viscosidad del producto desciende, y puede evaporarse hasta un contenido de sólidos mayor que el que se alcanza convencionalmente; obteniéndose así una mejoría en el aspecto económico.

Usando enzimas es posible también convertir proteínas de pescado en productos proteicos, que sean tan fáciles de digerir que puedan ser usados como sustitutos de leche para alimentar lechones y becerros. Cuando los problemas de sabor se hayan resuelto, estos productos podrán ser utilizados para humanos. Finalmente las enzimas pueden ser usadas en la manufactura de productos valiosos como extracto de carne, procedente de los desechos industriales de los rastros; así es posible recuperar los residuos de carne adheridos al hueso del animal.

El agua de extracción es un subproducto obtenido durante la producción de alimento de pescado. Es alta en proteína y tiene un valor nutricional excelente. Puede ser vendido con la denominación de pescado seco soluble.

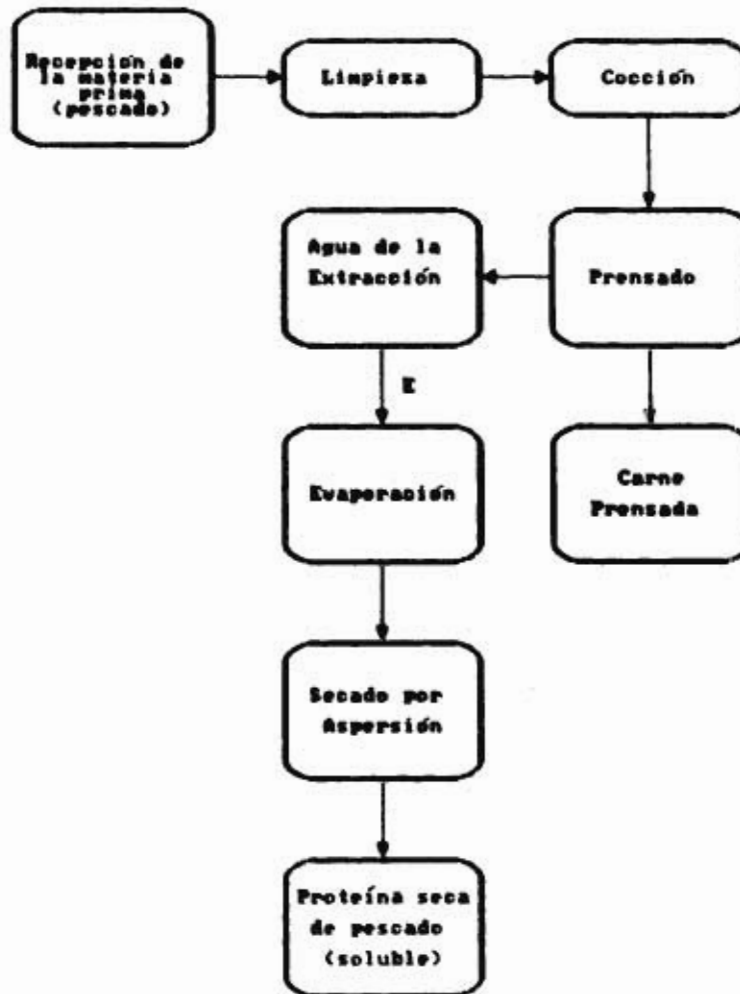


Diagrama # 14 Elaboración de Proteína Animal Hidrolizada (21)

## INDUSTRIA AZUCARERA

## AZUCAR REFINADO

El almidón es un componente natural de la caña de azúcar, hasta cierto punto el almidón es transferido al jugo de caña obtenido por extracción, y ahí permanece a través de todos los pasos subsecuentes. Parte de este almidón es degradado por enzimas ya presentes en el jugo de caña, pero si la concentración de almidón es muy elevada, el almidón puede presentarse en el azúcar cristalizada (azúcar morena). Si ésta se ha de procesar hasta azúcar refinada, las concentraciones de almidón mayores de ciento nivel son inaceptables, porque dificultan la filtración de la solución de azúcar; este proceso de obtención de azúcar refinado se resume en el diagrama No. 15. Se ha generalizado como práctica, el añadir enzimas concentradas durante la evaporación del jugo de caña para acelerar la degradación de almidón (7).

**AMILASA TERMOESTABLE.** Una enzima de este tipo con alta estabilidad frente al calor puede ser añadida en una etapa temprana de la evaporación de múltiple efecto (7).

**DEXTRANASA.** El polisacárido dextrano no es un componente natural de la caña de azúcar, pero a veces su formación en la caña se debe a crecimiento bacteriano. Esto ocurre particularmente cuando la caña se almacena por largos periodos de tiempo, bajo condiciones adversas tales como

alta temperatura y humedad. El dextrano tiene diferentes efectos en el procesamiento de azúcar: la clarificación del primer jugo obtenido es menos eficiente, la filtración se dificulta, las superficies de calentamiento se llenan de una película gomosa, la cual afecta como bien sabemos la transferencia de calor, la cristalización disminuye resultando en bajos rendimientos de azúcar. Estos problemas pueden solucionarse añadiendo la enzima dextranasa (de origen fungal). Este problema del dextrano también puede ser encontrado en el procesamiento de remolacha para obtener azúcar. En este caso el dextrano es un problema cuando la remolacha ha sido dañada por heladas. La solución también estriba en usar dextranasas (37).

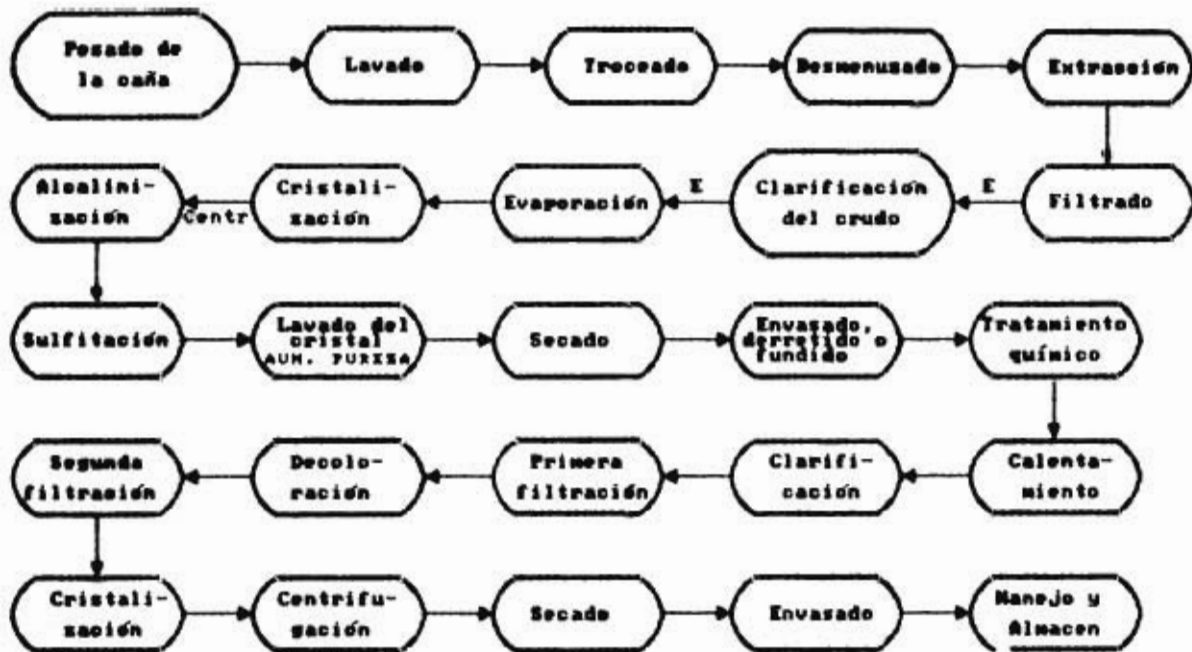


Diagrama # 15 Elaboración de Azúcar Refinado (24)

## INDUSTRIA DE FERMENTACIONES

Dentro de las industrias que aprovechan el proceso de fermentación con el fin de producir algún alimento, se han elegido dos ejemplos que involucren la utilización de una o varias enzimas para poder alcanzar las características finales deseadas de cada uno de estos productos. En ambos procesos, es común la utilización de enzimas exógenas para conseguir los cambios deseados con un menor costo.

## CERVEZA (15, 37)

Tradicionalmente, la cerveza es producida por la fermentación de un mosto, obtenido a través de la extracción con agua (maceración) de malta molida, frecuentemente con una mezcla de adjuntos de otros materiales ricos en almidón, filtrando y llevando a ebullición dicha mezcla con lúpulo. Durante el macerado, las enzimas de la malta degradan el almidón y las proteínas de la misma malta, así como de los cereales adjuntos que hayan sido usados. Los productos de esta degradación son azúcares simples, aminoácidos y pequeños péptidos, los cuales pueden ser utilizados por la levadura para la producción de alcohol etílico, bióxido de carbono, nuevas células de levadura y componentes de sabor. En el proceso tradicional, la malta actúa tanto como material crudo, proporcionando almidón y proteínas y como fuente de las enzimas. Sin embargo, el malteado es un



proceso caro e ineficiente para la producción de enzimas. Se pueden conseguir ahorros considerables reemplazando al menos parte de la malta con materiales no malteados, por ejemplo cebada y otros granos de cereales y utilizando enzimas producidas industrialmente. Aparte de las ventajas económicas también se puede lograr un control más eficiente del proceso de elaboración de cerveza y esto se debe principalmente a la calidad y actividad uniformes de las enzimas industriales; este último proceso está esquematizado en diagrama No. 16. Esto es un contraste con la malta que es un ingrediente altamente variable cuya calidad depende de las características de la cebada usada como materia prima y de la técnica de malteado que se use. También es importante el hecho de que exista una amplia selección de enzimas industriales que le den flexibilidad al proceso y se ajusten a las necesidades específicas de cada proceso. Los puntos más importantes donde se aplican las enzimas industriales en cervecera son los siguientes:

- Reemplazamiento de la malta por cebada no malteada. La cebada no malteada es un sustituto natural y menos caro que la malta, ya que contiene los mismos componentes de la malta. Sin embargo, la cebada tiene un contenido muy bajo de enzima, con la excepción de la beta-amilasa (enzima de formación de la maltosa). Cuando se reemplazan grandes cantidades de malta con cebada no malteada es necesario añadir enzimas que degraden los polisacáridos y las proteínas, es decir, amilasas, glucanasas y proteinasas de

manera que se obtenga una degradación satisfactoria de estos componentes.

- Mejoramiento de la filtración. Aún cuando se utilicen preparaciones de malta únicamente, la velocidad de filtración del mosto después de la maceración es algunas veces insatisfactoria. Esto se debe a la presencia de ciertos polisacáridos, beta-glucanos, los cuales se encuentran en la cebada y en maltas pobremente modificadas, las cuales incrementan la viscosidad del mosto con lo cual su paso por los filtros se dificulta. Los beta-glucanos no degradados pueden presentar también un problema durante la fermentación, particularmente en cervezas fuertes, ya que son insolubles en alcohol y de ahí que haya precipitación cuando una cierta cantidad de alcohol ha sido formada. Debido a las características gelatinosas de este precipitado, la filtración de la cerveza terminada es difícil. Estos problemas pueden ser prevenidos adicionando una betaglucanasa a la mezcla inicial de malta, adjuntos y agua.

- Incremento de la proporción de adjuntos. Adjuntos es la denominación común para materiales ricos en carbohidratos diferentes de la malta usados en la producción de cerveza. La cebada no malteada es sólo uno de ellos, son más importantes los granos de maíz molidos, el arroz, el sorgo, el almidón de tapioca y varios azúcares. El común denominador de estos materiales es que contienen niveles

muy bajos de proteínas. Cuando la cantidad usada rebasa ciertos límites, es necesario añadir más proteína en el mosto, ya sea por adición directa o mejor, por proteína proveniente de la malta. La adición de enzimas para la conversión del almidón de estos adjuntos, se logra mediante el uso de amilasas.

- Licuefacción de adjuntos. Los materiales como el maíz y el arroz que contienen almidón, son muy resistentes al ataque de las enzimas; por ello deben tratarse previamente, hirviéndolos por un cierto tiempo antes de añadirse a la mezcla final del mosto. Durante el hervor, dichos materiales se gelatinizan, teniendo una viscosidad muy alta la cual es difícil de manejar y debe entonces ser adelgazada para poder manejarse por bombeo. Para conseguir dicho adelgazamiento se puede usar malta, pero cada día es más común el empleo de enzimas microbianas pues son más económicas y pueden ser adicionadas a temperaturas mayores que la malta.

- Cervezas bajas en carbohidratos y bajas en calorías. Las enzimas de la malta no pueden desdoblar todo el almidón hasta azúcares fermentables; una pequeña cantidad, 1 o 2 % de dextrinas, permanecen en el mosto y aparecen finalmente en la cerveza. Cuando se añade una enzima capaz de desdoblar estas dextrinas durante la fermentación, muy pocos carbohidratos quedarán en la cerveza ya que casi todos habrán sido transformados en alcohol y bióxido de

carbano por la levadura. Si esto se considera cuando se prepara el mosto, es posible producir una cerveza con contenido de alcohol moderado pero de bajas calorías, porque el contenido residual de carbohidratos ha sido reducido. Esta cerveza baja en calorías es de interés no sólo para los diabéticos, que deben restringir su ingestión de carbohidratos, sino que también interesa a personas que gustan reducir la ingestión de calorías.

- Cerveza resistente a temperaturas bajas. Cuando la cerveza se almacena a bajas temperaturas como en el refrigerador, 5-8 °C, tiende a enturbiarse debido a la formación de material coloidal insoluble que proviene de la reacción entre taninos y proteínas contenidos en la cerveza. Esta turbidez puede prevenirse con un tratamiento que precipite los taninos, o bien rompiendo la proteína de manera que no pueda reaccionar con los taninos.

En la maceración se realiza una proteólisis con la finalidad de proveer aminoácidos libres y péptidos que le confieren sabor y cuerpo a la cerveza además de proporcionar nutrientes para la fermentación; también se realiza una sacarificación para proveer de azúcares fermentables, los cuales son la mayor parte de los que estarán disponibles para la fermentación.

**AMILOGLUCOSIDASA o GLUCAMILASA**- Enzima capaz de desdoblar totalmente el almidón y las dextrinas hasta glucosa. Utilizada para producción de cerveza baja en calorías.

ALFA-AMILASA- Usada para la licuefacción de los adjuntos ricos en almidón. Produce azúcares, maltosa en mayor proporción, a partir de almidón y de dextrinas.

BETAGLUCANASA- Mejora la filtración. Reduce la viscosidad del mosto y aumenta el rendimiento.

PULULANASA. En la elaboración de la cerveza produce un mosto altamente fermentable.

CELULASAS- Cuando se usen adjuntos ricos en celulosa y otros polisacáridos como el trigo y el sorgo, facilita la filtración.

PAPAINA- Extraída del látex de la papaya, es una proteasa usada para prevenir la turbidez en cervezas sometidas a bajas temperaturas.

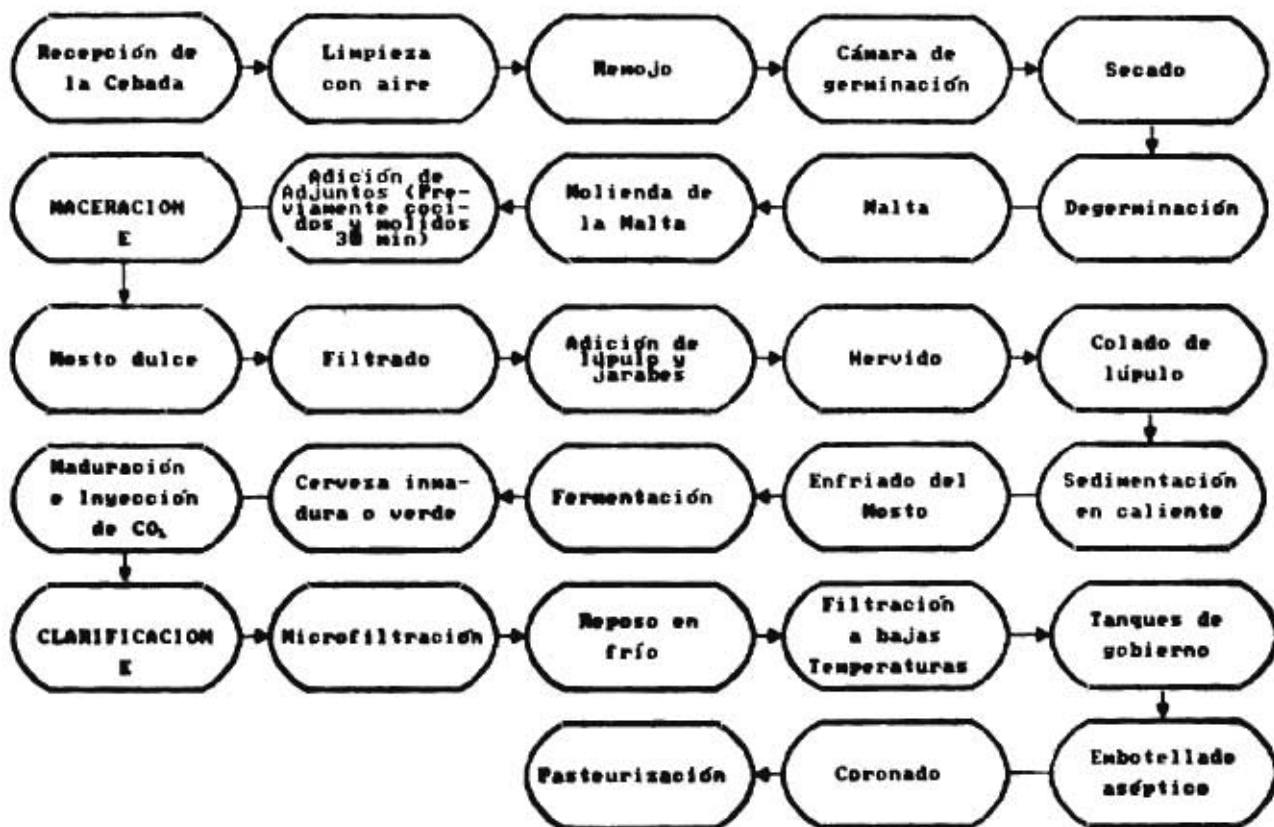


Diagrama # 16 Elaboración de Cerveza (15)

## VINO BLANCO (30, 37)

Las enzimas que se utilizan en la elaboración industrial de jugos son también de aplicación en la elaboración de vinos. Un problema específico en la manufactura de vinos es el procesamiento de uvas atacadas por el hongo Botrytis cinerea. Este hongo produce beta-glucanos (un polímero de la glucosa), estas sustancias de alto peso molecular tienen un efecto muy negativo en la clarificación y filtración de los vinos. Estos efectos negativos pueden ser eliminados fácilmente con la aplicación de una beta-glucanasa específica que desdoble los beta-glucanos hasta glucosa. Otros polisacáridos, importantes para las propiedades organolépticas de los vinos no son afectadas por la beta-glucanasa. Un proceso de producción de vino utilizando enzimas, se muestra en el diagrama No. 17.

**BETA-GLUCANASA.** Degrada los beta-glucanos en vinos preparados con uvas infectadas por Botrytis, mejorando la clarificación y la filtrabilidad de dichos vinos. Por su alta especificidad otros polisacáridos importantes para las propiedades organolépticas de los vinos no son degradados.

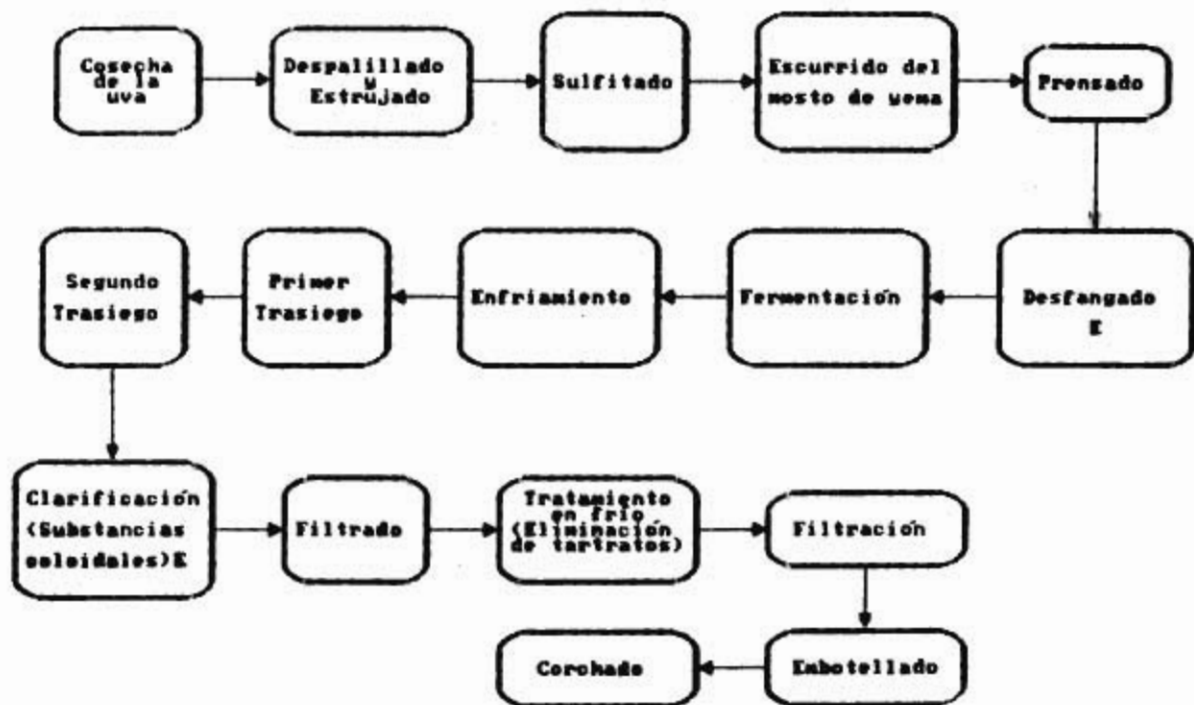


Diagrama # 17 Elaboración de Vino Blanco (19)



## INDUSTRIA DE BEBIDAS ESTIMULANTES

En este apartado se tratan los procesos de obtención de dos bebidas estimulantes de amplio consumo mundial. El carácter de estimulante se los proporciona el contenido de cafeína en cada caso. Las enzimas añadidas tienen un papel muy importante en ambos procesos.

### CAFE (30, 37)

En el procesamiento de café fresco, la pulpa de la fruta del café se remueve de la semilla después de remojarla en agua. Durante el remojo las enzimas naturales que desdoblan la pectina (pectinasas) ablandan la pulpa y hacen que ésta se desprenda más fácilmente de la semilla. Al igual que otros procesos enzimáticos este proceso depende de la temperatura, si la temperatura es muy baja, la reacción puede llevar mucho tiempo.

Más adelante cuando el café es procesado hasta café instantáneo se puede presentar otro problema que puede solucionarse usando una enzima. Antes del secado por aspersión o secado por congelación, el extracto de café es concentrado tanto como sea posible, mediante evaporación de múltiple efecto. El uso de esta alta tecnología es sin embargo, limitada por la presencia en el extracto de café de sustancias de alto peso molecular

(polisacáridos), que aumentan la viscosidad del extracto concentrado. El desdoblamiento de estos polisacáridos con enzimas adecuadas reduce la viscosidad y hace posible que la evaporación alcance un contenido más alto de materia seca con el resultante ahorro de energía (ver diagrama No. 18).

GALACTOMANASA. Tiene una acción específica en los polisacáridos galactomannanos contenidos en la semilla de café.

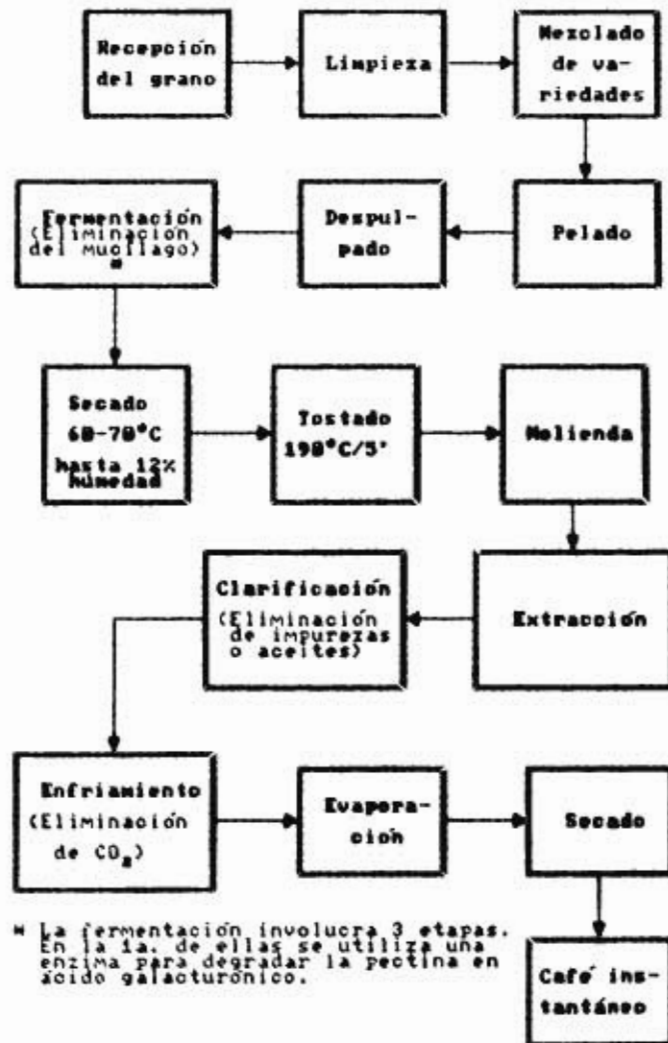


Diagrama # 18 Elaboración de Café Instantáneo (38)

## TE (45, 47)

El té proviene de las hojas tiernas del arbusto del té. Estas hojas contienen tres importantes tipos de componentes que afectan la calidad de la bebida: la cafeína que da al té su efecto estimulante; taninos y compuestos similares que dan color y concentración.

La aceptación del té instantáneo ha aumentado sobre todo por la comodidad que ofrece en la preparación de té helado. Este hecho, sin embargo, introduce una complicación. Las hojas y el extracto de té contienen cafeína y taninos. Estos están en solución en agua caliente, pero en agua fría una parte de ellos se separa, formando un complejo que dá a la bebida una ligera turbidez. Esta turbidez se elimina del concentrado antes de la deshidratación con la ayuda de enzimas, las cuales son añadidas después de la extracción como se ilustra en el diagrama No. 19.

Se puede llevar a cabo un control mediante parámetros como turbidez o bien por la medición de sólidos insolubles separados por centrifugación.

TANASA (tanin-acil hidrolasa). Esta enzima se obtiene del *Aspergillus niger*, se usa para tratar estos insolubles e hidrolizarlos hasta formas solubles.

La tanasa puede ser añadida a un pH de 5.5 en una proporción de 190 mg por cada 75 ml. de extracto de Té.

Se mantiene una temperatura de 30°C por 70 minutos con agitación ocasional; finalmente se eleva la temperatura hasta 90°C para inactivar la enzima y removerla posteriormente por centrifugación.

ESTERASA. Esta enzima proviene del Aspergillus oryzae. La esterasa provoca la hidrólisis de los taninos hasta ácido tánico, glucosa y ácido gálico.

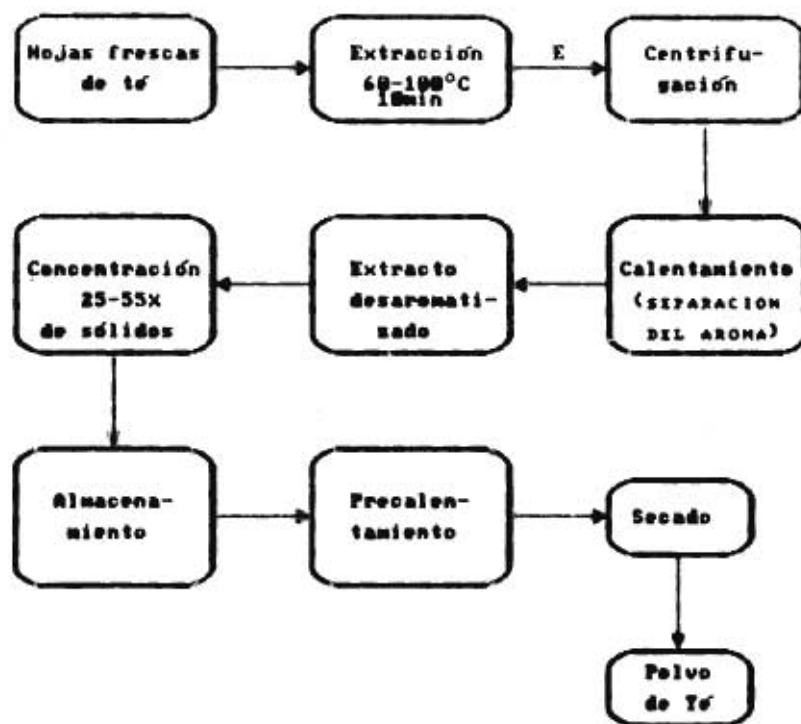


Diagrama # 19 Elaboración de Té en Polvo (45)

## INDUSTRIA CARNICA

## ABLANDAMIENTO DE CARNE (8, 12)

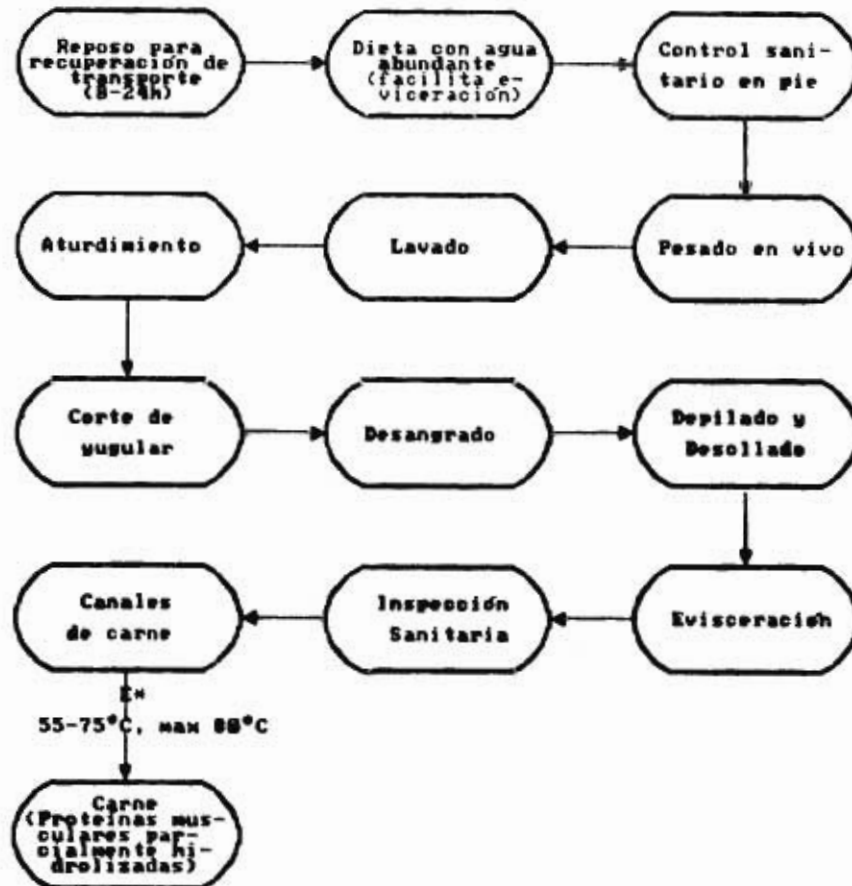
La carne dura puede ser ablandada por ciertas enzimas, las cuales catalizan la hidrólisis de una o más de las proteínas del músculo. Las enzimas proteolíticas atacan al sarcolema y las fibras del músculo; otras atacan ya sea el colágeno o elastina. Algunas enzimas de plantas tropicales son ablandadores de carne efectivos, por ejemplo la bromelaina de la piña, la ficina de los higos, y las proteasas del latex de la papaya verde que incluyen la papaina, la quimopapaina (la enzima principal y una peptidasa). La bromelaina es más activa frente al colágeno que frente a las proteínas de las miofibrillas, lo contrario es cierto para la papaina, la ficina y algunas otras enzimas fungales. Las tres enzimas de la papaya pueden hidrolizar de manera efectiva las proteínas de las miofibrillas, pero el tejido conectivo es atacado sólo después que ha sido calentado para disgregar la triple hélice. Las tres enzimas no son afectadas por el calentamiento a 60°C, pero la quimopapaina es la más estable de las tres a 70°C. Una preparación de enzimas de papaya en forma de polvo seco diluido con sal, lleva algún tiempo en el mercado como ablandador de carne. Espolvoreado en la superficie de la carne debe introducirse en el interior para que sea efectivo. Es esencialmente inactivo en la carne a temperatura ambiente, aumenta su

actividad en la carne si se eleva la temperatura entre 55 y 75°C y es mucho más activa cuando alcanza los 80°C, temperaturas mayores inactivan la enzima.

La inyección de una solución acuosa de enzima a 5-10% de concentración, antes de la matanza (aproximadamente 0.5mg x lb de peso en vivo) es un método muy efectivo para obtener carne de res blanda. El animal se sacrifica 1/2 hr después de la inyección. En el almacenamiento refrigerado o congelado, la enzima en la carne está inactiva, pero lleva a cabo su acción suavizante cuando la carne se cuece. En esta revisión el proceso descrito corresponde al tratamiento de los canales de carne con enzima añadida, lo cual resulta también muy efectivo para el ablandamiento de la carne (ver diagrama No. 20).

El ablandamiento de la carne por enzimas aparentemente es distinto al logrado por maduración o por cocción. Las carnes ablandadas con enzimas tienden a tener una consistencia pastosa debido a la pérdida de la estructura de las fibras del músculo.





\* E = Bromelina (piña), Ficina (higo)  
 Papaína, Chimopapaína.

Diagrama # 28 Ablandamiento de Canales de Carne (39)

## INDUSTRIA DE HUEVO

## HUEVO EN POLVO (4, 8, 12, 45)

Las claras, las yemas o los huevos enteros se pueden deshidratar después de la pasteurización mediante cualquiera de varios métodos, entre los cuales están el secado por aspersion, el secado en charolas y la liofilización. La clara de huevo contiene rastros de glucosa. Cualquiera que sea el método de deshidratación empleado, al secarse o durante el almacenamiento subsecuente a una temperatura por arriba del punto de congelación, la glucosa se une a las proteínas del huevo y tiene lugar la reacción de Maillard. Se ha descubierto que es posible prevenir esta reacción de oscurecimiento, eliminando la glucosa mediante la adición de enzimas comerciales. Este paso de la eliminación de azúcar se hace antes de deshidratar la clara de huevo (ver diagrama No. 21).

ALFA-AMILASA. La sensibilidad de la Salmonella al calor, es similar a aquella de la alfa-amilasa de la yema, de manera que la pasteurización de la yema de huevo o del huevo entero puede controlarse probando residuos de alfa-amilasa, usando el método almidón-iodo. La pasteurización del huevo (sin cáscara) antes del secado, elimina la posibilidad de que sean portadores de bacterias patógenas del grupo Salmonella.

GLUCOSA OXIDASA. La adición de esta enzima a huevos deshidratados, elimina la glucosa que contienen estos productos, evitando así que esta intervenga en reacciones de oscurecimiento (reacciones de Maillard).

La aplicación más importante de esta enzima es en la eliminación de la glucosa del huevo antes de su secado o deshidratación. Esto es necesario, ya que de otra manera el huevo en polvo tiende a presentar reacciones de deterioro, como el oscurecimiento no enzimático, durante su almacenamiento; dichas reacciones se efectúan entre los azúcares reductores y las proteínas.

La estabilidad de la clara de huevo seco se asegura eliminando por fermentación la glucosa o mediante la enzima glucosidasa. Al eliminar la glucosa se mejora la estabilidad en almacenamiento de huevo entero y de los productos de yema.

CATALASA. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, lo que es muy deseable para eliminar el peróxido de hidrógeno que se forma como resultado de la transformación de la glucosa en ac. glucónico. Esta enzima se obtiene comercialmente del hígado, o bien de microorganismos como Micrococcus lysodeikticus y Aspergillus niger. Se emplea en la eliminación del peróxido de hidrógeno residual que se utiliza en el blanqueado de algunos alimentos, o en la "pasteurización en frío".

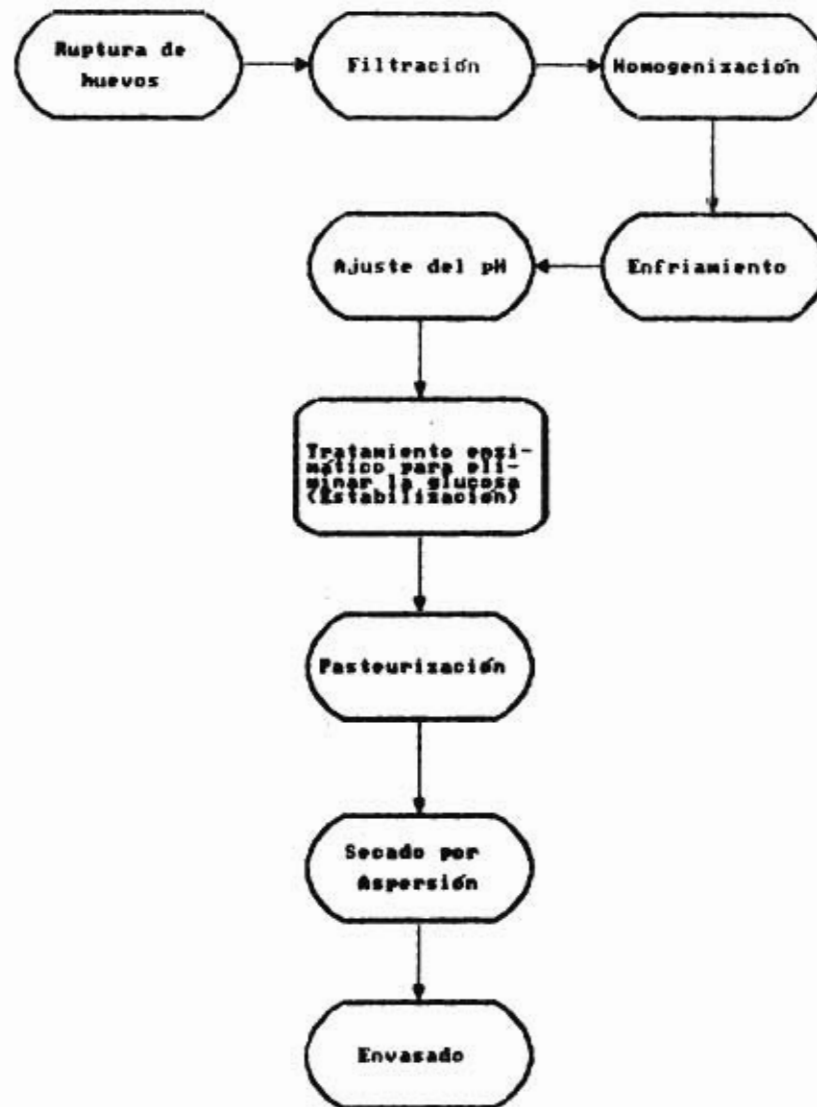


Diagrama N 21 Elaboración de Huevo Deshidratado (38)

## INDUSTRIA DE ACEITES

## ACEITE DE OLIVA (37)

En la extracción de aceite vegetal por prensado, en ocasiones es problemático obtener un rendimiento máximo, debido al hecho de que la fracción oleosa es difícil de separar de los otros componentes. Por ejemplo, el caso en la manufactura de aceite de oliva y aceite de palma. En estos casos se han encontrado ventajas al tratar los materiales prensados con varias enzimas como celulasas, proteinasas y pectinasas, que pueden disolver los componentes responsables de la retención del aceite en la pulpa, las cuales se añaden después de la primera extracción como se observa en el diagrama No. 22. De aquí que la eficiencia y en algunos casos la calidad del aceite puedan ser mejorados.

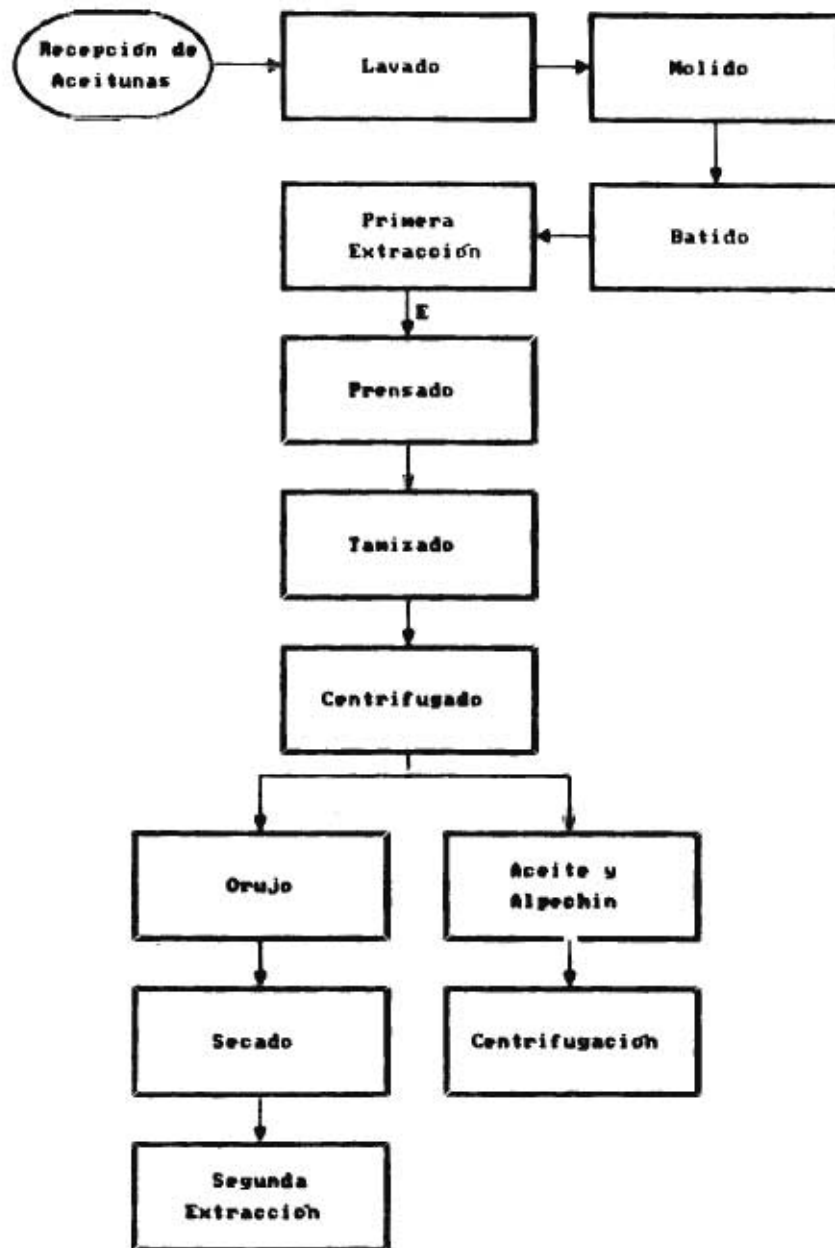


Diagrama # 22 Elaboración de Aceite de Oliva (30)

### VIII TECNICAS DE CONTROL

Dentro de los objetivos de este trabajo está la implementación de un manual de técnicas que permita tener un control sobre el punto del proceso en donde intervenga un enzima exógena o bien donde tenga relevancia el seguimiento de una enzima endógena. En el presente capítulo se concreta dicho objetivo, habiendo cubierto en capítulos anteriores la información necesaria para comprender de una manera más adecuada la función de este control.

La información que se presenta a continuación fue agrupada de acuerdo a la clasificación hecha en el capítulo V de este trabajo. Para cada caso se menciona la aplicación, el principio, las ventajas y desventajas, el equipo necesario y además se detalla la metodología de la técnica.

#### MONITOREO DE PROTEASAS

La hidrólisis de un enlace peptídico en una proteína ofrece potencialmente varias maneras de monitorear el alcance de la reacción. Por cada enlace peptídico hidrolizado se generan un ácido carboxílico y un grupo amino, el número de moléculas se incrementa. Las pruebas que pueden emplearse para los monitoreos del efecto de las proteasas en los alimentos evalúan a los compuestos

generados por la hidrólisis dentro de estos podemos mencionar a los siguientes:

#### PROPIEDADES REOLOGICAS DE LA MASA

**Aplicación.** Las propiedades reológicas de la masa, determinadas con instrumentos diseñados para valorar ciertos atributos físicos, constituyen índices valiosos del efecto de las enzimas sobre la masa para elaborar pan y galletas.

**Principio.** Los equipos utilizados para medir los cambios experimentados por las masas después de la aplicación de enzimas son los siguientes:

- Amasadoras con registrador. Registran los cambios experimentados por las propiedades reológicas sobre el amasado. Recogen datos sobre factores tales como la evolución de la masa (tiempo pico), la estabilidad, la evolución del gluten, la consistencia de la masa, la absorción de agua, etc.
- Extensógrafo o Alveógrafo. Registran la extensibilidad o el punto de ruptura de la masa bajo una tracción uniforme. Sirve para medir el efecto de los aditivos añadidos a la harina.

#### ANÁLISIS DE NITROGENO LIBRE (grupo amino)

**Aplicación.** Este método es usado principalmente para determinar el grado absoluto de hidrólisis. Estos



procedimientos son complejos y tardados. Por su precisión estos métodos se usan como estándar para calibrar procedimientos más rápidos para realizar en la línea de producción.

Principio. La hidrólisis de un enlace peptídico genera una amina y un ácido carboxílico. El grupo amino se considera libre y puede reaccionar con compuestos químicos para generar compuestos coloridos. Esto puede ser medido en un espectrofotómetro. Usando una curva estándar, la cantidad de color se relaciona al número de enlaces hidrolizados. Una gran variedad de agentes cromogénicos han sido empleados para crear estos complejos coloridos (ninhidrina, o-ftaldehído). Un método común involucra el uso de TNBS (ácido trinitrobencensulfónico).

Ventajas y desventajas. La ventaja de estos métodos es que proporciona valores absolutos. Son los métodos indicados para determinar el grado absoluto de hidrólisis. Las desventajas son la complicada preparación de las muestras así como el tiempo requerido para ello; se requiere mano de obra calificada. No da información de los pesos moleculares de los productos de la hidrólisis.

Equipo. El método del TNBS requiere un baño de temperatura constante (50°C), un espectrofotómetro y un potenciómetro.

## ANÁLISIS POR VISCOSIMETRÍA (2, 11)

Aplicación. Este método puede ser usado siempre que se observe un cambio de viscosidad durante la hidrólisis. Los cambios de viscosidad son más dramáticos en las primeras etapas de la hidrólisis, lo que hace que este método sea más útil para el monitoreo de bajos grados de hidrólisis. Puede ser usado para hacer mediciones en la línea de proceso.

Principio. La viscosidad o la resistencia al flujo de un material tiene la ventaja de poderse relacionar con la hidrólisis de una suspensión proteica. Una disminución de la viscosidad, dentro de ciertos límites, puede correlacionarse razonablemente bien con una disminución en el peso molecular. Este fenómeno ha sido utilizado como una forma de describir varias enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, una reducción en la viscosidad ha sido usada en cervecera para medir las modificaciones del mosto.

Ventajas y desventajas. Monitorear una proteólisis mediante una reducción de viscosidad puede ser un método rápido; es un método de fácil adaptación para pruebas en línea de proceso. Un problema es que los cambios más dramáticos y más fácilmente medibles en la disminución de viscosidad se observa en las primeras etapas de hidrólisis, mientras que los cambios en viscosidad tienden

a ser menores en las últimas etapas de hidrólisis donde los cambios son más difíciles de medir.

Equipo. Existen diferentes equipos regidos bajo diferentes principios para medir la viscosidad, estos principios incluyen, la rotación, la flotación, y flujo capilar.

#### ANÁLISIS DE CAMBIOS DE pH (1, 2)

Aplicación. Esta técnica se adapta mejor a procesos de hidrólisis proteica que se lleven a pH's mayores de 6.5 con resultados óptimos entre pH 7.5-9.0. Debe ser considerado cuando se requiera una hidrólisis muy precisa.

Principio. Conforme una proteasa rompe enlaces peptídicos, se producen grupos que pueden ser titulados. En pH's neutros o débilmente alcalinos, esto tiende a desplazar el pH hacia el lado ácido. El pH de la reacción puede mantenerse adicionando hidróxido de sodio. La cantidad de dicha base (NaOH) adicionada para mantener un pH constante puede relacionarse con la actividad proteica; con la relación siguiente:

$$GH = \frac{B \times N}{M} \times \frac{1}{h} \times 100\%$$

donde:

GH : grado de hidrólisis. Porcentaje de enlaces peptídicos desprendidos por la proteasa.

B : volumen de la base añadida (ml)

N : normalidad de la base (meq/ml)

M : masa de proteína en reacción (gramos)

$k_1$  y  $1/h$  : constantes disponibles en la bibliografía.

**Ventajas y desventajas.** Esta técnica de seguimiento de pH constante, es un método simple y preciso para monitorear la actividad proteolítica. Es independiente de la variación de sustrato de la dosis de enzima y de la temperatura de reacción.

Una vez que el grado de hidrólisis (GH) ha sido determinado en un proceso, se puede parar la reacción proteolítica cuando se haya añadido el volumen de la base calculada. Para cada nuevo lote se puede determinar el volumen sustituyendo los valores de: M, N, y GH.

La única desventaja de este método es la adición de minerales al producto. Para productos que no deban tener un alto contenido de cenizas se puede usar la técnica de caída de pH. Conforme actúa la proteasa en la proteína el pH decrece. El pH de la reacción se estabiliza en algún valor del rango ácido (pH de 5 para proteína de soya). Conforme el pH se aleja del pH óptimo de la enzima la actividad de la enzima también decrece.

Equipo. EL equipo requerido para esta técnica es un potenciómetro y un mezclador.

#### ANÁLISIS POR OSMOMETRIA (13, 22, 25)

Aplicación. Esta es una técnica ideal para monitorear procesos proteolíticos. Es rápida y se recomienda para procesos que duren 1-2 horas.

Principio. El número de moléculas en una solución determina la presión osmótica, el punto de congelación y la presión de vapor de una muestra. Conforme cambia el número de moléculas en una solución debido a la acción enzimática, estas propiedades también cambian. Los osmómetros están calibrados para leer presión osmótica.

Ventajas y desventajas. Una medida puede llevarse a cabo en menos de 5 minutos. Su única desventaja es que el decremento en la presión osmótica, el punto de congelación y la presión de vapor de una muestra puede no ser significativo en algunas sustancias; puede ser necesario correlacionar este método con el TNBS. Este método no es efectivo en presencia de grandes cantidades de sal.

Equipo. Existen dos tipos de osmómetros, los que miden el punto de congelación y los que miden el punto de vaporización.

## MONITOREO DE CARBOHIDRASAS

Para monitorear las reacciones de carbohidrasas generalmente se miden los azúcares desprendidos de los polímeros de carbohidratos. La mayoría de los métodos están centrados alrededor de la medición de glucosa, producto de la degradación de almidón y de celulosa.

### RENDIMIENTO

**Aplicación.** Esta medición es recomendada cuando uno de los fines de la aplicación de enzimas sea precisamente el aumento del rendimiento. Es aplicable a la industria de jugos, aceites, café y a la de azúcar.

**Principio.** Moléculas complejas y de alto peso molecular son degradadas a otras más sencillas por la acción de una enzima, esto genera que aumente la eficiencia de la extracción.

**Ventajas y desventajas.** Hasta cierto punto es un método aproximado, aunque para fines prácticos es rápido, sencillo e ilustrativo del efecto de la enzima sobre el rendimiento.

**Procedimiento.** Se debe involucrar una cantidad conocida de materia prima en dos tipos de ensayos; uno en donde se aplique la enzima y otro donde no se haga. Esto

proporcionará datos que indiquen si la la enzima cumple la función para la cual fue aplicada. Para obtener el rendimiento se debe aplicar lo siguiente:

$$\text{Rendimiento} = \frac{E - S}{S}$$

donde: E es la cantidad de producto obtenida después de adicionar la enzima.

S es la cantidad de producto obtenida sin la adición de enzima.

#### PROPIEDADES REOLOGICAS DE LA MASA (22)

La aplicación y el principio son los mismos a los mencionados en el monitoreo de proteasas.

- Amilógrafo. Se utiliza para medir el efecto de la alfa amilasa sobre la viscosidad de la harina, en función de la temperatura.

#### PRUEBA DEL IODO (2, 36)

Aplicación. La reacción sirve como indicador de punto final de la licuefacción de almidón hacia dextrinas. Es un método rápido para observar si todo el almidón ha sido degradado por las amilasas. Es un indicador de la presencia de almidón.

Principio. El iodo reacciona con el almidón para dar un complejo de color azul/negro obscuro. Cualquier polímero

de la glucosa que contenga al menos seis moléculas de dextrosa con enlaces 1-4 dará color en la reacción. La celulosa no genera el complejo de color.

Ventaja y desventajas. Es rápida y no requiere equipo sofisticado. Sin embargo es un método cualitativo. Se requiere experiencia para la interpretación del punto final.

Equipo. Cristales de Iodo, yoduro de potasio, material de vidrio. Se pueden adquirir patrones de comparación para el punto final.

#### DETERMINACION DE LACTOSA (METODO POLARIMETRICO) (22)

Aplicación. Esta técnica es de utilidad para leches tratadas enzimáticamente con el fin de disminuir su contenido de lactosa.

Principio. Cuando se hace pasar luz polarizada a través de soluciones de azúcar, el plano de la luz se rota. La dirección y magnitud de la rotación depende del lente utilizado, de la concentración y del tipo de azúcares presentes. En aquellas reacciones donde los azúcares se están modificando, la rotación varía e indica el alcance de la reacción. Es una alternativa buena para observar reacciones de isomerización.



Ventajas y desventajas. Son métodos sencillos y rápidos. Puede incluso ser adaptado a las líneas de proceso. Este método se limita a soluciones claras de azúcares que puedan polarizar la luz. La diferencia en la rotación específica de los azúcares en cuestión debe ser significativa.

#### MÉTODOS QUE APROVECHAN LAS CARACTERÍSTICAS REDUCTORAS DEL GRUPO ALDEHÍDO O CETONA DE LOS AZÚCARES (2, 13, 22)

Aplicación. Estos métodos proporcionan una medida cuantitativa de la degradación de los carbohidratos.

Principio. Los azúcares que poseen un extremo reductor como la glucosa pueden reducir los iones de cobre. Esto puede ser medido de varias maneras: pesando el precipitado de cobre depositado en un papel filtro (método de Munson-Walker); midiendo la cantidad de un complejo colorido en un espectrofotómetro (método de Nelson); por titulación de sales de cobre (Método de Lane-Eynon) etc. El valor de las pruebas se compara con una curva estándar de glucosa pura. Los datos se reportan como dextrosa equivalente.

Ventajas y desventajas. Son un grupo de métodos sencillos que no requieren de equipo sofisticado. Se obtienen resultados en 15-30 minutos, haciendolo útil para el monitoreo en la línea de proceso. El método gravimétrico

es un poco mas tardado pero ofrece la precisión de las balanzas analíticas.

Se requiere experiencia para obtener resultados de utilidad. Se necesita frecuentemente trabajar con soluciones estándar con frecuencia.

Equipo. Balanza, parrilla, bureta, baño de agua caliente y dependiendo del método elegido un espectrofotómetro.

#### POLARIMETRIA

Aplicación. Este método se usa para medir los azúcares resultantes de la hidrólisis del almidón o bien para observar la conversión de un azúcar en otra.

Principio. Cuando se hace pasar luz polarizada a través de soluciones de azúcar, el plano de la luz se rota. La dirección y magnitud de la rotación depende del lente utilizado, de la concentración y del tipo de azúcares presentes. En aquellas reacciones donde los azúcares se están modificando, la rotación varía e indica el alcance de la reacción. Es una alternativa buena para observar reacciones de isomerización.

Ventajas y desventajas. Son métodos sencillos y rápidos. Puede incluso ser adaptado a las líneas de proceso. Este método se limita a soluciones claras de azúcares que puedan polarizar la luz. La diferencia en la rotación

específica de los azúcares en cuestión debe ser significativa.

Equipo. Polarímetro, baño de agua.

Procedimiento. Deben de observarse las indicaciones de los fabricantes de polarímetros.

#### OSMOMETRIA

Aplicación. Este método ha sido usado para medir la hidrólisis de biopolímeros largos. Puede ser usado en procesos que duren menos de una hora.

Principio. En este caso, el principio es el mismo que el mencionado en el monitoreo de proteasas.

Ventajas y desventajas. Es un método rápido y exacto, aún con soluciones no filtradas. Se ha determinado una relación lineal con la hidrólisis de carbohidratos. Las sales pueden interferir pero se pueden hacer las correcciones pertinentes. Este método habla poco del perfil de los azúcares presentes.

Equipo. Osmómetro de punto de congelación, un medidor de conductividad y un refractómetro.

#### FIBRA CRUDA (13, 22)

Aplicación. Constituye un índice de las sustancias presentes en alimentos de origen vegetal, principalmente

celulosa, lignina, y pentosanas que junto con pequeñas cantidades de sustancias nitrogenadas forman las estructuras celulares vegetales.

Principio. Se basa en una digestión en condiciones determinadas cuyo residuo orgánico combustible e insoluble es la fibra cruda.

Ventajas y Desventajas. Las cantidades de los diferentes componentes de la fibra cruda pueden variar con las condiciones que se emplean, por lo que para obtener resultados consistentes deben seguirse procedimientos estandarizados con rigidez.

#### METODO DE LA GLUCOSA OXIDASA (34).

Aplicación. Este método es recomendado en presencia de otros azúcares porque es específico para glucosa. Es decir, la enzima oxida solo la glucosa y no otro azúcar reductor.

Principio. La glucosa oxidasa reacciona sólo con glucosa y oxígeno para formar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. A su vez el peróxido reacciona con un colorante en presencia de peroxidasa de RABANO para dar un producto de color, el cual puede ser medido en un espectrofotómetro.

Ventajas y desventajas. Es el único método junto con el de cromatografía líquida de alta resolución que determina el contenido exacto de glucosa, aun en presencia de otros azúcares reductores. Tiene un error del 1% que puede ser o no aceptable dependiendo de la aplicación.

Equipo. Un espectrofotómetro y kits especiales de análisis de glucosa.

#### TURBIDEZ-METODO DE PRECIPITACION (36)

Aplicación. Este método es útil para detectar y cuantificar pectina y otras gomas en las muestras, y es particularmente útil cuando se trabaja con pectinasas.

Principio. Las gomas, glucanos y pectinas precipitan con la adición de alcohol. La turbidez puede entonces ser medida ocularmente o con un nefelómetro.

Ventajas y desventajas. Es un método fácil, rápido y no es caro. No se pueden identificar carbohidratos aislados.

Equipo. Puede ser necesario un nefelómetro.

#### VISCOSIDAD (11)

Aplicación. Este método trabaja con compuestos que son complejos por naturaleza. Esta especialmente recomendado para reacciones donde no se generen azúcares reductores. Es útil para monitorear polímeros de alto peso molecular que sean sometidos a un pequeño grado de hidrólisis.

Principio. Las soluciones de polímeros de carbohidratos como las gomas, las pectinas y los glucanos, exhiben resistencia al flujo que puede ser medida en un viscosímetro. Cuando una reacción enzimática rompe los grandes polímeros en pequeños fragmentos o rompe ramificaciones, la viscosidad decrece.

Ventajas y desventajas. La viscosidad es un parámetro relativamente fácil de medir utilizando el equipo adecuado. Los valores indican la tendencia general de la reacción pero no dan detalles de la misma. El rompimiento de algunos enlaces puede significar un cambio notable en la viscosidad y esto ofrece ventajas sobre otros métodos.

Equipo. Viscosímetro.

#### ANÁLISIS DE NARINGINA (MÉTODO DE DAVIS) (55)

Aplicación. La naringina es un glucósido flavonoide amargo encontrado en la toronja. No es el único compuesto amargo de la toronja, pero es usado en la industria como un índice del grado de amargor en jugo de toronja.

Principio. Esta técnica se basa en el desarrollo de un complejo colorido (amarillo) entre la naringina y los reactivos usados en el método. A través de una curva estándar, se puede determinar indirectamente y de manera aproximada el contenido de naringina en la muestra.

Ventajas y desventajas. La técnica de Davis es una prueba rápida para determinar flavonoides totales en jugo de toronja. Esta no es específica para naringina, sin embargo, es un índice de la cantidad de naringina.

Equipo. Colorímetro o espectrofotómetro con 420 nm, centrífuga.

#### MONITOREO DE LIPASAS

Las modificaciones de grasas y aceites por vía de las enzimas, ofrece un panorama muy extenso. No solamente se hidrolizan triglicéridos, sino que también se pueden reorganizar e incluso sintetizar. Las lipasas y las esterasas pueden trabajar en ambos sentidos.

Existen varios compuestos que se pueden medir como resultado de estas reacciones. Generalmente es suficiente seguir la aparición o desaparición de los Ácidos Grasos Libres (AGL). En algunas ocasiones es útil monitorear los niveles de Monoglicéridos (MG), Diglicéridos (DG) y/o Triglicéridos (TG). En el caso de desarrollo de sabor es útil tener el perfil de estos últimos tres. En general se puede decir que es más complicado monitorear la acción de lipasas que las de proteasas o carbohidrasas.

## MONITOREO DE AGL

Para el monitoreo de los ácidos grasos se pueden emplear varias técnicas analíticas, dentro de las cuales podemos mencionar a las siguientes:

### METODO DEL pH ESTACIONARIO

Aplicación. Este método es rápido y es útil como tamizaje para varias enzimas y para determinar las dosis aproximadas requeridas. Puede ser utilizado para determinar la actividad específica de una lipasa o de una esterasa.

Principio. Conforme ocurre la lipólisis, se liberan AGL los cuales tienden a disminuir el pH de la mezcla. Añadiendo una solución alcalina el pH puede mantenerse constante. La cantidad de álcali añadido es proporcional a los AGL liberados.

Ventajas y desventajas. Es el método más rápido y fácil de llevar a cabo; sin embargo no es un método adecuado para determinar la cantidad absoluta de AGL después de la hidrólisis. Los datos reflejan la cantidad relativa de AGL y determinar así la cantidad de enzima requerida. La reacción debe tener un buen mezclado y debe haber ausencia de iones Calcio y Magnesio en el medio, que forman sales insolubles que engañan al electrodo.

Equipo. Un buen mezclador, un potenciómetro y una balanza para medir la cantidad de álcali añadido.



#### TITULACION DIRECTA EN PRESENCIA DE ALCOHOL

Aplicación. Es un método bastante rápido, cuya aplicación sirve para establecer dosificación de enzimas.

Principio. Se añade etanol a una proporción de la mezcla para emulsificarla. La muestra se titula hasta pH 9.5 o hasta el punto final del indicador azul de timol.

Ventajas y desventajas. No requiere equipo sofisticado. No todos los AGL son solubles completamente en el solvente del sistema; por lo tanto es una información relativa de las cantidades de AGL generados por el sistema.

Equipo. Equipo de titulación, azul de timol, potenciómetro.

#### VALOR ACIDO

Aplicación. Es un método muy utilizado en la industria láctea para medir AGL.

Principio. Se toma una alícuota de la muestra y se mezcla con alcohol isopropílico y tolueno. Se titula con una solución de KOH hasta el punto final del indicador fenolftaleína (pH aprox 7).

Ventajas y desventajas. Es un método simple de titulación. Los valores de AGL serán relativos pues no todos se solubilizan al pH del punto final.

Equipo. Equipo de titulación y un potenciómetro.

#### EXTRACCION DOLE Y TITULACION (18)

Aplicación. Este método se usa para medir cantidades absolutas de AGL en varias grasas y aceites.

Principio. Una muestra se mezcla con heptano/isopropanol a un pH ácido. Se añade heptano y agua para romper la emulsión. Bajo estas condiciones todos los AGL se encuentran en la fase del solvente orgánico. Se toma una alícuota del solvente y se mezcla con alcohol. Se titula con una solución de KOH hasta el punto final de azul de timol.

Ventajas y desventajas. Es una manera de determinar la cantidad absoluta de AGL. Al extraerse la cantidad total de grasa, también puede determinarse su contenido simultáneamente. Es un método laborioso.

Equipo. Equipo de titulación.

#### EXTRACCION DE FOLCH Y TITULACION

Aplicación. Determinación de AGL en varias grasas y aceites.

Principio. Una muestra se acidifica y se extrae en repetidas ocasiones con una mezcla de cloruro/metanol metileno. La fase orgánica se evapora. Una alícuota de la grasa/aceite se titula con una solución de KOH y alcohol.

Ventajas y desventajas. Determina exactamente la cantidad de AGL, es sin embargo un método muy laborioso.

Equipo. Material de titulación.

#### EXTRACCION Y TITULACION CON ACIDO SALICILICO

Aplicación. Es un método bueno para productos lácteos líquidos y sólidos y para muestras que contengan mucho material no graso como proteínas. Determina el nivel absoluto de AGL.

Principio. La muestra se acidifica y se mezcla con ácido silícico (polvo) con un mortero. Se mezcla el polvo resultante con cloruro/metanol metileno y se filtra. El filtrado se titula con una mezcla de KOH y alcohol.

Ventajas y desventajas. El ácido silícico impide la interferencia de compuestos no grasos en la titulación.

Equipo. Material para titulación.

## IX DISCUSION

La primera observación que se desprende de este trabajo es la gran amplitud del tema de la tecnología de enzimas aplicadas en la industria de alimentos.

Es importante señalar que el objetivo del presente trabajo fué el presentar un manual de ayuda para la determinación de la actividad enzimática de una forma indirecta, esto es que se pueda cuantificar o identificar dicha actividad a través de mediciones sencillas y rápidas.

La tecnología enzimática tiene un gran campo de aplicación como se puede observar a través de la presente revisión; tiene gran influencia en la industria alimentaria, aunque a nivel nacional no todas las industrias de este tipo hayan encontrado apoyo en su uso. Se ha visto que la aplicación de las enzimas en otro tipo de industrias como la de detergentes, la de curtido de pieles, la de producción de alcohol, es también muy importante, no tratándose en este trabajo ya que se sale de contexto.

El presente estudio puede ser un apoyo para las industrias donde la utilización de enzimas sea una parte importante del proceso. Las enzimas, como se ha visto ofrecen múltiples ventajas, sin embargo su uso inadecuado puede representar grandes pérdidas de dinero y por lo

tanto una reducción de la eficiencia dentro de una industria. Uno de los puntos claves para sacar el máximo provecho de las enzimas, es el seguimiento de la acción enzimática por métodos sencillos. La particularización de cada caso es fundamental en el tipo de control que se sugiere; esta labor fue conseguida satisfactoriamente considerando la variedad de industrias y la variedad de enzimas que se abarcaron.

Como se ha visto, existen diversas fuentes de obtención de enzimas para uso comercial, ocupando un lugar relevante las de origen microbiano y especialmente las de origen fungal, ya que tienen una alta especificidad. Es importante señalar que los mejores resultados en la aplicación de las enzimas comerciales se consiguen con el uso, cada vez más común, de mezclas de distintos tipos de enzimas para conseguir un cambio específico. Las casas comerciales dedicadas a distribuir enzimas a las diferentes industrias, dedican gran parte de su investigación a la optimización de dichas mezclas.

La primer industria tratada en esta revisión, la industria de jugos, constituye la de más amplio contenido, reflejando lo encontrado en la bibliografía referente a las enzimas aplicadas a los alimentos. Lo anterior se debe a la diversidad de productos finales y de materias primas involucradas en esta industria. Por otro lado, se puede

decir que el grupo de enzimas más utilizadas en el procesamiento de frutas y vegetales son las pectinasas.

Los procesos elegidos para tratar esta industria pertenecen a la elaboración de jugos a partir de dos frutas y un vegetal; constituyen tres ejemplos de aplicación de enzimas totalmente distintos entre sí, ofreciendo así un mejor panorama del tema tratado. La elaboración del jugo de manzana ejemplifica el uso de enzimas para clarificación; en el proceso de obtención de jugo de toronja se resalta el mejoramiento de sabor gracias a distintas enzimas y por último en el caso de Jugo de zanahoria se consigue un mejoramiento en textura y color.

Con respecto a la industria panadera se pueden resumir las principales ventajas de la utilización de enzimas como modificadores de textura y color en productos como el pan blanco y las galletas. Esta industria se ha visto altamente beneficiada con la tecnología enzimática, pues facilita la obtención de las características finales perseguidas.

En el caso de la que se ha denominado industria de Jarabes se abordaron dos procesos en donde se ejemplifican una licuefacción y una bioconversión. Este último proceso es único en lo referente a lo tratado en este trabajo, ya que consiste en la conversión de un sustrato a otro, a diferencia del resto de las enzimas añadidas en otros procesos que se limitan a modificar el sustrato al que son aplicadas. Los altos rendimientos que se obtienen

en la actualidad en la conversión de glucosa a fructuosa son solamente posibles a través de la enzima glucosa isomerasa que es altamente específica.

En la industria láctea se encontró una diversidad de usos de la tecnología enzimática, comenzando con la aplicación de enzimas microbianas a un proceso milenario como es la elaboración del queso; en relación también al queso se consiguen modificaciones de gran importancia comercial tanto en el sabor como en la reducción de tiempos de maduración. Otro aspecto de dicha tecnología es la obtención de leche con bajo contenido de lactosa, de importancia nutricional para las personas intolerantes a dicho carbohidrato. La ejemplificación del uso de una enzima como indicador de la eficiencia de un punto del proceso se incluye en la industria láctea; teniendo gran importancia en lo que se refiere a salud pública. Con lo anterior se observa claramente la utilización de enzimas endógenas y añadida en la misma industria.

Dentro de la industria proteica se mencionan aspectos diversos de la aplicación de enzimas comerciales añadidas. En primer término, las proteínas vegetales pueden ser tratadas para obtener texturizados proteicos con el fin de cubrir deficiencias proteicas en algunos sectores de la población; por otro lado la obtención de concentrados de proteína vegetal hidrolizada, encuentran su uso principal como potencializadores de sabor. Este último aspecto es de

una gran importancia económica para una parte de la industria alimentaria. En segundo término, se mencionan las proteínas animales, donde se revisa una aplicación relevante que hace posible la recuperación de proteínas solubles de pescado que de otra manera se desperdiciarían. En un país como México estas aplicaciones tecnológicas son las que deben ocupar el interés de profesionales que deseen mejorar la ingesta proteica de la población más necesitada.

El objetivo de aplicar enzimas comerciales en la industria azucarera es principalmente el optimizar el proceso de obtención del azúcar, eliminando polisacáridos que al estar presentes disminuyen la eficiencia global del mismo proceso. Este constituye un claro ejemplo de ahorro energético y por tanto económico a través de la aplicación de la tecnología enzimática.

Dentro de la que ha sido denominada industria de fermentaciones se incluyen dos ejemplos, cerveza y vino blanco, que involucran la utilización de varias enzimas para la obtención de las características finales deseadas. Son ejemplos de gran interés económico y junto con la industria de jugos quizá los más estudiados e investigados. Con respecto a la cerveza, existe una gran cantidad de información bibliográfica que ha sido seleccionada y ordenada en la presente revisión.



La industria de bebidas estimulantes constituida por los procesos de elaboración de café y té, utiliza las enzimas añadidas para mejorar tanto el procesamiento mismo, como las características finales que les den una mejor aceptación ante los consumidores.

La aplicación de enzimas en la industria cárnica nacional no es común, lo que probablemente se deba a los resultados poco tangibles aunados al alto costo de las enzimas comerciales. Es más corriente el uso de ablandadores conteniendo enzimas, directamente durante la preparación casera de la carne.

La industria de huevo incluye dos aspectos importantes de la utilización de enzimas. El primero, como en el caso de la industria láctea, es la utilización de una enzima endógena, la alfa amilasa, como indicador de la eficiencia de la pasteurización aplicada al huevo antes de ser sometida al secado. El segundo aspecto persigue la prevención del oscurecimiento del huevo, sometido al secado, por presencia de glucosa contenida naturalmente en el huevo; esto se hace con la adición de una enzima comercial, la glucosa oxidasa. En esta industria se observan las ventajas de esta tecnología en dos sentidos distintos.

La industria aceitera cada día descubre la utilidad del uso de enzimas añadidas, principalmente para aumentar la eficiencia de sus procesos. Este es un campo poco

estudiando comparativamente con otras industrias como la de jugos o la de fermentaciones.

Dado la amplitud de la tesis se decidió agrupar las técnicas de control de acuerdo a la clasificación mencionada en esta recopilación. Esto es válido pues los efectos observados por la acción de una proteasa serán similares sin importar el origen de la proteína sobre la que esté actuando. Lo anterior también se cumple para las diferentes carbohidrasas, para las lipasas y las oxidoreductasas e isomerasas.

Otro de los objetivos perseguidos con la elaboración de este manual es el brindar un apoyo bibliográfico a los estudiantes de carreras relacionadas con alimentos; este objetivo claramente se cumple al presentar de una manera ordenada y sencilla los puntos fundamentales de la tecnología enzimática. Es importante señalar que existe bibliografía relacionada al tema más no en la conformación que se le dió a este trabajo y menos aún en el idioma español. La recopilación de los diagramas de bloques que se incluyen es importante pues fueron obtenidos de múltiples fuentes y enriquecidos con información adicional.

La gran dinámica que el campo de la tecnología enzimática ofrece, obliga por otro lado a actualizar este tipo de controles día a día, considerando desde luego que la tecnología desarrollada en torno al monitoreo y control

también avanza a pasos agigantados. Es pertinente decir que las técnicas resumidas en este trabajo pretenden ser lo más sencillas posibles considerando el contexto de pequeñas y medianas industrias, esto sin perder de vista que el mejor monitoreo es siempre el que se tiene al alcance, abarcando desde una prueba colorimétrica hasta un ensayo en un cromatógrafo; esto será de acuerdo siempre a las necesidades y posibilidades de la industria involucrada.

## X CONCLUSIONES

- Se logró un desarrollo del tema partiendo de lo general hasta particularizar con las técnicas de monitoreo o seguimiento durante la aplicación.
- Es importante conocer a fondo y de forma individual la acción de cada una de las enzimas en cada una de las industrias donde se aplican.
- El control global de la aplicación de enzimas en cualquier industria, debe comprender las etapas de recepción, almacenamiento y aplicación de dicha enzima. Esto repercute directamente sobre la eficiencia del proceso.
- Es posible estandarizar el control o monitoreo enzimático en industrias similares siempre considerando que cuanto más se particularice el caso mejores resultados se obtendrán.
- La mejor técnica o método de monitoreo es siempre el que se tiene disponible; es decir, si una determinada industria cuenta con equipo sofisticado debe aprovecharlo al máximo y no necesariamente buscar técnicas sencillas.
- Se consiguió elaborar un manual que brinde apoyo bibliográfico a estudiantes de carreras relacionadas con los alimentos.

- La tecnología enzimática en torno a la industria de alimentos avanza día con día; paralelamente la tecnología necesaria para el control y el monitoreo de la aplicación de enzimas avanza asimismo rápidamente.

#### RECOMENDACIONES

- Puede ser objeto de posteriores trabajos el tomar cada uno de los casos que se trataron y hacer un seguimiento de la utilización de enzimas no sólo en su parte final sino a lo largo de todo el camino que esta materia prima (la enzima) recorre desde su ingreso a la planta donde se vaya a aplicar. Esto abarcaría etapas como la de recepción, almacenamiento y aplicación de la enzima dentro del proceso de producción. Esta última parte ha constituido la parte central de la presente revisión.

## XI BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adler-Nissen J. ENZYMATIC HYDROLYSIS OF FOOD PROTEINS. *Process Biochemistry*, July/August 1977.
- 2.- AOAC OFFICIAL OF ANALYSIS, 1984. p. 150-610
- 3.- Arnold R.G. et al. APPLICATION OF LIPOLYTIC ENZYMES TO FLAVOR DEVELOPMENT IN DAIRY PRODUCTS. *Journal of Dairy Science*, Vol. 58, No. 8
- 4.- Badul Dergal Salvador. QUIMICA DE LOS ALIMENTOS. Editorial Alahambra Mexicana. Primera Edición. México 1981.
- 5.- Bannar Robert. NEW FRONTIERS FOR LACTOSE-REDUCED MILK. *Food Engineering*, July 1980.
- 6.- Braverman J.B.S. INTRODUCCION A LA BIOQUIMICA DE LOS ALIMENTOS. Ed. El Manual Moderno S.A. México 1980.
- 7.- Colonna Paul et al. ACTION OF BACILLUS SUBTILIS ALFA-AMYLASE ON NATIVE WHEAT STARCH. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol 31, 1988.
- 8.- Charley Helen. FOOD SCIENCE. John Wiley & Sons. Second Edition. USA 1982.
- 9.- Cheftel Jean Claude & Cheftel Henry. INTRODUCCION A LA BIOQUIMICA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS. Volumen I y II. Editorial Acribia. Zaragoza, España 1977.
- 10.- Chen Wen-Pin. GLUCOSE ISOMERASE (A REVIEW). *Process Biochemistry*, June/July 1980.
- 11.- Dearly John. VISCOMETERS FOR ON LINE MEASUREMENT AND CONTROL. *Chemical Engineering*, October 1, 1984.

- 12.- Desrosier Norman. ELEMENTOS DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Editorial CECSA, México 1983.
- 13.- Egan Harold et al. ANALISIS QUIMICO DE ALIMENTOS DE PEARSON, Compañía Editorial Continental, Segunda impresión. México 1987. p. 150-517.
- 14.- Emken E.A. COMMERCIAL AND POTENTIAL UTILIZATION OF LIPOXYGENASE. J. Am. Oil Chemists' Soc. Vol 55, April 1979.
- 15.-ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Macropaedia Vol. III, 15 Edition, Encyclopaedia Britannica, Inc., USA 1981.
- 16.- Enzyme report. Rohm, ENZYMTHECNOLOGIE. Mai 1988.
- 17.- Faubion J.M. and Hoseney R.C. LIPOXYGENASE: ITS BIOCHEMISTRY AND ROLE IN BREADMAKING. Cereal Chem. Vol 58, No. 3, 1981.
- 18.- Folch Jordi et al. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. AUGUST 23, 1956.
- 19.- García G. M. y López M.A. ENZIMAS INMOVILIZADAS Y SU APLICACION EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. Ciencia y Tecnología 1985.
- 20.- Gunther R.C. CHEMISTRY AND CHARACTERISTICS OF ENZYME-MODIFIED WHIPPING PROTEINS. J. Am. Oil Chemists Soc., March 1979 (vol. 56).
- 21.- Gutiérrez López G. et al. ENZIMAS PECTICAS II: INFLUENCIA DE LA POLIGALACTURONASA EN LAS PROPIEDADES REOLOGICAS DE LA PULPA DE PAPAYA. Tecnología de alimentos. Vol XVIII, No. 2.

- 22.- Hart J. y Fisher H., ANALISIS MODERNO DE LOS ALIMENTOS. Editorial Acribia, Zaragoza, España 1971.
- 23.- Holsinger V.H. et al. WHEY BEVERAGES: A REVIEW. Journal of Dairy Science, Vol. 57, No. 8
- 24.- Ingenio Presidente Benito Juárez S.A., INSTRUCTIVO DE TRABAJO PARA ELABORACION DE AZUCAR ESTANDAR, Zafra 1986 - 1987, Superintendencia de elaboración.
- 25.- Jacobsen Finn and Rasmussen Olelykke. ENERGY-SAVINGS THROUGH ENZYMATIC TREATMENT OF STICKWATER IN THE FISH MEAL INDUSTRY. Process Biochemistry, October 1984.
- 26.- Kilara A. ENZYMES AND THEIR USES IN THE PROCESSED APPLE INDUSTRY: A REVIEW. Process Biochemistry, July/August 1982.
- 27.- Lehninger Albert. BIOQUIMICA. Ediciones Omega. Sexta reimpression. Barcelona 1982. p. 159-200.
- 28.- López M. A. y Quintero R. R. TECNOLOGIA ENZIMATICA. Aplicaciones en Alimentos y Medicina. UNAM, México 1987.
- 29.- Macrae A.R. LIPASE-CATALYSES INTERESTERIFICATION OF OILS AND FATS. J. Am. Oil Chemists' Soc. Vol 60, No. 2, February 1983.
- 30.- Madrid A. MANUAL DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS. A.M.U. Ediciones, 1986
- 31.- MANUAL DE INDUSTRIAS DE ALIMENTOS. Instituto del Libro. La Habana, Cuba.
- 32.- Martínez V.J. y Silva S.G. FERMENTOS Y ENZIMAS EN LA INDUSTRIA QUESERA. Tecnología de Alimentos (Mex.) Vol. XVIII, No. 2.



- 33.- Matz Samuel. BAKERY TECHNOLOGY AND ENGINEERING. Editorial THE AVI PUBLISHING COMPANY, INC. Second Edition. 1972.
- 34.- Mercer D. Gerald. ENZYMES FOR EVERY NEED. Regulatory Affairs. Miles Inc. Biotech Division. Elkhart Indiana USA 1985. p. 5-63.
- 35.- Morris Charles E. SWEET PROTEIN SYRUPS. Food Engineering, July 1980.
- 36.- Novo Ferment, PECTINEX ULTRA SP-L. La formula del 100% y su aplicación en la Industria de Zumos de Fruta. Bioindustrial Group, Dinamarca.
- 37.- Novo Industri A/S. ENZYMES AT WORK. Copenhagen. December 1987.
- 38.- Novo Kuala Lumpur. PINEAPPLE SKIN JUICE CONCENTRATE. Novo Industrials Enzymes Division, May 1988.
- 39.- Obtención de Carne. Manuales para Educación Agropecuaria. Area de Industrias Rurales. SEP/Trillas. México 1983.
- 40.- Olsman H. HIDROLYZED AND AUTOLYZED VEGETABLE PROTEINS AS FUNCTIONAL FOOD INGREDIENTS. J. Am. Chemists Soc., Marzo 1979 (Vol. 56).
- 41.- Ostrowski A. et al. FUNDAMENTOS DE LA TECNOLOGIA DE LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS. Editorial Mir, Moscú .
- 42.- Paredes y López. ECOS TECNOLOGICOS; MEMORIAS DEL SIMPOSIO SOBRE ENZIMAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. Tecnología de Alimentos. Enero-Febrero 1977, Vol XII, No. 1.

- 43.- Pazur J.H. and Kleppe K. THE HYDROLYSIS OF ALFA-D-GLUCOSIDES BY AMYLOGLUCOSIDASE FROM ASPERGILLUS NIGER. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 237, No. 4, April 1962, USA.
- 44.- Peña; Arroyo; Gómez; Tapia; Villa. BIOQUIMICA. Ed. LIMUSA, México 1981. p. 173-205.
- 45.- Potter Norman. LA CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. Editorial EDUTEX. México 1978.
- 46.- Quintero Ramirez Rodolfo. INGENIERIA BIOQUIMICA. Ed. Alhambra Mexicana. Primera Edición. México 1981.
- 47.- Reed Gerald. ENZYMES IN FOOD PROCESSING. Academic Press. Second Edition. London 1975.
- 48.- Rombouts F.M. and Pilnik W. ENZYMES IN FRUIT AND VEGETABLE JUICE TECHNOLOGY. Process Biochemistry, August 1978.
- 49.- Schmid R.O. OXIDOREDUCTASES-PRESENT AND POTENTIAL APPLICATIONS IN TECHNOLOGY. Process Biochemistry, May 1979.
- 50.- Seitz E.W. INDUSTRIAL APPLICATION OF MICROBIAL LIPASES: A REVIEW. J. Am. Oil Chemists' Soc. Vol 51, february 1974.
- 51.- Stark R. George. Enzymes Function and Regulation. Biocore Unit IV. Mc Graw Hill Inc. USA 1974.
- 52.- Stryer L. BIOQUIMICA . Editorial Reverté S.A. España 1979. p. 115-175.
- 53.- Szczodrak J. THE ENZYMATIC HYDROLYSIS AND FERMENTATION OF PRETREATED WHEAT STRAW TO ETHANOL. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 32, No. 6, September 1988.

- 54.- Técnicas de Análisis. SPINREACT. Gerona España, 1980.
- 55.- Technical Procedures 6.15.1, January 1985.
- 56.- THE USE OF ENZYMES IN BAKING. Biotech Product Division. Miles Lab. Inc. USA 1985. p. 3-21.
- 57.- THE USE OF ENZYMES IN FOOD TECHNOLOGY. Biotech Product Division. Miles Lab. Inc. USA 1985. p. 5-57.
- 58.-TROPICAL FRUIT JUICES. BIOTECSA S.A. Mexico 1988.
- 59.- Woo A.H. and Lindsay R.C. RAPID METHOD FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF INDIVIDUAL FREE FATTY ACIDS IN CHEDDAR CHEESE. Journal of Dairy Science, Vol. 65, No. 7, 1982.
- 60.- Woodroof & Phillips. BEVERAGE: CARBONATED AND NONCARBONATED. AVI Publishing Company Inc. USA 1981.